

Untersuchungen zur
Verbreitung von Klasse II-Transposons
wie *Tn21*, *Tn501* und *Tn3*
in terrestrischen Habitaten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

von

Normann Günther

aus Hamburg

Kassel, August 2004

„Ich kann, weil ich will, was ich muß“

Meiner geliebten Frau

Datum der Disputation: 08.12.2004
Erster Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Schmidt
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ewald Langer

Promotionsnummer: 2370
Bezeichnung im Kasseler OPAC: „dis2370_18.pdf“

Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Mobile genetische Elemente	4
1.1.1 IS-Elemente	5
1.1.2 Transposons	6
1.1.3 Integrons	8
1.2 Transposons der Tn3 Familie	8
1.3 Mechanismen des Gentransfers - Genetische Grundlagen	10
1.3.1 Konjugation und Horizontaler Gentransfer	10
1.3.2 Konjugation	11
1.3.2.1 Plasmide.....	11
1.3.2.2 Konjugative Transposons	12
1.3.3 Transduktion	12
1.3.4 Transformation.....	13
1.4 Rekombination und Transposition	14
1.4.1 Rekombination.....	14
1.4.1.1 Homologe Rekombination.....	15
1.4.1.2 Sequenzspezifische Rekombination.....	16
1.5 Vorkommen von DNA in natürlichen Habitaten	17
1.6 Schutz von DNA	20
1.6.1 Laborstudien zum Schutz von DNA	21
1.7 Gentransfer und Horizontaler Gentransfer in terrestrischen Habitaten	21
1.7.1 Verwendbarkeit adsorbierter DNA für Gentransfer.....	21
1.7.1.1 Transformation.....	21
1.7.1.1.1 <i>Transformation indigener Bakterien</i>	23
1.8 Feldstudien zum HG in terrestrischen und aquatischen Habitaten	23
1.8.1 Terrestrische Feldstudien.....	23
1.8.2 Aquatische Feldstudien	24
1.8.3 Transformation.....	24
1.8.4 Konjugation	26
1.9 Einflüsse auf den HG	27
1.9.1 Konjugation	27
1.9.1.1 Bodenbakterien als Rezipienten von Plasmiden	28
1.9.2 Abiotische Faktoren	29
1.9.2.1 Feuchtigkeit	29
1.9.2.2 Temperatur.....	29
1.9.2.3 pH-Wert.....	29
1.9.2.4 Tonminerale	30
1.9.3 Biotische Faktoren	30
1.9.3.1 Bodenmakrolebewesen.....	30
1.9.4 Transduktion	30
1.9.4.1 Einflüsse auf die Transduktion	31
1.9.5 Feldstudien in terrestrischen und aquatischen Umgebungen	32
1.10 Methoden zum Nachweis von Genotypen in der Bodenmikrobiologie	33
1.10.1 Klassisches Screening	33
1.10.2 Plasmide zum Nachweis von Transposition.....	34
1.10.3 Ablösen von MO aus Boden.....	35
1.11 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Genotypen in der Bodenmikrobiologie	35

1.11.1	Nachweis von DNA in Umweltproben	35
1.11.2	DNA - Isolierung aus Proben von terrestrischen Habitaten	37
1.11.2.1	Isolierung von DNA	38
1.11.2.2	Lyse der Zellen.....	38
1.11.2.2.1	<i>Chaotrope Substanzen</i>	38
1.11.2.2.2	<i>Enzyme</i>	38
1.11.2.2.3	<i>Detergenzien</i>	39
1.11.2.2.4	<i>Hitze, Mikrowelle</i>	39
1.11.2.2.5	<i>Mechanisch</i>	39
1.11.2.3	Gewinnung der DNA.....	40
1.11.2.3.1	<i>Glas, Silica, mineralisches Material auf Siliziumbasis</i>	40
1.11.2.3.2	<i>Salzpräzipitation</i>	40
1.11.2.3.3	<i>Phenol / Chloroform</i>	40
1.11.2.3.4	<i>Guanidiniumhydrochlorid</i>	41
1.11.2.3.5	<i>Ionenaustauscher</i>	41
1.11.2.3.6	<i>Präzipitation von DNA mit Alkohol</i>	41
1.12	Huminstoffe	42
1.12.1	Vorkommen von Huminstoffen.....	42
1.12.2	Substanzklassen	43
1.12.3	Extraktion von Huminsäuren.....	44
1.13	DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion PCR	45
1.13.1	PCR-Inhibitoren.....	45
1.13.2	Kontaminationen der PCR.....	46
1.14	Ziel dieser Arbeit	47
2	Material und Methoden	48
2.1	Geräte und Zubehör	48
2.2	Chemikalien	49
2.3	Antibiotika und Schwermetalle	50
2.4	Nährmedien	50
2.5	Molekularbiologische Testkits und Enzyme	51
2.6	Restriktionsendonukleasen	51
2.7	Bakterienstämme und Plasmide	52
2.8	Mikrobiologische Diagnostika	54
2.9	Isolation von Bodenbakterien aus Bodenproben	54
2.9.1	Bodenprobenentnahme.....	54
2.9.2	Aufarbeitung der Bodenproben	54
2.10	Direkte Ausplattierung von Bodenbakterien auf Selektivmedium	54
2.11	Anreicherung von Bodenbakterien durch Flüssig-Subkultivierung	55
2.12	Reinzucht der Antibiotika-resistenten Bakterien	55
2.13	Stammhaltung	55
2.14	Präparation von DNA	56
2.14.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	56
2.14.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Reinkulturen	56
2.14.3	Plasmidpräparation nach Panayotatos [1987], modifiziert.....	56
2.14.4	Plasmidpräparation nach Kado und Liu [1981], modifiziert.....	57
2.14.5	Plasmidpräparation nach Allen [1994].....	58
2.14.6	Plasmidpräparation mit QIAGEN-Anionenaustauschersäulen.....	59
2.15	Präparation von Zell-Gesamt-DNA	60
2.15.1	Präparation von Bakterien-Genom mit Guanidiniumhydrochlorid mittels QIAGEN-Säulen nach Günther (1996).....	60

2.15.2	Lyse mit Proteinase K	61
2.15.3	Lyse durch Hitzebehandlung	61
2.15.4	Lyse durch Mikrowellenbehandlung	61
2.15.5	Präparation von genomischer DNA nach Current Protocols in Molecular Biology.....	62
2.16	Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse	62
2.17	Isolierung von Gesamt-DNA aus Boden	63
2.17.1	Aufschluss von Boden mit Fastprep-System nach Günther	63
2.18	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	64
2.19	Nachweis und Charakterisierung von DNA.....	64
2.19.1	Einsatz von Restriktionsendonukleasen	64
2.19.2	Nachweis von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese.....	64
2.20	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAEX II.....	65
2.21	Elektroelution mittels Elutrap (Biotrap).....	66
2.22	Nachweis von Plasmidfunktionen.....	66
2.22.1	Agarplattenmating	67
2.22.2	Flüssigmating.....	67
2.22.3	Transformation durch Elektroporation kompetenter Zellen.....	67
2.22.4	Nachweis von Transpositionseignissen mittels Plasmiden	68
2.22.4.1	Nachweis von Transpositionseignissen mittels Plasmid pRB2138.....	68
2.23	Bodensäulen	69
2.24	Klonierung	70
2.24.1	Ligation von Vektor- und Ziel-DNA	70
2.24.2	Klonierung von Genen und DNA-Fragmenten.....	71
2.25	Molekularbiologische Lokalisation von Genen.....	71
2.25.1	DNA-Hybridisierung.....	71
2.25.2	Kolonie-Hybridisierung.....	72
2.25.3	Southern-Blot-Hybridisierung	73
2.25.4	Dot-Blot-Hybridisierung	73
2.26	DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter DNA.....	73
2.26.1	DNA-Markierung.....	74
2.26.2	Hybridisierung der Sonden-DNA	74
2.26.3	Kolorimetrische Detektion der DNA-Sonden	75
2.27	Polymerase-Ketten-Reaktion - PCR	76
2.27.1	PCR-Primer.....	77
2.27.2	Temperaturprofile	78
2.28	DNA-Sequenzierung	78
2.28.1	ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit.....	79
2.28.2	Direct Sequencing LI-COR 4200 IR ²	80
2.29	Identifizierungsmethoden	81
3	Ergebnisse	82
3.1	Ermittlung einer geeigneten Methode zur DNA Präparation	82
3.2	Überprüfung der Spezifität der PCR-Amplifikate	83
3.3	Nachweisgrenzen nach Isolierung von DNA aus Reinkulturen und anschließender PCR.....	84
3.3.1	PCR-Nachweisgrenzen bei aus Reinkulturen gewonnenen DNA-Proben	84
3.4	Präparation von DNA aus Boden.....	85
3.5	Kontrollen bei der Präparation von DNA aus Boden.....	85
3.5.1	Ergebnisse der Präparation von DNA aus Boden:	87

3.6	Nachweisgrenze des Systems „Fastprep nach Günther“	89
3.7	Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse	89
3.7.1	Ergebnisse zu Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse:.....	89
3.8	Screening von Böden auf Transposasegene	90
3.8.1	Bodenprobennahme.....	90
3.8.2	Kontrollen:.....	92
3.8.3	Screening von Böden auf Transposasen mittels PCR.....	92
3.8.4	Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposasegene mittels PCR:.....	93
3.9	Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 1 96	
3.9.1	Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung.....	96
3.10	Herstellung von Gensonden für Transposase, <i>tnpA</i> Typ Tn3, Tn21 und Tn501	96
3.11	Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 2 97	
3.12	Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 2:	98
3.13	Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionseignissen	102
3.14	Konjugationsversuche: <i>Pseudomonas</i> und <i>E. coli</i> als Wirte von pRB2138....	102
3.15	Herstellung Digoxigenin markierter Sonden zum Nachweis für pRB2138	102
3.16	Vorversuche zum Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionseignissen	103
3.17	Nachweis von Transpositionseignissen mittels Plasmid pRB2138.....	103
3.18	Vorversuch Konjugation: <i>Pseudomonas</i> und <i>E. coli</i> als Wirte von pRB2138	104
3.19	Vorversuch Elektroporation.....	104
3.19.1	Ergebnisse zum Nachweis von Transpositionseignissen mit Plasmid pRB2138	105
3.20	Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionseignissen	106
3.20.1	Vorversuch: Überprüfung des Systems in sterilen Bodensäulen.....	106
3.20.2	Ergebnisse zu Vorversuch: Überprüfung des Systems in sterilen Bodensäulen	107
3.21	Screening von Bodenproben in Bodensäulen auf transponierbare Elemente mittels pRB2138	108
3.21.1	Ergebnisse zu Screening von Bodenproben in Bodensäulen auf transponierbare Elemente mittels pRB2138	108
3.22	Überprüfung vorhandener Bakterienkollektive auf <i>tnpA</i> vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21	110
3.22.1	Ergebnisse zu Überprüfung vorhandener Bakterienkollektive auf <i>tnpA</i> vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21	111
3.23	Sequenzstrategie und Herstellung eines genomischen Klonen von Isolat Hg17.6	119
3.24	Sequenzierung des genomischen Klonen von Hg17.6.....	120
3.25	Sequenzanalyse des genomischen Klonen von Hg17.6	123
4	Diskussion.....	128
4.1	Entwicklung eines Protokolls zur einfachen Isolierung von Boden-Gesamt-DNA.....	128
4.2	Kontrollen	130
4.3	Vergleich der entwickelten Methode mit anderen.....	131
4.4	Bewertung der erzielten Ergebnisse.....	131
4.5	Isolierung von potentiell Transposon-beherbergenden Stämmen	133

4.6	Screening von Böden auf Transposasen mittels Koloniehybridisierung.....	134
4.7	Screening von vorhandenen Bakterienkollektiven	135
4.8	Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionsereignissen	136
4.9	Vorversuche	137
4.10	Vorversuche in sterilen Bodensäulen	138
4.11	Screening von Bodenproben in Bodensäulen mittels pRB2138 auf transponierbare Elemente	139
4.12	Sequenzierung einer Transposase vom Typ Tn21	142
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis	147

Abkürzungen

<i>aadA</i>	Gen für AAD-(3'')(9)
<i>aadB</i>	Gen für Aminoglykosid 2''-Adenylyltransferase
Ab ^{sr}	Sensitivität/Resistenz gegenüber bestimmtem Antibiotikum
Abb.	Abbildung
A. demin.	demineralisiertes Wasser
A. bidest.	(doppelt) destilliertes Wasser
ad.	zugeben (bis)
Ak	Amikacin
Ap	Ampicillin
APH(3'')	Aminoglykosid 3''-Phosphotransferase
<i>aphA</i>	Gen für Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase
<i>aphC</i>	Gen für APH(3'') (zerfällt in die Leseraster strA/strB)
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase
bp	Basenpaare
bhr	Broad host range
BMO	Boden Mikroorganismus
CFU	colony forming units
<i>Chr. luteola</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
CTAB	Hexadecyl-trimethyl-ammoniumbromid
d	day (Tag)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DHPS	Dihydropteroat-Synthetase
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FSG	Fastprep System nach Günther
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
Gm	Gentamicin
h	hour (Stunde)
Hfr	High frequency of recombination
Inc	Inkompatibilitätsgruppe (Klassifizierungsschema für Plasmide)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalacto-pyranosid
IR	Inverted Repeat
IS	Insetionselement
Iso-A/B	Isosensitest-Agar/Bouillon
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
Km	Kanamycin
konz.	konzentriert
l	Liter

lac	Lactose
lac ⁺	Lactose-Verwertung
Lsg.	Lösung
LW	Leitungswasser, steril
m...	milli ...
M	Molarität
<i>mer</i>	Gen für Quecksilberresistenz
min	Minute
MO	Mikroorganismus
<i>mob</i>	mobilisierbar
mRNA	messenger RNA
NI-A/B	Standard I-Agar/Bouillon
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
Nm	Neomycin
OC	Open Circular
OD ₅₄₆	Optische Dichte, gemessen bei 546 nm
oriT	origin of transformation (Transformationsursprung)
p.a.	per analyse
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pfu	Plaque forming Units (Plaque bildende Einheiten)
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>P. flu</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. put</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. stu</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>recA</i>	Gen für homologe Rekombination
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
Sm	Streptomycin
Sm/Su ^r	Resistenz gegenüber Streptomycin und Sulfonamid
Sp	Spectinomycin
Su	Sulfonamid
s.u.	siehe unten
<i>sulI/sulII</i>	Gene für DHPS I / DHPS II
<i>sul</i>	Sulfonamid-Resistenzgen
<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tn	Transposon
<i>tnpA</i>	Transposasegen
U	Unit
ÜN	Über Nacht (Kultur)
v/v	Volumen/Volumen
V	Volt
VT	Volumenteil
w/v	Gewicht/Volumen
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
X-phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
μ	mikro

1 Einleitung

Genetischer Austausch zwischen Mikroorganismen ist ein Prozess, der die potentielle Möglichkeit eines MO zur Adaptation an seine Umwelt und damit seine Überlebensmöglichkeiten, gerade auch im Boden, erhöht [Cohan et al., 2004, 1996; Slater, 1985]. Horizontaler Gentransfer hat über einen evolutionären Zeitraum stattgefunden und letztendlich zu der heute vorherrschenden Diversität bei den Bodenmikroorganismen geführt. Die Rolle mobiler genetischer Elemente wie Plasmide, Transposons, IS-Elemente, Integrons und auch Phagen bei der vertikalen als auch horizontalen Verbreitung von Genen ist in diesem Zusammenhang von ganz hervorragender Bedeutung.

Diese mobilen Elemente stellen, neben Mutationen, die treibende Kraft in der Evolution der Mikroorganismen dar. Dies gilt sowohl für die genetische als auch für die phylogenetische Ebene [Lorenz u. Wackernagel, 1994; Rensing et al., 2002; Pepper et al., 2004]. Sie sind die Grundlage für die schnelle Adaptation von MO an sich ändernde Umweltbedingungen.

Dieses schnelle Adaptationsvermögen auf sich ändernde Umweltbedingungen offenbarte sich zuerst im klinischen Bereich [Ochiai et al., 1959; Akiba et al., 1960; Watanabe, 1963]. Obwohl die Entdeckung nutzbarer Antibiotika wie die des Penicillins [Fleming, 1929], sowie die Einführung anderer Antibiotika in die medizinische Therapie zu einem vorher noch nie dagewesenem Erfolg bei der Behandlung bakterieller Infektionen und Krankheiten führten, zeigte sich gerade hier zum ersten Mal die volle Breite der Möglichkeiten von MO sich an veränderte „Umweltbedingungen“ anzupassen.

Anfängliche Erfolge der Antibiotikatherapie wurden schnell durch neu auftauchende Resistenzen zunichte gemacht. Als klassisches Beispiel sei hier erwähnt, dass vier Jahre nach Einführung des Penicillins 59% aller *Neisseria gonorrhoeae* Stämme Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum erworben hatten [Wagner, 1978; Schumann, 1990]. Die Resistenzentwicklung gegenüber jedem neu entwickelten Antibiotikum erfolgte in solch einer Geschwindigkeit und Frequenz, dass Mutation nicht die alleinige Ursache sein konnte [Ochiai et al., 1959; Wiedemann, 1974]. Es müssen also noch andere Mechanismen Ursache einer solchen Variabilität sein.

Die Möglichkeit der Aufnahme nackter DNA ist seit den Experimenten von Griffith (1928) bekannt, der Mechanismus der Konjugation [Lederberg u. Tatum, 1946] wurde 1946 entdeckt, gefolgt von den Entdeckungen der Transduktion 1952 [Zinder u. Lederberg, 1952]. 1957 wurde das erste konjugative R-Plasmid aus klinischen Proben als Ursache für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und damit für Genaustausch erkannt und nachgewiesen. Es wurde gleichzeitig der Beweis erbracht, dass vier Resistenzen mittels eines Plasmides übertragen werden konnten und dass die Verbreitung dieser Resistenzen auch horizontal erfolgt [Ochiai et al., 1959; Akiba et al., 1960; Watanabe, 1963].

Seitdem sind viele R-Plasmide sowie deren vertikaler und horizontaler Transfer bei Gram-negativen und -positiven Bakterien nachgewiesen [Schumann, 1990; Foster, 1983]. Weitere zahlreiche Mechanismen des inter- und intrachromosomalen Gentransfers in Ökosystemen wie dem Intestinaltrakt oder *in vitro* sind beschrieben, erforscht und nachgewiesen [Gormley u. Davies, 1991; Trieu-Cuot et al., 1987; Trieu-Cuot et al., 1988; Wassenaar et al., 1995; Brisson-Noel et al., 1988].

Für terrestrische oder aquatische Ökosysteme, namentlich schadstoffbelastete, liegen einige, für nicht schadstoffbelastete weitaus weniger Untersuchungen vor. Dies liegt zum einen an der relativen Seltenheit der oben beschriebenen Phänomene, zum anderen an dem Problem der technischen Umsetzung eines umfassenden wissenschaftlichen Nachweises.

Als ein Ursprung der Resistenzgene werden antibiotikaproduzierende Bodenmikroorganismen, wie Actinomyceten und Pilze genannt [Benevise u. Davies, 1973; Thompson u. Gray, 1983]. Die Frage nach dem Vorkommen dieser Resistenzen und gerade auch ihre Verteilung in unbelasteten Habitaten bleibt nach wie vor nur ansatzweise beantwortet. Im Gegensatz zu den gut untersuchten Antibiotikaresistenzmechanismen hospitierender, pathogener Keime, ist über Herkunft und Verteilung dieser Gene, besonders über die Mechanismen ihrer Verbreitung, sprich ihre Assoziation mit Vektoren (Plasmiden und Transposons) in natürlichen Habitaten wenig bekannt. Gerade auch vor dem Hintergrund der Freisetzung gentechnisch veränderter MO besteht hier nach wie vor ein großer Forschungsbedarf.

Es scheint gesichert, dass horizontaler Gentransfer bei der Verbreitung dieser Gene eine entscheidende Rolle spielt [Schmidt et al., 1990; De la Cruz u. Davies 2000, Cohan et al., 2004]. Ebenfalls scheinen mobile genetische Elemente wie z.B. Transposons eine Rolle bei der Verbreitung von Genen wie bei Bodenmikroorganismen zu spielen [Nwosu, 2001, Holt et al., 1999; Pearson et al., 1996; Mindlin et al., 2001].

Weiterhin ist gesichert, dass auch mittels horizontalem Gentransfers eine Verbreitung dieser Gene im Boden erfolgt [Mindlin et al., 2001; Nwosu, 2001; Mindlin et al., 2001]. Die genaue Art und Weise der genetischen Kommunikation von Bodenmikroorganismen ist jedoch noch weithin unverstanden.

Wie oben bereits erwähnt, wurden Mechanismen des Gentransfers im medizinischen Umfeld zahlreich erforscht und nachgewiesen. Für terrestrische oder aquatische Ökosysteme liegen weitaus weniger Untersuchungen vor. Neben der relativen Seltenheit der oben beschriebenen Phänomene, ist es problematisch in Boden exakte Nachweise zu führen. Zum einen verhalten sich Laborstämme im Boden vollkommen anders als im Labor und Bodenbakterien unter Laborbedingungen anders als im Boden, zum anderen stellt Boden ein sehr komplexes, undefiniertes und inhomogenes Ökosystem dar. Um ein definiertes Bodensystem zu erhalten, wird deswegen häufig mit Bodensäulen gearbeitet [Hill u. Top, 1998] (siehe 2.23).

Boden ist jedoch nicht nur hinsichtlich seiner autochthonen, zum größten Teil unerforschten Bakterienflora inhomogen und undefiniert, sondern auch hinsichtlich seines mannigfaltigen Reservoirs an freier DNA.

Nackte DNA hat in terrestrischen Ökosystemen hohe Persistenz und kommt in relativ hohen Konzentrationen vor (siehe 1.5) [Schmidt, 1991; Doerfler u. Schubert.,1997]. Romanowski et al. [1993a] wiesen bei verschiedenen Bodentypen mittels PCR nach, dass ausgebrachte DNA über Monate persistiert. Transformationsaktivität konnte noch nach 60 Tagen nachgewiesen werden [Romanowski et al., 1993a]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DNA an Tonminerale, bzw. an Quarz gebunden bis zu 1000fach resistenter gegen DNaseI war als in freier Lösung [Romanowski et al., 1991, 1993; Lorenz u. Wackernagel, 1987, 1990]. Ähnliche Konzentrationen sind bei freier DNA in aquatischen Habitaten zu finden (siehe Tabelle 2).

Im Boden spielt die Transformation bei allen Gruppen von Mikroorganismen, einschließlich der Archaeen eine entscheidende Rolle beim horizontalen Gentransfer und hat so schon früh die Phylogenie beeinflusst [Wassenaar et al., 1995; Fernandez-Herrero et al., 1995; Kosovich u. Prozorov, 1990; Lorenz et al., 1992; MECBAD, 2003]. Dies wird dadurch unterstützt, dass die Transformationsfrequenz von im Boden befindlicher DNA teilweise um den Faktor 20-25 mal höher als unter Laborbedingungen beschrieben wird [Lorenz et al., 1988; Graham J. u. Istock, 1978; Lorenz et al., 1992].

Einige Autoren sehen hierin einen großen, wenn nicht sogar den beherrschenden Einfluss auf die bakterielle Populationsdynamik, Evolution und Speziesbildung [Lorenz u. Wackernagel, 1994; Mindlin et al., 2001; Rensing et al., 2002].

Gleichzeitig finden Transfektion und Konjugation im Boden statt und tragen sowohl zu der vertikalen als auch der horizontalen Verbreitung von Genen bei [Henschke u. Schmidt, 1989; Klingmüller et al., 1990; Neilson et al.1994; Rensing et al., 2002]. Diese Mechanismen der Genübertragung haben ihren Platz im natürlichen Umfeld weit häufiger als es Laborergebnisse vermuten ließen. [Kellenberger, 1994]. Bei der Übertragung von Plasmiden bzw. DNA stellen Gattungsgrenzen prinzipiell kein Hindernis dar, ebenso wenig der Transfer von Gram-positiven zu Gram-negativen Bakterien und umgekehrt [Gormley u. Davis, 1991; Courvalin, 1994]. Befindet sich der Rezipient bzw. der Donor in einem geeigneten physiologischen Zustand und stellt die Umwelt kein chemisch oder physikalisch ungeeignetes Habitat zur Verfügung, so sollte man eher von einem erfolgreichen Transfer ausgehen als die Frage stellen, ob ein solcher überhaupt stattfindet.

Die natürliche Schranke für den horizontalen Gentransfer besteht vielmehr in der Existenz eines von Donor und Rezipient geteilten Ökosystems, sowie der Integration, der Expression und der Etablierung der übertragenen Gene beim Rezipienten. Die Struktur übertragener Gene, besonders die der primären Promotorstrukturen, der Codongebrauch, das Restriktionssystem und die Basenzusammensetzung ist primär die Grenze des horizontalen Gentransfers.

Der Boden stellt ein Milieu dar, welches einen regen Genaustausch ermöglicht: Dies beinhaltet sowohl Mechanismen für eine innerhalb der Zelle erfolgreiche Rekombination der Gene als auch die Mechanismen diese neuentstandenen Genkombinationen auch horizontal weiterzugeben.

Auf diese Mechanismen und genetischen Strukturen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.1 Mobile genetische Elemente

IS-Elemente (IS) und Transposons (Tn), welche durch Barbara McClintock [McClintock, 1961] ursprünglich in Mais (*Zea mays*) entdeckt wurden, werden als "springende Gene" oder transponierbare Elemente bezeichnet, da sie von einem Ort eines DNA-Moleküls an einen beliebigen anderen Ort des gleichen Moleküls (intramolekulare Transposition) oder von einem DNA Molekül auf ein anderes (intermolekulare Transposition) springen können [McGregor, 2003; Bennett, 2000; Bennett u. Grinsted, 1988; Bishop u. Sherratt, 1984].

Der Rekombinationsschritt wird durch Transposasen katalysiert, deren genetische Information auf dem springenden Element selbst kodiert ist [Grinsted et al., 1990; Liebert et al., 1999]. Transponierbare Elemente sind in der Regel nicht abhängig von einer bestimmten Sequenz in der Zielstruktur [Bennett, 2000; Schmidt et al., 1989a; Schmitt, 1986].

Die Einteilung mobiler DNA-Elemente erfolgte in drei Klassen [Günther, 1991]:

Klasse I umfasst sämtliche IS-Elemente sowie daraus zusammengesetzte Transposons, wobei das Transposase-Gen im IS-Element liegt. Zu Klasse II gehören Transposons vom Typ Tn3 oder Tn1000, die eigene Inverted Repeats (IR) und ein eigenes Transposase-Gen (*tnpA*) besitzen. Klasse III beinhaltet transponierbare Bakteriophagen, wie beispielsweise den Phagen Mu, welche über eigene komplexe, nicht immer einheitliche Strukturmerkmale verfügen. Eine schematische Übersicht zu Klasse I- und II-Strukturen ist in Abbildung 1 dargestellt.

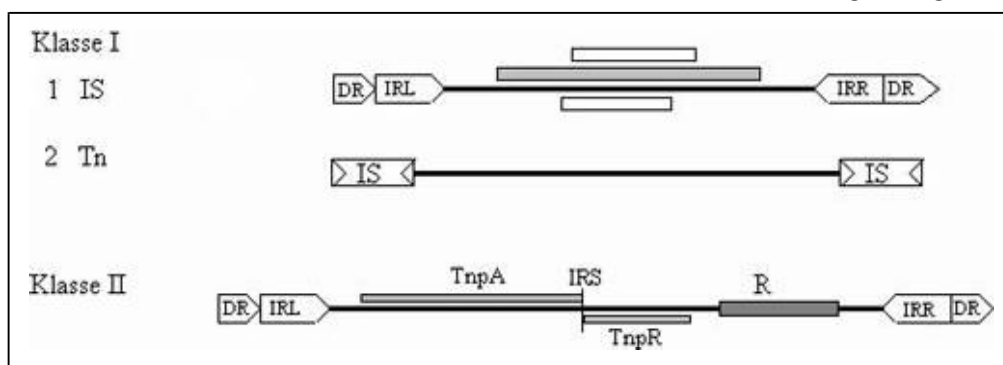


Abbildung 1: Übersicht mobiler DNA-Elemente, verändert nach Günther [Günther, 1991].

Klasse I: 1) IS-Elemente: Funktionslose, offene Leseraster, als offene Boxen und die, deren Relevanz für die Transposition nachgewiesen wurde, durch graue Boxen dargestellt. 2) Die Transposons der Klasse I bestehen aus IS-Elementen und zusätzlichen Genen, wie Antibiotikaresistenzen.

Klasse II: Transposons vom Typ Tn3, Tn21 oder Tn501 mit den Genen für die Transposase (*tnpA*), Resolvase/Repressor (*tnpR*), Resistenzmarkern (R, graue Box) und der internen 'Cointegrat-Resolution-Site' (IRS).

1.1.1 IS-Elemente

Das Fehlen eigener physiologischer Marker, wie z.B. Antibiotika- oder Schwermetallresistenzen erschwerte die Erforschung von IS-Elementen zunächst sehr [Lewecke, 1993]: Durch die Beobachtung, dass einige Transposons durch direkte oder umgedrehte Wiederholungen von IS-Elementen flankiert werden, wie beispielsweise Tn9 durch direkte Wiederholung von IS1, wurden entscheidende Einblicke in die Biologie von IS-Elementen möglich. Die physiologisch nachweisbaren und oft selektionierbaren Marker auf den Transposons hingegen erleichterten die Untersuchung der Aktivität flankierender IS-Elemente [Calos u. Miller, 1980].

IS-Elemente haben eine Größe von ca 0,8 - 1,8 kb. An ihren Enden besitzen sie invertierte Sequenzwiederholungen (10 - 40 bp) welche als Erkennungssequenz für die eigenen Transpositionsenzyme benötigt werden. Außer diesen Sequenzen kodieren IS-Elemente in ihrem Kernteil ausschließlich für die Transpositionsgene und die zugehörigen Regulationssignale. Die Kodierung erfolgt in sehr kompakter Form mit mehreren ineinander liegenden offenen Leserahmen oder in antisense Orientierung [Schmitt, 1986; Mahillon u. Chandler, 1998].

Ein charakteristisches Merkmal von IS Elementen ist eine Zielstellenverdoppelung, die während der Insertion erfolgt. IS-Elemente transponieren in einer Frequenz von 10^{-2} - 10^{-7} [Mahillon u. Chandler, 1998]. Im Genom von *E. coli* wurden bis zu zehn [Calos u. Miller, 1980] Kopien dieser Elemente gefunden. IS-Elemente bedingen auf der Ebene der „Einzelorganismen“ einfache bis komplexe Veränderungen im Genom mit teilweise letalen Konsequenzen.

Die Insertion von IS-Elementen kann zur Unterbrechung von Strukturgenen oder starken polaren Effekten führen. Gelegentlich hat die Insertion eines IS-Elementes vor einem Gen die Aktivierung der Expression dieses Genes zur Folge. Gleichzeitig wird in der unmittelbaren Nachbarschaft von IS-Elementen die Bildung von Deletionen stimuliert. Eine Reversion zum ursprünglichen Phänotyp wurde nach unexakter Exzision dieser Elemente beobachtet [Starlinger u. Saedler, 1976; Lewecke, 1993].

Doch auch als Substrat für das homologe Rekombinationssystem der Bakterienzellen sind IS-Elemente für die Entstehung von Deletionen [Nevers u. Saedler, 1978], Inversionen [Arber et al., 1980], Kointegratbildung und anschließender Replikonfusion von Bedeutung [Galas u. Chandler, 1982]. In F- und R-Plasmiden nachgewiesene, sich wiederholende DNA-Sequenzen, welche später als IS1, IS2, IS3 und Tn1000 identifiziert wurden, sind durch ihre Beteiligung an Rekombinationsereignissen für massive DNA-Umstrukturierungen wie Replikonfusion bzw. -segregation, Deletionen oder Inversionen verantwortlich [Davidson et al., 1975; Lewecke, 1993; Ohtsubo u. Ohtsubo, 1978].

Die Abschnitte, die zwischen einem Paar rekombinierender IS-Elemente liegen, können also invertiert, deletiert, inseriert und verdoppelt werden. So erfolgt beispielsweise die Entstehung von *Hfr*-Stämmen über eine homologe Rekombination und Kointegratbildung des F-Plasmids mit IS2, IS3 oder Tn1000 und dem Bakterienchromosom. Eine spätere Exzision kann dann

zur Entstehung von F'-Plasmiden führen [Davidson et al., 1975]. Deletionen oder Inversionen finden in diesem Bereich um den Faktor 2-3 häufiger statt. Außerdem können Promotorelemente im IS-Element selbst die Expression von benachbarten Genen bewirken [Schmitt, 1986; Cohen, 1976].

Auf der individuellen Zellebene erscheinen diese Resultate nachteilig, für die Gesamtpopulation einer Bakterienspezies hingegen stellt dieser Mechanismus einer Umstrukturierung ganzer Genombereiche („Makromutation“) einen Selektionsvorteil und wichtigen Evolutionsfaktor dar [Lewecke, 1993]: Durch eine Erhöhung der genetischen Variabilität ermöglicht dieser Mechanismus eine schnellere Anpassung an herrschende Umweltbedingungen [Syvanen, 1984]. IS-Elemente verleihen ihrem Wirt einen Selektionsvorteil, doch ist dieser nicht immer so offensichtlich wie z.B. die Antibiotikaresistenzen vieler Transposons. In einem Langzeitversuch konnte gezeigt werden, dass allein die Präsenz von IS10 in einer Flüssigkultur ein besseres Wachstum von Bakterien, relativ zur IS-freien Referenzkultur, bewirkte [Chao u. McBroom, 1985]. IS-Elemente ermöglichen über den Mechanismus der „Makromutation“ Evolutions sprünge und Prozesse zur sympatrischen Artbildung [Rensing et al., 2002]: Durch die Fähigkeit zur Mobilisierung von Genen in Form von zusammengesetzten Transposons (siehe 1.1.2) sind sie auch am horizontalen Gentransfer auf inter- und intraspezifischer Ebene in größeren Populationen beteiligt (s.u. Abbildung 2) [Lewecke, 1993].

Das „Überleben“ der IS-Elemente ist eine Gratwanderung zwischen Schädigung des Wirtes und der eigenen Reproduktion [Lewecke, 1993]: Bei zu hoher Kopienzahl besteht die Gefahr, dass der Wirt durch die Veränderungen seines Genoms stirbt, bei zu geringer Kopienzahl ist der Bestand des IS-Elementes gefährdet. Aus diesen Gründen haben verschiedene IS-Elemente unterschiedliche Mechanismen zur Autoregulation und Einbeziehung von Wirtsparametern zur Steuerung ihrer Transpositionsrate entwickelt [Prentki et al., 1987].

1.1.2 Transposons

Transposons enthalten im Gegensatz zu IS-Elementen nicht nur die Information für ihre Übertragung sondern noch zusätzliche Gene. Dies können z. B. Antibiotika- oder Schwermetallresistenzgene sein, welche sie in ihrem Kernteil enthalten [Schmidt, 1984, Liebert, 1999]. Manche Transposons sind von IS-Elementen flankiert, in diesen Fällen kodieren die IS-Elemente für den Transpositionsapparat. Transposons mit einem solchen Aufbau werden als mobile DNA Elemente der Klasse I zusammengefasst. Transposons der Klasse II hingegen besitzen nur kurze, umgekehrte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) von 35 - 140 bp. In diesem Fall wird der Transpositionsapparat von dem Transposon selbst kodiert (siehe Abbildung 1). Die Frequenz der Transposition von Transposons oder auch IS-Elementen wird durch die Konzentration der Transposase in einer Zelle bestimmt. Springen diese Elemente zu häufig, kann dies für die Zelle letale Auswirkungen haben, da dieses Springen zu Mutationen führen kann. Die Kontrolle der Transposase-Genexpression ist deshalb für die

Zelle von großer Bedeutung. Beide Klassen der Transposons unterscheiden sich in der Art der Transposition. Klasse I-Transposons wie z. B. Tn5 oder Tn10 transponieren nichtreplikativ, auch konservativ genannt [Bennett, 2000]. Nach dieser Art der Transposition ist das transponierbare Element nur in der Empfänger-DNA nicht aber in der Donor-DNA vorhanden.

Klasse II-Transposons wie Tn3, Tn501 oder Tn21 werden erst repliziert und anschließend wird eines der Replikationsprodukte auf das Empfängergenom übertragen. Während der Transposition wird eine Kopie des transponierbaren Elements hergestellt. Nach der Transposition ist das Element sowohl in der Donor-DNA als auch in der Empfänger-DNA vorhanden. Diese replikative, intermolekulare Transposition führt zu Kointegraten, welche entweder durch Resolvasen oder durch homologe Rekombination wieder aufgelöst werden [Bennett, 2000].

Bei beiden Mechanismen wird die Zielstruktur in der Empfänger-DNA verdoppelt. Dies ist eine Folge des überhängenden Aufschneidens der Zielstruktur. Die beiden entstandenen einzelsträngigen Stücke werden durch DNA-Polymerase aufgefüllt, was zu deren Verdoppelung führt. Später können diese kurzen Sequenzen, da sie spezifisch sind, als Nachweis für eine erfolgte Transposition dienen [Holt et al., 1999].

Transposons sind in der Lage Antibiotikaresistenzen anzusammeln und zu exprimieren. Bestimmte Stellen des Transposons (hot spots of recombination) scheinen für die Aufnahme immer neuer Gene und deren Organisation in sogenannten Genkassetten verantwortlich zu sein. Übertragung von Mehrfachresistenzen durch Transposons ist üblich [Schmidt, 1984; Schmitt, 1986; Liebert et al., 1999]. Transposons sind hierdurch auch wesentlich an der Verbreitung von Resistenzmechanismen, auch durch horizontalen Gentransfer, beteiligt (siehe Abbildung 2) [Dahlberg u. Hermansson, 1995].

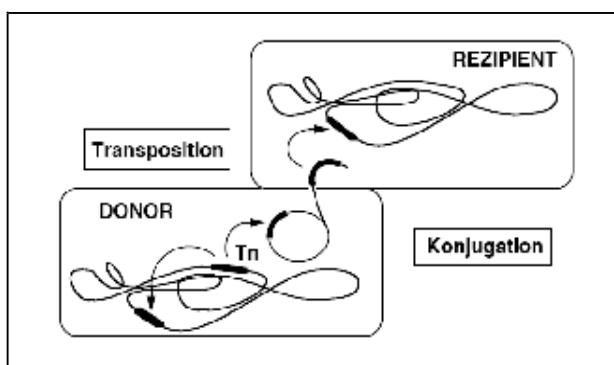


Abbildung 2: Horizontale Verbreitung von Transposon-kodierten Genen durch Transposition und Konjugation (nach Jenal, 2002).

Ein Transposon (dicke Linie), das z.B. eine bestimmte Resistenz trägt, kann innerhalb eines Chromosoms (intramolekular) oder vom Chromosom auf ein Plasmid (intermolekular) transponieren. Plasmide, die ein oder mehrere Transposons enthalten, können durch Konjugation von einer Donorzelle auf eine Rezipientenzelle übertragen werden. Gleiches gilt analog für IS-Elemente.

1.1.3 Integrone

Eine seit einigen Jahren bekannte Gruppe von beweglichen genetischen Elementen stellen die Integrone dar [Fluit u. Schmitz, 2004; Stokes u. Hall, 1989; Brown et al., 1996]. Bei ihnen handelt es sich um defekte Transposonderivate. Eine gemeinsame Eigenschaft der Integrone ist ihr konserviertes 5'-Ende. Dieses Ende kodiert für zwei zum variablen Mittelteil gerichtete Promotoren und eine sequenzspezifische Rekombinase. Sie ist verantwortlich für das Integrieren von Antibiotikaresistenzgenen in Form von transposoneigenen Genkassetten in den variablen Kernteil des Integrone. Das 3'-Ende enthält in der Regel ein Sulfonamidresistenzgen (*sulI*), sowie ein weiteres Gen welches Resistenz gegenüber Ethidiumbromid verleiht (*qacΔE1*). Sie haben keine oder nur Teile von Transpositionsfunktionen (z.B. *tniA* aus Tn21) (siehe Abbildung 3). Integrone wurden bis jetzt als Bestandteile von Transposons der Tn21-Familie oder unabhängig auf verschiedenen Gruppen von Plasmiden mit weitem Wirtsbereich gefunden [Hall et al., 1994; Lévesque et al., 1995; Liebert et al., 1999].

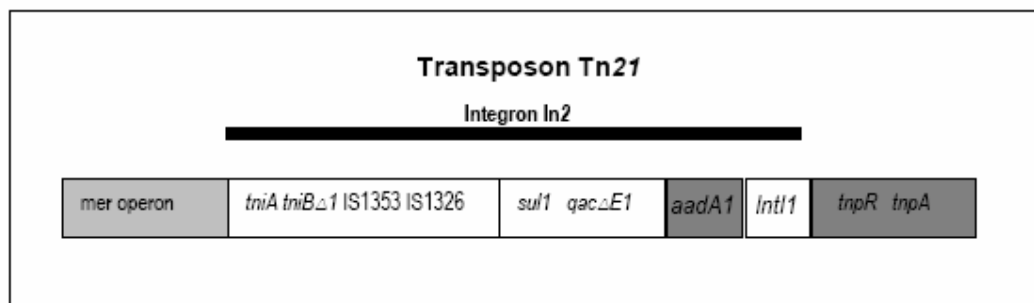


Abbildung 3: Skizze von Integrone In2, Teil des zusammengesetzten Transposons Tn21

Der schwarze Balken zeigt die Länge des 11 kb großen In2: *tniA* und *tniB* Δ 1 = Transposasegene, IS1353 und IS1326 = Insertions-Elemente, *sulI* = Sulfonamidresistenzgen, *qac* Δ 1 = Resistenzgen gegenüber quaternären Ammonium-Desinfektionsmitteln, *aadA1* = Genkassette: Aminoglycosid Adenyltransferase, *IntI1* = Integrase-Gen

1.2 Transposons der Tn3 Familie

Da in der hier vorliegenden Arbeit die Transposons Tn3, Tn501 und Tn21 eine zentrale Rolle spielen, sollen sie kurz vorgestellt werden. Sie sind gut untersucht und gehören zu unterschiedlichen evolutionären Ästen der Tn3-Familie [Grinsted et al., 1990; Liebert et al., 1999]. Viele der gut charakterisierten Transposons der Tn3-Familie wurden zuerst in klinischen Isolaten entdeckt und dort auch zuerst beschrieben [Galas u. Chandler, 1989; Sherratt, 1989]. Die Transposons der Klasse II beinhalten transponierbare Elemente sowohl aus Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien. Normalerweise sind diese Transposons mit verschiedenen Typen phänotypischer Marker wie Antibiotikaresistenz oder Schwermetallresistenz assoziiert. Viele dieser Transposons werden auf konjugativen Plasmiden gefunden. Ihnen ist gemeinsam dass sie i.d.R. für eine eigene interne Transposase (*tnpA*) und eine eigene interne Resolvase (*tnpR*) kodieren, sowie Inverted Repeats (IR) und eine „Internal Resolution

Site“ (*res*) besitzen. Die Homologie der verschiedenen Transposasen innerhalb der Familie liegt auf der Aminosäureebene zwischen 12 und 98 % [Grinsted et al., 1990; Liebert et al., 1999]. Teilbereiche des Transposasegens sind jedoch immer für das bestimmte Familienmitglied so charakteristisch, dass sie ein gutes Unterscheidungsmerkmal bieten, nach dem z.B. in terrestrischen Habitaten gesucht werden kann [Dahlberg u. Hermansson, 1995]. Tn21 und Tn501 vermitteln Quecksilberresistenz, Tn21 darüber hinaus noch Resistenz gegenüber Streptomycin, Spectinomycin und Sulfonamid; Tn3 vermittelt lediglich Ampicillinresistenz (Abbildung 4).

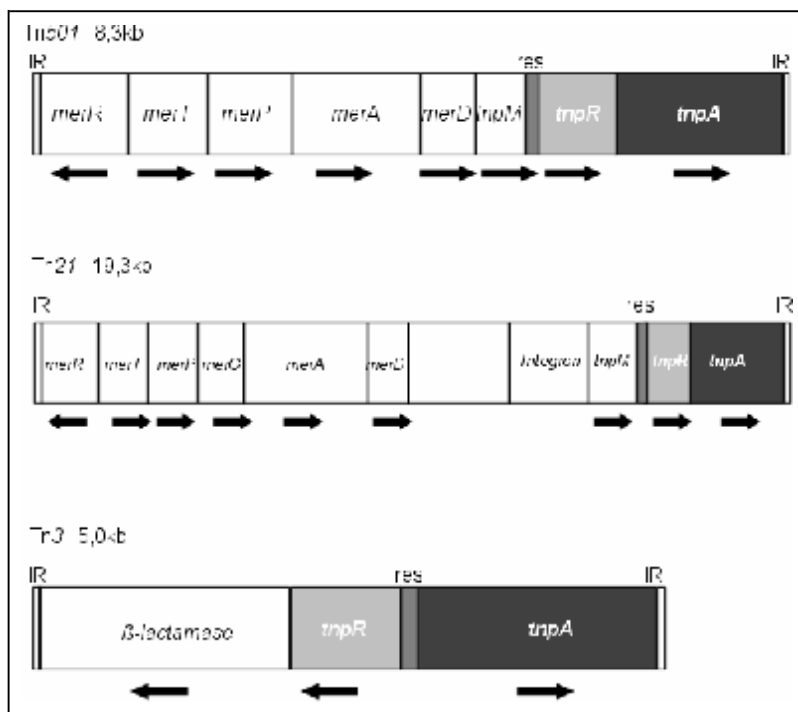


Abbildung 4: Einfache, schematische Abbildung von Tn501, Tn21 und Tn3.

IR = Inverted Repeats, *res* = resolution site, *tnpA* = Transposase, *tnpR* = Resolvase, *tnpM* = unbekanntes Gen, *merA*, C, D, P, R, T = Gene des *mer* Operons (Quecksilberresistenz) schwarze Pfeile = Transkriptionsrichtung der Gene.

Der Tn21- und Tn501-Zweig unterscheidet sich von dem Tn3-Zweig durch die unterschiedliche Transkriptionsrichtung von *tnpA* und *tnpR*. Beim Tn21-Zweig liegen diese in der gleichen Orientierung, bei Tn3 in unterschiedlichen. Weiterhin wird *tnpA* und *tnpR* bei Tn3 durch die „Internal Resolution Site“ (*res*) getrennt, was bei dem Tn21 Zweig nicht der Fall ist. Die Transposasen von Tn3 und Tn21 sind auf Aminosäurebasis zu 29 % identisch, bei der Resolvase zu 30 %. Tn21 und Tn501 gehören wiederum zu zwei Untergruppen des Tn21-Zweiges. Die Transposasen von Tn21 und Tn501 sind auf Aminosäurebasis zu 72 % identisch bei der Resolvase beträgt die Homologie 82 % [Grinsted et al., 1990].

Viele Tn21 ähnliche Elemente mit verschiedensten Antibiotikaresistenzen sind bekannt. Tn21 und verwandte Elemente kodieren für eine Integrase, welche für die „einfache“ Akquisition

(*attC*-Rekombinations-Sites) von Antibiotikaresistenzen verantwortlich ist [Grinsted et al., 1990; BFR, 2001]. *Tn21* wurde 1977 zum ersten Mal erwähnt und wird mittlerweile auch als das „Flagship of the Floating Genome“ bezeichnet [Liebert et al., 1999]. Es ist mit seinen Variationen sicher sowohl das geographisch, als auch über verschiedene Genera weitverbreitetste beschriebene genetische Element [Liebert et al., 1999; Grinsted et al., 1990]. Ein Mitglied der *Tn21* Familie wurde sogar in 8000 - 10000 Jahre altem Permafrostboden nachgewiesen [Kholodii et al., 2003].

Weiterhin liegen Studien vor, welche das Vorhandensein von Transposons dieses Typs, bzw. deren Transposasen, aus überwiegend belasteten aquatischen Habitaten [Mindlin, et al. 2001; Barkay et al., 1989; Barkay et al., 1989a; Leff et al., 1993; Olson et al., 1991; Rinkel et al., 1994; Smalla et al., 1993; Dahlberg u. Hermansson, 1995] und einige in belasteten terrestrischen Habitaten [Rensing et al., 2002; Mindlin et al. 2001; Olson et al., 1991; Bräuning, 1998; Holt et al., 1999; Holt et al., 1999a; Günther, 1996] zeigen.

1.3 Mechanismen des Gentransfers - Genetische Grundlagen

Horizontaler Gentransfer ist die Weitergabe bzw. Aufnahme genetischen Materials unabhängig von bestehenden Artgrenzen [De la Cruz u. Davies, 2000]. Es gibt im wesentlichen drei Mechanismen, welche für den natürlicherweise stattfindenden horizontalen Gentransfer verantwortlich sind:

Konjugation

Transduktion und

Transformation.

1.3.1 Konjugation und Horizontaler Gentransfer

Das anfänglich schon erwähnte Auftreten von vier gleichen Resistenzen bei unterschiedlichen Spezies wurde in den späten fünfziger Jahren zuerst in Japan bei *Escherichia coli* und *Shigella dysenteriae* beobachtet [Ochiai et al., 1959]. Dieses Phänomen führte Akiba [1960] und Ochiai [1959] zu der Vermutung, dass eine Übertragung von Genen einer Spezies zur anderen mittels eines infektiösen genetischen Elements erfolgt war und nicht die Folge separater Mutationen in einer Spezies war. Es handelte sich um ein konjugatives R-Plasmid, welches erstmalig als Ursache für einen horizontalen Gentransfer nachgewiesen werden konnte. Es wurde außerdem der Beweis erbracht, dass vier Resistenzen mittels eines Plasmides übertragen werden konnten [Ochiai et al., 1959; Akiba et al., 1960; Watanabe, 1963]. Wie bereits oben erwähnt, wurden solche R-Plasmide bei Gram-negativen und -positiven Spezies nachgewiesen, die für Mensch und Tier pathogen sind [Schumann, 1990].

Plasmide spielen beim Gentransfer, im Speziellen bei der Ausbreitung von Antibiotika- und Schwermetallresistenzen, die zentrale Rolle.

1.3.2 Konjugation

1.3.2.1 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, sich autonom duplizierende, zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle. Sie werden bei den Archaeen, Bakterien und Eukarya angetroffen. Sie sind in der Lage ihre eigene Kopienzahl zu kontrollieren. Bei dem erstmals 1946 von Lederberg u. Tatum [1946] beschriebenen Mechanismus der Konjugation werden Plasmide und/oder DNA durch den direkten Kontakt einer Donor- und Rezipientenzelle übertragen [Lederberg u. Tatum, 1946].

R-Plasmide vermitteln Resistenzen gegenüber Antibiotika und/oder Schwermetallen. Sie sind gewöhnlich konjugativ oder mobilisierbar. Das heißt, sie verfügen über Transfergene (*tra*) oder Mobilisierungsgene (*mob*) und eine intakte *nic/bom*-Stelle [Wilkins u. Lanka, 1993]: Die *tra*-Gene, die auch als Resistenztransferfaktor (RTF) bezeichnet werden, veranlassen ihre Wirtszelle dazu einen Konjugationsapparat auszubilden, um physischen Kontakt zur anderen Zelle auszubilden. Hierbei kommt es dann zur aktiven Übertragung der DNA des Plasmides, welches für die *tra*-Gene kodiert. Darüber hinaus können weitere Plasmide, sofern sie mobilisierbar sind (d. h. eine *nic/bom*-Stelle tragen), ebenfalls mit übertragen werden. Dies geschieht jedoch nur wenn *mob*-Proteine in der Zelle vorhanden sind. Es muss also mindestens ein Plasmid in der Zelle für die *mob*-Proteine kodieren. Durch diese Mobilisierungsproteine, die an der *nic/bom*-Stelle binden, kommt es zum Strangbruch in der Plasmid-DNA und damit ebenfalls zu einer Übertragung der mobilisierbaren Plasmide nach dem „Rolling-Circle-Mechanismus“ [Novick, 1980; Willetts, 1993]. Die *nic/bom*-Stelle fungiert hier also als *oriT*.

Der Kontakt zwischen den zwei konjugierenden Zellen wird durch die Donorzelle über den Fertilitäts- (F) Pilus hergestellt. Bei dem Kontakt zwischen der F⁺ und der F⁻-Zelle kann eine Kopie des F-Plasmids in die Empfängerzelle übertragen werden, welche dadurch selbst F⁺ wird [Firth, 1996; Wilkins u. Lanka, 1993]. Eine interessante Eigenschaft einiger konjugativer Plasmide ist die potentielle Möglichkeit chromosomale Gene zur Rezipientenzelle zu mobilisieren [Haas u. Holloway, 1976]. Wird ein F-Plasmid stabil in das Chromosom einer Zelle eingebaut, können gleichzeitig Gene aus dem Bakterienchromosom der Donorzelle übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie von Teilen des Genoms der Hfr-Donorzelle („High-frequency-recombinant“) in die Empfängerzelle eingeschleust. Über den Mechanismus der homologen Rekombination können dann diese Genabschnitte in die Empfängerzelle integriert werden. Diese Möglichkeiten der Übertragung von DNA durch Konjugation sind vielfach dokumentiert [Lorenz et al., 1991; Brisson-Noel et al., 1988; Trieu-Cuot, 1987; Trieu-Cuot, 1988]. Plasmide Gram-negativer MO verteilen sich auf 25

Inkompatibilitätsgruppen (Inc) [Couturier et al. 1988; Wilkins u. Lanka, 1993]. Von diesen haben die IncP, W, N und C ein sehr weites Wirtsspektrum in Bezug auf Transfer und autonome Replikation [Thomas, 1989]. Der Mechanismus der Konjugation kommt sowohl in Gram-negativen wie Gram-positiven Bakterien und Streptomyzeten vor.

Plasmide stellen universelle Vektoren dar, welche direkt zum Transfer von genetischer Information von einer Bakterienzelle zur anderen geeignet sind. Innerhalb der Zelle stellen sie die Matrix zur Verfügung, innerhalb der Gene vor einem möglicher Transfer neu rekombiniert oder assimiliert werden können [Cohen, 1976].

1.3.2.2 Konjugative Transposons

Konjugative Transposons sind weitere DNA-Elemente, welche die Fähigkeit besitzen zwischen Chromosomen verschiedener Zellen zu translozieren [Clewell u. Gawron-Burke, 1986; Senghas et al., 1988]. Diese Elemente kodieren die Funktionen zum Herausschneiden des Transposons (*tnpR*) aus dem Donorchromosom, sowie zum Transfer (*tnpA*) und Einbau (*tnpI*) in andere Zellen. Meistens besitzen sie ebenfalls Resistenzgene. Obwohl konjugative Transposons hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien beobachtet werden, kommen sie auch in Gram-negativen Bakterien vor [Craig, 1996; Schenker, 1999].

1.3.3 Transduktion

Es kommen jedoch noch weitere Mechanismen des Gentransfers in Frage, eine davon ist die Transduktion. Sie wurde erstmals 1952 von Zinder und Lederberg in Salmonellen entdeckt [Zinder u. Lederberg, 1952]. Teilstücke des Bakteriengenoms sowie von Plasmiden können durch von Bakteriophagen vermittelte Transduktion übertragen werden [Masters, 1996].

So wirtsspezifisch wie die Bakteriophagen sind, so sehr verschieden sind sie in ihrem Transduktionsmechanismus: Hierbei unterscheidet man zwischen spezieller und generalisierter Transduktion. Bei der unspezifischen Transduktion wird DNA der Wirtszelle entweder zusätzlich oder anstelle des Phagen-genoms in den Phagenpartikel verpackt. Bei einigen transduzierenden Phagen kann so DNA in einer Größenordnung von ca. 100 kb übertragen werden. Dies entspricht ca 2,5 % des Genoms von *E. coli*: In einigen Fällen sogar bis zu 8 %. Es können also ganze Gruppen von Genen übertragen und anschließend durch Rekombination in einer anderen Bakterienzelle integriert werden [Singer u. Berg, 1992]. Bei einigen Bakteriophagen, wie z. B. Mu (Mutator Phage), erfolgt die Transduktion des Phagen-genoms stets zusammen mit 1-2 kb Wirts-DNA. Diese wird an beliebiger Stelle ins Bakteriengenom inseriert [Margolin, 1987; Weisberg, 1994].

Bei der speziellen Transduktion werden ebenfalls Abschnitte des Wirtsgenoms mitübertragen, jedoch mit dem Zweck einer homologen Insertion der Phagen-DNA in das Wirtsgenom. In diesem Fall kann der Austausch eines defekten mit einem funktionstüchtigen Gen erfolgen. Die Größe dieser ausgetauschten Segmente reicht von nur einigen Kilobasen bis

über 100 kb und ist wahrscheinlich durch unterschiedliche Restriktions-Modifikationssysteme der Donor- und Empfängerzellen begrenzt [DuBose et al., 1988; McKane u. Milkman, 1995].

1.3.4 Transformation

Als weitere Möglichkeit des Gentransfers sei der am längsten bekannte, von Griffith 1928 entdeckte und von Avery et al. [1944] weiter untersuchte Mechanismus der Aufnahme nackter DNA genannt. Freie, zugänglich vorliegende, DNA wird durch Zellen aufgenommen und mittels homologer Rekombination in das Bakteriengenom integriert.

Um nackte DNA aufnehmen zu können, müssen Zellen kompetent sein, dies erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme um den Faktor drei. Kompetenz ist abhängig vom physiologischen Zustand der Zellen und der Wachstumsphase [Chamier et al., 1993].

Man unterscheidet eine im Labor künstlich erzeugte Kompetenz von Bakterien von der natürlichen Kompetenz, bei der unter nativen Bedingungen DNA von Bakterien aufgenommen werden kann. Natürliche Kompetenz wurde bei einer Reihe von pathogenen Bakterienspezies wie *H. influenzae* oder *S. pneumoniae* in einer bestimmten Phase des Zellzyklus beobachtet [Stewart u. Carlson, 1986; Lorenz u. Wackernagel, 1994]. Bei einigen Spezies wie *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* liegt die Kompetenz permanent, d.h. in jeder Phase des Zellzyklusses, vor [Catlin, 1960; Sparling, 1966].

Während des Transformationsprozesses in ein anderes Bakterium muss die DNA zwei Membranen und auch die Peptidoglykanschicht durchqueren, um in das Zytoplasma zu gelangen, wo sie in das Chromosom z.B. mittels eines RecA-abhängigen Prozesses integriert werden kann [Kooimey et al., 1987]. Bakterien besitzen zu diesem Zeitpunkt eine veränderte Zelloberfläche und es wird die Aktivität bestimmter Enzyme benötigt, zum einen zur Aufnahme der DNA, zum anderen zum Prozessieren der DNA. Kompetenzspezifische Proteine sind bestimmte zellwandgebundene DNA-Bindungsproteine, zellwandauflösende Autolysine, sowie verschiedene Nukleasen [Barany et al., 1983; Günther, 1996]

Andere zellwandgebundene an der Transformation beteiligte Proteine könnten in den an der Zelloberfläche befindlichen Membranvesikeln („Blebs“) vorhanden sein [DeVoe u. Gilchrist, 1973; Andersen et al., 1979; Schenker, 1999:]. In diesen werden DNA-bindende Proteine sowie zirkuläre und lineare DNA nachgewiesen [Dorward et al., 1989, 1989a]. Die in diesen Membranvesikeln aufgenommenen Plasmide können anschließend interzellulär transferiert werden [Dorward et al., 1989a]. Es ist von der Bakteriengattung abhängig, ob die DNA als Einzelstrang oder als Doppelstrang aufgenommen wird, ebenso wie lang das aufgenommenen DNA-Fragment ist. Bei entsprechender Homologie kann die aufgenommene DNA in das Genom integriert werden [Kooimey et al., 1987]. Die für die Rekombination verwendete DNA wird entweder durch Selbstlyse von Bakterien oder aktive Mechanismen freigesetzt [Hebeler u. Young, 1975; Lorenz et al., 1988; 1991; 1992] und kann von natürlich

transformierbaren Bakterien aufgenommen werden [Frosch u. Meyer, 1992; Lorenz et al., 1988; 1988b; 1990; 1991; 1992].

Für manche Bakterien sind bestimmte Sequenzen "uptake sequences" identifiziert worden, die für die effektive Aufnahme von DNA aus der Umgebung verantwortlich sind. So sind z.B. in *Neisseria* und *H. influenzae* ähnliche, 10 bp lange „uptake sequences“ identifiziert worden, die für die effektive Aufnahme von Doppelstrang-DNA aus der Umgebung verantwortlich sind [Goodman u. Scocca, 1988; Schenker, 1999]. Es sind über 40 Spezies bekannt, welche über ein natürliches Transformationssystem verfügen, das es ihnen ermöglicht auch artfremde DNA aufzunehmen [Lorenz u. Wackernagel, 1994].

Wie kommt es aber dazu, dass eine von Bakterien aufgenommene DNA auch in die schon in der Bakterienzelle vorhandene chromosomale oder Plasmid-DNA integriert wird ?

Hierfür sind die folgenden Mechanismen verantwortlich und sollen kurz beschrieben werden.

1.4 Rekombination und Transposition

1.4.1 Rekombination

Bakterien sind, wie oben beschrieben, in der Lage, zusätzliche genetische Information durch Aufnahme fremder DNA zu erwerben. Diese DNA kann von derselben Spezies sein oder artfremder Natur. An die oben beschriebenen Translokationsvorgänge kann sich in der Empfängerzelle eine DNA-Rekombination anschließen. Der Einbau dieser so aufgenommenen DNA in das Chromosom der Zelle erfolgt anschließend durch den Mechanismus der Rekombination mit Hilfe des RecA Proteins [Kooimey et al., 1987; Kowalczykowiak et al., 1994; Kopecko u. Cohen, 1975]. Der Mechanismus der homologen Rekombination an sich wurde besonders an *E. coli* studiert [Kowalczykowiak et al., 1994]. Wie oft jedoch Transformation von DNA stattfindet lässt sich nicht wirklich sagen, da nur die Transformationsereignisse, welche man an einem verändertem Phäno- oder Genotyp nachweisen kann, auch statistisch erfasst werden.

Ein veränderter Phänotyp lässt sich noch recht einfach nachweisen, da man hier mit Mitteln des Ausplattierens auf ein Selektivmedium schnell eine Aussage bekommt. Die Rekombinationsereignisse hingegen, bei denen die neu integrierte DNA nicht exprimiert wird sind nur mit aufwändigen Mitteln zu erfassen, da man hier nur mittels PCR oder Hybridisierungstechniken wie z.B. Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) oder Southern-Blottings eine genügend große Zahl von potentiellen Rekombinanten daraufhin untersuchen könnte. Es unterliegt nicht nur die chromosomale DNA, sondern auch die der Plasmide der Rekombination, was sich beispielhaft an der Entstehung von R-Plasmiden mit ihren Mehrfachresistenzen manifestiert.

Man kann die Rekombination grob in zwei Arten, namentlich die homologe (generelle) und die nicht homologe (illegitime) mit dem Sonderfall der sequenzspezifischen Rekombination einteilen. Homologe und sequenzspezifische Rekombination sollen hier kurz erläutert werden.

1.4.1.1 Homologe Rekombination

Homologe Rekombination benötigt als eigentliches Substrat einzelsträngige DNA. Diese muss zur auszutauschenden DNA ähnlich (homeolog), fast identisch (homolog) oder identisch sein [Schenker, 1999]: Die minimale DNA-Länge zur Rekombination wird MEPS („minimal efficient processing segment“) genannt. Segmente mit geringerer Länge rekombinieren ineffizient [Shen u. Huang, 1986]. MEPS variieren zwischen verschiedenen Organismen, so sind sie in Säuger-Zellen 200 bp lang [Liskay et al., 1987], haben in *S. cerevisiae* eine Länge von 26 oder 89 bp [Ahn et al., 1988; Sugawara u. Haber, 1992] und in *E. coli* 20-27 bp [Watt et al., 1985; Shen u. Huang, 1986]. Schon geringere Sequenzunterschiede reduzieren die Rekombinationsrate erheblich. So verringern 16% Sequenzunterschiede zwischen zu rekombinierenden DNA-Abschnitten in *E. coli* bei einer Phagen-Plasmid-Rekombination die Rate um den Faktor 100 [Watt et al., 1985]. Shen und Huang beobachteten bei einem ca. 400 bp langen DNA-Abschnitt mit einer Homologie von 65% je nach Rekombinationssystem eine 300- bis 888-mal geringere Rekombinationsrate [Shen u. Huang, 1986]. Für *Salmonella typhimurium* und *E. coli* (80% DNA-Sequenzhomologie) wurde ein Unterschied mit dem Faktor 1000 berichtet [Rayssiguier et al., 1989; Rayssiguier et al., 1991]. 52%ige homeologe DNA scheint die für diesen Mechanismus unterste Grenze zu sein, bei der homeologe Rekombinationsprozesse noch funktionieren [Mézard et al., 1992].

Als Resultat dieses Vorgangs kann ein Einzelstrang der DNA-Doppelstränge so ausgetauscht werden, dass dies zu einer Mutation führt, da die Homologie nicht 100%ig sein muss. Der interessantere Fall ist jedoch der Austausch eines ganzen Doppelstranges durch diesen Mechanismus. Hierdurch erfolgt eine neue Kombination von Genen im Chromosom oder auf einem Plasmid, denn die Rekombination beruht auf dem RecA-System, welches nur in der Lage ist, generelle Homologien in den Nukleotidsequenzen zu erkennen. Da dieses System auch für die Reparatur von DNA bei z.B. Strangbrüchen, zuständig ist, erklärt sich die Notwendigkeit der Unspezifität dieses Systems. So wurde für das RecA Protein *in vitro* gezeigt, dass es bis zu 30% Sequenzunterschied toleriert [Schenker, 1999; DasGupta u. Radding, 1982].

Die verschiedenen Reparatursysteme der Organismen scheinen eine der Barrieren für den Erfolg homologer Rekombination darzustellen [Claverys u. Lacks, 1986; Rayssiguier et al., 1989; Mézard et al., 1992]. Mismatch-Reparatursysteme, wie sie z.B. für *S. pneumoniae* und *E. coli* beschrieben wurden, können durchaus nicht in allen MO identifiziert werden [Schenker, 1999]. Es wird vermutet, dass bei einem zu großen Sequenzunterschied das

Reparatursystem heteroduplexe Zwischenstufen während des Rekombinationsprozesses inaktiviert und/oder abbaut [Radman, 1989].

Eine weitere Barriere für die Rekombination sind zweifelsohne die Restriktionsmodifikationssysteme (R-M Systeme) [Barcus u. Murray, 1995], da sie fremde DNA erkennen und restringieren [Schenker, 1999]: Dieses Phänomen wurde erstmalig von Arber und Dussoix [Dussoix u. Arber, 1962; Arber u. Dussoix, 1962] beschrieben. Ein solches System besteht i.d.R. aus einer Methyltransferase, die bestimmte Basen einer Erkennungssequenz methyliert und einem Restriktionsenzym, das DNA ohne methylierte Erkennungssequenz zerschneidet [Wilson u. Murray, 1991]. R-M Systeme wurden in vielen verschiedenen Bakterienarten entdeckt [Roberts, 1989]. So wurden z.B. in einem *N. gonorrhoeae* Stamm bis zu 14 unterschiedliche Methyltransferasen gefunden [Stein et al., 1995]. Die biologische Relevanz von R-M Systemen ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird spekuliert, dass zelleigene DNA und damit die Zelle vor fremder DNA, wie Phagen DNA, geschützt werden soll [Price u. Bickle, 1986]. Neuere Theorien gehen eher von einem "selfish gene model" aus, bei dem R-M-Operons selber den größten Vorteil ihrer Verbreitung durch die Integration im Chromosom besitzen [Naito et al., 1995; Kobayashi u. Nakayama, 1998]. Wenn sie einmal integriert wurden, ist es für die „Wirtszelle“ äußerst schwierig, wenn nicht gar unmöglich, sie wieder zu verlieren [Schenker, 1999].

1.4.1.2 Sequenzspezifische Rekombination

Sequenzspezifische oder auch ortsspezifische Rekombination erfordert wesentlich kürzere aber definiere Sequenzhomologien (5-15 Basenpaare). Sie erfolgt an einer bestimmten Stelle. So inseriert der Phage 8 bei *E. coli* in der Regel zwischen die Gene *gal* und *bio*. Hier hat das Phagen- mit dem Bakterien-Genom eine Sequenzhomologie, die zum Einbau des Phagen-genoms genutzt wird („attachement site“). Das RecA-System ist bei dieser Art der Rekombination nicht beteiligt. Diese Art von Rekombination wird durch ortsspezifische (sequenzspezifische) Rekombinasen katalysiert, welche kurze, homologe Fragmente spezifisch erkennen und den Strangaustausch zwischen diesen beiden katalysieren. Invertasen können die Ausrichtung eines DNA Stückes umkehren, welches zwischen zwei Erkennungsstellen liegt, wie bei dem klassischen Beispiel der Variation des Flagellin in *Salmonella typhimurium* [Porwollik et al., 2002]. Zu der Klasse der Invertasen gehören auch Enzyme, welche für die Integration von DNA verantwortlich sind.

Da es, wie gerade kurz dargelegt, viele Mechanismen für die Aufnahme und Integration von DNA gibt, ist ein wesentlicher Faktor für die genetische Variabilität das Vorhandensein eines möglichst großen Pools an verfügbarer DNA. Deswegen soll das natürliche Vorkommen von DNA in verschiedenen Habitaten betrachtet werden.

1.5 Vorkommen von DNA in natürlichen Habitaten

Nackte DNA hat in Ökosystemen eine lange Halbwertszeit und kommt seit Millionen von Jahren in relativ hoher Konzentration vor (s.u. Tabelle 1 und Tabelle 2). DNA wird ständig, hauptsächlich durch Pflanzen, aber zum erheblichen Teil auch von Mikroorganismen in die Umwelt eingetragen [Doerfler u. Schubbert, 1997]. Die Persistenz von freier DNA wird in erster Linie durch nukleolytische Degradation, Aufnahme durch MO und Schutz vor Degradation durch Adsorption an geladene Oberflächen wie z.B. Mineralien beeinflusst [Blum et al., 1997; Khanna u. Stotzky, 1992]. DNA ist ein sehr stabiles Molekül, das in einigen Fällen über 5.000 Jahre, weit über den Tod des Organismus hinaus, wenn auch in fragmentierter Form persistieren kann [Pääbo, 1985]. Archäologische Untersuchungen an Funden biologischer Herkunft, wie z.B. des Tiroler Eismannes „Ötzi“ [Handt et al., 1994] oder auch antiker ägyptischer Mumien [Pääbo, 1985] haben dies eindrucksvoll gezeigt. Was jedoch mit dem größten Teil dieser DNA geschieht ist ungewiss.

Tabelle 1: DNA-Mengen und Quellen in der Umwelt nach Doerfler u. Schubbert [1997]

DNA als Teil des Ökosystems, eine anthropozentrische Mengenabschätzung über Eintrag und Verbreitungswege
1. Nahrungsaufnahme Mensch <ul style="list-style-type: none"> • Aufnahme: 100 bis 1000 mg DNA / Tag • Ausscheidung: 1 bis 10 mg DNA / Tag • Kloake / Tag: 1 bis 10 kg DNA / Tag und 100 Mio. Einwohner; DNA in rekombinationsfähigen Fragmenten
2. Infektionen mit Viren und Mikroorganismen
3. Beerdigungen pro Jahr <ul style="list-style-type: none"> • 100 g DNA pro Mensch; 88 Tonnen/Jahr in Deutschland
4. Jahreszeitliche Belastung durch Pflanzen <ul style="list-style-type: none"> • Pollenflug • Laub und Früchte; wahrscheinlich Tonnen von DNA
5. Übertragungen bei Sexualverhalten <ul style="list-style-type: none"> • 10 bis 30 mg DNA / Jahr; 5 bis 15 kg DNA / Jahr und 1 Million Einwohner
6. Rekombinante DNA in den Laboratorien <ul style="list-style-type: none"> • 10^{-9} bis 10^{-6} g DNA / Labor und Experiment
1. - 5. Vorgänge seit Jahrmillionen 6. Rekombinierte DNA seit 1972

Weitere Untersuchungen haben sich mit dem Vorkommen und der Konzentration von freier DNA in aquatischen Systemen beschäftigt (siehe Tabelle 2). Bei terrestrischen Habitaten kann man nur grobe Abschätzungen machen, da die Konzentration der freien DNA nur schwer zu bestimmen ist. Dies liegt daran, dass die Methoden, welche freie DNA aus dem Boden extrahieren auch unweigerlich eine Lyse vorhandener lebender Zellen zur Folge haben und somit artifiziell DNA freisetzen. Von Süßwassersedimenten ausgehende Abschätzungen geben einen Wert von $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ Sediment an [Ogram et al., 1987]. Quellen für frei im Boden vorkommende DNA sind entweder tote, lysierte Zellen, wachsende Zellaggregate oder Zellen, welche für ein aktives Ausbringen von DNA sorgen. Bilden z. B. Streptomyceten ihr Luftmyzel aus, so lysieren ihre vegetativen Hyphen um Nährstoffe freizusetzen, hierbei setzen sie DNA frei [Charter et al., 1988; Beneveniste u. Davies, 1973]. Aber auch *Bacillus subtilis* ist in der Lage, aktiv intakte Plasmide und chromosomale DNA in seine Umwelt zu entlassen [Lorenz et al., 1991].

Untersuchungen haben gezeigt, dass freie DNA in größerer Menge im Boden [Romanowski et al. 1992; Romanowski et al. 1993a; Blum et al. 1997], im Meerwasser [Paul et al. 1987; DeFlaun u. Paul 1989; Turk et al. 1992], im Süßwasser [Paul et al. 1989], im Abwasser [Fibi et al., 1991] sowie in Meeressedimenten [Maeda u. Taga, 1974] hydrolysiert wird. Diese Hydrolyse der freien DNA hat ihre Ursache im überall vorhandenen Auftreten von zellgebundenen oder freien DNasen, welche durch Mikroorganismen produziert werden, um freie DNA als Wachstumssubstrat zugänglich zu machen [Greaves u. Wilson 1970; Paul et al., 1988].

DNase-produzierende Mikroorganismen können in einigen Fällen über 90% der heterotrophen bakteriellen CFU terrestrischer und aquatischer Habitate stellen [Maeda u. Taga, 1973; Maeda u. Taga, 1974]. Von einer positiven Wechselbeziehung zwischen der Erhöhung der Anzahl von Mikroorganismen und der Erhöhung der Aktivität von DNasen nach Hinzufügung von Wasser auf unterschiedliche Böden wurde von Blum et al. [1997] berichtet. Bodenrehydrierung bewirkte eine erhöhte Verfügbarkeit von Nährstoffen und damit einhergehend ein Wachstum der Nukleasen-ausscheidenden Mikroorganismen. Die Hemmung des pro- und eukaryontischen Wachstums im Boden durch Antibiotika und Cycloheximid bewies den Ursprung der DNasen im Boden. Während das Hinzufügen von Cycloheximid und Wasser die Produktion von DNasen nicht blockierte, hemmte die Zugabe von Antibiotika die Produktion der DNasen fast vollständig [Blum et al., 1997]. Studien, über die Persistenz von DNA im Boden zeigten, dass in den Boden eingebrachte DNA schnell hydrolysiert wurde, aber immer noch nach mehr als 2 Monaten nachweisbar war [Romanowski et al., 1992; Romanowski et al., 1993a].

In einer anderen Studie, nach langfristiger Inkubation von DNA im gleichen Boden, setzten Romanowski et al. [1993a] quantitative PCR für den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen der eingebrachten Plasmide ein. Gleichzeitig wurde die aus dem Boden isolierte DNA durch Elektroporation in *E. coli* auf das Vorhandensein der intakten Plasmid-DNA überprüft. Nach 60 Tagen Inkubation war weniger als 0,2% der eingeführten Plasmid-DNA durch PCR

nachweisbar und gleichzeitig nahm die Transformationsaktivität um mehr als Faktor 10^4 bei diesem Transformationsansatz ab [Romanowski et al., 1993b]. In Studien, die unterschiedliche aquatische Habitate untersuchten, zeigte sich, dass DNA normalerweise schneller in Wasser als in terrestrischen Umgebungen degradiert wird. Jedoch unterscheiden sich die Degradationskinetiken der verschiedenen Lebensräume erheblich. So wurde das ^{32}P -markierte Plasmid pBR322 in Phosphor-limitiertem Meerwasser mit einer Kinetik von $0,4 \mu\text{g DNA l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Stunde wesentlich schneller hydrolysiert als in nicht Phosphor-limitiertem Meerwasser mit einer Kinetik von ungefähr $0,002 \mu\text{g DNA pro l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [Turk et al., 1992]. [^3H]-Thymidin-markierte chromosomale DNA von *E. coli* in oligotrophes Meeresoberflächenwasser eingebracht, wurde nach weniger als 12 h fast vollständig degradiert [Paul et al., 1987]. Für [^3H]-markierte 8-Bakteriophagen-DNA, die in oligotrophes beziehungsweise eutrophes Süßwasser inokuliert wurde, wurden Halbwertszeiten von ungefähr 4,2 und 5,5 h beobachtet [Paul et al., 1989]. pBR322-DNA zu einer Abwasserprobe hinzugefügt, wurde innerhalb von 20 Minuten vollständig in die offen zirkuläre (OC) und lineare Form umgewandelt [Phillips et al. 1989]. In Meeressedimenten hingegen wurden Halbwertszeiten von ungefähr 140 h für DNA-Moleküle errechnet [Maeda u. Taga, 1974].

Habitat	Konzentration DNA $\mu\text{g l}^{-1}$
Süßwasser	
Oligotroph ^a	1,43+-1,1 1,74
Eutroph ^b	12,1+-1,2 11,9+-8,9 6,97
Sumpf ^c	7,8
Sediment ^d	1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$
Seewasser	
Flussmündung ^e	9,4-11,6 6-44
Küste	2,0-7,0 ^f 5,0-15,0 ^g
Offene See	17,1 +- 12,7 ^h 4,6 ^g 0,5-5,0 ^g
Tiefsee (500-1500m)	0,2-0,5 ^g

Tabelle 2: Vorkommen extrazellulärer DNA in Süß- und Seewasser nach Dröge et al. (1999) verändert

a Crystal River Springs, Kings Bay, Crystal River, Florida. Proben aus 0.1-0.3 m Tiefe, b Medard Stausee, durch Landwirtschaft und Phosphat belasteter eutrophierter See, Edward Medard State Park, Valrico, Florida, c stark bewachsener Sumpf im Boyd Hill Nature Park, an den Lake Maggiore grenzend, St. Petersburg, Florida, d Fort Loudon Stausee, Knoxville, Tennessee, e Bayboro Harbor, eutrophierte Bucht in Tampa Bay, Florida, f Golf von Triest, g Golf von Mexico, h Ostsee

1.6 Schutz von DNA

Wie sich an dem oben aufgeführten Beispiel von Meeressediment verdeutlicht, wird DNA durch die Adsorption an Tonminerale geschützt [Lorenz u. Wackernagel, 1987]. Von allen Faktoren, welche die Degradation von nackter DNA im Boden beeinflussen, ist dies der mit Abstand wichtigste, was die Verweildauer von DNA in der Umwelt angeht [Lorenz u. Wackernagel, 1987, 1991b, 1994]. Dieses Phänomen und andere Schutzmechanismen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Unter den meisten Umweltbedingungen sind DNA-Moleküle negativ geladen und adsorbieren infolgedessen an z. B. positiv geladenen Randflächen von Lehmmineralien. DNA-Moleküle können aber ebenfalls auch an negativ geladenen Oberflächen, wie den Oberflächen von Lehm binden. Dies geschieht mit Hilfe von elektrostatischen Brücken, die durch zweiwertige Kationen wie Kalzium oder Magnesium aufgebaut werden [Lorenz u. Wackernagel, 1987; Lorenz u. Wackernagel, 1994; Paget u. Simonet, 1994]. Abstoßung zwischen negativen Ladungen von DNA-Molekülen und Oberflächen wird zum einen durch eine Erhöhung der Konzentration von entgegenwirkenden monovalenten Kationen sowie zum anderen durch das Verringern des pH-Wertes erreicht [Lorenz u. Wackernagel, 1994]. Wenn die Abstoßung gesenkt wird, wird Adsorption aufgrund nichtionischer van der Waals Kräfte theoretisch möglich [Lorenz u. Wackernagel, 1987]. Unterhalb von pH 5 erfolgt die Adsorption an negativ geladenen Oberflächen durch Protonierung der DNA-Basen, welches zu positiv geladenen DNA-Molekülen führt [Greaves u. Wilson, 1969].

Lehmmineralien [Khanna u. Stotzky, 1992; Paget et al., 1992] oder Sand [Aardema et al., 1983; Lorenz et al., 1988] besitzen hohe DNA-Bindungskapazitäten. Die Aufnahmekapazität von DNA an Montmorillonit, einem Lehmmineral, erhöhte sich sogar mit der Zugabe von DNA [Khanna und Stotzky 1992]. So wurde über die Adsorption von 30 mg DNA an einem Massenäquivalent von 1 g Montmorillonit berichtet [Paget et al., 1992]. Sand hingegen hat eine viel geringere Adsorption im Bereich von 1.5 - 4.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, was auch an der bedeutend geringeren Oberfläche liegt [Aardema et al., 1983; Lorenz et al., 1988].

Das Bindungsverhalten von Plasmid-DNA an ungereinigtes Material aus einem Grundwasser-Bewässerungssystem wurde von Chamier et al. [1993] analysiert. Es wurde 80 % der DNA-Menge, die an chemisch reinem Seesand als adsorbierend nachgewiesen wurde, bei dem aus dem Bewässerungssystem entnommenem Material nachgewiesen. Weiterhin wurde an unterschiedlichen Typen von sterilisierten Bodenproben das Adsorptionsverhalten von linearen Plasmiden untersucht. Ogram et al. [1994] wiesen so DNA-Bindungsraten von mehr als 1.4 mg g^{-1} nach. Im Vergleich hierzu wurde eine Bindungskapazität von ungefähr 3.6 $\mu\text{g cm}^{-3}$ bei chromosomaler DNA in sterilisierten Meeressedimenten nachgewiesen [Stewart et al., 1991].

Diese Studien zeigen also einen erheblichen Schutz der DNA gegen nukleolytische Degradation durch Adsorption an Lehmmineralien [Khanna u. Stotzky, 1992; Paget et al., 1992; Gallori et al., 1994], Seesand [Aardema et al., 1983; Lorenz et al. 1988; Romanowski et

al., 1991], Material aus einem Grundwasser-Bewässerungssystem [Romanowski et al., 1993b], sowie nicht sterilem Boden [Blum et al., 1997].

1.6.1 Laborstudien zum Schutz von DNA

An sterilem Material adsorbierte DNA aus einem Grundwasser-Bewässerungssystem ist ungefähr 1000-fach beständiger gegen DNaseI als freie Plasmid-DNA in sterilem, gefiltertem Grundwasser. Romanowski et al. [1993b] wiesen dies durch den Anstieg der säurelöslichen Radioaktivität aus ³H-Thymidin-gelabelter Plasmid-DNA nach Zugabe von DNaseI nach [Romanowski et al., 1991; 1993; 1994; Lorenz u. Wackernagel, 1987; 1990].

Weiterhin wurde der Schutz von DNA durch Adsorption an Mineralien von Khanna und Stotzky [1992] in einem Transformationsassay eindrucksvoll demonstriert. Nachdem Montmorillonit-DNA-Komplexe mit DNaseI inkubiert und anschließend mit kompetenten *B. subtilis* Zellen gemischt wurden, fand Transformation statt, jedoch stark gehemmt. Nur ca. 10% der Transformationsereignisse wie in demselben Experiment ohne Zugabe von DNaseI konnten nachgewiesen werden [Khanna und Stotzky, 1992]. Jedoch führte eine ungefähr vierfach niedrigere Menge freier DNaseI, gemischt mit der gleichen Menge ungebundener DNA, fast zur kompletten (ca. 99.8%) Hemmung der Transformation.

Ein anderes Experiment demonstrierte die unbeeinflusste Transformation von kompetenten *B. subtilis* Zellen in Anwesenheit von DNaseI, wenn chromosomale DNA an Sandkörnern bzw. an Sandsäulen adsorbiert war, bis zu einer Konzentration von 1 µg DNaseI ml⁻¹. Demgegenüber war die Transformation durch chromosomale DNA in Flüssigkultur bei 20-fach niedrigerer Konzentration von DNaseI schon stark gehemmt [Lorenz et al., 1988].

1.7 Gentransfer und Horizontaler Gentransfer in terrestrischen Habitaten

1.7.1 Verwendbarkeit adsorbierter DNA für Gentransfer

1.7.1.1 Transformation

Gentransfer mittels Transformation in natürlichen Habitaten ist von zwei Faktoren abhängig, zum einen von der natürlichen Kompetenz der Bakterienzelle, d.h. sie muss in der Lage sein nackte DNA aufzunehmen, zum anderen muss freie, nackte DNA verfügbar sein.

Die Transformationsfrequenz von DNA in terrestrischen Habitaten wurde in ersten Untersuchungen als teilweise um den Faktor 20-25 höher als unter Laborbedingungen beschrieben [Lorenz et al., 1988; Graham u. Istock, 1978]. Über 44 natürlicherweise transformierbare Bakterienarten wurden bis jetzt identifiziert [Lorenz u. Wackernagel, 1994].

Bakterien mit natürlicher Kompetenz entwickeln diese normalerweise während bestimmter Wachstumsphasen; i. d. R. während ihrer exponentiellen Wachstumsphase oder in ihrer stationären Phase wie z. B. bei *Acinetobacter calcoaceticus* oder wie bei *Pseudomonas stutzeri* im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase [Lorenz et al., 1992].

Kompetenzentwicklung in natürlichen Habitaten ist nach wie vor nur teilweise verstanden. Erste Untersuchungen in dieser Richtung erfolgten mit Agarplatten aus Bodenextrakt [Lorenz u. Wackernagel, 1991b] oder sterilen und unsterilen Mikrokosmen mit unterschiedlichem Nährstoffangebot [Nielsen et al., 1997]. Diese Untersuchungen zeigten, dass Kompetenz in der Umwelt ein verbreitetes Phänomen sein muss. Lorenz und Wackernagel [1991b; 1992] untersuchten die Auswirkung von diversen Nährstoffmängeln auf das Bodenbakterium *Pseudomonas stutzeri* und stellten fest, dass Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoff-Mangel zur Ausbildung von Kompetenz und einer 290-fachen Erhöhung der Transformationsfrequenz führt. Diese Ergebnisse konnten in einem Temperaturbereich von 20 – 37 °C mit einem Maximum bei neutralem pH erzielt werden. Unter 20 °C fiel die Transformationsfrequenz um den Faktor 2 je °C, konnte aber bis 16 °C nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen zeigten hingegen das genaue Gegenteil, nämlich dass die Zugabe von Nährstoffen bei *A. calcoaceticus* und einem marinen *Pseudomonas*-Stamm zu einer Erhöhung der Kompetenz führte [Dröge et al., 1999].

Mehrere Studien zeigten auch hier wieder die Rolle von geladenen Oberflächen bei der Transformation von natürlich transformierbaren Bakterien. Dies wurde in der Flüssigphase, welche sich unmittelbar auf Mineralien befindet, nachgewiesen, d.h. kompetente Bakterien nehmen die adsorbierte DNA direkt von den geladenen Mineraloberflächen auf [Lorenz et al., 1988; Lorenz u. Wackernagel, 1990; Chamier et al., 1993; Romanowski et al., 1993b].

Romanowski et al. (1993b) setzten eine Säule ein, die Material aus einem Grundwasser-Bewässerungssystem enthielt, an welches chromosomale DNA adsorbiert war. Die Säule wurde für 30 min mit einem zellfreien Filtrat von einer kompetenten *B. subtilis* Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurden die Säulen gespült und die durch das durchgespülte Eluat vermittelte Transformationsaktivität von *B. subtilis* gemessen. Die Transformationsaktivität entsprach nur 12% verglichen mit einer gleich langen Inkubation innerhalb der Säulenmatrix. Anscheinend wurde nur ein geringer Anteil der kompetenten Zellen im Mikrokosmos durch nicht adsorbierte DNA transformiert. Im Fall von *B. subtilis* wurde eine fünfzigfach höhere Transformationsrate mit chromosomaler DNA in den Sandmikrokosmen an den flüssig / fest Übergängen der Mineralien als in Flüssigkultur nachgewiesen [Lorenz et al., 1988].

Demgegenüber war die Transformationsrate von *P. stutzeri* [Lorenz u. Wackernagel, 1990] sowie *A. calcoaceticus* [Chamier et al., 1993] bei an Sand adsorbierter chromosomaler DNA mit der beim Einsatz von freier DNA vergleichbar. Nicht nur die Transformation von DNA-Fragmenten, sondern auch die ganzer Plasmide wurde bei *Acinetobacter calcoaceticus* beschrieben [Lorenz et al., 1992]. Die erzielte Transformationsrate mit an Sand adsorbierter

Plasmid-DNA von *A. calcoaceticus* war jedoch erheblich geringer verglichen mit freier Plasmid-DNA [Chamier et al., 1993].

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Studien die zeigten, dass adsorbierte DNA für natürliche Transformation zur Verfügung steht, berichteten Stewart et al. (1991) über DNA, die Meeressediment hinzugefügt wurde und größtenteils nicht für kompetente Bakterien erreichbar war. Die Autoren analysierten die Transformation von *P. stutzeri* ZoBell durch an Meeressediment adsorbierte chromosomale DNA. Das Beimpfen von sterilem Meeressediment mit DNA im Bereich von 0-1.0 µg cm⁻³ ergab keine signifikante Erhöhung der Transformationsfrequenzen. Wurden die Sedimente jedoch vorher mit einem Überschuss an Kalbs-Thymus-DNA gesättigt, so nahmen die Transformationsfrequenzen mit der Zunahme der DNA-Konzentration zu.

1.7.1.1 Transformation indigener Bakterien

Über den Anteil von Bakterien mit natürlicher Kompetenz in natürlichen Bakterienpopulationen ist wenig bekannt. Einige kultivierbare, heterotrophe Bakterien aus verschiedenen marinen Milieus wurden auf ihre Fähigkeit DNA in Filtertransformationsexperimenten aufzunehmen hin gescreent [Frischer et al., 1994]: Drei von 30 und 15 von 105 der Isolate wurden durch Plasmid- bzw. chromosomale DNA transformiert. Isolate welche durch Plasmid-DNA transformiert wurden schlossen die Gattungen *Vibrio* und *Pseudomonas* ein. Aus diesen Klassen sind einige Repräsentanten aus Laborexperimenten bekannt, welche natürliche Transformationssysteme besitzen. Viele, nicht weiter identifizierte Isolate besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur natürlichen Transformation. Plasmidtransformationen bei marinen Mischkulturen aus Oberflächen- und Tiefenwasser, Sedimenten, Meeresschwämmen, Holothurien und der Korallen-Deckschicht mittels Filtern auf festen Meerwassermedien erfolgten in fünf von 14 Proben [Frischer et al., 1994].

Bakterien aus Meeressedimentproben wurde in einem Experiment DNA, welche vorher aus Rifampicin-resistenten Bakterien des gleichen Sediments gewonnen wurde, angeboten und Transformation nachgewiesen [Stewart u. Sinigalliano, 1990]. Die Zahl der Rif^r Kolonien in den DNA-behandelten Proben war reproduzierbar dreifach höher als die Zahl der Kolonien, welche spontane Resistenz in den unbehandelten Kontrollproben zeigten.

1.8 Feldstudien zum HG in terrestrischen und aquatischen Habitaten

1.8.1 Terrestrische Feldstudien

Einige Feldstudien haben Horizontalen Gentransfer im Boden nachgewiesen. So beobachteten Götz und Smalla [1997] den Transfer des IncQ Plasmides pIE723 von *E. coli* zu *P. putida*. Analog zu den oben beschriebenen Laborversuchen erhöhte sich die Transferrate um das zehnfache, nachdem dem Boden Schweinejauche zugegeben wurde. Stockwell et al.

[1996] stellten Plasmidtransfer unter *Agrobacterium* sp. ohne Selektionsdruck in einer Frequenz von 10^{-4} je Rezipientenzelle fest.

Der überwiegende Teil der Untersuchungen beschäftigte sich mit der Konjugation in der Rhizosphäre [Stockwell et al., 1996; Lilley u. Bailey, 1997; van Elsas et al., 1998; Sullivan et al., 1996]. So konnte die Aquisition von Hg^{+} -Plasmiden durch genetisch veränderte *P. fluorescens* in einer Frequenz von 1 bis 1.3×10^{-2} nachgewiesen werden [Lilley u. Bailey, 1997]. Der Plasmidtransfer verschiedener Pseudomonaden konnte in unmittelbarer Nähe von Zuckerrüben nachgewiesen werden, während in 5 cm Entfernung kein Plasmidtransfer mehr nachzuweisen war [Lilley et al., 1994]. Auch diese Befunde stimmen mit den im Labor erhaltenen Ergebnissen überein. Die Mobilisierung des IncQ Plasmides pIE723 in der Rhizosphäre mittels des zuvor aus *P. fluorescens* der autochthonen Mikroflora isolierten Helferplasmides pIP02 konnte nachgewiesen werden. Transkonjuganten konnten hier mit einer CFU von $10^2 - 10^3$ je g Boden nachgewiesen werden [van Elsas et al., 1998]. Gleiche Zahlen fand Hirsch [1996] für das pSYM::Tn5 heraus. Sullivan et al. [1996] konnten nach sieben Jahren immer noch einen über HG eingebrachten genetischen Marker in der indigenen Flora nachweisen.

1.8.2 Aquatische Feldstudien

Plasmidtransfer wurde sowohl in Süßwasser [O'Morchoe et al., 1988] als auch im Besonderen in Klärwerken nachgewiesen [Marcinek et al., 1998; Mach u. Grimes, 1982].

Überraschend war hierbei, dass die eingesetzten Stämme von *Enterococcus faecalis* Plasmide in einem Fall in höherer Frequenz übertrugen als unter Laborbedingungen auf Agarplatte [Marcinek et al., 1998]. Die Autoren führten dies auf den in der Kläranlage herrschenden Stress und die zur Zeit der Messung vorherrschende Belastung durch Schwermetalle, sowie die niedrigen Temperaturen zurück. Entgegengesetzt zu diesen Ergebnissen zeigten sich in anderen Klärbecken jahreszeitliche Wechsel mit niedrigeren Transferraten im Winter und höheren im Sommer. Bei Experimenten in Seewasser [O'Morchoe et al., 1988] und dem Epilithon eines Flusses [Bale et al., 1988; Bale et al., 1988b] wurden ebenfalls Transferereignisse nachgewiesen, jedoch geringer als unter Laborbedingungen. Die Transferrate im Fluss nahm mit zunehmender Temperatur des Wassers ebenfalls zu.

1.8.3 Transformation

Verglichen mit der Zahl von Laborstudien sind nur wenige Daten aus Feldstudien bekannt, welche sich mit der Transformation autochthoner Bakterien in natürlichen Habitaten beschäftigen. Es sind kaum Daten über Transformation von Bakterien in terrestrischen Habitaten bekannt.

Eine Studie zeigte die natürliche Transformation von *A. calcoaceticus* in limnischen Habitaten durch chromosomale und plasmidäre DNA [Williams et al., 1996]. Lebende Zellen und

ein Rohlysat des prototrophen Donorstammes *A. calcoaceticus* und eines auxotrophen *A. calcoaceticus* Rezipientenstammes wurden auf separaten Filtern immobilisiert. Diese wurden zusammen an der sterilen Oberfläche von Schieferplatten, welche in einem Fluss versenkt wurden, platziert. Anschließend Transformation zu Prototrophie durch das Lysat wurde in drei unterschiedlichen Flüssen mit Frequenzen von 10^{-3} bis 10^{-6} pro Rezipient beobachtet.

Transformation durch Zellen welche DNA freisetzen konnte hingegen nur in einem Fluss nachgewiesen werden und das auch nur in einer Frequenz zwei Potenzen unter der beim Rohextrakt gemessenen. Die beobachteten Transformationsfrequenzen, sowohl die bei Einsatz des Lysates als auch bei Einsatz der Donorzellen erhöhten sich auffällig mit der Temperatur. Keine Transformation konnte während des Winters bei Wassertemperaturen zwischen 2 °C und 6 °C nachgewiesen werden. Bei der optimalen Temperatur für Transformation *in situ* waren die Transformationsfrequenzen mit denen vergleichbar, die unter Laborbedingungen auf Nährbodenplatten erreicht wurden.

Über den erfolgreichen Plasmidtransfer bei *A. calcoaceticus* auf in einem Fluss versenkten, sterilen Steinen durch Lysat und lebende Donorzellen eines Donorstammes, welcher das nichtkonjugative Plasmid pQM17 von *A. calcoaceticus* beherbergte, wurde ebenfalls von Williams et al. (1996) berichtet. Weiterhin wurde die Transformation auch eines indigenen, auxotrophen *A. calcoaceticus* Stammes des Fluss-Epilithons nachgewiesen. Hierzu wurde wiederum ein Rohlysat des prototrophen *A. calcoaceticus* Donorstammes verwandt. Dieses Lysat wurde in Kontakt mit den epilithisch vorkommenden indigenen Bakterien gebracht, worunter sich auch der nachgewiesene auxotrophe Transformant des *A. calcoaceticus* Stammes befand. Prototrophe Transformanten wurden anschließend mit einer Frequenz von 1.0×10^{-4} an den Schieferplatten im Fluss nachgewiesen [Williams et al., 1996].

Transformation ist am horizontalen Gentransfer häufig beteiligt und wie einige Experimente vermuten lassen können effektiver als z.B. Konjugation. Man könnte so weit gehen und von der in der Umwelt vorkommenden DNA als extrakorporalem Genom zu sprechen. Weiterhin zeigt sich, dass dieses Phänomen bei allen Gruppen einschließlich der Archaeen auftritt und so schon früh die Phylogenie beeinflusst haben könnte. Einige Autoren sehen hierin den treibenden Einfluss auf die bakterielle Populationsdynamik, Evolution und Speziesbildung [Lorenz u. Wackernagel, 1994]. Andere Autoren [Steward u. Carlson, 1986; Redfield, 1993] sehen in der Transformation einen weiteren Grund, nämlich die Aufnahme von DNA als Quelle für Stickstoff, Kohlenstoff und Energie, was sich ebenfalls durch einige der beschriebenen Experimente zu bestätigen scheint.

Aber auch die Konjugation ist, wie im Folgenden beschrieben wird, ein Faktor bei der Verbreitung von Genen und damit eine Triebfeder der Evolution von MO.

1.8.4 Konjugation

Wie unter 1.3.2 bereits erwähnt, ist die Konjugation sehr abhängig von dem physiologischen Status der Donor- und Rezipienten-Zellen [Dröge et al., 1999]. Wichtig ist hierbei in erster Linie eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen. Verschiedene Untersuchungen, welche diesen Zusammenhang bestätigen liegen vor [van Elsas et al., 1987; Top et al., 1990]. Es kann generell davon ausgegangen werden, dass der physiologische Status der Donorzellen entscheidend oder zumindest wichtiger ist als der der Rezipientenzellen. Versuche, in denen die Donorzellen einem Nährstoffmangel ausgesetzt waren, ergaben keine Konjugationsereignisse, wo hingegen eine Unterversorgung der Rezipientenzellen ohne Folgen blieb [Muela et al., 1994; Dröge et al., 1999]. Die gleiche Korrelation besteht im Hinblick auf die Wachstumsrate, hier ist wiederum nur die Wachstumsrate der Donorzellen von Interesse [Dröge et al., 1999]. Kroer et al. [1998] postulieren ein Grundniveau der physiologischen Aktivität welches sehr niedrig läge und Konjugation ermögliche. Sei dieses Niveau einmal erreicht, würde auch eine weitere Nährstoffzugabe keine weitere Erhöhung der Konjugationsrate bringen.

Besondere Erwähnung sollte hierbei auch die Rhizosphäre finden. Dieser Bereich des Bodens wird von einigen Autoren als besonders förderliche Zone für die Konjugation genannt [van Elsas et al., 1989]. Diese Bereiche in und um eine Wurzel unterscheiden sich grundlegend von denen in unmittelbarer Nähe, denn schon in kurzer Entfernung von einer Wurzel ist die Frequenz der Konjugation eine völlig andere. Auch der Transfer chromosomaler Marker ist in unmittelbarer Nähe der Wurzeln festgestellt worden [Troxler et al., 1997]. Versuche mit bepflanzten und unbepflanzten Mikrokosmen führten zu gleichen Ergebnissen, in einem Fall zu einer Steigerung der Rate um 2×10^4 [Smit et al., 1998; Kroer et al., 1998]. Weitere Untersuchungen stellten hierzu vertiefend fest, dass es anscheinend nicht notwendigerweise lebende Wurzeln sein müssen, um eine höhere Konjugationsrate zu erreichen. Die Autoren führen dies auf eine lokal höhere Dichte von MO an der Wurzeloberfläche zurück [Kroer et al., 1998]. Eine Zusammenfassung bekannter Wege des horizontalen Gentransfers wird in Abbildung 5 gegeben.

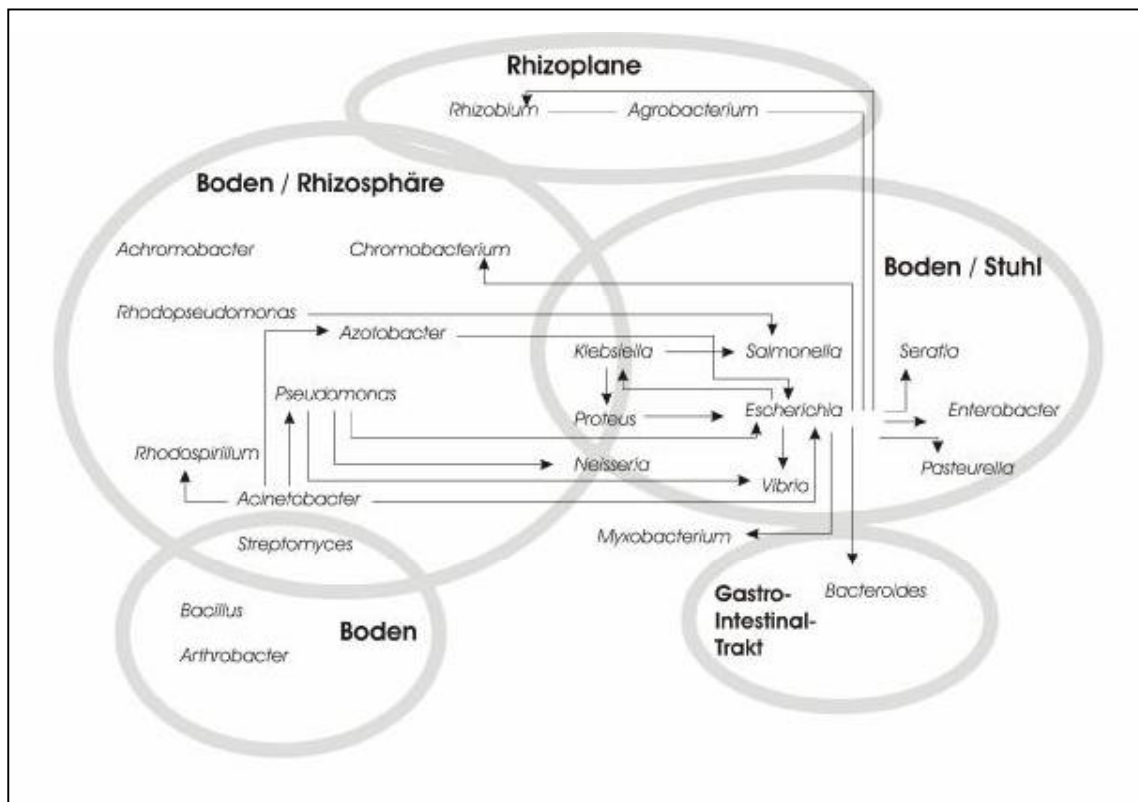


Abbildung 5: Wege des horizontalen Gentransfers. Verändert nach Schütte et al., 1998

1.9 Einflüsse auf den HG

1.9.1 Konjugation

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Anwesenheit der autochthonen Bakterienflora sich negativ auf die Konjugationsraten von Experimenten sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Systemen auswirkt [Top et al., 1990; O'Mochae et al., 1988]. Im Boden unterliegen MO einer Vielfalt von Einflüssen wie Wettbewerb, Konkurrenz oder Fraßfeinden. Der Zellmetabolismus und das Überleben sind also stark schwankenden Einflüssen ausgesetzt, welche sich negativ auf Konjugationsereignisse auswirken können. So konnte in einigen Experimenten Plasmidtransfer im Boden erst nachgewiesen werden, nachdem dieser durch Autoklavieren sterilisiert worden war [Top et al., 1990; Neilson et al., 1994]. Das Gleiche gilt für nicht steriles Seewasser und die Oberfläche von limnischem Gestein [O'Mochae et al., 1988; Bale et al., 1987]. Wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass mit einem Autoklavieren auch ein Freisetzen von Nährstoffen einhergeht, was wiederum die Konjugation (s.o.) beeinflussen kann.

1.9.1.1 Bodenbakterien als Rezipienten von Plasmiden

Der Transfer von Plasmiden auf Teile der autochthonen Bakteriengesellschaft nach Inokulation von plasmidtragenden Bakterien in nicht sterile Bodensäulen ist ein nachgewiesenes Phänomen [Henschke u. Schmidt, 1990; Smit et al., 1991; Pukall et al., 1996; Brokamp u. Schmidt, 1991]. Smit et al. berichteten von dem Transfer des IncP Plasmides RP4 von *P. fluorescens* auf indigene Bakterien der Genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Sphingomonas* und *Alcaligenes*. Diese Experimente zeigten, dass Plasmidtransfer zwischen den eingebrachten Bodenbakterien und genetisch unterschiedlichen Bakterien in unsterilen Bodensäulen stattfindet.

Gleiches wurde für die Blattoberfläche von Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris*) berichtet, die mit plasmidtragenden (RP1, IncP) *P. syringae* beimpft wurden [Björklöf et al., 1995]. Dieses konjugative Plasmid wurde auf typische Bodenbakterien wie *Pseudomonas*, *Alcaligenes* und *Xanthomonas* aber auch *Sphingobacterium* und *Enterobacter* übertragen. Ein weiteres Experiment auf den Blättern der Buschbohne mit einem *P. fluorescens* Stamm welcher das IncP Plasmid RP4 trug zeigte, dass das Plasmid auf sechs weitere *Pseudomonas spp.*, *Stenotomonas maltophilia* und vier weitere unbestimmte Gram-negative Bakterienisolate übertragen wurde [Normander et al., 1998].

Da ein Großteil der BMO nicht kultivierbar ist, kommen zum Nachweis solcher Konjugationsphänomene bei Nichtkultivierbaren auch spezielle, gentechnisch veränderte Plasmide zum Einsatz. Dahlberg et al. [1998] setzten ein Plasmid ein, das mit dem *Aequore victoria-gfp* Gen (Green Fluorescent Protein), welches Fluoreszenz verleiht, versetzt war. GFP lag in der Wirtszelle unter der Kontrolle des *lac* Promotors, der durch eine chromosomale Insertion im gleichen Stamm suprimiert wurde. So konnte gewährleistet werden, dass nur Transkonjuganten fluoreszieren. Diese Transkonjuganten wurden mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie auf Einzelzell-Ebene ausgewertet. Nachdem plasmidtragende *P. putida* Zellen mit Oberflächenwasser aus einem See vermischt wurden, konnten so verschiedene morphologische Zelltypen erfasst und Konjugationsfrequenzen zwischen 10^{-6} und 10^{-4} ermittelt werden.

Im Weiteren sollen die abiotischen Einflüsse in terrestrischen Habitaten sowohl auf den Gentransfer im Allgemeinen als auch insbesondere auf den horizontalen Gentransfer, zusammengefasst werden. Viele Bedingungen haben einen entscheidenden Einfluss darauf ob Gentransfer stattfinden kann. In vielen Parametern ist durchaus ein Selektionsmechanismus zu sehen: Welcher MO ist unter bestimmten Bedingungen in der Lage Gene zu tauschen, aber auch, welche genetischen Elemente können überhaupt von welchen MO getauscht werden.

1.9.2 Abiotische Faktoren

1.9.2.1 Feuchtigkeit

Ganz entscheidende Bedeutung hat die Feuchtigkeit auf die Verfügbarkeit z.B. von Nährstoffen und Sauerstoff im Boden und damit hat sie direkten Einfluss auf die Physiologie der Zellen.

Aber auch die Beweglichkeit der Zellen ist direkt durch die Feuchtigkeit beeinflusst. So ist z.B. bei *S. meliloti*, welche das IncP-Plasmid RP4 transkonjugieren, bei Feuchtigkeit unterhalb 20 % die Lebensfähigkeit der Zellen direkt negativ beeinflusst, wohingegen eine Feuchte von über 20 % negative Auswirkung auf das Ausbilden von Zell zu Zell-Kontakt durch den IncP kodierten starren Pilus hat [Lafuente et al.,1996]. Hier sind 20 % als das Optimum beschrieben. Es sind aber auch andere Werte von 8 – 9 % Feuchtigkeit bei anderen MO als Optimum beschrieben [Richaume et al., 1989; Bleakley u. Crawford, 1989]. Eine Prozent-angabe ist jedoch immer nur für einen MO und einen bestimmten Boden aussagefähig, da je nach Beschaffenheit des Bodens das Wasser unterschiedlichst gebunden und somit unterschiedlich verfügbar ist.

1.9.2.2 Temperatur

Einen weiteren abiotischen Faktor stellt die Temperatur dar. Hierbei muss man grundsätzlich zwischen der optimalen Temperatur für das Bakterium und jener für das Plasmid unterscheiden. Konjugation ist sowohl bei niedrigen Temperaturen von 4 - 15 °C als auch bei hohen Temperaturen von 30 - 40 °C beobachtet worden. Hier liegt der ideale Wert sicherlich in einer Kombination der optimalen Temperatur für das Plasmid und der der Donorzelle. Als Beispiel: Bei einem Konjugationsversuch in sterilem Boden zwischen *E. coli* als Donor und *Sinorhizobium fredii* als Rezipient mit dem Plasmid pBLK1-2 beobachtete man Plasmidtransfer von 5 °C bis 40 °C mit einer maximalen Transferfrequenz bei 28°C [Richaume et al., 1989]. Die optimale Wachstumstemperatur für *E. coli* liegt jedoch bei 37 °C. Wobei es hier wieder die Ausnahme gibt, dass bei Nährstoffmangel der Temperatureinfluss sehr gering zu sein scheint. So zeigte *Vibrio* unter Nährstoffmangel bei 4 und 26 °C gleiche Konjugationsraten [Goodmann et al., 1993].

1.9.2.3 pH-Wert

Der pH-Wert des Bodens kann ebenfalls Einfluss auf den physiologischen Status der Donorzellen und damit auf die Konjugation haben. Ebenso besteht durch den pH-Wert direkter Einfluss auf die Bindungsfähigkeit an Oberflächen. Gerade fixiert an Oberflächen finden, wie oben bereits beschrieben, viele Konjugationsereignisse statt. Auch die Ausbildung von Zell zu Zell-Kontakten wird durch pH und Kationenkonzentration beeinflusst. Generell ist bei einem

pH im neutralen bis leicht sauren Bereich die Konjugationsrate am höchsten [Lafuente et al., 1996]. Aber auch hier zeigt sich, dass sich Temperatur und pH-Wert synergistisch beeinflussen. Bei nicht optimaler Temperatur konnte die Konjugationsrate durch Erniedrigung des pH-Wertes erhöht werden [Singleton u. Anson, 1983].

1.9.2.4 Tonminerale

Die Gegenwart von Tonmineralen wirkt sich in zwei Effekten aus. Zum einen puffern Tonminerale (Montmorillonite und Bentonite) durch ihre Kationenaustauschfähigkeit den pH-Wert und binden so organische Bestandteile, zum anderen immobilisieren sie MO durch ihre große geladene Oberfläche und ermöglichen so Zell zu Zell-Kontakte [Stotzky, 1986]. So konnte die Plasmid-Transferrate in sterilem, sandigen Boden durch die Zugabe von Ton bis zu einer Konzentration von 15% erhöht werden. Darüber hinaus wurden die MO so immobilisiert, dass eine Abnahme des Transfers berichtet wurde [van Elsas et al., 1987].

1.9.3 Biotische Faktoren

1.9.3.1 Bodenmakrolebewesen

Arbeiten von Hoffmann et al. [1998] zeigten, dass im Magen vom Mikroarthropoden (*Folsomia candida*) ein reger Plasmidtransfer zwischen eingebrachten *E. coli* und den dort vorkommenden Gram-negativen MO stattfindet. Sie benutzten zu diesem Nachweis ein RP4-*luc* Derivat, welches einen biolumineszenten Phänotyp verleiht. Mittels 16S rRNA Analyse konnten sie eine erstaunlich große Vielfalt von \forall -, \exists - und (-Subklassen von Proteobakterien nachweisen. Dieser Nachweis ließ vermuten, dass es sich bei den Mägen der Mikroarthropoden um „Hot Spots“ für konjugativen Gentransfer bei BMO handelt [Hoffmann et al., 1998]. Es wurde von gleichen Beobachtungen im Darm des Regenwurms (*Lumbricus terrestris*) berichtet [Henschke et al., 1989].

1.9.4 Transduktion

Als weiterer Mechanismus der horizontalen Genübertragung im Boden kommt die Transduktion in Frage. Die Betrachtung der Phagen ist nicht Thema dieser Arbeit. Da aber aus den erfolgten Laboruntersuchungen und Feldexperimenten zur Rolle der Transduktion auf ein sehr hohes Potential für den Austausch von genetischen Informationen unter Bakterien in natürlichen Habitaten zu schließen ist, soll dieser wichtige Komplex doch kurz dargestellt werden. Lysogenie erscheint besonders vorteilhaft für die Aquisition von neuer DNA (siehe 1.9.5). Studien zeigen eine hohe Konzentrationen von Bakterien und eine erstaunlich hohe Konzentration von Phagen in terrestrischen, sowie aquatischen Lebensräumen [Germida u. Casida, 1983; Wommack et al., 1992; Paul et al., 1993; Campbell et al., 1995; Schrader, 1997;

Yin, 1997]. Frühere Studien, welche sich mit der Frage des Vorkommens von Phagen in terrestrischen Habitaten beschäftigten, setzten klassische Methoden wie Ausplattieren auf selektiven Agarplatten ein, um unterschiedliche Indikatorbakterien nachzuweisen. Plattentechnik ist zur Untersuchung terrestrischer Habitate immer noch die Methode der Wahl, da es schwierig ist Bodenproben so vorzubereiten, dass sie für Analysemethoden wie z.B. Mikroskopie verwendbar sind. Phagen sind im Bereich von $0-10^7$ pfu pro Gramm Boden nachgewiesen worden (siehe Tabelle 3). In aquatischen Habitaten wird die Transmissions-Elektronen-Mikroskopietechnik häufig verwendet um Konzentrationen und Morphologie der Phagen zu bestimmen [Proctor u. Fuhrman, 1990; Wommack et al., 1992]. So wurden mit dieser Methode hohe Konzentrationen von Phagen im Bereich von 10^3-10^8 ml⁻¹ in Meerwasser, marinem Sediment, Seewasser, Abwasser oder aktiviertem Schlamm ermittelt.

Tabelle 3: Vorkommen von Phagen in aquatischen und terrestrischen Habitaten

Wirtsmikroorganismen	pfu (g ⁻¹ Boden) ^a	Quelle
<i>P. putida</i>	0 – 10 ⁴	Campbell et al. (1995)
<i>Ensifer adhaerans</i>	0 – 10 ⁴	Germida u. Casida (1983)
Actinomycetes	0 – 10 ⁴	Lanning u. Williams (1982)
<i>Arthrobacter</i> Boden Isolat	0 – 10 ³	Germida u. Casida (1981)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	4 x 10 ⁷	Reaney u. Marsh (1973)
Habitat	Phagen Konzentration (ml ⁻¹) ^b	Quelle
Meereswasser	1.7 x 10 ⁶ – 1.2 x 10 ⁷	Paul et al. (1993)
Meeresediment	1.35 x 10 ⁸ – 5.3 x 10 ⁸ cm ⁻³	Paul et al. (1993)
Seewasser	2.5 x 10 ⁸	Berg et al. (1989)
Abwasser	2.2 x 10 ⁷	Ewert u. Paynter (1980)
Aktivierter Klärschlamm	9.5 x 10 ⁷	Ewert u. Paynter (1980)

Tabelle nach Dröge et al. (1999) a = Die pfu wurde mittels Transfektion von Wirtsmikroorganismen festgestellt
b = Phagen Konzentration mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie ermittelt

1.9.4.1 Einflüsse auf die Transduktion

Verglichen mit den Studien über Gentransfer in natürlichen Habitaten, Konjugation und Transformation betreffend, sind nur wenige Studien über Gentransfer mittels Transduktion in natürlichen Habitaten bekannt. Dabei scheint gerade Transduktion eine weit größere Rolle einzunehmen als bisher angenommen. Transduktion in natürlichen Habitaten wird durch Umweltparameter beeinflusst, welche sich direkt auf die Adsorption der Phagen an ihre spezifischen Wirtszellen, sowie die Bakteriophagenausbreitung auswirken. In vitro sowie in situ Experimente, die sich mit den abiotischen und biotischen Parametern hierbei auseinandersetzen, sind durchgeführt worden.

Dabei wurden als biologische Parameter der physiologische Status der Wirtszelle [Kolter et al., 1993; Kokjohn et al., 1991; Schrader et al., 1997] und die Wirtszellendichte [Wiggins u. von Alexander, 1985; Kokjohn et al., 1991; Marsh u. Wellington, 1992] untersucht.

Untersuchte relevante abiotische Parameter welche die Phagen-Adsorption und Ausbreitung beeinflussen sind die Temperatur [Seeley u. Primrose, 1980], pH-Wert [Stotzky et al., 1981] und Feuchtigkeitsgehalt des Bodens [Stotzky et al., 1981], Ionenstärke [Hayes, 1964; Primrose et al., 1982; Stotzky, 1986], und das Vorhandensein von Oberflächen [Yin et al., 1997; Zeph et al., 1988; Stotzky, 1989; Ripp u. Miller, 1995].

Laborstudien haben gezeigt, dass Bakteriophagen an Wirtszellen, welche über längeren Zeitraum unter Hungerbedingungen gehalten wurden, adsorbieren und sich in ihnen vermehren können [Kokjohn et al., 1991; Schrader et al., 1997]. Jedoch waren Latenzzeitperioden sowie Wurfgröße unter den Hungerbedingungen niedriger, verglichen mit denen die in einem nährstoffreichen Medium beobachtet wurden [Schrader et al., 1997]. Die Resultate der bekannten Experimente und Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass Transduktion auch in nährstoffarmen Habitaten stattfindet [Kokjohn et al., 1991; Schrader et al., 1997]. Studien die den Einfluss der Wirtszellendichte auf die Phage-Wirt-Interaktionen untersuchten zeigten, dass Transduktion bei natürlicherweise vorkommenden Zelldichten stattfindet [Wiggins u. von Alexander, 1985; Kokjohn et al., 1991; Marsh u. Wellington, 1992]. Das Vorhandensein von Lehmmineralien zeigt positive Effekte, sowohl auf das Überleben der Bakteriophagen als auch auf die Phage-Wirt-Interaktionen [Yin et al., 1997; Zeph et al., 1988; Stotzky G., 1989; Ripp u. Miller, 1995].

1.9.5 Feldstudien in terrestrischen und aquatischen Umgebungen

Die Transduktion der Streptomycinresistenz (Sm^r) durch den Bakteriophagen F116 von einer spontanen Sm^r *P. aeruginosa*-Mutante zu einem nicht resistenten *P. aeruginosa*-Stamm in einer Testkammer welche in einen See versenkte wurde, wurde von Morrison et al. [1978] analysiert.

Transduktion von chromosomalen Markergenen eines nicht-lysogenen *P. aeruginosa* Donorstammes zu einem lysogenen (Phage DS1) *P. aeruginosa* Rezipientenstamm in Versuchskammern, wiederum in einem See versenkt, ergaben den wechselseitigen Austausch von chromosomalen Markergenen zwischen den lysogenen und nicht-lysogenen Zellen und andersherum [Saye et al., 1990]: Interessanterweise fungierte der lysogene Stamm nicht nur als Quelle für transduzierende Phagen sondern im Verlauf des Experimentes auch als Rezipient. Lysogene Transduktanten konnten hierbei 10 bis 100fach häufiger nachgewiesen werden als Transduktanten der nicht-lysogenen Stämme. Dieses Resultat wurde durch das verbesserte Überleben der lysogenen Stämme auf Grund ihrer Immunität gegenüber Infektion durch freie Bakteriophagen erklärt. Die Autoren stellten fest, dass in Lysogenie ein Mechanismus für die Erhöhung der Größe und der Flexibilität des Genpools zu sehen sei, welcher den natürlichen Bakterienpopulationen zur Verfügung steht [Saye et al., 1990]. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass viele Bakterien, die aus terrestrischen sowie aquatischen Habitaten isoliert wurden, temperente Phagen beherbergen [Miller u. Sayler, 1992]. Zum Beispiel berichteten Ogunseitian et al. [1992], dass bis 40% der *P. aeruginosa* in

natürlichen Ökosystemen DNA-Sequenzen enthielten, welche mit Bakteriophagengenomen übereinstimmend sind.

Die Transduktion des Plasmids Rms149 zwischen *Pseudomonas* Stämmen wurde in Testkammern mit sterilem Seewasser demonstriert [Saye et al., 1987].

Ripp und Miller [1995] berichteten, dass die Konzentration von Bakteriophagen und Bakterien auf Schwebeteilchen im Wasser die Wahrscheinlichkeit von Bakteriophagenvermehrung und damit die der Transduktion erhöhen kann. Die Autoren analysierten die Transduktion des Plasmids Rms149 innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* mittels Testkammern, die in einem See versenkt wurden. Die Kammern wurden mit sterilisiertem Seewasser entweder aus einer Tiefe von 6 m oder von der Oberfläche des Sees gefüllt. Die Konzentration an Schwebestoffen im Wasser von den tieferen Proben lag ungefähr 14fach höher als die im Oberflächenwasser. Nach Inkubation der Kammern im See wurden 100 mal mehr Transduktanten in den Kammern mit den Proben aus 6 m Tiefe entdeckt als in denen, welche die Oberflächenwasserproben enthielten. Die Anhäufung der Bakteriophagen und der Bakterienzellen auf den Schwebestoffen und damit die räumliche Nähe von Phage und Wirt sorgt also aller Wahrscheinlichkeit nach für eine höhere Anzahl von Transduktanten und damit für einen höheren Gentransfer [Ripp u. Miller, 1995].

1.10 Methoden zum Nachweis von Genotypen in der Bodenmikrobiologie

1.10.1 Klassisches Screening

Ausgehend von den oben dargestellten Möglichkeiten des Gentransfers stellt sich eine zentrale Frage und zwar mit welcher Methodik man diese Wege des Austausch von genetischer Information und im Besonderen die daran beteiligten genetischen Elemente nachweisen kann.

Für Schätzungen der Anzahl von Bakterien in den terrestrischen und aquatischen Habitaten, wurden entweder die Ausplattierungsmethode, Methoden der Zellfärbung mit z.B. Acridinorange [Wommack et al., 1992] oder in situ Hybridisationsmethoden [Amann et al., 1995] verwendet. Unterschiedliche Böden wie Lehmboden [Devanas u. Stotzky, 1988; Stotzky, 1989], Waldboden [Kauri, 1978], Wüstenboden [Singleton u. Anson, 1983] oder fruchtbarer Mollisol [Metting, 1993] wurden untersucht und Bakterien in einer Anzahl von $10^4 - 10^9$ Zellen g^{-1} nachgewiesen. Andere Autoren geben Zahlen von $10^{10} - 10^{11}$ Bakterien Zellen g^{-1} Boden an [Torsvik et al., 1995]. Selenska und Klingmüller [1991] rechneten die aus Boden präparierte DNA auf Zellen zurück und kamen so auf Werte von 2×10^{10} Zellen g^{-1} Boden.

In aquatischen Systemen wie Süßwasserseen und Flüssen [Brayton et al., 1987; O'Morchoe et al., 1988], Meerwasser [Iriberry et al., 1987; Wommack et al., 1992], Flussschlamm [Fjerdugstad E., 1975], Abwasser und aktiviertem Schlamm [Altherr u. Kasweck, 1982; Fujita u. Ike, 1994], wurden Bakterienzahlen in einem Bereich von $10^3 - 10^9$ Bakterien pro ml

mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Es liegen zahlreiche Untersuchungen zu dem Vorkommen von Antibiotika- bzw. Schwer-metall-Resistenzen in Böden vor. Der Nachweis dieser und die Untersuchungen der Resistenzen und der zugehörigen Gene wurden i.d.R. an terrestrischen Isolaten durchgeführt. Ferner wurden diese Isolate auch auf weitere Resistenzen untersucht. Hier zeigen sich zwei methodische Probleme dieser konventionellen mikrobiologischen Techniken:

Durch die Auswahl des Mediums mit dem man die MO isoliert werden 90 – 99,9 % aller potentiell zu isolierenden Bodenbakterien ausgeschlossen [Trevors u. van Elsas, 1995]. Dieses Phänomen wird auch als „Viable but nonculturable bacteria“ lebensfähige aber nicht kultivierbare MO beschrieben [Colwell, 2000]. Sucht man in einer Probe ein genetisches Element, welches mit einem Marker gekoppelt ist auf den man selektieren kann, so wird man diesen wählen, um zu selektionieren.

Durch diese Wahl des Markers nach dem gescreent wird erfolgt eine weiter Vorselektion. In der Regel wird dem Medium ein Antibiotikum zugesetzt und so, aus dieser geringen Zahl aller potentiell auf einem bestimmten Medium zu isolierenden MO, wiederum der größte Teil ausgeschlossen. Des Weiteren werden so die Kopplungsgruppen der Antibiotikaresistenzgene und auch anderer Gene durch das Antibiotikum, nach welchem zuerst gescreent wurde, determiniert. Das heißt, man kann mit dieser Methodik nur einen sehr kleinen Bruchteil aller zur Verfügung stehenden Mikroorganismen und damit der gesuchten Gene einer Umweltprobe erschließen. Mit diesen „klassischen Methoden“ kann also nur ein durch die oben aufgezeigten Randbedingungen reduzierter Teil eines Habitates aufgezeigt werden. Nur ein winziges Stück des im Boden zur Verfügung stehenden „Gesamtgenomes“ kann so untersucht werden, der isolierte Bakterienstamm jedoch um so intensiver. Da man den Stamm isoliert hat besteht der Vorteil dieser Methode darin, dass mit dem isolierten BMO die Korrelationen zwischen den Phänotypen auf die gescreent wurde, den gesuchten Genen, und den Wirtszellen gezogen werden können.

1.10.2 Plasmide zum Nachweis von Transposition

Will man bestimmte mobile genetische Elemente wie z.B. Transposons in einem natürlichen aquatischen oder terrestrischen Habitat nachweisen, kann man sich einen Vorteil verschaffen, indem man ein Bodenbakterium mit einem Plamid wie z.B. pRB2138 einsetzt, welches dazu in der Lage ist Transposons „einzufangen“. Kommt es zu einer Transposition in dieses Plasmid hinein, so wird in diesem Fall eine supprimiertes Tetrazyklinresistenzgen aktiviert und phänotypisch sichtbar (siehe 2.22.4). Man kann so mit einem Screening auf Tc^r Bakterien, also einem positiven Screening, einfach nach einem Transpositionereignis suchen. Dies bedingt aber eine vorherige Aufnahme der DNA und eine anschließende Transposition in das Plasmid und nicht etwa in das Chromosom des Bakteriums. Da prinzipiell jedes transponierbare Element in das Plasmid transponieren kann, ist ein zusätzlicher Selektionsschritt auf das gesuchte Element nötig. Des Weiteren kann man in einer Probe kein

bestimmtes Gen, sprich Transposon oder IS, „suchen“, sondern ist auf ein zufälliges Rekombinationsereignis angewiesen. Eine weitere Restriktion besteht darin, dass Bakterien mit einem solchen, i.d.R. gentechnisch manipulierten, Plasmid nicht ohne Weiteres freigesetzt werden dürfen und man so auf den Einsatz von Mikrokosmen angewiesen ist, welche das natürliche Habitat nur zum Teil widerspiegeln können.

1.10.3 Ablösen von MO aus Boden

Einige Arbeiten nehmen eine Stellung zwischen den klassischen Methoden der Mikrobiologie und neueren Methoden der Molekularbiologie ein, wenn sie der Frage nach der Verteilung eines Gens in einem natürlichen Habitat nachgehen. Das Ziel dieser Methode besteht darin, die gesamten MO einer bestimmten Bodenprobe durch verschiedene Arbeitsschritte zuerst aus der natürlichen Matrix abzulösen und dann die gesamte DNA dieser Fraktion aufzureinigen (siehe 2.9).

Wie in 1.10.1 beschrieben haben diese Methoden wiederum den Nachteil, dass sie nur einen bestimmten Anteil, der im Boden befindlichen MO herauslösen können und so kein repräsentatives Bild der untersuchten Bodenprobe geben. Man erspart sich jedoch den Nachteil der Verunreinigung der präparierten Boden-DNA mit Huminstoffen wie bei einigen Methoden, welche die gesamte Bodenprobe aufschließen und so eine Extraktion der Boden-Gesamt-DNA durchführen.

1.11 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Genotypen in der Bodenmikrobiologie

1.11.1 Nachweis von DNA in Umweltproben

Seit den späten 80er Jahren wurde im Zusammenhang mit der Problematik bei Freisetzungsversuchen eine Vielzahl von Untersuchungen [Schmidt, 1991; Schmidt et al., 1990, 1989; Henschke u. Schmidt 1990a; BFR, 2001] an terrestrischen Habitaten durchgeführt, welche sich auch mit der Aufreinigung von Gesamt-DNA aus Boden beschäftigten. Hierbei sind eine Vielzahl von Methoden und Protokollen entstanden, welche sich mit der Aufreinigung von DNA aus Boden beschäftigen. So viele Studien wie seitdem vorliegen, so viele verschiedene Methoden sind auch seitdem im Einsatz. Es zeichnet sich nicht ab, dass sich eine Methode durchgesetzt hätte oder von sich behaupten könnte universell einsetzbar zu sein.

Die, zumindest finanziell, größten Anstrengungen in diesem Bereich fanden nach den Terroranschlägen am 11. September 2001 und den damit einhergehenden Anschlägen mit „Milzbrandbriefen“ statt. In den USA wurde daraufhin ein Forschungs- und Entwicklungsprogramm in Höhe von 5,6 Mrd. US-Dollar aufgelegt [House Rpt.108-037, 2003], welches auch speziell Methoden zum Nachweis von Bakterien und Viren, bzw. deren DNA, in

Umweltproben zur Serienreife führen sollte. Bis jetzt ist aus diesem Programm kein universelles Gerät oder eine universelle Methode hervorgegangen, welche gesuchte DNA schnell und zuverlässig in Umweltproben nachweisen könnte.

Will man also etwas über die Verbreitung von Genen in einem natürlichen Habitat wie dem Boden erfahren und geht davon aus, dass nur 1-10 % aller im Boden vorkommenden MO kultiviert werden können [Torsvik et al., 1995], erscheint es sinnvoll andere Methoden als diese klassischen Methoden der Mikrobiologie zu bemühen und sich direkt mit der gesamten DNA des Bodens zu beschäftigen, um so einen repräsentativen Überblick über den gesamten Pool der DNA einer Probe, einschließlich der nicht zu kultivierenden Fraktion, zu bekommen. Die ersten Techniken hierzu wurden von Torsvik und Goksoyr [1978] entwickelt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist quantitativ arbeiten zu können, da man bei der Selektion auch auf speziellen Selektionsmedien, selbst bei der kultivierbaren Fraktion, eine Verschiebung der ursprünglich im Boden vorhandenen Anzahl der MO bekommt. Dies liegt daran, dass jeder kultivierbare Mikroorganismus individuell optimale Wachstumsbedingungen besitzt und so unter den gewählten Selektionsbedingungen unterschiedlich gut wächst, was die Ergebnisse verfälscht (siehe 1.10.1).

Sollte kein Marker vorhanden sein nach dem selektiert werden kann, so hat man mit den klassischen Methoden Probleme ein bestimmtes Gen oder Ereignis nachzuweisen. Man muss in diesen Fällen zu aufwändigen und teuren Screeningmethoden greifen. Diese Methoden des phänotypischen Screenings haben den Schwachpunkt, dass man selbst mit großem Aufwand nur einen Teilausschnitt des zu untersuchenden „Genpools“ einer Probe erreichen kann.

Alle vergleichenden, qualitativen und quantitativen Aussagen über Verteilung und Vorkommen von MO, oder Aussagen über Auftreten oder Verteilung von z.B. Resistenzen aus einem Bakterienkollektiv welche mittels solcher, unter 1.10.1 beschriebenen Methoden der Vorselektion erarbeitet wurden, sind prinzipiell als nicht repräsentativ für die Gesamtheit der Probe zu betrachten.

Diese Ergebnisse haben die Einschränkung, dass man mit dem ersten Antibiotikum auf das man screenen bereits die Kopplungsgruppen ausschließt, bei denen diese Resistenz nicht vertreten ist. Dies hat zur unmittelbaren Folge, dass man Mutationen oder Varianten eines sich nur in dieser Antibiotikaresistenz unterscheidenden aber sonst identischen Elementes, wie dies z. B. bei einem Plasmid oder Transposon vorkommen kann, so nicht finden kann. Dabei sind es gerade diese Unterschiede, welche sehr viel über Evolution, Herkunft und Verteilung der gesuchten Elemente aussagen. Diese Ergebnisse sind jeweils nur repräsentativ für die Methode der Isolierung.

Will man ein repräsentatives Bild eines Phänomens wie z. B. eines Genes innerhalb einer Probe zeichnen, muss man die Gesamtheit der Gene dieses Habitates erfassen und analysieren. Dies geschieht durch Extraktion und Analyse der gesamten DNA der Probe.

So kann man alle nichtkultivierbaren Fraktionen erfassen, seien sie nun nichtkultivierbar auf Grund des gewählten Wachstumsmediums oder wegen des gewählten Selektivmarkers.

Im Folgenden soll auf diese Methodik eingegangen und ihre Prinzipien beschrieben werden.

1.11.2 DNA - Isolierung aus Proben von terrestrischen Habitaten

Den Arbeiten, welche sich damit beschäftigen aus Bodenproben die gesamte DNA zu extrahieren ist eigen, dass sie eine Kombination von extremen physikalischen Kräften wie Mahlen in Mühlen, Einfrieren und Auftauen mit flüssigem Stickstoff, Kochen, etc. mit einer weiteren oder gleichzeitigen Behandlung mit verschiedensten Chemikalien, Detergenzien und Puffern zum Aufschluss der Bodenprobe anwenden (siehe 2.9.2). Den unterschiedlichen Methoden des Aufschlusses folgen ebenso unterschiedliche Methoden der weiteren Reinigung des Bodenlysates. Selbstredend schließt eine solche Aufreinigung von Bodenproben die DNA von Pilzen, Algen, erdbewohnenden Tieren (Kleinstinsekten) und Pflanzen (Wurzelmateriale, Rotte) mit ein. Man bekommt also ein Gemisch verschiedenster DNA-Spezies, was aber bei der hohen Spezifität molekularbiologischer Methoden, wie z.B. einer PCR, den Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz nicht weiter behindert.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die Menge der aus Boden zu extrahierenden DNA-Mengen. Torsvik et al. [1978] ermittelten einen DNA-Gehalt bei Bakterienzellen aus Boden von 8,4 fg pro Zelle, womit sie sich im oberen Bereich der bei Bakterien festzustellenden Menge an DNA befinden [Torsvik et al., 1995]. Es wurden jedoch auch Mengen von 2-9 fg / Zelle in der kultivierbaren Fraktion bei Bodenmikroorganismen nachgewiesen, bei den Nichtkultivierbaren 1,6-2,4 fg. Bei angenommenen 10^{10} Zellen g^{-1} Boden macht dies eine Menge von 20-90 μg DNA g^{-1} Boden [Torsvik et al., 1995]. Selenska u. Klingmüller [1991] extrahierten bis zu 100 μg DNA aus 2 g Boden. Ausgehend von 5 fg DNA / Zelle rechneten sie so auf 2×10^{10} MO g^{-1} Boden zurück. Trevors und Cook [1992] verglichen verschiedene Methoden zur DNA-Aufreinigung aus Bodenproben und erhielten DNA Mengen zwischen 2,1 und 19,5 μg g^{-1} trockenem Boden. In weiterer Literatur sind Werte zwischen 0,4 und 187 μg DNA g^{-1} Boden beschrieben [Torsvik et al., 1995]. Bei dem Rückrechnen der DNA-Konzentration auf Zellen wird jedoch nicht berücksichtigt, dass im Boden auch andere Quellen für DNA vorhanden sind bzw. DNA auch frei vorkommt.

Recherchen ergaben, dass bis Ende 1999 in Deutschland ca. 75 Kits für die Isolierung genomischer DNA auf dem Markt erhältlich waren. Eine Marktübersicht und Beschreibung einiger Kits wurde 1996 und 2000 veröffentlicht [Mack A., 1996; Merk S., 2000]. Lediglich ein Kit, das der Fa. Bio101 war explizit zur Aufreinigung von DNA aus Boden vorgesehen. Das Stuhlkit der Fa. Qiagen war, laut Information des Herstellers, ebenfalls zur Aufreinigung von DNA aus Boden geeignet, wird jedoch als solches nicht gehandelt. Die Gewinnung der DNA beruht bei 90% der Kits auf lediglich fünf Prinzipien:

Lyse der Zellen mit Guanidiniumhydrochlorid oder Laugen, Entfernung von Inhibitoren mit Ionenaustauschern, Aufreinigung mit Phenol, Salzpräzipitation von Proteinen und Adsorption an Glas / Silica [Merk S., 2000]. Diese Kits stellen damit eine kommerzielle Adaptation der in den „klassischen“ Handbüchern der Molekularbiologie wie Ausubel et al. (1998) oder Sambrook et al. (2001) beschriebenen Methoden dar.

Diese Prinzipien sollen, da sie bei der Isolation von DNA aus Boden von entscheidender Bedeutung sind, kurz in ihren Mechanismen beschrieben werden.

1.11.2.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von DNA aus Bakterienzellen, welche sich für die anschließende Analyse mittels PCR eignet, erfordert mehrere Schritte. Zuerst muss die Zellwand lysiert werden, um die DNA zugänglich zu machen. Anschließend werden Verunreinigungen wie Proteine und andere Zellbestandteile durch Bindung der DNA an Trägermaterialien oder durch Präzipitation und Sedimentation entfernt. Die DNA wird abschließend eluiert oder resuspendiert.

1.11.2.2 Lyse der Zellen

1.11.2.2.1 Chaotrope Substanzen

Chaotrope Substanzen wie z.B. Guanidiniumhydrochlorid (GHCl), Guanidiniumisothiocyanat (GITC) oder Natriumperchlorat (NaClO_4) denaturieren Proteine der Zellwand und lysieren so die Zellen. Konzentrierte guanidiniumhaltige Lösung zerstört durch hydrophobe Wechselwirkungen die Sekundärstruktur der Proteine während die Struktur der Nukleinsäuren dagegen erhalten bleibt. [Chomczynski u. Sacchi, 1987]. NaClO_4 bindet an Proteine und löst damit auch die Proteinanteile der DNA ab [Hamaguchi u. Geiduschek, 1962]. Diese Substanzen entfernen also auch störende Enzyme wie DNasen [Alberti u. Fornaro, 1990]. Stark chaotrope Substanzen wie Guanidiniumisothiocyanat (GITC) oder Guanidiniumhydrochlorid (GHCl) wurden früher lediglich zur Isolierung von RNA eingesetzt [Chomczynski u. Sacchi, 1987], es wurde jedoch nachgewiesen, dass intakte DNA von Zellen welche mit GHCl oder Natriumperchlorat lysiert wurden, ebenfalls mittels Ethanolpräzipitation isoliert werden kann [Bowtell, 1987].

1.11.2.2.2 Enzyme

Durch den Einsatz von Enzymen (Proteinase K, Lysozym, Protease, Pronase, u.a.) werden die in der Zellwand enthaltenen Proteine „verdaut“ und somit die strukturelle Integrität der Zellwand zerstört. Proteinase K ist eine Serinprotease und wird seit 1970 für die Lyse von Zellen eingesetzt. Das keratinhydrolysierende Enzym ist in der Lage native Proteine zu hydrolysieren, indem es Peptidbindungen bevorzugt zwischen Alanin und Arginin spaltet. So werden auch störende Enzyme wie DNasen inaktiviert. EDTA wirkt laut Ebeling et al. [1974] auf die Enzymaktivität nicht inhibitorisch. Das pH-Optimum liegt zwischen 7,5 und 12,0. Der Effekt von Proteinase K kann durch den Zusatz von Natrium Dodecylsulfat (SDS) verstärkt werden [Gross-Bellard et al., 1973]. Hansen [1974] zeigte die lytischen Effekte von Proteinase K auf *Bacillus cereus*. Barry u. Gannon [1991] versetzten autoklavierte Mykobak-

terienkulturen mit Proteinase K. Nach Inkubation bei 56 °C und anschließender Hitzeinaktivierung bei 95 °C wurde die so erschlossene DNA ohne weitere Behandlung erfolgreich in der PCR eingesetzt.

1.11.2.2.3 Detergenzien

Die Zellmembran besteht aus einer Doppellipidschicht, welche sich durch den Einsatz von Detergenzien denaturieren lässt. Detergenzien sind amphipatische, oberflächenaktive Substanzen, deren nichtpolare Regionen an hydrophobe Moleküle binden und diese so in wässrige Lösung bringen. Anwendung finden sowohl ionische Detergenzien wie SDS als auch nichtionische wie Triton X-100, Tween oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Triton X-100 oder auch die Natriumsalze von SDS solubilisieren Proteine und Protein-komplexe [Ibelgauf, 1993], sowie die Histone der Nukleinsäuren [Wallace, 1987]. CTAB kann auch für die Präzipitation von Proteinen eingesetzt werden. Bei niedriger NaCl-Konzentration bilden Nukleinsäuren mit CTAB einen unlöslichen Komplex, der sedimentiert werden kann.

1.11.2.2.4 Hitze, Mikrowelle

Behandlung mit Hitze führt zur Denaturierung der Zellwandproteine. Dies macht die DNA der Zelle zugänglich. Der Effekt wird auch durch Erhitzung oder Behandlung mit Mikrowellen erreicht. Beschrieben sind DNA-Freisetzen aus Gram-positiven oder säurefesten Bakterien [Bollet et al., 1991; Goodwin u. Lee, 1993].

1.11.2.2.5 Mechanisch

Die Zerstörung der Zellwand lässt sich auch mit einer mechanischen Behandlung erreichen. Zu diesem Zweck werden die Proben zusammen mit einer speziellen Matrix (Achatkugeln, Porzellanperlen, Seesand) in einem dafür vorgesehenen Gerät zerkleinert. Nach einem Zentrifugierschritt steht das DNA-haltige Lysat für die weitere Bearbeitung zur Verfügung. Diese Methode eignet sich zur Aufbereitung komplexer und harter Ausgangsmaterialien wie Gewebe, Pflanzenteile oder Boden. So isolierten Hurley et al. [1987] mit dieser Methode DNA aus *Mycobacterium paratuberculosis*. Eine mechanische Zelllyse wird außerdem durch die Behandlung mit Ultraschall, Zerreiben mit flüssigem Stickstoff, Seesand oder Kunststoffteilen erreicht.

1.11.2.3 Gewinnung der DNA

1.11.2.3.1 Glas, Silica, mineralisches Material auf Siliziumbasis

Bei dieser Technik wird die Adsorption von DNA an eine Matrix aus Glas, Silica oder ein anderes mineralisches Trägermaterial auf Siliziumbasis in Anwesenheit von chaotropen Substanzen wie GITC oder Natriumperchlorat genutzt. Die Bindung erfolgt bei hoher Salzkonzentration [Boom et al., 1999; Merck S., 2000]. Für die Bindung von DNA an Silicaoberflächen sind hauptsächlich Wasserstoffbrücken sowie schwache elektrostatische Anziehungskräfte einhergehend mit der Abspaltung von Wasser verantwortlich. Perchlorat-anionen binden jeweils vier Wassermoleküle, was die Anzahl freier Wassermoleküle reduziert, welche die DNA zur Lösung benötigt. Dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der neutralen DNA-Silicakomplexe verschoben [Melzak et al., 1996]. In diesem Komplex gebunden können Proteine, andere Zellbestandteile und Salzverunreinigungen mittels Waschschritten entfernt werden, während die DNA gebunden bleibt. Unter Niedrigsalzbedingungen wird die DNA anschließend von dem Trägermaterial eluiert. Diese Matrix wird kommerziell in Form von Säulen oder als Suspension angeboten. Bei den Säulen werden die Proben zusammen mit einer Bindungslösung, die eine chaotrope Substanz enthält, durch die Matrix geführt. Hierbei wird die DNA reversibel an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschschritten wird die DNA mit Elutionslösung von der Matrix gelöst. Liegt die Matrix als Suspension vor, wird sie nach Binden der DNA durch Zentrifugieren sedimentiert. Das Sediment wird mit Ethanol gewaschen und die DNA anschließend mit A. bidest. oder einer Pufferlösung eluiert.

1.11.2.3.2 Salzpräzipitation

Bei der Salzpräzipitation werden nach Zellyse die Zellwand und andere Zellbestandteile durch eine hochkonzentrierte Salzlösung präzipitiert und die Proteine werden anschließend durch Zentrifugieren sedimentiert. Die DNA, die sich im Überstand befindet, wird mit Hilfe von Alkoholen gefällt, gewaschen und in Puffer oder A. bidest. aufgenommen [Miller et al., 1988]. Diese Technik ermöglicht ebenfalls Polysaccharide von Pflanzen-DNA zu entfernen [Feng et al., 1992].

1.11.2.3.3 Phenol / Chloroform

Die klassische Methode der DNA-Isolierung ist die Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol. Phenol, als organisches Lösungsmittel lysiert die Zellen, indem es die Zellwandproteine beim Ausschütteln denaturiert. Die DNA befindet sich aufgrund der polaren Gruppen ihres Zuckerphosphat-Rückgrats in der wässrigen Phase. Die hydrophoben Lipide befinden sich in der organischen Phase und die Proteine verbleiben in der Interphase

[Wallace, 1987; Borst u. Miller, 1990]. Die obere DNA-haltige Phase wird vorsichtig abgenommen und mit Chloroform als zweitem organischen Lösungsmittel versetzt. Zugabe von Isoamylalkohol verhindert hier größere Schaumbildung und stabilisiert die Trennung der Phasen [Marmur, 1961]. Nach Präzipitieren und Waschen der DNA mit Ethanol oder Isopropanol wird diese in A. bidest. oder Puffer aufgenommen.

Die klassische Aufreinigung mit Phenol ist ebenfalls als Kit erhältlich. Bei den meisten dieser Kits ist die gleichzeitige Aufreinigung von DNA und RNA sowie von Proteinen möglich. [Ausubel et al., 1998; Blin u. Stafford, 1976; Kirby, 1957]

1.11.2.3.4 Guanidiniumhydrochlorid

Die Zellen werden mit einem Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Lysispuffer lysiert und Zelldebris durch Zentrifugieren sedimentiert. Die DNA im Überstand wird mit Alkohol präzipitiert, gewaschen und anschließend in A. bidest. oder Puffer aufgenommen. [Ausubel et al., 1998; Chomczynski u. Sacchi, 1987; Sambrook et al., 1989]

1.11.2.3.5 Ionenaustauscher

DNA kann mit Hilfe von Ionenaustauschern isoliert werden. Anionenaustauscher besitzen positiv geladene Gruppen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle interagieren. Die Bindung erfolgt in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH der eingesetzten Puffer. Mittels Waschschriffen werden Verunreinigungen wie Proteine oder Kohlenhydrate von der die DNA bindenden Matrix entfernt. Die DNA wird anschließend mit einem anderen Puffer von dem Ionenaustauscher eluiert.

1.11.2.3.6 Präzipitation von DNA mit Alkohol

Im Anschluss an die Lyse der Zellen und weitere Aufreinigung wird die DNA durch Zugabe von Alkoholen präzipitiert. Die Präzipitation erfolgt entweder mit Ethanol oder mit Isopropanol. Durch Zugabe von Alkohol wird den DNA-Molekülen Wasser entzogen. Dies führt zu einer Aggregation der Nukleinsäuremoleküle und zur nachfolgenden Präzipitation [Wallace, 1987; Ibelgaufits, 1993]. Die DNA wird durch Zentrifugation sedimentiert, anschließend gewaschen und mit A. bidest. oder Puffer in Lösung gebracht.

Der Aufschluss von Zellen zur Isolierung von DNA aus verschiedensten Matrices stellt aufgrund der vielen verschiedenen Methoden an sich kein Problem dar. Der entscheidende Punkt ist die anschließende Reinigung des DNA-haltigen Lysates für anschließende Untersuchungszwecke.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von genetischen Elementen in terrestrischen Habitaten indem DNA aus Bodenproben isoliert wird. Die anschließenden Untersuchungen werden mittels PCR durchgeführt. Das Hauptproblem bei der Isolation von DNA aus Boden ist es, die DNA von den im Boden ubiquitär vorkommenden Huminstoffen zu trennen. Huminstoffe verhindern den Ablauf der PCR und sind das Hauptproblem bei der Isolation von Gesamt-DNA aus Boden [Torsvik et al., 1995]. Aus diesem Grunde soll im Folgenden die Natur der Huminstoffe beschrieben werden.

1.12 Huminstoffe

Die Isolation von DNA aus Umweltproben, speziell aus Böden, wird in erster Linie durch die im Boden vorkommenden Huminstoffe bzw. Huminsäuren negativ beeinflusst [Torsvik et al., 1995; Tebbe et al.; 1995, Asa et al., 1999; Lloyd-Jones et al., 2001; Howeler et al., 2003].

Eine anschließende weitere molekularbiologische Untersuchung der mehr oder weniger gut aufgereinigten DNA wird ebenfalls durch die vorhandenen Huminstoffe stark behindert, so dass aus diesem Grunde immer Kontrollen mitgeführt werden müssen [Torsvik et al., 1995].

Da es sich bei den Huminstoffen um ubiquitär vorkommende Metabolite handelt, welche auch ansonsten die Umwelt stark beeinflussen wird eine kurze Einleitung dieses komplexen Themas gegeben. Begrifflich leiten sich die Huminstoffe von Humus dem lateinischen Ausdruck für Boden ab.

Die Formulierung des Begriffs Huminsäure geht auf Döbereiner 1822 zurück und bezieht sich ebenfalls auf dunkelfarbiges, organisches Material im Boden. Die heute noch übliche Verwendung des Begriffs Huminsäure zur Bezeichnung der alkalilöslichen und säureunlöslichen Fraktion des organischen Materials stammt von Berzelius 1839 [Fookan, 1999]. Huminstoffe bestehen aus Huminen, insbesondere Humin- und Fulvinsäuren. Sie kommen ubiquitär vor und machen vielerorts bis zu 70% des organischen Materials aus. Neben der erwarteten Verbreitung in terrestrischen und aquatischen Habitaten, limnischen und marinen Sedimenten und Torfen finden sie sich unerwarteter Weise auch in Systemen wie z.B. antarktischen Böden bzw. Sedimenten oder sogar atmosphärischen Aerosolen [Fookan, 1999; Stevenson, 1985].

1.12.1 Vorkommen von Huminstoffen

Der Anteil an Huminstoffen innerhalb der jeweiligen Systeme variiert stark und ist dabei von vielen Faktoren wie der Bioproduktivität, dem mikrobiellen Abbau von organischem Material, Sedimentationsraten, Redox-Bedingungen sowie Korngrößenverteilungen und der vorhandenen Mineralogie [Rashid, 1985] abhängig. Der mittlere Gehalt von basisch extrahierbaren Huminstoffen am gesamten organischen Kohlenstoff mariner Sedimente liegt zwischen 25 und 50%. In alten Sedimenten variiert dieser Gehalt sogar zwischen 0,1 und 70,1%. In extremen Fällen werden für bestimmte Böden und Sedimente sogar Werte von bis

zu 90% gefunden [Rashid, 1985; Fooker, 1999]. Das Verhältnis der Huminstofffraktionen untereinander variiert ebenfalls stark. So liegt beispielsweise der Fulvinsäureanteil am basischen Extrakt bei Waldböden mit über 75% deutlich über dem Wert eines grasbewachsenen Bodens, welcher einen Anteil von nur knapp 27% Fulvinsäuren enthält [Stevenson, 1985].

Ihre Umweltrelevanz begründet sich auf ihren vielfältigen chemischen und physikalischen Eigenschaften. Da Huminstoffe sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Charakter besitzen, sind sie in fast allen ökologischen Kompartimenten der Biosphäre zu finden. Der Anteil funktioneller Gruppen am Huminstoffmolekül beträgt für Fulvinsäuren 50 - 60% und für Huminsäuren noch 20 - 30% [Rashid, 1985], was die Huminstoffe nicht nur aus analytischer, sondern besonders aus ökologischer Sicht interessant macht. Diese auch als refraktäres organisches Material bezeichneten Makromoleküle sind in der Lage, an der Oberfläche verschiedener Materialien zu adsorbieren und damit Prozesse wie Lösungsvorgänge, Fällungsreaktionen und Kristallisationen stark zu beeinflussen. Bei der Komplexierung und Zurückhaltung von Metallionen spielen die Huminstoffe eine wichtige Rolle. Dabei sind Huminstoffe kaum in der Lage monovalente Metalle zu binden, während sie mit divalenten Kationen sehr starke Wechselwirkungen eingehen. Über diese Fähigkeit Metalle (so z.B. auch Mg^{2+} bei der PCR) und kleinere organische Moleküle zu komplexieren, nehmen sie Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit und verändern somit Toxizitäten oder Nährstoffangebote. Aufgrund ihrer ausgeprägten Säure-Base-Eigenschaften spielen sie als Säure-Base-Puffer in Böden eine wichtige Rolle [van den Hoop et al., 1990; Fooker, 1999].

1.12.2 Substanzklassen

Im Gegensatz zu den meisten Stoffgruppen in der Chemie sind die Huminstoffe nicht über ihre molekulare Struktur oder Struktureinheiten, sondern über ihr Löslichkeitsverhalten in wässrigen Systemen definiert. Der Hauptgrund hierfür liegt in ihrer hohen Komplexität und Diversität, welche die Huminstoffe nicht als eine einheitliche Substanzklasse erscheinen lässt. Allgemein gesagt sind Huminstoffe komplexe Mischungen sich ähnelnder Makromoleküle mit variierenden Strukturen, Funktionalitäten und molaren Massen. Eine Fraktionierung dieses komplexen Gemisches in reine Einzelsubstanzen ist selbst mit Hochleistungstrennverfahren prinzipiell nicht möglich [Fooker, 1999]. Im Laufe der letzten zwei Jahrhunderte wurden mehrere Huminstoffuntergruppen mit unterschiedlichsten Eigenschaften entdeckt und unterschiedlich bezeichnet. Die International Humic Substances Society (I.H.S.S.) versucht seit 1981 diese Begriffe und Definitionen zu präzisieren und zu standardisieren [I.H.S.S., 1998]. Dabei geht es nicht nur um die Standardisierung der Begriffe und Definitionen, sondern vor allem auch um die Normierung von Extraktionsverfahren und Aufarbeitungsmethoden, aufgrund derer die Huminstoffe ja unterschieden und definiert werden, sowie um die Bereitstellung von Huminstoffstandards. Die heute üblichen und

anerkannten Definitionen für Huminstoffe und deren Untergruppen definieren sich nach Aiken et al. [1985]:

Huminstoffe: Gruppe von biogen gebildeten, heterogenen organischen Substanzen, die allgemein als gelb bis schwarz gefärbt, hochmolekular und refraktär charakterisiert werden können.

Fulvinsäuren: Fraktion der Huminstoffe, welche bei jedem pH-Wert in wässrigen Systemen löslich ist.

Huminsäuren: Fraktion der Huminstoffe, welche unter sauren Bedingungen ($\text{pH} < 2$) in Wasser unlöslich ist, bei höheren pH-Werten jedoch in Lösung geht.

Humine: Fraktion der Huminstoffe, welche in wässrigen Systemen bei jedem pH-Wert unlöslich ist.

Aufgrund ihrer extrem hohen Komplexität und dem Umstand, dass es wohl keine zwei identischen Huminstoffmoleküle in einer Probe oder Fraktion gibt, ist es nicht möglich, Huminstoffe durch eine exakte chemische Strukturformel darzustellen. Ein modellhafter Strukturvorschlag stammt von Haworth (Abbildung 6), mit einem Kern, an dem andere nachweisbare Komponenten mehr oder minder stark gebunden sind.

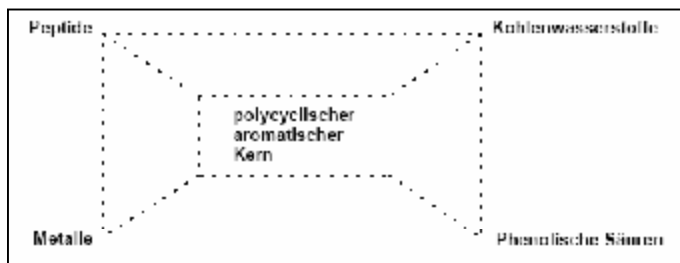


Abbildung 6: Huminstoffe: Modellstruktur nach Haworth.

Die Abbildung zeigt den modellhaften Strukturvorschlag nach Haworth (1971). Das Grundgerüst stellt hierbei ein polycyclischer, aromatischer Kern dar, an dem andere Komponenten wie Metalle, Polysaccharide, Kohlenwasserstoffe und phenolische Säuren mehr oder minder stark gebunden sind. Haworth geht davon aus, dass es sich bei diesen Bindungen sowohl um kovalente Bindungen als auch Wasserstoffbrücken handelt, die fest genug sind, vielen biologischen und chemischen Angriffen zu widerstehen [nach Fooker U., 1999].

1.12.3 Extraktion von Huminsäuren

Die Gewinnung von Huminsäuren aus Boden erfolgt nach dem von der International Humic Substances Society vorgeschlagenen Verfahren [Weber, 1999] über eine alkalische Extraktion mit Natronlauge. Unter diesen Bedingungen wird aber auch DNA mittels alkalischer Lyse aus dem Boden extrahiert. So kommt es zwangsläufig dazu, dass unter diesen Bedingungen bei der Isolierung von Boden-Gesamt-DNA auch immer Huminstoffe mit isoliert werden. Gleichzeitig steigt mit der Zeit der Durchführung der Lyse auch die Menge der

Huminstofffraktionen so sehr an, dass sie sich letztendlich nicht mehr sinnvoll von der DNA trennen lassen [Frostedgard et al., 1999]. Frostedgard et al. untersuchten 1999 zwanzig verschiedene Böden auf das Optimum des pH-Wertes zur DNA-Extraktion. Bei allen Böden stieg die Menge an extrahierter DNA mit steigendem pH-Wert. Die Verteilung der erhaltenen Mengen an extrahierter DNA war wie folgt: Für pH 6.0, 31 ∓ 13%; für pH 7.0, 43 ∓ 16%; für pH 8.0, 60 ∓ 14%; für pH 9.0, 82 ∓ 12% und für pH 10.0, 98 ∓ 63%. Für 16 der Böden wurde die größte Ausbeute bei pH 10 erreicht, bei den anderen bei pH 9. Jedoch war die Menge an mitextrahierten Huminstoffen bei pH 10 so hoch, dass die weiteren Untersuchungen der Böden mittels PCR mit den bei pH 9 erhaltenen Extrakten durchgeführt wurden [Frostedgard et al., 1999].

1.13 DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt [Mullis, 1990] und 1985 erstmals beschrieben [Saiki et al., 1985]. Sind die Basensequenzen der Enden des gesuchten DNA-Fragments bekannt, kann durch entsprechende Wahl von Primern ein gewünschtes Teilstück vervielfältigt werden. Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die zu einem definierten Bereich eines einzelsträngigen Nukleinsäuremoleküls komplementär sind. Bei der PCR lagern sie sich als Startpunkt an die entsprechenden Bereiche des komplementären DNA-Moleküls für die Neusynthese des anderen Strangs durch die DNA-Polymerase an. Die Primer werden so gewählt, dass der eine zum codogenen Strang (5'-3') und der andere zum reversen Strang (5'-3') komplementär ist. Die Länge sollte, damit eine sequenzspezifische Bindung erfolgt und bestimmte Bindungstemperaturen erreicht werden (siehe 2.27), zwischen 15 und 30 bp liegen. Die Verwendung von ineinander verschachtelten Primern, also drei oder vier Primern, ermöglicht eine sichere Kontrolle, ob es sich bei dem amplifizierten Produkt auch wirklich um das gesuchte handelt, da die in dem ersten Schritt erzeugte Sequenz als Matrize für die zweite PCR verifiziert wird. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises der Spezifität der Amplifikate erfolgt mittels Restriktionsendonukleasen. Diese schneiden die DNA an einer spezifischen Sequenz und so lässt sich aus der Länge der erhaltenen Fragmenten die Gesamtlänge ermitteln und mit der erwarteten Länge vergleichen.

1.13.1 PCR-Inhibitoren

Hemmstoffe oder Inhibitoren für die PCR finden sich zum einen in der Probenmatrix wie z.B. Boden, in dem die DNA nachgewiesen werden soll, zum anderen gelangen sie während des Vorgangs der DNA-Extraktion in die Probe. Hemmstoffe sind alle Stoffe, welche die Polymerase in ihrer Aktivität hemmen wie z.B. Huminsäuren (siehe 1.12), aber auch Detergenzien wie SDS, Tween, Triton X-100 und einige Enzyme wie Proteinase K können

die PCR ebenfalls inhibieren. Die mögliche Wirkung liegt zum einen in der Denaturierung der DNA-Polymerase, zum anderen werden die Magnesiumionen des PCR-Puffers cheliiert und stehen so der Polymerasereaktion nicht mehr zur Verfügung [Merk, 2000]. Die Konzentration der Inhibitoren kann im einfachsten Falle durch Verdünnen gesenkt werden. Eine Entfernung von vielen Inhibitoren kann schon während der DNA-Isolierung durch Bindung entweder der DNA oder der Inhibitoren an eine geeignete Matrix erreicht werden [Wilson, 1997]. Ein weiterer Faktor, speziell bei aus Boden isolierter DNA, ist auch die hohe Konzentration von DNA an sich. Huminsäuren sind bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten als primäres Hemmnis der PCR anzusehen [Torsvik et al., 1995; Tebbe et al., 1995; Asa et al., 1999; Lloyd-Jones et al., 2001; Howeler et al., 2003].

1.13.2 Kontaminationen der PCR

Ein erhebliches Problem bei der Auswertung der PCR kann die Kontamination mit unerwünschter DNA darstellen, welche durch falsche Handhabung z.B. von Pipetten oder durch Entstehen von Aerosolen, die zu untersuchende Probe kontaminiert. Da die PCR eine sehr sensitive Methode ist, genügt theoretisch ein einziges DNA-Molekül, um ein falsch-positives Ergebnis zu erhalten. Aus diesem Grund erfolgt die Planung von entsprechend geeigneten Negativkontrollen. Optimal ist ein Arbeiten in verschiedenen Räumen. Der Ansatz des Mastermixes sollte räumlich möglichst getrennt von der Probenaufbereitung erfolgen und die Untersuchung der Amplifikate wiederum räumlich getrennt. Zum Vermeiden von falsch-positiven Ergebnissen kann auch die Anzahl der PCR-Zyklen gesenkt werden [Wright u. Wynford-Thomas, 1990].

1.14 Ziel dieser Arbeit

Aufbauend auf zahlreichen, oben beschriebenen Arbeiten und mehreren in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie der Universität Kassel durchgeführten Diplomarbeiten, welche mobile genetische Elemente wie Transposons vom Typ Tn21, Tn501 oder Tn3 in vorwiegend belasteten Böden nachgewiesen haben, sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, wie sich das Vorkommen und die Verbreitung dieser Elemente in verschiedenen unbelasteten terrestrischen Habitaten darstellt. Auf diesem Wege sollte Information über die Evolution dieser Elemente erhalten werden.

Hierzu wurden verschiedene Ansätze gewählt:

In einem molekularbiologischen Ansatz sollten verschiedenste, unbelastete Böden mittels PCR auf das Vorhandensein von Leitgenen, in diesem Fall denen der Transposasen vom Typ Tn3, Tn21 und Tn501, hin untersucht werden.

Hierzu sollte ein System entwickelt werden, welches es ermöglicht, die Gesamt-DNA aus verschiedensten Böden mit diesem einen System einfach, schnell und reproduzierbar zu extrahieren, um sie anschließend der Untersuchung mittels PCR zugänglich zu machen.

In einem parallelen Ansatz sollten aus den gleichen Böden MO mittels Selektivmedien isoliert werden. Diese Isolate sollten anschließend auf genetische Marker hin untersucht werden und die Ergebnisse mit denen welche mittels PCR erhaltenen wurden, verglichen werden.

In einem weiteren Ansatz sollte der Fragestellung dieser Arbeit mittels Mikrokosmen nachgegangen werden. Hier sollte mit definierten Mikroorganismen versucht werden, die Übertragung von potentiell transponierbaren Elementen aus der autochthonen Flora unbelasteter Böden nachzuweisen und wenn möglich diese Elemente zu isolieren und zu charakterisieren.

Weiterhin sollten zwei in der Arbeitsgruppe vorhandene Bakterienkollektive auf das Vorhandensein dieser transponierbaren Elemente mittels Gensondentechnik und PCR hin untersucht werden. Eventuell vorhandene Elemente sollten isoliert und charakterisiert werden und die so erhaltenen Ergebnisse anschließend mit den Ergebnissen aus den unbelasteten Böden verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Zubehör

Dokumentation

Minolta 7000
W-Transilluminator
Image Documentation System CS-1

Minolta, Japan
Appligene, Frankreich
Cybertech, Berlin

Elektrophorese-Zubehör

Horizontalgel System
Netzgerät Macrodrive 5

Eigenbau der Abt. Mikrobiologie
LKB, USA

Elektroelutions-Zubehör

S & S Biotrap (Elutrap)
BT 1-Membran
BT 2-Membran

Schleicher & Schuell, Dassel
Schleicher & Schuell, Dassel
Schleicher & Schuell, Dassel

Zentrifugen

J2-21 Kühlzentrifuge
JA 10 Rotor
JA 20 Rotor
Biofuge 15
Eppendorffzentrifuge
Laborzentrifuge

Beckmann, USA

Heraeus Christ, Osterode
Eppendorf, Hamburg
Hermle, Gosheim

Bodensäulen

Eigenbau der Abt. Mikrobiologie

Sonstiges

Reaktionsgefäße
Petrischalen
Analysenwaage
Brutschrank
Eis-Maschine
Fastprepmaschine FP120
Elektroporationsgerät
Gene-Pulser mit Pulse-Controller
Gilson-Pipetman
Hybridisierungsöfen
Laborautoklav VST 50/70
Mikroskop BH 2
Magnetrührer IkaMag RET
Mikroprozessor pH-Meter 537
Präzisionswaage BA 610

Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
BA 110 S Sartorius, Göttingen
Memmert, Schwabach
Ziegra, Isernhagen
Bio101, USA
BioRad, München
BioRad, München
Abimed, Langenfeld
Appligene, Frankreich
Zirbus, Osterode
Olympus, Hamburg
IKA Labortechnik, StauEen
WTW, Weilheim
Sartorius, Göttingen

Roller-Inkubator	Schütt, Göttingen
Schüttelwasserbad	Julabo, Seelbad
Sicherheitswerkbank	Bleymehl, Inden
Speed-Vac UniVapo 100H	Uni Equip, Martinsried
Spektralphotometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Eching
Tisch-Autoklav HST 250	Zirbus, Osterode
Tisch-Rundschüttler	Infors, Schweiz
VacuGene XL Blotting System	Pharmacia LKB, Freiburg
Vakuumschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad W19	Haake, Karlsruhe
Wasserbad 5P	Haake, Karlsruhe
3MM Filterpapier	Whatman, England
Hybond-N Membranen	Amersham, Braunschweig
NEN GeneScreen Membran	NEN DuPont, USA
Qiabrane Nylonmembran	Qiagen, Hilden
Quickseal-Zentrifugenröhrchen	Beckmann, USA
Schraubdeckelgläschen	Wheaton, USA

Sequenzierer

LI-COR 4200	Licor, USA
-------------	------------

2.2 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Sigma, Deisenhofen
Lambda-DNA	Boehringer, Mannheim
Lithiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
dNTP (Desoxynukleotidtriphosphate)	Boehringer, Mannheim

Alle übrigen Chemikalien waren in p. a. Qualität von Merck, Darmstadt.

2.3 Antibiotika und Schwermetalle

Die folgenden Antibiotika und Schwermetalle wurden zur Selektion verwendet:

Tabelle 4: Eingesetzte Antibiotika und Schwermetalle

Name	Abkürzung	Konzentration* [µg/ml]	Hersteller
Ampicillin	Ap	100	Boehringer, Mannheim
Chloramphenicol	Cm	30	Sigma, Deisenhofen
Spectinomycin	Sp	45	Sigma, Deisenhofen
Sulfonamid	Su	500	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sm	30	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Km	50	Sigma, Deisenhofen
Trimethoprim	Tr	100	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	Tc	15	Sigma, Deisenhofen
Actidion**	Act	50	Sigma, Deisenhofen
Quecksilber(II)-chlorid	Hg	40	Merck, Darmstadt
Na-Pyrophosphat ***	NaPO	2,5 mM	Merck, Darmstadt

* Angegeben ist die Standardkonzentration im Medium

** Zusatz bei Isolierung aus Boden zum Unterdrücken von Pilzwachstum

*** Zusatz zu Tc Medium um den Hintergrund an Tc^s zu verringern

2.4 Nährmedien

Die nachfolgenden Medien wurden nach Herstellerangaben zubereitet:

I) Nutrient-Bouillon oder -Agar (N I) (Standard I-Medium, Merck): Dieses Medium wurde als Standardmedium für nichtselektive Zellanzucht von Mikroorganismen verwendet.

II) Isosensitest-Bouillon oder -Agar (Iso) (Oxoid, Wesel): Dieses Medium wurde gewählt um auf bestimmte Antibiotikaresistenzen hin selektieren zu können und dabei die Wirksamkeit einiger Antibiotika zu gewährleisten.

III) Dauerkultur-Medium (DK): Für die Aufbewahrung von Mikroorganismen über einen längeren Zeitraum wurde das folgende nährstoffarme Medium benutzt: a) Standard II-Bouillon (Merck) 0,3 g, b) Standard II-Agar (Merck) 1,0 g, beide A. bidest. ad 100 ml.

3 ml Schraubdeckelgläschen wurden mit dem Medium zu 2/3 gefüllt und dann im Autoklaven

sterilisiert. Die Bakterien wurden per Stichkultur angeimpft und bei 30°C einen Tag lang bebrütet. Falls die Kulturen gut angewachsen waren, wurden die Gläschen verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert.

IV) AIX-Medium: Dieses Medium diente zur Selektion von rekombinanten Klonen mit insertioneller Inaktivierung im β -Galaktosidase-Gen des *lac*-Operons nach der Klonierung in pUC-Vektoren. Für 1 Liter Medium wurden folgende Komponenten in gelöster Form hinzugegeben: Ampicillin 100 mg / ml A. bidest., IPTG: 50 mg / ml A. bidest., X-Gal 40 mg / ml Formamid

2.5 Molekularbiologische Testkits und Enzyme

QIAEX II	Qiagen, Hilden
Digoxigenin DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase	Uni-Kassel AG Nellen / AG Schmidt
Taq-Polymerase	Boehringer, Mannheim
ABI-Prism BigDye	ABI, USA
Terminator Cycle Sequencing Kit	
Thermostequease	Amersham Pharmacia

2.6 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 5: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz 5'-3'	Puffer (10 x)
<i>Ava</i> I	C/PyCGPaG	H
<i>Eco</i> RI	G / AATTC	H
<i>Eco</i> RV	GAT / ATC	B
<i>Bam</i> HI	G / GATCC	B
<i>Bgl</i> II	GCCNNNN / NGGC	H
<i>Bst</i> EII°	G / GTNACC	B
<i>Hind</i> II	GTPy/PaAC	B
<i>Hind</i> III	A / AGCTT	B
<i>Pae</i> I (<i>Sph</i> I)	GCATG/C	H
<i>Pst</i> I	CTGCA / G	H
<i>Rsa</i> I	GT / AC	L
<i>Sma</i> I*	CCC / GGG	A
<i>Ssp</i> I	AAT / ATT	H

° Inkubationstemperatur: 60°C,

*Inkubationstemperatur: 25°C,

Inkubationstemperatur der anderen Enzyme:

37°C; Die Schrägstriche deuten die

Schnittstellen an.

2.7 Bakterienstämme und Plasmide

Die Bakterienstämme und Plasmide, mit denen in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurde, sind mit ihren wichtigsten genetischen Eigenschaften und Angabe ihrer Herkunft (Referenz) in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst. Die Nomenklatur der genetischen Marker folgt den Vorschlägen von Novick et al. (1976) und Shaw et al. (1993).

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Marker/Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> C600+	<i>recA, thi, thr, leu, tonA</i>	Cohen et al., 1972
<i>E. coli</i> Dh5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> V517+	8 Plasmide als Größenmarker (pVA517A-H)	Marcina et al., 1978
<i>E. coli</i> SM10+	<i>thi, tier, leu, Km^r</i> , enthält RP4:: <i>Mu</i> im Chromosom	Simon et al., 1983
<i>E. coli</i> RRI+ DSM 4859	<i>leuB6, proA2, thi1, ara14, galK2, lac⁻, Sm^r</i> (Derivat von <i>E. coli</i> K12 - HB101)	DSMZ
<i>P. fluorescens</i> R2f	Rif ^r	van Elsas et al., 1988
<i>P. putida</i> "Iso"	Sm ^r , Su ^r , Sp ^r , Hg ^r	Grimme, 1995
<i>P. putida</i>	-	Grimme, 1995
<i>P. stutzeri</i> JM302	Tc ^s , <i>hisX1</i>	Sikorski J. et al. 1998

+) Alle *E. coli* -Stämme sind vom Typ K12

*) Bakterienstämme, die aus Bodenproben isoliert wurden

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [kb]	Marker/Genotyp	Herkunft/Referenz
RSF1010	8,7	<i>aphC, sulII, mob</i>	Scholz P. et al., 1989
PACYC184	3,9	Cm ^r , Tc ^r	DSMZ
pACYC184::Tn501	12,2	Cm ^r , Tc ^s :: Hg ^r	Bennett P. M. et al., 1978
pACYC184::Tn3	8,9	Cm ^r , Tc ^s :: Ap ^r	Sherratt D., 1989
pUC 18 / pUC 19	2,69	<i>bla</i>	Norrande et al., 1983
pBR322	4,36	Tc ^r , Ap ^r	DSMZ
pBR322::Tn2411	23	Tc ^r , Ap ^r :: Spec ^r , Sm ^r , Sul ^r , Hg ^r	Kratz et al., 1983
pRB2138	45	Cm ^r , Tp ^r , induzierbar Tc ^s konjugativ	Konstrukt aus: pBR322 <i>HindIII-PstI</i> - Fragment; pTR262 <i>PstI-BamHI</i> - Fragment: <i>cl</i> -Region von Bakteriophage 8; pACYC184 <i>BamHI-HindIII</i> - Fragment: ori, Cm ^r , Strukturgen für Tc ^r ; R388 <i>PstI</i> -Fragment: Tp ^r , tra [Bishop u. Sherratt, 1984]
pFLHG176HP	4,943	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Konstrukt aus pUC19 mit 2257 bp großem <i>HindII / PstI</i> Insert aus Hg17.6
pFLHG176HPP	4,127	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 1441 bp großem <i>PaeI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19
pFLHG176HPPR	3,502	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 816 bp großem <i>PaeI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19
pFLHG176HPE	4,053	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 1367 bp großem <i>EcoRI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19
pFLHG176HPER	3,576	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 890 bp großem <i>EcoRI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19
pFLHG176HPA	3,734	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 1048 bp großem <i>AvaI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19
pFLHG176HPAR	3,859	<i>bla</i>	Diese Arbeit, Subklon von pFLHG176HP mit 1209 bp großem <i>AvaI</i> Insert aus pFLHG176HP in pUC19

2.8 Mikrobiologische Diagnostika

API 20 NE	BioMerieux, Nürtingen
Bactident Aminopeptidase	Merck Darmstadt
Bactident Oxidase	Merck, Darmstadt

2.9 Isolation von Bodenbakterien aus Bodenproben

Sowohl für die Isolierung von Boden-Gesamt-DNA, als auch zur Isolierung von Boden-MO wurden Bodenproben an verschiedenen „unbelasteten“ Standorten in Kassel, Mecklenburger Seenplatte an der Kanustation Mirow und Flurstücken entlang der Bundesstraße zwischen Kassel und Marburg, Niederzwehren in Kassel und Habichtswald bei Kassel entnommen. Bei den Proben aus Kassel handelte es sich um Proben aus dem Naturschutzgebiet Dönche sowie einigen Waldstücken im Habichtswald. Bei den Proben entlang der Bundesstraße handelte es sich um, in einiger Entfernung zu der Straße liegendes, Begleitgrün älterer Waldstücke.

2.9.1 Bodenprobenentnahme

Pro Probe wurden ca. 100 g Boden aus dem oberen Ah-Horizont mit einer kleinen Schaufel entnommen und in einen Plastikbeutel gegeben. Der Beutel wurde mit einem Wattestopfen verschlossen, während des Transportes gekühlt und bei 4°C gelagert. Die Schaufel wurde zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen vor jeder Probennahme mit Wasser und 70 % Ethanol gereinigt.

2.9.2 Aufarbeitung der Bodenproben

Von jeder Bodenprobe wurden 10 g in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 10 Teilen (w/v) steriler 1,8 % Na-Pyrophosphat-Lsg. (pH 7,2) und 1 Teil (w/w) sterilen Kieseln versetzt. Diese Ansätze wurden für 30 min bei 250 rpm auf den Schüttler gestellt, um ein möglichst breites Spektrum der vorhandenen Bodenbakterien von den Bodenpartikeln zu lösen. Anschließend ließ man die Grobanteile kurz sedimentieren.

2.10 Direkte Ausplattierung von Bodenbakterien auf Selektivmedium

Der Auftrag erfolgte nachdem die Grobanteile kurz sedimentiert hatten. Der Auftrag auf die entsprechenden Selektivplatten erfolgte je nach dem anschließend verfolgten Zweck. Für Isolierung von resistenten Kolonien ist eine Anzahl von knapp unter 10^4 auf einer Platte die obere sinnvolle Grenze. Für Replika- oder Abklatsch-Techniken ist $4-5 \times 10^3$ die sinnvolle Obergrenze. Der Auftrag erfolgte je eine Verdünnungsstufe über und eine unter der gewünschten Anzahl von CFU, um sicher auf einer Platte einem verwertbaren Ausstrich zu

bekommen. Die Verdünnung wurde bei AB oder Schwermetallen als Zusatz im Selektivmedium drei bis vier Potenzen über der zu erwartenden Anzahl von $\sim 10^9$ CFU g^{-1} Boden angesetzt, da nur ein geringer Teil der BMO resistent ist.

2.11 Anreicherung von Bodenbakterien durch Flüssig-Subkultivierung

Von dem Überstand der $Na_4-P_2O_7$ Lsg. wurde 1 ml zu 25 ml selektivem Wachstumsmedium pipettiert und bei RT mit 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert, bis eine deutliche Trübung sichtbar wurde. Um das unerwünschte Wachstum von Pilzen zu unterdrücken, wurde Actidion zugesetzt. Die so behandelten Boden-Mikroorganismen wurden wiederholt in frisches Selektivmedium überimpft. Sobald die Kulturen eine $OD_{546} > 0,5$ erreicht hatten, wurden sie in einer 1:50-Verdünnung mit neuem Medium versehen und erneut bis zur oben genannten Trübung bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaliger Subkultivierung wurden die Mikroorganismen auf Selektivagarplatten ausplattiert.

2.12 Reinzucht der Antibiotika-resistenten Bakterien

Im Anschluss an die Flüssig-Subkultivierung erfolgte die Reinzucht (Vereinzelung) der Antibiotikaresistenten Mikroorganismen auf den entsprechenden Agarplatten. Jeweils 100 μ l Flüssigkultur wurden nach geeigneter Verdünnung auf einer Selektiv-Agarplatte mit einem Drigalskispatel ausgespatelt und bei 30°C für 1-2 Tage bebrütet. Einzelne Kolonien wurden dann mit einem spitzen Glasstab gepickt und im "Dreistrich Verfahren" auf neue Platten übertragen. Diese Vereinzelung erfolgte mindestens zweimal. War das makroskopische und mikroskopische Erscheinungsbild einheitlich, wurde die Kultur als Reinkultur angesehen.

2.13 Stammhaltung

Die Haltung der Bodenisolate erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden:

1. Damit die Mikroorganismen jederzeit für Versuche zur Verfügung standen, wurden die Isolate auf Agarplatten aufbewahrt. Angewachsene Platten wurden, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C im Kühlraum gelagert. Spätestens nach drei Wochen erfolgte die Überimpfung auf frische Platten.
2. Für die langfristige Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt.

2.14 Präparation von DNA

2.14.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die einzelnen Nukleotide der DNA haben ihre Absorptionsmaxima zwischen 253 nm und 271 nm bei pH 7,0. Zur Konzentrationsbestimmung nach Clark und Switzer [1977] wurde ein Aliquot der DNA-Lösung in eine Quarzküvette überführt und mit einem Spektralphotometer bei 260 nm vermessen. Folgende Näherungswerte lagen der Konzentrationsbestimmung zugrunde:

Doppelsträngige (ds) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht 50 µg / ml

Einzelsträngige (ss) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht 33 µg / ml

Einzelsträngige (ss) RNA: 1 OD_{260nm} entspricht 40 µg / ml

Verunreinigungen konnten durch die Bestimmung der Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm und Bildung der Quotienten E_{260nm} / E_{230nm} und E_{260nm} / E_{280nm} festgestellt werden. Dabei gelten folgende Richtwerte [Marmur, 1961]:

$E_{260nm} / E_{230nm} < 2,2$ und $E_{260nm} / E_{280nm} > 1,9$

2.14.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Reinkulturen

2.14.3 Plasmidpräparation nach Panayotatos [1987] , modifiziert

Dieses ist eine schnelle Methode zur Plasmidisolation. Die präparierte DNA ist anschließend für molekularbiologische Analysen geeignet.

Lösungen:

1.	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
2.	Lysozym-Stammlösung:	
	Lysozym	10 mg
	Tris/HCl, pH 8,0	1 ml
3.	LiCl-Ethanol-Lösung: (-20 °C)	
	Lithiumchlorid	0,6 M
	Ethanol	99 %
4.	Kirby-Mix:	
	Phenol	440 ml
	o-Kresol	60 ml
	Hydroxychinolin	0,1 g
	Tris/HCl, 1 M, pH 8,0	

Phenol und Kresol wurden im Wasserbad bei 70°C geschmolzen, mit Hydroxychinolin versetzt und bis zur Sättigung 2 x im Scheidetrichter mit 0,5 l Tris/HCl ausgeschüttelt.

5.	Kirby-Chloroform:	
	Kirby-Mix	1 VT
	Chloroform	1 VT

6.	Chloroform-Isoamylalkohol:	
	Chloroform	24 VT
	Isoamylalkohol	1 VT

Durchführung:

5-10 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in 0,4 ml Tris/HCl suspendiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und zum Zellaufschluss mit 50 µl Lysozymlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung vorsichtig mit 400 µl Kirby-Mix gemischt und 20 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert (13.000 rpm, RT). Der wässrige Überstand wurde abpipettiert. Trübe Überstände wurden nochmals mit 1 VT Kirby-Chloroform behandelt. Anschließend wurde durch die Zugabe von 1 VT Chloroform-Isoamylalkohol das restliche Phenol entfernt. Mit 2,5 VT 0,6 M LiCl in Ethanol wurde für 15 min bei -20°C gefällt. Durch eine 30 minütige Zentrifugation mit 15.000 rpm bei 4°C in der Kühlzentrifuge wurde die gefällte Plasmid-DNA pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgekippt und das Pellet in einer Speed-Vac getrocknet. Dieses wurde dann in 40 µl A. bidest. aufgenommen und stand nun für weiteren Analysen zur Verfügung. Im Anschluss an einen folgenden Restriktionsverdau wurde zur Beseitigung von evtl. vorhandener RNA 1 µl RNase A zugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert.

2.14.4 Plasmidpräparation nach Kado und Liu [1981], modifiziert

Diese Methode basiert auf einer alkalischen SDS-Lyse mit anschließender Abtrennung der Zellproteine durch Phenol.

Sie ist vor allem für die Präparation von größeren Plasmiden (> 20 kb) geeignet.

Lösungen:**1. TE-Puffer:**

Tris/HCl, pH 7,9	40 mM
EDTA	2 mM

2. SDS-Lösung:

Tris/NaOH, pH 12,3	50 mM
SDS	3 % (w/v)

Durchführung:

Die Zellen aus 5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation geerntet, in 130 µl TE-Puffer suspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zugabe von 265 µl SDS-Lösung wurde kräftig durchgemischt. Dann wurde die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert, mit 800 µl Kirby-Mix versetzt und die beiden Phasen durch langsames horizontales Rollen des Gefäßes durchgemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 20-30 min bei 4°C in einer Kühlzentrifuge. Der klare Überstand (20-200 µl) wurde vorsichtig mit einem 1000-µl-Pipet-

man abgezogen und konnte direkt in einer Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt werden. Um die so erhaltene DNA mit Restriktionsendonukleasen spalten zu können, wurden direkt Anschließend weitere Reinigungsschritte mit Kirby-Chloroform, Chloroform-Isoamylalkohol und eine Ethanol- oder Isopropanol-Fällung durchgeführt. Eine höhere Ausbeute an DNA erhielt man, indem man das Verhältnis von TE-Puffer und Kirby-Mix zugunsten des TE-Puffers veränderte. Auch eine erhöhte Inkubationstemperatur von 50 °C führte bei einigen Stämmen zu einer besseren Lyse und damit höherer DNA-Ausbeute.

2.14.5 Plasmidpräparation nach Allen [1994]

Diese Methode kombiniert Lysozym-Lyse mit alkalischer SDS-Präzipitation und ist für sehr große Plasmide (Megaplasmide) bis ca. 250 kb geeignet.

1. Lyse-Puffer:

Tris/HCl, pH 8,0	24 mM
EDTA	9 mM
Glucose	50 mM
Saccharose	0,73 M
Lysozym	1 mg/ml

2. SDS-Lösung:

NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)

3. Ammoniumacetat-Lsg.1:

NH ₄ Ac	7,5 M
--------------------	-------

4. Ammoniumacetat-Lsg.2:

NH ₄ Ac	2 M
--------------------	-----

5. TE-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,9	40 mM
EDTA	2 mM

Durchführung:

Die Zellen aus 0,5 - 1 l Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, in 13,5 ml Lyse-Puffer resuspendiert und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Hierauf wurden 10 ml SDS-Lsg hinzugegeben, durch Kippen gemixt und für 15 min auf Eis gelegt. Nach Zugabe von 13 ml 7,5 M NH₄Ac-Lsg wurde für weitere 15 min inkubiert. Der Überstand wurde 10 min mit 5000 rpm zentrifugiert und durch ein Baumwolltuch gefiltert. 15 ml Isopropanol wurden zugesetzt und nach weiterer Inkubation von 15 min bei RT wurde der Zellextrakt erneut für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 2 M NH₄Ac-Lsg resuspendiert und für 15 min auf Eis gelegt. Der Überstand wurde mit 2 ml Isopropanol versetzt und nach 10 min bei RT erneut 15 min mit 5000 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde 15 min bei RT getrocknet und in 250 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.14.6 Plasmidpräparation mit QIAGEN-Anionenaustauschersäulen

Durch die Verwendung von Anionenaustauschersäulen kann der Einsatz von Phenol zur Abtrennung von Zellproteinen umgangen werden. Diese Säulen sind in verschiedenen Größen, d.h. mit unterschiedlichen Bindungskapazitäten für Plasmid-DNA aber gleicher Säulenmatrix, kommerziell erhältlich. Die gleichen Säulen nur in besser Qualität werden auch als Säulen zum Aufreinigen von genomischer DNA von der gleichen Firma angeboten (s.u.) Mini-Säulen (Qiagen-tip 20) haben eine Kapazität, die auf 20 µg Plasmid-DNA begrenzt ist. Für Präparationen in größerem Maßstab stehen Midi- (Qiagen-tip 100, bis 100 µg) und Maxi-Säulen (Qiagen-tip 500, bis 500 µg) zur Verfügung. Bei dem Qiagen-System zur Plasmidpräparation erfolgt der Aufschluss der Zellen mittels alkalischer SDS-Lyse. Anschließend erfolgt an der Säulenmatrix die selektive Bindung der Plasmid-DNA. Mitgeschleppte Proteine und andere Kontaminanten werden, während die Plasmid-DNA an der Säulenmatrix gebunden ist, durch Spülen der Säule entfernt. Die Ablösung der gebundenen DNA erfolgt durch die Wahl geeigneter pH-Werte und der Salzkonzentration. Die Säulen wurden nach Gebrauch mit QF-Puffer gespült, in QBT-Puffer gelagert und abweichend von den Herstellerangaben bei Experimenten mehrfach benutzt, bei denen Kreuzkontaminationen keine Rolle spielten.

Lösungen:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | Puffer P 1: (Resuspensionspuffer), pH 8,0, +4°C | |
| | Tris/HCl | 50 mM |
| | EDTA | 10 mM |
| | RNase A | 100 µg/ml |
| 2. | Puffer P2: (Lysepuffer), RT | |
| | NaOH | 200 mM |
| | SDS | 1 % (w/v) |
| 3. | Puffer P3: (Neutralisationspuffer), pH 5,5, +4°C | |
| | Kaliumacetat | 3 M |
| 4. | Puffer QBT: (Equilibrierungspuffer), pH 7,0 | |
| | NaCl | 750 mM |
| | MOPS | 50 mM |
| | Ethanol | 15 % (v/v) |
| | Triton X-100 | 0,15 % (v/v) |
| 5. | Puffer QC: (Waschpuffer), pH 7,0 | |
| | NaCl | 1 M |
| | MOPS | 50 mM |
| | Ethanol | 15 % (v/v) |
| 6. | Puffer QF: (Elutionspuffer), pH 8,5 | |
| | NaOH | 1,25 M |
| | Tris/HCl | 50 mM |
| | Ethanol | 15 % (v/v) |
| 7. | TE-Puffer: pH 8,0 | |
| | Tris/HCl | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |

Durchführung:

Je nach Menge der zu präparierenden Plasmid-DNA und ihrer vorliegenden Kopienzahl in der Zelle (high- oder low-copy Plasmide) wurden 5 - 15 ml einer Übernachtskultur für eine Mini-Präparation mit Qiagen-tip 20, 25-150 ml oder 100-350 ml (Midi/Maxi-Präparation mit Qiagen-tip 100/500) durch 5-15 minütiges Zentrifugieren bei 8000 rpm geerntet. Das Zellpellet wurde in 0,3 (4 / 10) ml P1 resuspendiert und mit dem gleichen Volumen P2 versetzt. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Kippen vorsichtig durchgemischt und dann für nicht länger als 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 0,3 (4 / 10) ml gekühlter P3 hinzu gegeben, wieder vorsichtig durch Kippen gemischt und für 10 (15 / 20) min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Lysat für 15 (30) min mit 10.000 (15.000) rpm bei 4°C zentrifugiert und der wässrige Überstand auf eine Qiagen-tip 20 (Qiagen-tip 100/ 500) Säule aufgetragen, die zuvor mit 1 (4 / 10) ml QBT equilibriert wurde. Nach viermaligem (zweimaligem) Waschen der Säule mit jeweils 1 ml (10 / 30) QC, wurde die Plasmid-DNA mit 0,8 (5 / 15) ml QF von der Säule eluiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol zum Eluat, welches dann 30 min bei > 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde, so dass die DNA pelletiert wurde. Der Überstand wurde vollständig abgekippt, das Sediment zum Entfernen des Restsalzes mit 1 (5 / 15) ml -20 °C kaltem 70 % Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation erneut pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet in einer SpeedVac getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in einem geeigneten Volumen A. bidest. aufgenommen.

2.15 Präparation von Zell-Gesamt-DNA**2.15.1 Präparation von Bakterien-Genom mit Guanidiniumhydrochlorid mittels Qiagen-Säulen nach Günther (1996)**

Diese Methode basiert auf einer totalen Lyse aller Zellbestandteile außer der DNA. Man erreicht den Aufschluß der Zellen durch die Kombination einer Multienzym- mit einer Alkali-Lyse in zwei Schritten. Diese Methode arbeitet normalerweise mit Qiagen-Genomic-Säulen. Doch die Verwendung von Qiagen-tip 20 Säulen, welche normalerweise nur zum Aufreinigen von Plasmiden benutzt werden, brachte vergleichbare Ergebnisse. Laut Auskunft des Herstellers handelt es sich bei den Genomic-Tips lediglich um eine bessere Qualität der Plasmidsäulen.

Lösungen:

1.	Puffer P 1: (enzymatischer Lysepuffer)	
	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	50 mM
	RNase A	100 µg/ml
	Tween 20	0,5 %
	Triton X-100	0,5 %

2.	Puffer P 2:	(chemischer Lysepuffer) Guanidiniumhydrochlorid Tween 20	3M 20 % (w/v)
4.	Puffer QBT, QC und QF siehe 2.14.6		
5.	Lysozymlsg, L1:		100 mg/ml
6.	Proteinase K-Lsg, L2:		20 mg/ml

Durchführung:

Für eine Mini-Säule (tip 20) sollen nicht mehr als 4×10^9 Zellen zum Einsatz kommen. Dies entsprach 0,4-0,8 ml einer Übernachtskultur. Durch 1- 3 minütiges Zentrifugieren bei 3000 - 5000 g pelletierten die Zellen. Das Pellet wurde in 1 ml P1 resuspendiert und gevortext und nach Zugabe von 20 µl L1 und 45 µl L2 für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 0,35 ml P2 hinzugegeben, durch Kippen gründlich gemischt und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Nach 5-10 sec Vortexen wurde das Lysat auf eine Qiagen-tip 20 Säule aufgetragen, die zuvor mit 1 ml QBT equilibriert wurde. War das Lysat zu zähflüssig, wurde mit 1 VT QBT verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit jeweils 1 ml QC, wurde die DNA mit 2 x 0,8 ml QF von der Säule eluiert

2.15.2 Lyse mit Proteinase K

Zur Lyse der Bakterien wurden 20 µl der Proteinase K-Lösung mit 2 ml Lysispuffer vermischt. Die Bakterien wurden in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und eine Stunde bei 56 °C inkubiert. Durch 10 min Inkubation im Wasserbad bei 100 °C wurde die Proteinase K inaktiviert, um beim Durchführen einer PCR eine Denaturierung der *Taq*-Polymerase in der anschließenden PCR zu verhindern.

Lysispuffer Proteinase K: 10x PCR-Reaktions-Puffer 1 ml
Proteinase K (20 mg/ml) 100 µl
Tween20 50 µl
A. bidest. ad 10 ml

Der Lysispuffer wurde ohne Proteinase K hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die in A. bidest. gelöste Proteinase K wurde ebenfalls portioniert und bei -20 °C gelagert.

2.15.3 Lyse durch Hitzebehandlung

Die Proben wurden in 1 ml A. bidest. suspendiert und im Wasserbad bei 100 °C 5 min inkubiert.

2.15.4 Lyse durch Mikrowellenbehandlung

Die Proben wurden in 1 ml A. bidest. suspendiert und im Mikrowellenherd bei 650 W 2-5 min inkubiert.

2.15.5 Präparation von genomischer DNA nach Current Protocols in Molecular Biology

Bei dieser Methode erfolgt die Entfernung der denaturierten Proteine und Polysaccharide durch Komplexbildung mit CTAB in Kombination mit Phenol [Ausubel et al. 1998].

Lösungen:

1. TE-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,9	40 mM
EDTA	2 mM
2. SDS-Lösung:

SDS	10 % (w/v)
-----	------------
3. NaCl-Lösung:

NaCl	5 M
------	-----
4. CTAB/NaCl-Lsg:

CTAB	10 g
NaCl	4,1 g
A. Bideest. ad.	100 ml
5. Pronase K -lsg:

	20 mg/ml
--	----------
6. Kirby-Mix, Kirby-Chloroform, Chloroform-Isoamylalkohol siehe 2.14.3

Durchführung:

Das Zellpellet von 20 ml ÜN-Kultur (OD_{546} 1,5-2,0) wurde in 5,7 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ l SDS-Lösung und 30 μ l Pronase K -lsg. wurde die Suspension 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurden 1 ml 5 M NaCl und 800 μ l CTAB/NaCl Lösung zugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die restlichen Proteine wurden durch 1VT Kirby-Mix extrahiert (siehe 2.14.3). Dieses Verfahren wurde mit dem wässrigen Überstand erst mit 1 VT Kirby-Chloroform und danach mit 1 VT Chloroform-Isoamylalkohol wiederholt. Je 80 μ l dieses so gewonnenen Überstandes wurden in ein Eppendorf-Cup überführt und die DNA mit 0,7 VT Isopropanol gefällt. Die DNA wurde im Cup getrocknet und bei -20 °C gelagert.

2.16 Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse

Die Aufschlussmethoden wurden ebenfalls auf die Vollständigkeit der Lyse der eingesetzten Bakterien hin untersucht. Es wurde jeweils der mit exogenen Bakterien versetzte Boden mit den entsprechenden Methoden behandelt und anschließend daraufhin untersucht, wie viele von den zugesetzten Bakterien bzw. den autochthonen Bakterien anschließend nachgewiesen werden konnten. Es wurden standardmäßig 10^6 Zellen g^{-1} Boden eingesetzt. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die eingesetzten, pUC19 beherbergenden Bakterien, hier *P. stutzeri* und *E. coli*, auf AIX- Medium in blauen Kolonien wuchsen. Alle Präparationsmethoden wurden so

auf die Vollständigkeit ihrer Lyse hin untersucht. Das Debris der Bodenpräparationen wurde hierzu in 1 ml 0,9% NaCl-Lsg. aufgeschlämmt und, nachdem sich die Lösung durch Sedimentieren wieder geklärt hatte, 150 µl ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte ÜN bei 37 °C für *E. coli* und bei 18 °C für *P. stutzeri*, jeweils 48 h auf AIX Medium. Ein weiteres Überimpfen von 150 µl dieser Lösung auf NI-Medium zum Überprüfen des Gesamtwachstums, erfolgte bei allen Aufschlussmethoden. Der unaufgeschlossene Boden wurde ebenfalls ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte bei RT für 48 h. Allen Platten war Actidion zugesetzt um Pilzwachstum zu verhindern.

2.17 Isolierung von Gesamt-DNA aus Boden

2.17.1 Aufschluss von Boden mit Fastprep-System nach Günther

Bei dieser Methode handelt es sich um einen physikalischen Aufschluss von Boden und allen darin befindlichen Zellen. Hierbei wird nicht zwischen MO und anderen Zellen unterschieden.

Lösungen:	QBT-Puffer	siehe 2.14.6
	QC-Puffer	siehe 2.14.6
	QF-Puffer	siehe 2.14.6
	MP (Milchpulver-Stammlsg.) :	0,4 g / ml QBT-Puffer
	Isopropanol	100 %ig
	Ethanol	70 %ig -20 °C
Material:	Aufschluss-Cups	

Vorbereiten der Aufschluss-Cups:

Hierzu wurden verschraubbare 2 ml Reaktionsgefäße mit Standfuß wie folgt befüllt:

Glasperlen je	0,7 g
Seesand (ausgeglüht)	0,4 g
Glaskugel	1

Das Gewicht aller Cups wurde mit Sand austariert.

Durchführung:

Die Aufschluss-Cups wurden mit 0,5 g des gut durchmischten Bodens befüllt, wobei möglichst keine größeren Festkörper eingefüllt wurden. Anschließend wurden 900 µl QBT-Puffer zugesetzt, sowie 100 µl MP-Stlsg. Die Cups wurden nicht mehr als zu 7/8 befüllt.

Der Aufschluss erfolgte in der „Fastprepmaschine“ FP120, Stufe 5,5 für 30 sec. Bei 14000 rpm 3 min wurde abzentrifugiert, war der Überstand immer noch trübe wurde er für weitere 2-3 min zentrifugiert.

War der Überstand noch bräunlich, wurde er mit weiterer MP-Stlsg. versetzt und erneut zentrifugiert. An dieser Stelle kann mit Puffer P2 und P3 gefällt werden, falls der Überstand zu viskos oder trüb ist. Der Überstand war nun bereit zum Auftragen auf die Anionenaustauschersäule Qiagen-Tip 20 oder Genomic-Tip 20 (siehe 2.14.6).

2.18 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Um anschließend der Frage nachzugehen, ob innerhalb einer Bodenprobe der gleiche, natürlicherweise vorkommende genetische Marker wiedergefunden werden kann, wurden sowohl die vorhandenen Bodenprobe als auch später, durch das Nehmen weiterer Bodenproben am gleichen Ort, die Böden bei denen ein Transposasegen nachgewiesen werden konnte, weiter untersucht.

Aus der vorhandenen Bodenprobe wurden weitere Aliquots genommen und auf das Vorhandensein von Transposasgenen untersucht. Es wurde aus jeweils fünf weiteren Aliquots DNA isoliert und auf das Vorkommen von *tnpA* mittels PCR untersucht. Des Weiteren wurden um den Entnahmeort der Probe je drei weitere Proben genommen und von diesen Proben je sechs Aliquots, also insgesamt 18 Präparationen pro Fundstelle, auf das Vorhandensein von *tnpA* hin untersucht. Bei einigen der Böden, bei denen in der Präparation der ersten Bodenprobe keine Transposase nachgewiesen werden konnte, wurde ebenfalls mehrfach präpariert. Weiterhin wurden neue Bodenproben an der gleichen Stelle genommen und nochmals präpariert.

2.19 Nachweis und Charakterisierung von DNA

2.19.1 Einsatz von Restriktionsendonukleasen

Für die Charakterisierung von Plasmid-DNA wurde diese durch Typ-II-Restriktionsendonukleasen in spezifische Fragmente gespalten. Restriktionsenzyme dieser Art erkennen spezifische kurze DNA-Sequenzen (Tetra- bis Hexanukleotide) und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz. Dabei können glatte (blunt ends) oder überstehende (sticky ends) Enden entstehen [Winnacker, 1985].

Die enzymatische Verdauung präparierter Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben, normalerweise in einem Ansatz von 30-100 µl Gesamtvolumen mit 3-10 µl Enzympuffer (10x) und ca. 10 U Restriktionsenzym bei der angegebenen Temperatur für 60 min. Dafür wurde eine DNA-Konzentration von möglichst nicht mehr als 1 µg/U gewählt.

2.19.2 Nachweis von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Dies macht man sich beim Auftrennen von DNA zu Nutze. Im Agarosegel wird DNA elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt, d. h. sie wandert im elektrischen Feld. Dabei ist die Beweglichkeit linearer DNA-Fragmente innerhalb eines bestimmten Größenbereiches proportional dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte [Sambrook, 1989].

Lösungen:

1. Elektrophorese- (TBE-) Puffer: (10 x)

Tris	154,5 g
Borsäure	26,2 g
EDTA	9 g
A. bidest. ad.	1000 ml
2. Agarosegel:

Agarose	0,7 - 1,2 % (w/v)
TBE-Puffer (10 x)	0,1 VT
3. Farbmarder: (10x)

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Ficoll 400	1,5 % (w/v)
4. Ethidiumbromid-Färbelösung:

Ethidiumbromid	1 mg /l
----------------	---------

Durchführung:

Es wurden horizontale Submers-Agarosegele der Größe 25 x 20 und 8 x 10 cm hergestellt. Für große Gele wurden 400 ml und für kleine Gele 80 ml, bzw. 20 ml Agarose-Lösung zubereitet und in Plexiglaswannen mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresewanne gesetzt und mit den DNA-Proben beschickt, die zuvor mit 0,1 VT Farbmarder (bei ungeschnittenen Plasmiden bis zu 1 VT Farbmarder um ein Auftreiben der Proben zu verhindern) versetzt wurden. Die Elektrophorese der großen Gele erfolgte bei 40 V (100 mA) über Nacht, die der kleinen Gele bei 80 - 100 V für ca. 2 h, bzw. für 20-30 min bei 20 ml Gelen. Anhand der mit aufgetragenen Größenstandards konnte die Größe unbekannter Plasmide oder DNA-Fragmente bestimmt werden. Als Größenstandards für ungeschnittene DNA dienten die Plasmide aus *E. coli* V517 (pVA5 17 A-H) sowie die Plasmide RP4 und RSF1010, für geschnittene DNA wurde mit *Pst*I geschnittene λ -Phagen-DNA verwendet. Nach 5 - 30 minütiger Färbung im Ethidiumbromid-Färbegrad wurde die DNA auf einem UV-Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht. Man macht sich hierbei zu Nutze, dass Ethidiumbromid zwischen DNA-Basen interkaliert und in UV-Licht fluoresziert.

2.20 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAEX II

Durch Einsatz eines Silica-Gels (QIAEX II) können DNA-Fragmente selektiv aus Agarosegelen extrahiert werden. In Gegenwart einer hohen Salzkonzentration bindet die DNA an diese Matrix. Nach den anschließenden Waschvorgängen kann die DNA mit Wasser eluiert werden. Die auf diese Weise gewonnene DNA kann z.B. in Ligations- oder Markierungsreaktionen eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie im Gegensatz

zu anderen Methoden ohne Natriumjodid auskommt. Hierdurch wird die Effizienz von enzymatischen "downstream" Reaktionen nicht durch noch vorhandenes NaI reduziert.

Lösungen:

1. Matrix (QIAEX II)
2. Puffer QX 1™
3. Waschpuffer PE
4. Na-Ac, pH 5,0 3M

Durchführung:

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden einzelne DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Je nach Gewicht der Gelstücke und der Größe der ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurde die entsprechende Menge an QX 1-Puffer und QIAEX II zugegeben. Um den für die effektive Adsorption benötigten pH-Wert von <7,5 zu gewährleisten, wurden 10 µl Na-Ac zugegeben. Durch Erhitzen auf 55°C im Thermoblock unter mehrfachem Vortexen wurde die Agarose restlos geschmolzen und gelöst. Anschließend wurde der Matrix-DNA-Komplex durch kurze Zentrifugation (30 s) in der Eppendorffzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet noch einmal mit QX 1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde durch zweimaliges Waschen mit PE-Puffer und Zentrifugieren von Salzresten befreit. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und dann in 25 - 50 µl A. bidest. resuspendiert, um die DNA von der Matrix zu lösen. Nach 5 min wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert; die in ihm enthaltene DNA stand nun zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

2.21 Elektroelution mittels Elutrap (Biotrap)

Bei der Elektroelution werden geladene Moleküle durch ein elektrisches Feld aus einem Elektrophoresegel herausgelöst. Nach der Auftrennung von DNA durch Agarosegel-Elektrophorese wurde der Gelabschnitt, welcher die DNA von Interesse enthielt, herausgeschnitten und zu ca. 5 x 5 mm großen Würfeln zerkleinert. Anschließend erfolgte das Einlegen der Würfel in die Elutionsvorrichtung. In der verwendeten Biotrap erfolgte die Separation innerhalb einer von zwei Membranen begrenzten Kammer über eine spezielle Membran hinweg und das Eluat kann anschließend aus einer separaten Sammelkammer abpipettiert werden. Die Elution lief über Nacht bei 80-100 V, so dass sich am nächsten Morgen ca. 500 - 1000 µl Eluat, welches die gesuchte DNA enthielt, aus der Falle entnehmen ließ. Die Elution lief in demselben Puffer, in dem die ursprüngliche Gelelektrophorese stattfand.

2.22 Nachweis von Plasmidfunktionen

Konjugativer Plasmidtransfer

2.22.1 Agarplattenmating

Je eine Kolonie eines Donor- und Rezipientenstammes wurde in der Mitte einer für beide Stämme selektiven Agarplatte oder NI-Platte vermischt und nach 2-6 h im Brutschrank über die gesamte Platte ausgestrichen. Übernachten gewachsene Kolonien wurden präpariert und auf Plasmide hin untersucht.

2.22.2 Flüssigmating

Alternativ zu 2.22.1 wurden Zellen übernachten selektiv angezogen, abzentrifugiert und in nicht selektivem Medium resuspendiert. Die so erhaltenen Flüssigkulturen des Donor- und Rezipientenstammes wurden gemischt und bei 30 °C ohne Schütteln für 2 - 3 h inkubiert und anschließend selektiv ausplattiert.

2.22.3 Transformation durch Elektroporation kompetenter Zellen

Bei dieser Methode wird die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran durch das kurzzeitige Anlegen einer hohen Spannung vorübergehend erhöht. Gleichzeitig angebotene DNA kann von den Zellen nun aufgenommen werden.

Für die Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation durch Elektroporation wurden die Bakterienzellen aus einer ÜN in frisches Medium überimpft. Bei einer OD_{546} von 0,5 - 1 wurden die Zellen bei 8000 rpm, 10 min, 4°C geerntet. Dann wurden die Zellen zweimal mit kaltem, sterilem Leitungswasser gewaschen, anschließend in kaltem Leitungswasser aufgenommen und zu 200 µl aliquotiert auf Eis gestellt. Es kamen auch kompetente Zellen zum Einsatz, welche als Zellsuspension bei -20 °C in einer Lösung aus 25 % Glycerin und sterilem Leitungswasser gelagert wurden waren. Diese Zellsuspension wurde ebenfalls zu 200 µl aliquotiert und kam wie die Aliquots in Leitungswasser zum Einsatz. Diese Aliquots wurden mit Vektor- oder Plasmid-DNA versetzt und in einer vorgekühlten Elektroporations-Küvette (Elektrodenabstand: 0,2 cm) im BioRad Gene-Pulser bei einer Geräteeinstellung von 2,5 kV, 200 Ohm und 25 µFD elektroporiert. Bei diesen Einstellungen wird eine Feldstärke von 12,5 kV/cm erreicht. Danach wurden die Zellen sofort mit 2 ml Iso-Medium aus den Küvetten in ein Reagenzglas gespült und für 1 h bei RT bei langsamer Drehung auf einem Inkubationsroller inkubiert. Nach anschließendem Abzentrifugieren wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen auf Selektivmedium (i.d.R. AIX) ausplattiert und über Nacht bebrütet. Von diesen Platten wurden die Klone vereinzelt. Eine Kontrolle der Elektroporationsergebnisse erfolgte durch charakteristisches Schneiden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen oder PCR und anschließendem Auftrennen der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese.

2.22.4 Nachweis von Transpositionseignissen mittels Plasmiden

Zum Nachweis von Transpositionseignissen können Plasmide eingesetzt werden. Diese Methode wird unter Laborbedingungen angewandt um transponierbare Elemente und deren Fähigkeit zur Transposition nachzuweisen [McGregor, 2003, Bishop u. Sherratt, 1984; Gerlach u. Wiedemann, 1985]. Transponiert ein Element in solch einer Weise in ein Plasmid, dass sich der Phänotyp des MO ändert, so kann man nach dem veränderten Phänotyp screenen und so eine Transposition nachweisen. Dies kann grundsätzlich nach drei Vorgehensweisen erfolgen:

Durch Insertion eines Elementes in ein Plasmid kann der MO eine zusätzliche Eigenschaft hinzugewinnen, welche sich im Phänotyp äußert und nach der gescreent werden kann (siehe 1.1.1.) Als zweite Möglichkeit kann sich durch Inserieren eines Elementes in ein Gen des Plasmides der Phänotyp eines MO so ändern, dass eine Eigenschaft des MO entfällt oder drittens kann ein Plasmid so konstruiert sein, dass durch Insertion in einen bestimmten Bereich ein bestimmter Phänotyp ausgebildet wird. Im ersten Fall kann man nie ganz sicher sein, ob eine Transposition stattgefunden hat oder der MO ein weiteres Plasmid erworben hat, welches den Phänotyp verändert. Im zweiten Fall ist man auf eine aufwändige Replikatechnik angewiesen. Der letzte Fall hingegen ermöglicht ein schnelleres Positivscreening, da man nicht auf Replikatechnik angewiesen ist. Alle Methoden haben den Vorteil, dass man das transponierte Element anschließend in dem Plasmid inseriert vorliegen hat und so leichter präparieren und charakterisieren kann. Einen weiteren Vorteil bietet der Einsatz eines mobilisierbaren Plasmides, da viele Transposons, gerade aus Umweltproben, nicht konjugieren bzw. auf nicht mobilisierbaren Plasmiden liegen [Bennett u. Grinstead, 1988].

2.22.4.1 Nachweis von Transpositionseignissen mittels Plasmid pRB2138

Das konjugative Plasmid pRB2138 dient dem Nachweis von Transpositionseignissen.

Theorie/Funktion: Die Tc-Resistenz aus pBR322 steht unter Regulation des λ -Repressors *cI* und der Promotoren $P_{M/R}$. P_M ist direkt für die Expression der Tc-Resistenz verantwortlich. Das Plasmid verleiht einen Tc^s Phänotyp solange der Repressor *cI* intakt ist und expremiert wird. Inseriert nun ein Transposon oder IS-Element in diesen 0,5 kb großen Bereich, wird das *cI*-Repressorprotein nicht mehr gebildet und der Phänotyp wird Tc^r. So wird ein einfaches Screening auf Tc^r Kolonien möglich. Desweiteren ist pRB2138 so konstruiert, dass es 2 *ori*s (R388, pACYC184) enthält. Hiermit soll es auch möglich sein, intramolekulare Transposition, deren Resultat ein Zerfall des Plasmides in zwei Teile wäre, als 2 Replikons wiederzufinden. Hierfür sorgt auch die Größe von R388, welches ca. 40 kb an primärem Transpositionsziel zur Verfügung stellt [Bishop u. Sherratt, 1984].

pRB2138 ermöglicht ein positives Screening. So können schnell größere Mengen an Material untersucht werden, was bei nachzuweisenden Phänomenen mit geringer Häufigkeit von großem Vorteil ist. Auch kann mit diesem Plasmid die Transpositionsfrequenz bestimmt werden.

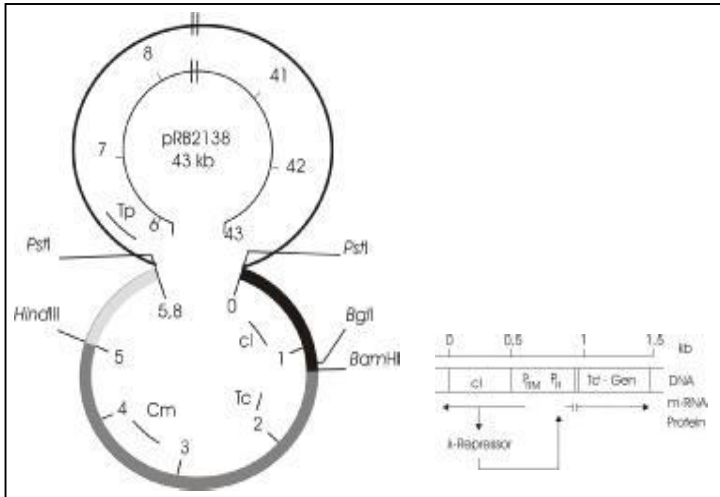


Abbildung 7: Karte von pRB2138 (links) sowie des Sektors mit dem *cl* – und dem *Tc*-Resistenzgen (rechts) verändert nach Gerlach u. Wiedemann, 1985.

Linke Seite: pRB2138 ist 43kb groß und wurde aus einem *HindIII* - *PstI* Fragment von pBR322 (hellgrau), einem *PstI* – *BamHI* Fragment von pTR262, welches die *cl* Region des Bakteriophagen 8 enthält (schwarz) und einem *BamHI* - *HindIII* Fragment von pACYC184 welches den *ori*, das *Cm*- und das *Tc*-Resistenzgen enthält (mittelgrau) hergestellt. Der zeichnerisch oben dargestellte Teil ist ein großes *PstI* Fragment von R388 welches für die *Tp*-Resistenz kodiert und das Plasmid konjugativ macht (schwarze dünne Linie oben).

Rechte Seite: *Tc*-Resistenz wird nur expremiert, nachdem kein *λ*-Repressor mehr expremiert wird. Zwischen dem Promotor des *cro*-Genes (P_R) und dem *Tc*-Resistenzgen (*Tc*) ist die Operatorsequenz des *lac*-Operons (II) inseriert.

2.23 Bodensäulen

Viele Laborstämme verhalten sich im Boden vollkommen anders als im Labor, gleiches gilt für Bodenbakterien unter Laborbedingungen [Angle et al., 1995]. Boden stellt ein sehr komplexes, undefiniertes und inhomogenes Ökosystem dar. Um ein definiertes Bodensystem zu erhalten, wird deswegen häufig mit Bodensäulen gearbeitet [Hill u. Top, 1998 ; Top et al., 1990; O'Morchoe et al., 1988].

Material: Aquarien Kies Körnung 2-3 mm
Sterile Kanülen
Sterile Spritzen

Durchführung:

Die Bodensäule besteht aus einer Glasröhre, welche nach oben und unten mit einen Schliff versehen ist. Vor den unteren Schliff, innerhalb der Röhre, kann eine Keramikfritte eingesetzt werden, welche die Säulenmatrix nach unten hin hält. Die Bodensäulen werden jeweils mit einem Gemisch aus 50 % Erde und Kies gefüllt.

Der Kies wird zugesetzt um Staunässe vorzubeugen, ein aerobes Klima zu haben und um einen leichter zu beeinflussenden Durchfluss durch die Säule zu erhalten. Für einen sterilen Mikrokosmos wurden die fertig gepackten Säulen für eine Stunde bei 130°C autoklaviert, um auch Sporenbildner abzutöten. Wollte man mit einer nicht sterilen Bodenprobe arbeiten, so wurde nur autoklavierter Kies zugesetzt.

Die Säule wurde nach oben mit Aluminiumfolie oder einem Wattebausch verschlossen. Seitlich, oberhalb der Füllgrenze des Bodens wurde durch das im Schraubverschluss angebrachte Diaphragma Flüssigkeit auf die Oberkante des Bodens mittels einer sterilen Kanüle appliziert. Unter der Fritte kann am Glasschliff ein Reservoir zum Auffangen des Durchflusses der Säule angebracht und mit einer Klammer gesichert werden. Aus diesem Reservoir konnte mittels einer sterilen Kanüle durch das Diaphragma Flüssigkeit entnommen werden. Die Säulen hingen im Dunkeln bei RT.



Abbildung 8: Befüllte Bodensäule

2.24 Klonierung

Konstruktion rekombinanter DNA

2.24.1 Ligation von Vektor- und Ziel-DNA

Sowohl Vektor- als auch Ziel-DNA wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 2.6) und durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Die interessierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel geschnitten und mittels der Qiaex-Methode (siehe 2.20) aus dem Gel eluiert. Für die kovalente Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten muss an den zu verbindenden Enden das Zuckerphosphatgerüst mit Phosphodiester-Bindungen verbunden werden. Diese Reaktion wird durch DNA-Ligase katalysiert. Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte mit etwa gleich großer Anzahl beider Fragmente.

Lösungen:

1. Ligase-Puffer (10 x):

Tris/HCl, pH 7,5	200 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	6 mM
2. DNA-Ligase:

Aus T4-infizierten *E. coli* Zellen gewonnen.

Durchführung:

Die Ligierung erfolgte bei 16°C über Nacht in einem Ansatz von:

40 µl DNA / A. bidest.
5 µl Ligasepuffer
5 µl Ligase

2.24.2 Klonierung von Genen und DNA-Fragmenten

Um bestimmte DNA-Fragmente problemlos und in größeren Mengen präparieren zu können wurden diese in pUC18- bzw. pUC19-Vektoren kloniert. Grundsätzlich erfolgt nach der Ligierung des gewünschten DNA-Fragmentes die Transformation eines geeigneten Wirtes mit dem religierten Klonierungsvektor (siehe 2.7). Darauf folgt die Selektion auf eine Funktion des Vektors und/oder des inserierten Fragmentes. Die hier verwendeten pUC-Derivate pUC18 und pUC19 tragen im β -Galaktosidase-Gen des lac-Operons ein Polylinker-Fragment das zahlreiche Restriktionsschnittstellen enthält [Norrander et al., 1983]. Die Insertion eines DNA-Fragmentes in diesen Polylinker verhindert die Synthese einer funktionstüchtigen β -Galaktosidase. Dies ist auf Agarplatten (AIX-Medium) leicht festzustellen. Bei Zusatz von IPTG, dem Induktor des lac-Operons, hydrolysiert eine intakte β -Galaktosidase das farblose Laktose-Analogon "X-Gal" und setzt die, in Reaktion mit Luftsauerstoff, tiefblaue Substanz 5-Brom-4-Chlor-Indigo frei. Kolonien mit pUC-Vektor ohne Insert erscheinen daher blau, während Kolonien, die durch die insertionelle Inaktivierung keine funktionelle β -Galaktosidase bilden, weiß sind [Gronenborn u. Messing, 1978]. Zusätzlich besitzen die Vektoren pUC18 und pUC19 eine Ampicillinresistenz als Vektormarker.

2.25 Molekularbiologische Lokalisation von Genen

2.25.1 DNA-Hybridisierung

Durch Hybridisierung mit sequenzspezifischen DNA-Sonden lässt sich DNA unterschiedlicher Herkunft auf Homologie testen. Dafür wird doppelsträngige DNA durch geeignete Bedingungen in Einzelstränge geschmolzen. Nach Zugabe einer ebenfalls einzelsträngigen, markierten DNA-Sonde reassoziieren bei Homologie beide DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang. Aufgrund der Markierung ist dieser Doppelstrang nun nachweisbar. Mit dieser

Technik kann zum einen die gesamte DNA von Zellen auf Homologie zu einer spezifischen DNA-Sonde (Kolonie-Hybridisierung) oder auch bestimmte zuvor aufgetrennten DNA-Fragmente (Southern-Blot-Hybridisierung) überprüft und identifiziert werden.

2.25.2 Kolonie-Hybridisierung

Bakterienkolonien werden durch Replika-Plattierung oder durch Abklatsch auf zuvor sterilisierte Nylon-Filter übertragen und über Nacht auf einem geeignetem Medium bebrütet. Nach der Lyse der Kolonien wird die DNA in denaturierter Form an die Membran gebunden und anschließend durch Hitze oder UV-Licht fixiert.

Lösungen:

1.	Lysozym-Puffer:	Glucose	50 mM
		Tris/HCl, pH 8,0	25 mM
		EDTA	10 mM
2.	Lysozym in Lösung		6 mg/ml
3.	SDS-Lösung:	SDS	10 % (w/v)
4.	Denaturierungslösung (D-Lsg.):	NaOH	0,5 M
		NaCl	1,5 M
5.	Neutralisationslösung (N-Lsg.):	Tris/HCl, pH 8,0	0,5 M
		NaCl	1,5 M
6.	20 xSSC, pH 7,0:	NaCl	3,0 M
		Na-Citrat	0,3 M

Durchführung:

Die Lyse erfolgte durch Auflegen der Filter auf Whatman 3MM-Papier, das mit den Lösungen so getränkt wurde, dass die Kolonien auf den Membranen gerade nicht verlaufen:

- I) 20 min Lysozym-Lsg.
- II) 10 min SDS-Lsg.
- III) 20 min D-Lsg.
- IV) 10 min N-Lsg.
- V) 5 min 2x SSC

Anschließend wurden die Filter luftgetrocknet und dann für 2 h unter Vakuum bei 80°C „gebacken“, um die DNA an der Nylon-Membran zu fixieren. Sie können bis zur Hybridisierung in Plastikfolie eingeschweißt und bei - 20 °C aufbewahrt werden.

2.25.3 Southern-Blot-Hybridisierung

Mit dem VacuGene XL Blotting System werden die durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nylon-Membran transferiert:

Lösungen:

1. Depurinisierungslsg.:	HCl 0,2 N
2.-4. D-Lsg., N-Lsg., 20x SSC	siehe 2.25.2

Durchführung:

Die Blot-Kammer wurde nach Vorschrift zusammengebaut und an die Vakuumpumpe angeschlossen. Eine Gene-Screen-Membran wurde entsprechend dem zu blottenden Teil des Gels zugeschnitten, in die Blot-Kammer gelegt, mit einer passenden Plastikmaske versehen und mit 2x SSC vorgeweicht. Bei schwach laufender Pumpe wurden nun die Maske und die Membran fixiert. Das Gel wurde vorsichtig auf die Membran gelegt, so dass die Gelränder dicht mit der Plastikmaske abschlossen. Die Gelslots wurden mit Agarose ausgegossen. Dann wurde ein Vakuum von 55-60 mbar angelegt und nur das Gel mit Depurinisierungslösung überschichtet. Die Lösung verblieb 30-45 min auf dem Gel. Anschließend wurde die überschüssige Lösung entfernt und das Gel erst mit D-Lsg. und danach mit N-Lsg. bedeckt. Dies erfolgte jeweils für den gleichen Zeitraum wie für die Depurinisierungslösung. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente mit 20x SSC auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte für 1h, dann wurden die Positionen der Gelslots mit einem Bleistift auf der Membran gekennzeichnet. Abschließend wurde die Membran getrocknet, und die DNA durch UV-Cross-Linking [0,5-1 J/cm²] an die Membran gebunden.

2.25.4 Dot-Blot-Hybridisierung

Hierbei wurde die Lösung mit der zu untersuchenden DNA auf eine Nylonmembran per Pipette oder Kapillare aufgetragen. Anschließend wurde die Membran getrocknet, und die DNA durch UV-Cross-Linking [0,5-1 J/cm²] an die Membran gebunden.

2.26 DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter DNA

Für die Durchführung wurde das DNA Labeling and Detection Kit der Fa. Boehringer nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Verfahren erlaubt den Nachweis ab 0,1 pg homologer DNA.

2.26.1 DNA-Markierung

Die zu markierende DNA wird in Einzelstränge getrennt, damit der komplementäre DNA-Strang an dieser Matritze mit markierten Desoxyribonukleotiden synthetisiert werden kann. Dies erfolgt mit Hilfe des Klenow-Enzyms mit einem "random primer". Dabei wird an Stelle von dTTP Digoxigenin-markiertes Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) eingebaut, so dass eine markierte DNA-Sonde entsteht.

Lösungen:

- | | | |
|----|---|-------|
| 1. | EDTA, pH8,0 | 0,2 M |
| 2. | LiCl | 0,4 M |
| 3. | Ethanol, 99%, gekühlt | |
| 4. | TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) | |
| 5. | DNA-Labeling and Detection Kit | |

Durchführung:

0,01 - 3 µg linearisierte DNA wurde in 15 µl A. bidest. aufgenommen, durch 10 minütiges Kochen im Wasserbad in Einzelstränge getrennt und im Anschluss sofort in einem Eis/Salz-Gemisch abgekühlt. 2 µl Hexanukleotid-Gemisch, 2 µl dNTP-Markierungsgemisch und 1 µl Klenow-Enzym des Markierungs-Kits wurden hinzugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 2 µl EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 µl LiCl mit 75 µl Ethanol gefällt. Das trockene Pellet wurde in 50 µl A.bidest. oder TE-Puffer aufgenommen und konnte bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert werden. Zur Hybridisierung von 100 cm² Filter wurden 5 - 10 µl markierte DNA benötigt.

2.26.2 Hybridisierung der Sonden-DNA

Lösungen:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | 20x SSC | siehe 2.25.2 |
| 2. | Hybridisierungslsg.: | |
| | 5x SSC | |
| | N-Lauroylsarcosin | 0,1 % (w/v) |
| | SDS | 0,02 % (w/v) |
| | Blocking Reagenz | 5 % (w/v) |
| | Formamid | 50 % |
| | Die Lösung wurde autoklaviert, um das Blocking Reagenz zu lösen. | |
| 3. | Waschlsg. I: | |
| | 2x SSC | |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |
| 4. | Waschlsg. II: | |
| | 0,1x SSC | |
| | SDS | 0,1 % (w/v) |

Durchführung:

Um bei gleicher Stringenz die Inkubationstemperatur zu erniedrigen, wurde die Hybridisierung mit Formamid durchgeführt. Die Stringenz lag unter den gewählten Bedingungen bei $>80\%$. I) Vorhybridisierung: In einer Hybridisierungsröhre wurden die Membranen mit 2x SSC unter Rollen gewaschen, bis sie an der Wand anlagen. Zwischen die Membranlagen in der Röhre wurde jeweils ein in 2x SSC vorgeweichtes Trennblatt gelegt. Die 2x SSC-Lsg wurde gegen Hybridisierungs-lösung ausgetauscht. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 1 h bei 42°C im Hybridisierungsofen. II) Hybridisierung: Die Lösung wurde durch 5 ml frische Hybridisierungslösung erneuert und mit 5-10 μl frisch denaturierter (10 min, 100°C) DIG-markierter DNA versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen. III) Waschschrte: Die Filter wurden 2x 5 min bei Raumtemperatur mit Waschlsg. I, dann 2x 15 min bei 68°C in Waschlsg. II gewaschen .

2.26.3 Kolorimetrische Detektion der DNA-Sonden

Über eine immunologische Reaktion (enzyme-linked immunoassay) wird in diesem Schritt homologe DNA sichtbar gemacht. Das Digoxigenin der DIG-dUTP-Sonde wirkt hier als Hapten, an das ein Anti-DIG-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase bindet. Anschließend wird die Position dieses Komplexes auf der Membran durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (Xphosphat) und 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sichtbar gemacht.

Eine Rehybridisierung ist möglich, da das Digoxigenin über eine alkalilabile Esterbindung an die Nukleotide gebunden ist. Ein Waschen mit 0,2 M NaOH in Anwesenheit von 0,1 % SDS führt zum vollständigen Entfernen der Markierungen. Diese Methode wurde angewandt, wenn eine Membran mit mehr als einer Sonde beschickt werden sollte.

Lösungen:

- | | | |
|----|--|-----------------|
| 1. | Maleinsäurepuffer, pH 7,5: | |
| | Maleinsäure | 100 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | NaOH | 200 mM |
| 2. | 10 % Block-Puffer-Stammlsg.: | |
| | Blocking-Reagenz
in Maleinsäurepuffer | 10 % |
| 3. | 1 % Block-Puffer-Gebrauchslsg.: | |
| | 10 % Block-Puffer | 10 % (v/v) |
| | Maleinsäurepuffer | 90 % (v/v) |
| 4. | Antikörper-Konjugat-Lsg.: | |
| | 1 % Block-Puffer | 20 ml |
| | DIG-AP-Konjugat | 4 μl |
| 5. | Reaktionspuffer, pH 9,5: | |
| | Tris | 100 mM |
| | NaCl | 100 mM |

6. Farblsg.:	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	50 mM
	Reaktionspuffer	10 ml
	NBT-Lsg.	45 µl
	X-phosphat-Lsg.	70 µl

Durchführung:

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen 5 min in A. bidest. gewaschen, dann 5 min in Maleinsäure equilibriert und anschließend für 45 min in 1 % Block-Puffer inkubiert. Danach wurden sie für 45 min mit Antikörper-Konjugat-Lsg. versetzt, darauf 3x 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen und für 5 min mit Reaktionspuffer equilibriert. Zum Schluss wurden die Filter mit Farblsg. versetzt und unter Lichtausschluss für 0,5-48 h entwickelt, bis eine bläulich-schwarze Färbung sichtbar wurde. Alle Schritte erfolgten unter Rollen im Hybridisierungssofen. Die Reaktion wurde mit A. bidest. gestoppt und die noch feuchten Filter für die Dokumentation fotokopiert oder fotografiert.

2.27 Polymerase-Ketten-Reaktion - PCR

Durch diese Methode wurden einzelne DNA-Fragmente amplifiziert. Hierbei dient die Template- oder Ziel-DNA als Matrize und wird zum Mastermix, der aus A. bidest., Primern, Desoxynucleosidtriphosphaten, Puffer und DNA-Polymerase besteht, gegeben. Als erstes wird bei 95 °C die DNA in Einzelstränge geschmolzen, um komplexe genomische DNA oder Plasmide vollständig zu denaturieren, damit die Primer nach Abkühlen an der Ziel-DNA hybridisieren können (annealing). Dies geschieht bei einer Temperatur, die für jeden Primer individuell ist. Bei 72 °C werden die DNA-Stränge mit Hilfe der eingesetzten DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Ein Zyklus besteht aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Ab dem dritten Zyklus erhält man DNA-Fragmente der gewünschten Länge.

Eine Standard PCR erfolgte in einem 50 µl Ansatz mit einer initialen Denaturierung der DNA bei 95 °C für 2 min. Es folgten 25-35 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierungs-Phase (30s bei 95 °C), einer 1 minütigen Annealingphase bei 62 °C und einer 1,5 minütigen Elongationsphase bei 72 °C. Der Syntheseschritt im letzten Zyklus wurde bis auf zehn Minuten verlängert, damit die Polymerase alle Stränge auffüllen kann. Bei PCR mit Boden-Gesamt-DNA wurde eine initiale Denaturierungsphase von 95°C für 5 min gewählt, um sämtliche DNA-Stränge für die anschließende Synthese als Einzelstrang vorliegen zu haben. Die Reaktionsansätze wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und wie unter 2.20 weiter behandelt, um die Amplifikationsprodukte von Template, Polymerasen und dNTPs zu reinigen, bzw. um den Erfolg der PCR zu überprüfen.

Für die Berechnung der Hybridisierungstemperatur gibt es verschiedene Programme und Formeln, welche einen sinnvollen Ausgangswert zur Optimierung der Temperatur liefern. Hier wurde mit folgender Formel für Primer bis zu einer Länge von etwa 20 Nukleotiden

gerechnet [Mülhardt, 1999]: $(\text{Anzahl von A+T}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von C+G}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C} =$ Schmelztemperatur der Primer (T_m). Die ersten Experimente wurden mit dem errechneten Temperaturwert durchgeführt und falls nötig anschließend aufgrund der experimentellen Daten korrigiert.

PCR-Reaktionsansatz: Template-DNA 10 – 100 ng
 dNTP-Gemisch, je dNTP 0,2 mM
 Primer je 100 pmol
 PCR-Puffer + 1,5 mM MgCl₂ 1-fach
 Taq -Polymerase 1 U
 A. bidest. ad 50 µl

Die einzelnen Komponenten wurden gekühlt zusammengebracht, vermischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Zugabe der Polymerase erfolgte bei kleineren Messreihen möglichst erst direkt vor dem PCR-Lauf.

2.27.1 PCR-Primer

Tabelle 8: PCR-Primer

Bezeichnung	Position	Länge	Sequenz	Referenz
p3-I	278–297	20-mer	5'-AACTGATCTTCCTGACCGTC-3'	Heffron F. et al. (1979)
p3-II	763–744	20-mer	5'-TATGACCGATACGGCAGGTG-3'	Heffron F. et al. (1979)
p5-I	2256–2237	20-mer	5'-ACATAGGTGGAATCGCGCAC-3'	Brown N. et al. (1985)
p5-II	1770–1789	20-mer	5'-TACTGCCGCGCATCAAGATC-3'	Brown N. et al. (1985)
p2-II	2162–2181	20-mer	5'-AGAAAGTTCGTCCTGGGCTG-3'	Ward E. et al. (1987)
p3-III	498–517	20-mer	5'-TCAGCAATGAACGGACCAGC-3'	Heffron F. et al. (1979)
p5-III	2044–2061	18-mer	5'-GCGGCGAAGGCATGCTGG-3'	Brown N. et al. (1985)
p2-III	1865–1884	20-mer	5'-GGCCAAGGACAAGAACCTGT-3'	Ward E. et al. (1987)

Die Primer wurden wie in Abbildung 9 angegeben kombiniert. Die Position bezieht sich auf die EMBL Database Sequenzen: p3- ISTN3X; p5- ISTN501b; und p2- TN21TNPA. Die Primer wurden in Anlehnung an die von auf Homologie zu allen in der EMBL Datenbank verfügbaren Sequenzen hin untersucht. Die Software VectorNTI wurde benutzt um Sekundärstrukturbildungen innerhalb der Primer oder der Zielsequenz auszuschließen. Nach Dahlberg et al., 1995.

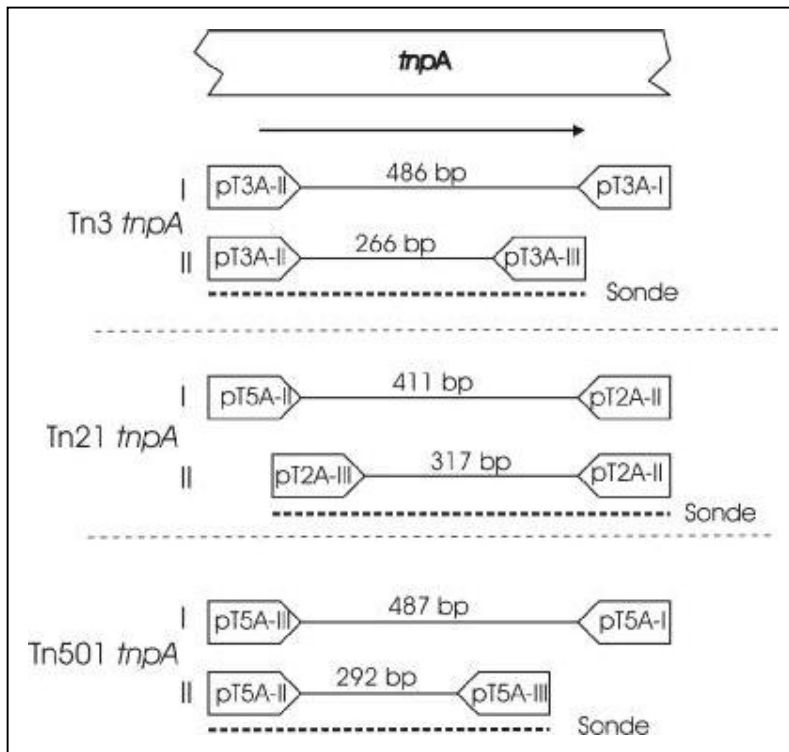


Abbildung 9: Primer und Sonden der *tnpA* von Tn3, Tn21 und Tn501

Primer und Sonden der *tnpA* von Tn3, Tn21 und Tn501. Die Länge der PCR-Produkte ist jeweils über den Linien angegeben, hinter I jeweils die erste PCR hinter II jeweils die geschachtelte PCR. Dieses PCR Produkt wurde auch als Gensonde benutzt (fette, gestrichelte Linie).

2.27.2 Temperaturprofile

Folgende Temperaturprofile wurden für die Experimente benutzt:

Eine initiale Denaturierung der DNA bei 95 °C für 2 min. Es folgten 25- 35 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierungs-Phase (30 s bei 95 °C), einer einminütigen Annealing-Phase bei 62 °C (Tn21 und Tn501) 60°C (Tn3) und einer einminütigen Elongationsphase bei 72 °C. Der Syntheseschritt im letzten Zyklus wurde bis auf zehn Minuten verlängert, damit die Polymerase alle Stränge auffüllen kann. Bei PCR mit Boden-Gesamt-DNA wurde eine initiale Denaturierungsphase von 95°C für 5 min gewählt, um sämtliche DNA-Stränge für die anschließende Synthese als Einzelstrang vorliegen zu haben.

2.28 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen basieren auf dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (1977). Dabei wird eine PCR durchgeführt, bei der dem Reaktionsansatz Didesoxynukleotide hinzugefügt werden. Auf der Länge des zu sequenzierenden DNA-Abschnitts wird statistisch an jeder Position anstelle eines Desoxynukleotids ein Nukleotid mit fehlender OH-Gruppe in den Strang eingebaut. Hierdurch wird dieser Strang nicht weiter verlängert. So werden PCR-

Fragmente verschiedener Länge mit einem markierten Nukleotid erzeugt, welche dann elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt werden können.

2.28.1 ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit

Bei dieser Methode werden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide eingesetzt. Mittels Einsatz von vier unterschiedlichen, je Base spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen kann die Sequenzier-PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels Sequenzier-Kapillare. Die Absorptionsspektren der eingesetzten Farbstoffe liegen so, dass sie bei Anregung durch Bestrahlung mit einem 488 nm Argon-Laser vier unterschiedlich erfassbare Einzelsignale emittieren. Die Sequenzierdaten werden online erfasst und elektronisch gespeichert. Die Sequenzierungen fanden im Labor der Molekularen Pathologie des Klinikums Kassel statt.

Lösungen:

1. Terminator Ready Reaction Mix
 - A-Dye Terminator markiert mit dichloro [R6G]
 - C-Dye Terminator markiert mit dichloro [ROX]
 - G-Dye Terminator markiert mit dichloro [R110]
 - T-Dye Terminator markiert mit dichloro [TAMRA]
2. dATP, dCTP, dITP, dUTP
3. AmpliTaq DNA Polymerase, FS, mit thermostabiler Pyrophosphatase
4. Tris-HCl Puffer, pH 9,0 (MgCl₂)
5. Primer
6. Template Suppression Reagent (TSR, Fa. PE Applied Biosystems)

Für einen Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert:

Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
Template (dsDNA)	200 – 500 ng
Primer	(je) 5 pmol
A. bidest.	ad 10 µl

Die PCR erfolgte mit einer einmaligen Denaturierung von 96 °C für 30 Sekunden.

anschließend 25 Zyklen: 10 sec Denaturierung bei 96 °C,
 5 sec Hybridisierung bei 50 °C
 4 min Elongation bei 60 °C.

Nach der PCR wurde dem Ansatz 60 µl Isopropanol (75 %) zugesetzt und 15 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde in einer Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 200 µl Isopropanol (75 %) gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet eine Minute bei 90 °C getrocknet.

Die DNA wurde in 20 µl TSR resuspendiert. Die Probe wurde für 4 min bei 94 °C denaturiert und bis zum Laden des Sequenzers auf Eis gestellt.

2.28.2 Direct Sequencing LI-COR 4200 IR²

Bei dieser Methode werden im Infrarotbereich anregbare markierte Primer eingesetzt. Die Sequenzreaktionen erfolgen in vier getrennten Reaktionsgefäßen, denen jeweils ein markiertes Didesoxynukleotid zugesetzt wird. Die PCR-Reaktionen werden auf vier Bahnen nebeneinander auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Bei diesem automatisierten System erfolgt die Detektion der einzelnen Fragmente mit Hilfe eines Lasers, welcher die Fragmente anhand der markierten Primer detektiert. Die Fragmente wandern in einem vertikalen Gel an dem Laser vorbei, der das Gel in seiner gesamten Breite 30 mal pro Sekunde scannt. Dieses System verfügt über zwei unterschiedliche Laser, die zwei unterschiedlich markierte Primer gleichzeitig detektieren können. Die Daten wurden elektronisch erfasst und mittels Computer mit der Software E-seq ausgewertet.

Eingesetzte Lösungen:

A,C,T,G – Mix mit Thermosequenase, Amersham Pharmacia
 Stop/Loading Puffer, Amersham Pharmacia
 Primer

Die Sequenzierungsreaktionen wurden wie folgt angesetzt:

DNA / Primer – Premix :

Template (ds-Plasmid-DNA)	1 µl
Primer	(je) 2 pmol
A. bidest.	ad 21 µl

In die vier 0,2 ml Reaktionsgefäße wurden 1,5 µl A, C, G oder T-Mix pipettiert. Von dem DNA / Primer – Premix wurden je 4,5 µl hinzugefügt und gemixt.

Die PCR erfolgte mit einer einmaligen Denaturierung von 95 °C für 5 min

anschließend 25 Zyklen: 15 sec Denaturierung bei 95 °C,
 30 sec Hybridisierung bei 54 °C
 90 sec Elongation bei 65 °C.

Bei Beenden der PCR wurde je 6 µl Stop-Puffer zugesetzt. Jeweils 1 µl der Sequenzierungsreaktionen wurde anschließend auf ein 7%iges PAA Sequenzgel aufgetragen und bei 2000 V bei 35 mA aufgetrennt.

2.29 Identifizierungsmethoden

Die folgenden Untersuchungen zur Identifizierung der Bodenisolatate wurden mit frisch überimpften Kulturen durchgeführt.

- I) Die isolierten Bakterien wurden makroskopisch auf ihre Koloniemorphologie (Größe, Form, Farbe, Profil, Oberfläche, Rand und Konsistenz) hin untersucht.
- II) Gestalt, Größe und Beweglichkeit wurde mikroskopisch (Phasenkontrast, 400x bzw. Ölimmersion 1000x) charakterisiert.
- III)
 - a. Das Gram-Verhalten wurde durch das KOH-Schnellverfahren festgestellt. Dabei macht man sich die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gegenüber 3%iger Kalilauge zu Nutze. Durch die Lyse der Zellwand Gram-negativer Bakterien wird ihre DNA frei, die als viskoser Faden sichtbar gemacht werden kann, während Gram-positive Bakterien nicht lysieren.
 - b. Zur Überprüfung der Gram-Reaktion erfolgte ein Test auf L-Alanin-Aminopeptidase. Dieses Enzym kommt in relevanter Aktivität praktisch nur bei Gram-negativen MO vor. Der Test erfolgte mit Aminopeptidase-Teststäbchen der Fa. Merck nach Angaben des Herstellers.
- IV) Um das Verhalten der MO bezüglich molekularem Sauerstoff festzustellen, wurde im Schnelltest mit Oxidase-Teststäbchen der Test auf Cytochromoxidase nach Angaben des Herstellers (Merck) durchgeführt.
- V) Die identifizierten Bakterien wurden weiterhin auf Resistenz gegen Quecksilber und Antibiotika untersucht.
- VI) Eine abschließende Identifizierung der Bakterien erfolgte über das API 20 NE Schnellidentifizierungssystem (bioMérieux) nach Vorschrift des Herstellers. Dieses standardisierte System nutzt 20 verschiedene Stoffwechselreaktionen für eine Identifizierung von Gram-negativen Bakterien, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden für jeden getesteten Stamm abschließend mit Angaben in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [1984] und in The Prokaryotes [1992] verglichen.

3 Ergebnisse

Vorwort:

Da bei der folgenden Beschreibung der Ergebnisse bei dem Thema „Nachweis von Markern in Boden-Gesamt-DNA“ die Entwicklung der Methode an sich auch ein Ergebnis ist, wird hier abweichend als sonst üblich, auch die Durchführung mit ihren wichtigsten Parametern als Ergebnis dargestellt.

Es wurde gleichzeitig mit einer Kombination aus molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden versucht, einen Hinweis auf Transposons in der Bodenprobe zu erhalten und falls geschehen zu verifizieren und das transposontragende Bakterium zu isolieren.

3.1 Ermittlung einer geeigneten Methode zur DNA Präparation

Literaturrecherchen und Recherchen im Internet ergaben, dass ca. 75 kommerzielle Kits für die Isolierung genomischer DNA aus verschiedenen Probenmatrizes erhältlich sind [Merk, 2000]. Der Großteil dieser Kits ist für ein breites Spektrum an Ausgangsmaterialien konzipiert. So können sowohl Zellen bzw. Gewebe von Eukaryonten als auch von Prokaryonten als Ausgangsmaterial zur DNA-Isolierung eingesetzt werden. Weiterhin bieten einige Firmen Kits an, die besonders für die Aufreinigung von DNA aus speziellen Matrizes wie Blut, pflanzlichen Geweben, Knochenmark, Stuhl und weiteren optimiert sind.

Es war jedoch nur ein Kit erhältlich, welches explizit für die Isolierung von DNA aus Boden angeboten wurde. Dies war das „FastDNA Spin Kit for Soil“ der Firma Bio101.

Literaturrecherchen zeigten weiterhin, dass es eine große Anzahl von Protokollen gab, mit welchen DNA aus Boden isoliert wurde. So führt das Buch „Nucleic Acids in the Environment“ [Trevors u. van Elsas, 1995] über 90 Methoden zur Extraktion von DNA aus Boden auf. Hiervon wurden 23 Methoden bzw. Variationen auf Eignung zur schnellen Isolation von DNA aus Boden hin untersucht, die sechs am geeignetsten erscheinenden Methoden wurden anschließend intensiv in verschiedenen Variationen evaluiert (s.u.).

Allen diesen Methoden ist gemeinsam, dass sie im wesentlichen auf fünf unterschiedlichen Prinzipien basieren. Dies sind: Salzpräzipitation von Proteinen, klassische Phenolaufrreinigung, Anionenaustausch zur Aufreinigung von DNA, Lyse mit chaotropen Salzen und Adsorption von DNA an oberflächenaktive Substanzen (siehe 1.11.2.1).

Folgende für die jeweiligen Methodiken repräsentative Präparationsmethoden und Kits, sowie die mit Buchstaben bezeichneten Aufschlussmethoden wurden intensiv auf Eignung für die Isolation von Boden-Gesamt-DNA und anschließende Analyse mittels PCR hin untersucht:

Evaluierete Methoden zur Isolation von DNA:

1. Präparation von Genom-DNA nach Current Protocols in Molecular Biology [Ausubel et al., 2002]
2. DNA-Präparation nach Allen mit Proteinase K [Ausubel et al., 2002]
3. Plasmidpräparation nach Kado und Liu [1981], modifiziert
4. Fastprep System nach Günther
5. FastDNA SPIN Kit for Soil [Qbiogene, 2000]
6. Guanidiniumhydrochloridmethode [Günther, 1996]

Evaluierete Methoden zum Aufschluß von Boden:

- a. Erhitzen mittels Wasserbad
- b. Erhitzen mittels Mikrowellen
- c. Zermahlen im Mörser mit flüssigem Stickstoff
- d. Mahlen der Bodenprobe mit „Retsch Mill MM301“
- e. Mahlen der Bodenprobe mittels Fastprep Instrument

Zuerst wurden die verschiedenen Methoden ohne den Einsatz von Boden auf ihre Spezifität und ihre Nachweisgrenzen bezüglich einer folgenden PCR hin evaluiert.

3.2 Überprüfung der Spezifität der PCR-Amplifikate

Nach den in 2.27 beschriebenen Bedingungen wurde die PCR mit den unter 2.27.1 aufgeführten Primern durchgeführt. Für die Amplifikation von *tnpA* vom Typ Tn21, Tn501 und Tn3 entstanden jeweils Amplifikate, die einer Größe von 411, 487 und 486 bp entsprachen. Die Spezifität der Amplifikate wurde durch eine weitere, unter Abbildung 9 beschriebene, geschachtelte PCR erhöht und überprüft. Hier entstand für Tn21 ein 317 bp großes, für Tn501 ein 292 bp großes und für Tn3 ein 266 bp großes Produkt.

Tabelle 9: Überprüfung der PCR-Primer mit dem jeweils verwendeten Template

Plasmid	Tn3		Tn21		Tn501	
	p3-II, p3-I	p3-II, p3-III	P5-II, p2-II	p2-III, p2-II	p5-II, p5-I	p5-II, p5-III
pACYC184::Tn3	+	+	-	-	-	-
pBR322::Tn2411	-	-	+	+	-	-
pACYC184::Tn501	-	-	-	-	+	+

+ = positives Signal - = negatives Signal bei PCR

3.3 Nachweisgrenzen nach Isolierung von DNA aus Reinkulturen und anschließender PCR

Die Feststellung der verschiedenen Nachweisgrenzen ist nicht Thema dieser Arbeit, soll aber zum Vergleich der Ergebnisse kurz beschrieben werden. Zur Feststellung der Nachweisgrenzen der verschiedenen Methoden wurden Verdünnungsreihen und aufkonzentrierte Kulturen von *P. stutzeri* und *E. coli*, welche die Plasmide pBR322::Tn2411 bzw. pUC19 beherbergten angesetzt, mit den verschiedenen Methoden DNA präpariert und anschließend eine PCR durchgeführt. Da alle Versuche mit dem gleichen Plasmid im gleichen Stamm durchgeführt und zur Bewertung der Resultate der einzelnen Methoden relativ zueinander verglichen wurden, wurde auf eine Bestimmung der exakten Plasmidzahl über Messung der Extinktion bei den einzelnen Versuchsansätzen verzichtet und erst zum Schluss bei dem besten System durchgeführt. Eine photometrische Messung zu Beginn der Experimente zeigte bei pBR322::Tn2411 eine Anzahl von 1,1 Plasmiden pro Zelle in *P. stutzeri* und 40 bei pUC19 in *E. coli*, so dass CFU analog zu einmal ermittelten Plasmidzahlen verwendet wurde. Um die Reproduzierbarkeit der PCR-Nachweise in Abhängigkeit der Probenaufbereitung zu untersuchen, wurden die Versuche dreimal durchgeführt. Aus der niedrigsten, in der PCR als positiv gewerteten Verdünnungsstufe wurde die Nachweisgrenze (CFU/ml) bezogen. Eingesetzt wurden Bakterien in einer Konzentration von 10^1 bis 10^5 je ml.

3.3.1 PCR-Nachweisgrenzen bei aus Reinkulturen gewonnenen DNA-Proben

Zermahlen im Mörser mit flüssigem Stickstoff (c) und die Methode (d), Mahlen der Probe mittels „Retsch Mill MM301“ waren für in Flüssigkeit gelöste Zellen nicht geeignet, das FastDNA SPIN Kit for Soil (5) war mit seinem ausgelieferten Protokoll nicht durchführbar.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse bei der Ermittlung der PCR Nachweisgrenzen bei aus Reinkulturen gewonnener DNA.

Methode	untere Grenze CFU ml ⁻¹	Obere Grenze CFU ml ⁻¹
1. Präparation von Genom-DNA nach Current Protocols in Molecular Biology	10 ²	10 ⁴
2. DNA-Präparation nach Allen mit Proteinase K	10 ³	10 ³
3. Plasmidpräparation nach Kado und Liu, modifiziert	10 ³	10 ⁴
4. Qiagen Genomic DNA Kit	10 ²	10 ³
5. FastDNA SPIN Kit for Soil	---	---
6. Guanidiniumhydrochloridmethode	10 ²	10 ³
a. Erhitzen mittels Wasserbad	10 ³	10 ⁴
b. Erhitzen mittels Mikrowellen	10 ²	10 ³
c. Zermahlen im Mörser mit flüssigem Stickstoff	---	---
d. Mahlen der Bodenprobe mit „Retsch Mill MM301“	---	---
e. Mahlen der Bodenprobe mittels Fastprep Instrument	10 ²	10 ³

3.4 Präparation von DNA aus Boden

Diese Methoden wurden zuerst ohne weiteren, vorhergehenden Aufschluss mit Bodenproben durchgeführt, was zu unbefriedigenden Ergebnissen bei der gleichen Bodenprobe und, besonders bei unterschiedlichen Böden, zu unreproduzierbaren Ergebnissen führte (mit Ausnahme der Methode 5, welche ja einen mechanischen Aufschluss beinhaltet, aber so geliefert wurde, dass auch nach Nachfrage beim Hersteller das Protokoll nicht erfolgreich durchzuführen war). Die Ergebnisse der Überprüfung der Kombination von Methoden und Kits mit den verschiedenen Aufschlussmethoden ist in Tabelle 11 dargestellt.

Überprüft wurde die Menge an DNA per Agarosegel- Elektrophorese. Auf eine Bestimmung der Menge und Reinheit per Spektrometer wurde verzichtet, da die Reinheit der DNA bei aufgeschlossenem Boden in keinem Verhältnis zu der Verwendbarkeit der so erhaltenen DNA für den Einsatz in der PCR stand und in der Regel nicht mit den Werten beim Aufschluss von Reinkulturen verglichen werden kann, stattdessen erfolgte eine Überprüfung mittels PCR [Smalla et al., 2000]. Den Bodenproben wurde eine definierte Menge an nachzuweisender Ziel-DNA in Form von präparierter DNA oder als Zielsequenz-tragende Zellen zugesetzt. In diesen Fall wurden *E. coli* und *P. stutzeri*, welche die Plasmide mit den nachzuweisenden Zielsequenzen beherbergten, gewählt. Als Ziel-DNA wurde in den Zellen das Gleiche Plasmid eingesetzt, welches auch als Marker beim Einsatz der Plasmid-tragenden Zellen diente: pUC19 und pBR322::Tn2411. So ließ sich erkennen, ob eine Methode dazu geeignet ist, Zellen in einer Bodenmatrix zu lysieren und anschließend DNA in einer für eine PCR erforderlichen Reinheit zu isolieren.

3.5 Kontrollen bei der Präparation von DNA aus Boden

Die so erhaltenen Lysate der aufgeschlossenen Bodenproben wurden zum Überprüfen des Erfolges der Präparation aufgeteilt. In Kontrollexperimenten wurden diese Ansätze jeweils so weit verdünnt, bis eine PCR stattfinden konnte. Dem einen Teil der Verdünnungsstufe wurde wiederum weitere Template-DNA zugegeben.

Dies diente der Überprüfung, ob bei einer angesetzten PCR die nicht stattfand, die Ursache darin lag, dass noch hemmende Stoffe vorhanden waren oder die Template-DNA zu sehr verdünnt war. Musste so weit verdünnt werden, dass nur in diesem Kontrollexperiment ein Signal erhalten wurde, also die ursprünglich vorhandene DNA soweit verdünnt war, dass sie mittels PCR nicht mehr amplifiziert werden konnte, so galt die Methode als nicht tauglich.

Diese Überprüfung wurde nur mittels Zugabe von präparierter DNA durchgeführt, da so der Einfluss eines möglicherweise nicht oder nur teilweise erfolgten Aufschlusses der Plasmid-tragenden Zellen nicht vorhanden war.

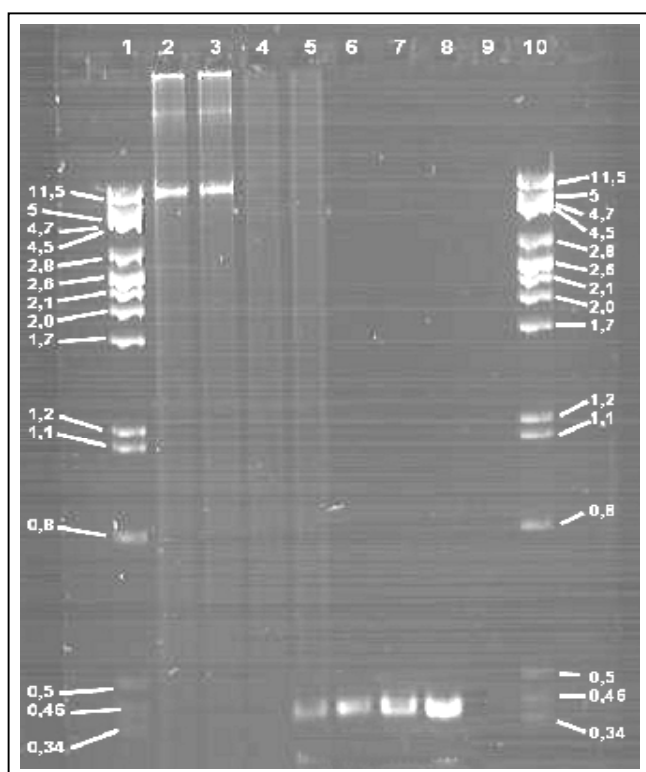


Abbildung 10: Verdünnungsreihe zur Durchführung von PCR mit Boden-Gesamt-DNA

Dargestellt ist hier exemplarisch die Überprüfung der Präparation von Boden-Gesamt-DNA auf Verwendbarkeit in der PCR. Hierzu wurden Verdünnungsreihen erstellt und jeweils ein Aliquot der präparierten Boden-Gesamt-DNA mit Target-DNA versetzt und eine PCR durchgeführt. Hier dargestellt ist die Präparation von Boden 3 (siehe Tabelle 13) mit PCR auf *tnpA* vom Typ Tn21. Eingesetzte Verdünnungsstufen: Bahn 2 und 3 entspricht dem Einsatz der gesamten, 4 und 5 der halben und 6 und 7 einem Drittel der präparierten Boden-Gesamt-DNA aus 0,5 g. Den Ansätzen 3, 5 und 7 wurde jeweils Template DNA zugesetzt. In Bahn 8 die Positivkontrolle, in Bahn 9 die Negativkontrolle (siehe 3.5). Bahn 1+10 Marker 8-PstI geschnitten.

Es kann eine Korrelation zwischen Anzahl von Zellen und Anzahl von Plasmiden gezogen werden: pUC19 als Multicopy-Plasmid mit 25-50 Kopien pro Zelle [Couturier et al., 1988]. pBR322::Tn2411 als Lowcopy mit 2-10 Kopien pro Zelle. Eine photometrische Messung zu Beginn der Experimente zeigte bei pBR322::Tn2411 eine Zahl von 1,1 bei pUC19 eine Anzahl von 40 Plasmiden pro Zelle.

Es konnte hier wiederum auf eine Messung der eingesetzten Zahl von Replikons verzichtet werden, da jeweils die gleiche Anzahl von Zellen, unter den gleichen Bedingungen angezogen, eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden wurden dann untereinander verglichen. Es wurden standardmäßig 10^8 Zellen g^{-1} Boden eingesetzt, so dass die Anzahl der eingesetzten Zellen immer innerhalb der Nachweisgrenze für alle Methoden lag. Für einen relativen Vergleich der Methoden war dieses Vorgehen ausreichend. Die Experimente wurden mit unterschiedlichen Böden (Nr. 1, 6, 7, siehe Tabelle 12) mehrfach wiederholt.

3.5.1 Ergebnisse der Präparation von DNA aus Boden:

Tabelle 11: Auftrag der Kombinationen der Lysemethoden mit den DNA-Präparationsmethoden zur Isolation von DNA aus Boden.

Lyse Methode	Versuchsbedingungen	DNA-Präparationsmethoden					
		1) Präp. von Genom-DNA nach Current Protocols in Molecular Biology	2) DNA-Präparation nach Allen mit Proteinase K	3) Plasmidpräparation nach Kado und Liu ,modifiziert	4) Fastprep nach Günther	5) FastDNA SPIN Kit for Soil	6) Guanidiniumhydrochlorid -methode
a) keine	Menge an erhaltener, präparierter DNA	+	++	+	+	+	++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	-	-	-
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	-	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-+	-+	-+	+	-+	+
b) Wasserbad	Menge an erhaltener, präparierter DNA	++	++	++	++	+	++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	-	-	-
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	-+	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-+	-+	-+	+	-	+
c) Mikrowellen	Menge an erhaltener, präparierter DNA	++	++	++	++	+	++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	-	-	-
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	-+	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-+	-+	-+	+	-	+
d) Mörser mit flüssigem Stickstoff	Menge an erhaltener, präparierter DNA	++	++	++	+	+	++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	-	-	-
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	-+	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-+	-+	-+	+	-	-+
e) Mahlen „Retsch Mill MM301“	Menge an erhaltener, präparierter DNA	+++	+++	+++	++++	++	++++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	++*	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	++	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-	-	-	++	-+	-+
f) Fastprep Schüttelmühle	Menge an erhaltener, präparierter DNA	+++	+++	+++	++++	++	++++
	PCR Signal ohne DNA-Verdünnung	-	-	-	++*	-	-
	PCR Signal nach DNA-Verdünnung	-	-	-	++	-	-+
	PCR Signal nach DNA-Zugabe	-	-	-	++	-+	-+

„Menge an erhaltener, präparierter DNA“ bezeichnet die Menge mittels Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesener Menge an Boden-Gesamt-DNA. „PCR Signal ohne DNA-Verdünnung“ bezieht sich auf die Ergebnisse der PCR mit Boden-Gesamt-DNA ohne vorherige Verdünnung. „PCR Signal nach DNA-Verdünnung“ bezeichnet Ergebnisse der PCR mit Boden-Gesamt-DNA in einer Stufe der Verdünnungsreihe ohne Zugabe von DNA. „PCR Signal nach DNA-Zugabe“ bezeichnet Ergebnisse nach Zugabe von externer DNA. Die Anzahl der + bezeichnet die Stärke des erhaltenen Signals, + heisst nicht reproduzierbar. * = bei einigen, wenigen Lysaten musste verdünnt werden um ein Signal zu erhalten.

Als die am besten geeignete Methode stellte sich also der Aufschluss mittels Fastprep Mühle und dem Zusatz von Milchpulver in Kombination mit Qiagen Genomic Säulen gefolgt von der Guanidiniumhydrochloridmethode heraus. Mit dieser Methode ließ sich DNA aus den meisten Böden ohne störende Huminsäuren präparieren. Die PCR konnte in der Regel direkt mit dem konzentrierten, nach dem Fällen und Trocknen in A. bidest. wieder aufgenommenem Eluat der Säulen durchgeführt werden. Bei Böden, wo dies nicht der Fall war konnte innerhalb der Verdünnungsreihe ein Signal erhalten werden.

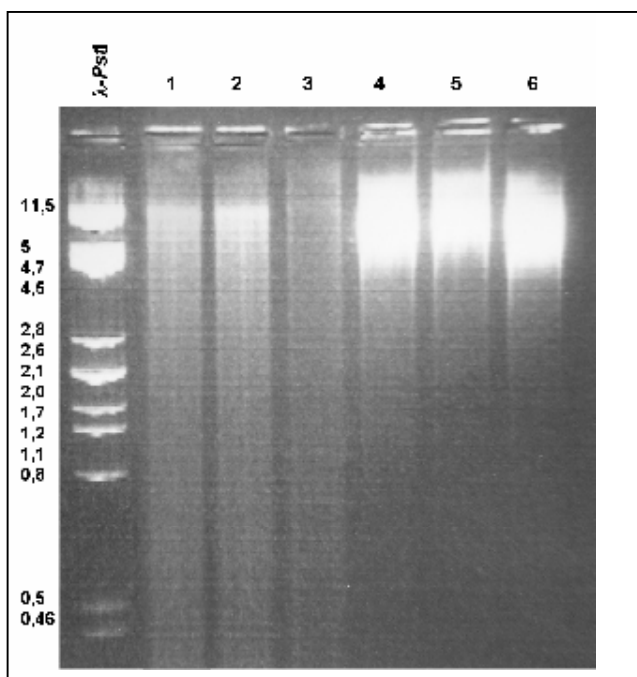


Abbildung 11: Verschiedene Aufschlussmethoden im Vergleich (siehe Tabelle 11)

Jeweils das Aliquot von 0,5 g Boden-Gesamt-DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Die DNA Präparation erfolgte mit verschiedenen Aufschlussmethoden: 1 = Wasserbad, 2 = Mikrowellen, 3 = Mörser mit flüssigem Stickstoff, 4 = Mahlen „Retsch Mill MM301“ 5 = Fastprep „Schüttel-Mühle“ mit kleinen Keramikperlen 6 = Fastprep „Schüttel-Mühle“ mit einer großen Keramikperle. In Bahn 1 Marker 8-*PstI* geschnitten

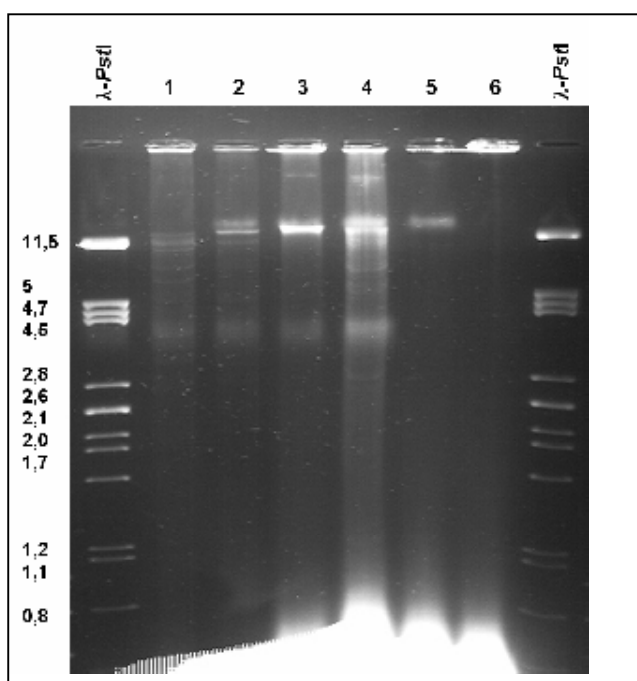


Abbildung 12: Verschiedene Präparationsmethoden für Boden-Gesamt-DNA im Vergleich (siehe Tabelle 11)

Jeweils ein Viertel Aliquot von 0,5 g DNA-Boden-Gesamt-DNA auf ein hochauflösendes 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA Präparation erfolgte mit verschiedenen Präparationsmethoden (siehe Tabelle 11) 1= Guanidiniumhydrochloridmethode 2= Fastprep nach Günther 3= Plasmidpräparation nach Kado und Liu, modifiziert 4= DNA-Präparation nach Allen mit Proteinase K 5= Präp. von genomischer DNA nach Current Protocols in Molecular Biologie, 6= FastDNA SPIN Kit for Soil. In Bahn 1 Marker 8-*PstI* geschnitten. In Bahn eins und zwei waren keine leuchtenden Schlieren am Agarosegelende zu sehen. Bei den Rasterung der leuchtenden Schlieren nach links in die Bahnen eins und zwei handelt es sich um Belichtungsartefakte der Digitalkamera.

3.6 Nachweisgrenze des Systems „Fastprep nach Günther“

Die realistische Nachweisgrenze dieses Systems lag bei den meisten Böden bei einem Optimum von 6×10^2 Templates g^{-1} Boden, wobei die Nachweisgrenze der eigentlichen PCR eine Zehnerpotenz niedriger liegt. Es konnten zwar Signale bei unter 6×10^2 Templates g^{-1} Boden erzielt werden, jedoch nicht reproduzierbar.

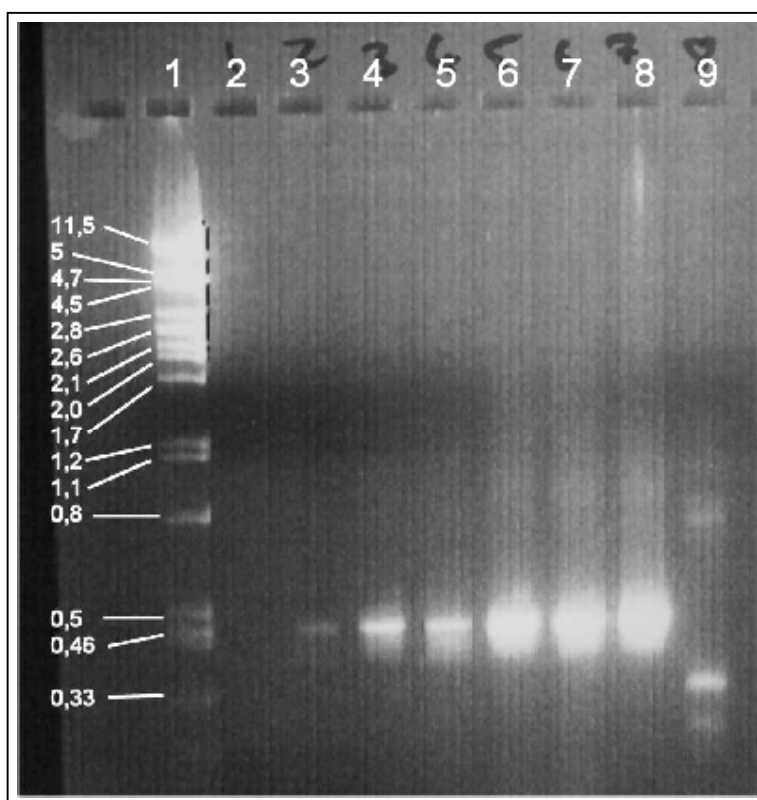


Abbildung 13: Experiment zur Nachweisgrenze des Fastprep Systems nach Günther.

In Bahn 1 Marker 8-*PstI* geschnitten. Bahn 2-8 PCR Fragmente nach PCR mit Tn501-Primern (siehe 2.27.1) mit DNA aus Präparationen von Boden-Gesamt-DNA von 0,5 g Boden jeweils versetzt mit unterschiedlichen Mengen an Templates. Mengen an Template: 2 = 5×10^1 , 3 = 10^2 , 4 = 10^3 , 5 = 10^4 , 6 = 10^5 , 7 = 10^6 , 8 = 10^7 auf 1 g Boden hochgerechnet. In Bahn 9 geschachtelte PCR mit den erhaltenen Fragmenten aus 4 (siehe 2.27.1).

3.7 Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse

Die Aufschlussmethoden wurden ebenfalls auf die Vollständigkeit der Lyse der eingesetzten Bakterien hin wie unter 2.16 beschrieben untersucht.

3.7.1 Ergebnisse zu Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse:

Es stellte sich heraus, dass bei keiner Methode abschließend ein nennenswertes Wachstum über 10^2 Kolonien g^{-1} Boden auf AIX Platten erfolgte.

Bei NI Platten war das Ergebnis ähnlich, wiederum kein größeres Wachstum, über 4×10^2 g^{-1} Boden außer bei Methode a (Erhitzen in kochendem Wasser) wurde eine CFU von 3×10^3 g^{-1} Boden gemessen. Die Bebrütung der aufgeschlämmten, unaufgeschlossenen Böden auf NI Medium brachte einen dichten Bakterienrasen auf dem NI-Medium.

3.8 Screening von Böden auf Transposasegene

3.8.1 Bodenprobennahme

Für die Untersuchungen wurden 32 verschiedene, nicht direkt oder soweit feststellbar gar nicht durch Eintrag exogener Bakterien, Antibiotika oder Schwermetalle belastete Böden ausgesucht. Ein Teil der Proben wurde in Kassel, Niederrhein um das AVZ herum und im Naturschutzgebiet Dönche genommen. Ein anderer Teil in Mecklenburg Vorpommern an der Müritz und wiederum ein anderer Teil entlang der B3 aus Richtung Marburg kommend auf der rechten Seite jeweils zwischen Feldflächen und älterem Baumbestand.

Die Proben wurden sowohl an räumlich nah nebeneinander gelegenen Stellen, als auch weit auseinander gelegenen Orten genommen. So wurde sichergestellt, zum einen ein eventuell räumlich gehäuftes Auftreten zu erfassen, als auch verschiedene, geografisch unterschiedliche Böden zu untersuchen.

Tabelle 12: Übersicht der genommenen Bodenproben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Nr.	Bodenproben	Bodenart
Kassel		
1	Treppenweg Baumgartenstraße 40, Kassel	Schluff
2	AVZ Parkhaus, Niederzwehren, Kassel	sandiger Schluff
3	(Kompostierte) Gartenerde, Baumgartenstraße 43, Kassel	Humus
4	Helleböhnenweg vor Garagen, Kassel	sandiger Schluff
5	Strauch vor AVZ, Niederzwehren, Kassel	sandiger Schluff
6	Grünfläche hinter AVZ Mathematik, Niederzwehren, Kassel	sandiger Schluff
7	Dönche, Mitte der Freifläche, Kassel	toniger Schluff
B3, von Marburg Richtung Kassel, in Fahrtrichtung rechte Seite		
8	Verzweigte Einfahrt zu Wiese, Ackerrand	toniger Schluff
9	Ackerrand mit Begleitgrün	toniger Schluff
10	Ackerrand mit Begleitgrün	toniger Schluff
11	Feldrand Wiese	toniger Schluff
12	Feldrand Acker	toniger Schluff
Mecklenburger Seenplatte, Kanustation Mirow		
13	Auffahrt Campingplatz runter links	schluffiger Sand, Löß
14	Fichte Campingplatzauffahrt, vorne	lehmiger Sand, Löß
15	Heidelbeerfläche am Nordhang, östlich vom Platz	schluffiger Sand, Löß
16	Rand eines angrenzenden Kartoffelfeldes, östliche Seite	schluffiger Sand, Löß
Niederzwehren, Kassel		
17	Maulwurfhügel vor AVZ	sandiger Schluff
18	Baum an Senke hinter Willy Brandt Schule	toniger Schluff
19	Dönche Hauptweg, Kurz nach Beginn, 50 m rechts	toniger Schluff
20	Dönche Hauptweg, Kurz nach Beginn, 100 m links	Schluff
21	Zwischen Hauptweg und Schulteich	Schluff
22	Direkt am Teich	Schluff
23	Hang Richtung Documenta Urbana	Sandiger Schluff
24	Kuppe am Hang bei Documenta Urbana, Nähe Naturschutzschild	Sandiger Schluff
25	Sitzbank hinter AVZ	Schluff
26	Baum vor Bibliothek	Sandiger Schluff
27	AVZ Eingang „Blumeninsel“	Schluff
Habichtswald, Weg von Konrad Adenauer Str , Parkplatz zu 7 Teichen		
28	200 m hinter Parkplatz, 10 m rechts vom Weg	toniger Schluff
29	dritte Weggabelung, rechte Seite 10 m vom Weg	toniger Schluff
30	Erste Lichtung, Waldrand	Schluff
31	Hang gegenüber dem ersten großen Teich	toniger Schluff
32	Hinter dem letzten Teich, 10 m	Schluff

3.8.2 Kontrollen:

Die Untersuchung der Böden erfolgte jeweils mit drei Kontrollen, einem negativen und zwei positiven Kontrollexperimenten:

1) Das negative Kontrollexperiment war ein PCR-Ansatz ohne Template, um den Ansatz auf Kontaminationen zu überprüfen.

2) Die erste Positiv-Kontrolle bestand aus einem PCR-Ansatz mit externem Template, um zu überprüfen ob unter den gewählten Bedingungen eine PCR erfolgt.

3) Für eine fehlgeschlagenen PCR bei den so durchgeführten Versuchen gibt es zwei Ursachen, nämlich zum einen kein vorhandenes Template in der aufgereinigten Bodenprobe und zum anderen zu viele Hemmstoffe in der aufgereinigten DNA aus dem Boden. Aufgrund der letzten Ursache bestand die zweite Positiv-Kontrolle aus einem normalen Reaktionsansatz mit der präparierten Boden-DNA wie im eigentlichen Versuch und zusätzlichem, extern zugesetztem Template. Dieser Ansatz sollte also verifizieren, ob eine Reaktion bei Verwendung der präparierten DNA aus dem Boden möglich gewesen wäre, sofern Template vorhanden gewesen wäre.

War die zweite Positivkontrolle negativ, wurden aliquotierte Mengen der aus dem Boden präparierten DNA eingesetzt, bis die Positiv-Kontrolle positiv war.

Aufgrund der sehr hohen Zahl von gleichzeitig anzusetzenden Reaktionen wurde die PCR mittels Mastermix gekühlt angesetzt.

Abschließend wurde jedes erzeugte PCR-Fragment mittels Dot-Blot verifiziert und erst nach positiver Hybridisierung als positiv bewertet.

3.8.3 Screening von Böden auf Transposasen mittels PCR

Die 32 Böden wurden nun auf das Vorhandensein von Transposase vom Typ Tn21, Tn501 und Tn3 hin mit der unter 2.17.1 beschriebenen Methode untersucht.

Die Bodenproben wurden soweit möglich grobmechanisch homogenisiert und durchmischt, Steine und größeres Pflanzenmaterial entfernt. Es wurden Bodenkrumen von einer Körnung zwischen 1 und 5 mm in der Boden-Lyse eingesetzt.

Die Bodenproben wurden für die erste Untersuchung mittels PCR 2 - 6 -mal präpariert.

3.8.4 Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposasegene mittels PCR:

Von diesen 32 untersuchten Böden zeigten fünf positive Signale, 27 Böden zeigten kein Signal.

Es wurde mittels PCR dreimal ein Signal vom Typ Tn21 und zweimal bei *tnpA* Typ Tn501 erhalten und mittels nested PCR und Dot-Blot verifiziert (siehe Abbildung 14).

Die Böden, bei denen ein Signal mittels PCR erzeugt werden konnte, wurden wie unter 2.18 beschrieben, mehrfach präpariert. Ein Transposasegen vom Typ Tn21 konnte bei zwei (Boden 3 und 8) der darauf folgenden wiederholten Präparationen und die vom Typ Tn501 (Boden 18) bei einer der darauf folgenden wiederholten Präparationen der gleichen Bodenprobe mittels PCR nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13, Spalte 7). Bei einer späteren Probenahme, ca. 4-6 Wochen danach, an der gleichen Stelle konnte es bei Boden 3 und 8 nachgewiesen werden, hingegen nicht mehr bei Boden 18. Bei Boden 24 hingegen konnte ein Transposasegen bei einer wiederholten Probenahme nachgewiesen werden, auch wenn es in der ursprünglichen Probe nicht ein weiteres Mal nachgewiesen werden konnte.

Alle anderen Bodenproben aus welchen ein Signal erhalten wurde, wurden ebenfalls nochmals präpariert, aber nur in diesem einen Fall wurde bei einem weiteren Aufschluss weitere Signale in der PCR erzielt.

Bei allen anderen Proben war dies nicht der Fall (siehe Tabelle 13).

Aus der genommenen Bodenprobe von Boden 6 wurde aus neun weiteren Teilproben DNA isoliert und auf das Vorhandensein von *tnpA* mittels PCR untersucht. Dieses Screening brachte bei vier von neun Präparationen ein weiteres positives Signal.

Die Untersuchungen der zweiten Probenahme am Probenahmeort der fünf mit PCR positiv gescreenten Proben brachte bei 3 der 15 neuen Proben zu je 6 Präparationen ein positives Ergebnis (siehe Tabelle 13, Spalten 1-7).

Bei den Böden bei denen in der ersten Präparation keine Transposase nachgewiesen werden konnte (1,2,4 und 5) und bei denen ebenfalls neue Bodenproben genommen wurden und mehrfach neue Präparationen durchgeführt wurden, konnte auch diesmal keine Transposase nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13, Spalten 8-10).

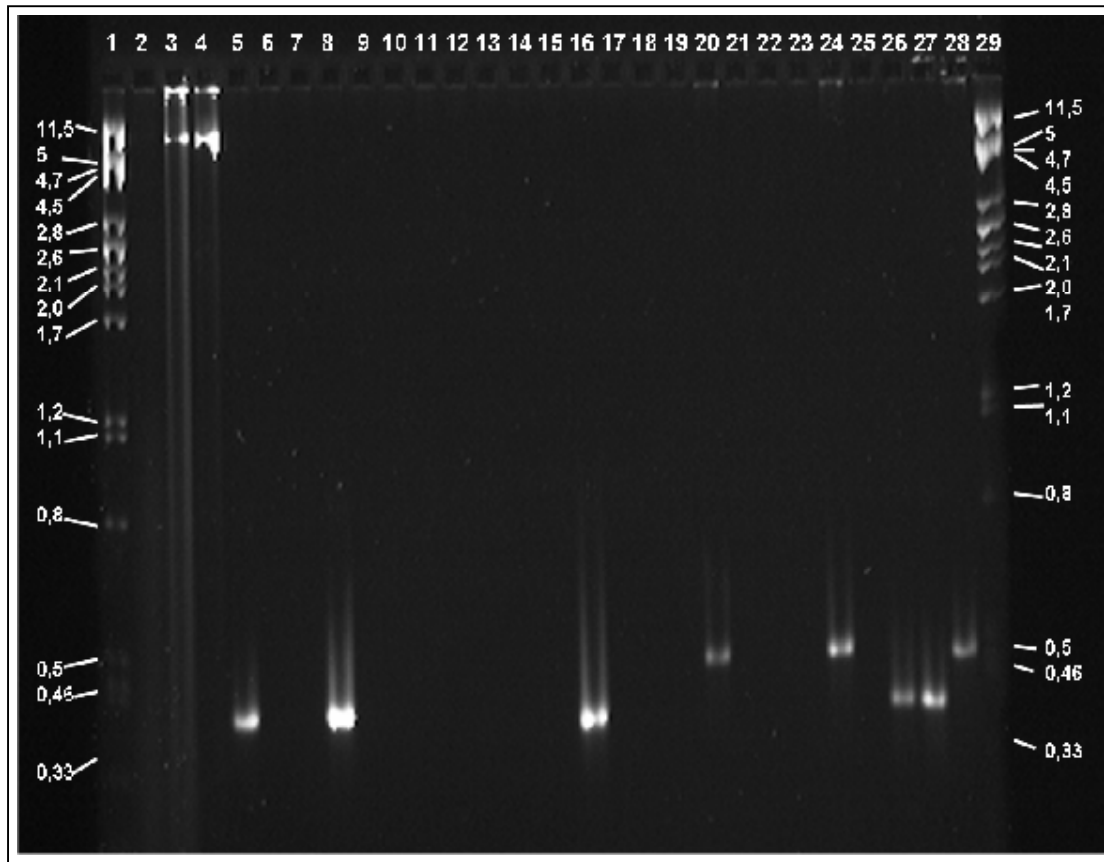


Abbildung 14: PCR mit Gesamt-Boden-DNA

In der Abbildung ist exemplarisch das Screening von 6 Böden auf *tnpA* vom Typ Tn501, Tn3, und Tn21 dargestellt. Die Gesamt-DNA wurde aus dem Boden mittels Fast Prep System nach Günther isoliert und anschliessend mittels PCR untersucht. Die PCRs sind jeweils in Gruppen zu sechs hintereinander aufgetragen gefolgt von einer Positiv- und einer Negativkontrolle für den jeweiligen Mastermix. Die letzten drei PCRs sind Positivkontrollen für die PCRs mit Boden-Gesamt-DNA der Böden eins und zwei mit Primern vom Typ *tnpA* Tn501 und drei mit Primern vom Typ *tnpA* Tn21. Die Positivkontrollen für die anderen drei Böden wurden in einem zweiten Agarosegel mitgefahren. Erste und letzte Bahn jeweils Marker 8-*Pst*I.

In Bahn 2 - 7 befinden sich die PCRs für *tnpA*, Typ Tn501 der Böden 5-10, Positivkontrolle in 8 und Negativkontrolle in 9 für Mastermix mit diesen Primern.

In Bahn 9 - 15 befinden sich die PCRs für *tnpA*, Typ Tn3 der Böden 5-10, Positivkontrolle in 16 und Negativkontrolle in 17 für Mastermix mit diesen Primern.

In Bahn 18 - 23 befinden sich die PCRs für *tnpA*, Typ Tn21 der Böden 5-10, Positivkontrolle in 24 und Negativkontrolle in 25 für Mastermix mit diesen Primern.

Ein positives Signal wurde in Bahn 5 für Boden Nr. 8 mit Primern *tnpA* Typ Tn501, in Bahn 20 für Boden Nr. 6 mit Primern *tnpA* Typ Tn21 erzielt.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Böden auf Transposasegene vom Typ Tn3, Tn21 und Tn501

Boden Nr.	Erste Probennahme						Neue Probennahme			Erste und Neue Probennahme							
	Anzahl Präparationen	PCR Signal Primer Typ			Aliquots in PCR	Signal bei zweiter Überprüfung gleicher Bodenprobe mittels neuer Präp. und anschl. PCR	Neue Probennahme an gleicher Stelle der ersten Probennahme			Signal Dot-Blot		Ausplattiert für Kolonie Hybridisierung		Positive Signale bei Kolonie Hybridisierung			
		Tn3	Tn21	Tn501			Anzahl	Präparationen	PCR Signal	Erste Probennahme	Neue Probennahme	Hg Medium	E Wachstum auf Hg	Blot Signale	tnpA Tn3	tnpA Tn21	tnpA Tn501
1	3	-	-	-	1	-	3	6	-	-	-	+	260	-	-	-	-
2	3	-	-	-	1	-	3	6	-	-	-	+	420	-	-	-	-
3	6+6	-	+	-	3	3	3	18	1	+	+	+	1200	48	-	+(36)	+(12)
4	3	-	-	-	1	-	3	6	-	-	-	+	280	-	-	-	-
5	3	-	-	-	1	-	3	6	-	-	-	+	150	-	-	-	-
6	1+6	-	-	+	1	-	3	18	0	+	-	+	1600	6	-	-	+
7	3	-	-	-	1	-	3	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	3+6	-	+	-	1	4	3	18	1	+	+	+	1300	12	-	+	-
9	2	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	6	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	3+6	-	-	+	1	4	3	18	0	+	-	+	760	0	-	-	-
19	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	3+6	-	+	-	1	-	3	18	1	+	+	+	1400	26	-	-	+
25	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	6	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Böden auf Transposasegene vom Typ Tn3, Tn21 und Tn501. Spalte 2 „Präparationen“ bezeichnet die Anzahl der erfolgten und untersuchten Präparationen eines Bodens mittels PCR. „Aliquots In PCR“ bezeichnet die Anzahl der Aliquotierungen bei den eingesetzten PCRs bis die Positivkontrollen positiv wurden. „Neue Probenahme“ bezeichnet die Anzahl der neu genommenen Proben des gleichen Bodens für die weiteren PCRs bei positiven Signal der ursprünglichen PCR (siehe 3.8.4). Unter „Neue Probennahme“ Unterpunkt „Präparationen“ bezeichnet die Anzahl der für weitere PCRs erfolgten Präparationen. Bei „Erste und Neue Probennahme“ Unterpunkt „Signal Dot-Blot“ zeigt, welche Signale aus der ersten Bodenprobe resultieren und welche aus den anschließenden Probenahmen. Unter „Ausplattiert für Koloniehybridisierung“ ist durch ein + angezeigt, wenn auf Hg-Medien ausplattiert wurde und Wachstum erfolgte. Unter „E Wachstum auf Hg“ ist die Summe der mittels Koloniehybridisierung gescreenten Kolonien. „Positive Signale bei Kolonie Hybridisierung“ zeigt an, welche Böden so untersucht wurden und auf welchem angegebenen Medium die Isolate gefunden wurden, welche ein Signal ergaben.

3.9 Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 1

Eine weitere, intensive Untersuchung der 5 Bodenproben, aus welchen ein Signal mittels PCR erhalten wurde fand anschließend statt. Im Falle der Böden, bei welchen ein Hinweis auf Tn21 bzw. Tn501 vorlag, wurden je 10 Hg-Platten angesetzt um eine Vorselektion zu ermöglichen, da *tnpA* hier häufig mit Quecksilberresistenz gekoppelt ist.

Die so bewachsenen Membranen wurden anschließend wie unter 2.25.2 beschrieben geblottet und mit den entsprechenden Sonden wie unter 2.26 beschrieben hybridisiert. Anschließend wurden die Kolonien mittels DNA-Sonden auf das Vorhandensein von *tnpA* vom Typ Tn3, Tn21, Tn501 hin untersucht. Die Sonden wurden mit den unter 2.27.1 beschriebenen Primern mittels PCR wie unter 2.26.1 hergestellt.

Weiterhin wurde die von den unterschiedlichen Böden gewonnene Gesamt-DNA per Dot-Blot auf Nylonmembranen übertragen und per Gen-Sonden auf das Vorhandensein von *tnpA* vom Typ Tn3, Tn21, Tn501 wie unter 2.25.4 beschrieben hin untersucht. Ergebnisse zur Untersuchung der weiteren Bodenproben sind unter 3.11 dargestellt.

3.9.1 Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung

Bei drei der geblotteten Böden (Boden Nr. 3, 8 und 24) kam es sowohl beim Dot-Blot als auch bei der Koloniehybridisierung zu positiven Signalen (Tabelle 13). Bei Boden 6 kam es nicht zu einem Signal im Dot-Blot jedoch bei der Koloniehybridisierung. Alle Positiv- und Negativkontrollen waren erwartungsgemäß.

3.10 Herstellung von Gensonden für Transposase, *tnpA* Typ Tn3, Tn21 und Tn501

Für die Herstellung der Sonden wurde jeweils eine PCR durchgeführt (siehe 2.27). Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden wie unter 2.20 beschrieben aufgereinigt und anschließend wie unter 2.26.1 beschrieben markiert. Die Sonden wurden anschließend per Dot-Blot (Abbildung 15) überprüft.

Tabelle 14: Überprüfung der Gensonden, *tnpA* Typ Tn3, Tn21 und Tn501

Plasmid / DNA	Sonden Typ		
	Tn3 <i>tnpA</i>	Tn21 <i>tnpA</i>	Tn501 <i>tnpA</i>
PACYC184::Tn3	+	-	-
pBR322::Tn2411	-	+	-
PACYC184::Tn501	-	-	+
RSF1010	-	-	-
pBR322	-	-	-
pUC18	-	-	-
<i>P. stutzeri</i> DNA	-	-	-
<i>E. coli</i> C600 DNA	-	-	-

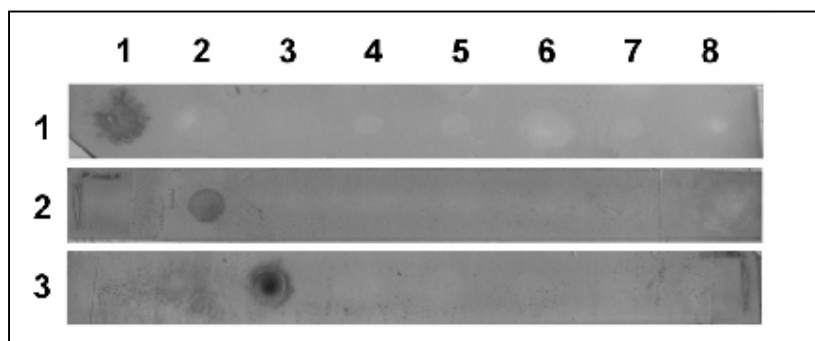


Abbildung 15: Überprüfung der Gensonden vom Typ Tn3 *tnpA*, Tn21*tnpA*, Tn501*tnpA*

Auf Nylonmembranstreifen wurde verschiedene DNA im Dot-Blot aufgebracht: 1= pACYC184::Tn3, 2= pBR322::Tn2411, 3= pACYC184::Tn501, 4= RSF1010, 5= pBR322, 6= pUC18, 7= *P. stutzeri* DNA, 8= *E. coli* C600 DNA. Anschließend wurde Streifen 1 mit Sonden vom Typ Tn3 *tnpA*, Streifen 2 mit Tn21 *tnpA*, und Streifen 3 mit Tn501 *tnpA* wie unter 2.25.4 beschrieben geblottet, die Sonden hybridisierten spezifisch.

3.11 Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 2

Wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigten besteht ansatzweise eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Screeningversuche welche mit PCR durchgeführt wurden und denen die durch Kolonieblotting erhalten wurden. Da es sich bei dem nachzuweisenden Phänomen um ein seltenes handelt, wurden die Untersuchungen auf eine statistisch aussagefähigere Basis gehoben. Hierzu wurden alle Böden gleichzeitig mittels Ausplattierung vorselektiert und mit Mitteln der Molekularbiologie auf potentiell Transposon-tragende BMO hin untersucht.

Hierzu wurden die unter Tabelle 12 beschriebenen Böden auf die von Tn21, Tn3 und Tn501 bekannten Resistenzen (Tn21: Su/Sm, Hg; Tn3: Ap und Tn501: Hg) als Leitgene phänotypisch hin vorgescreent. Um auch ähnliche AB Kopplungsgruppen als die bekannten (siehe

1.11) bzw. auch evtl. defekte Transposons zu erfassen, wurde jeder Ansatz auch auf NI-Medium direkt wie unter 2.10 beschrieben ausplattiert.

Dies geschah in verschiedenen Verdünnungsstufen wie unter 2.10 beschrieben. Die so bewachsenen Platten wurden anschließend wie unter 2.10 beschrieben auf Nylonmembranen abgeklatscht und mittels Koloniehybridisierung wie unter 2.25.2 beschrieben mit den entsprechenden *tnpA* Sonden vom Typ Tn21*tnpA*, Tn3*tnpA*, und Tn501*tnpA*, wie unter 2.26 beschrieben, hybridisiert (siehe Abbildung 16).

3.12 Ergebnisse zu Screening von Böden auf Transposons mittels Kolonie-Hybridisierung Teil 2:

Mittels Kolonie-Blot aus direkter Bodenplattierung wurden in dieser Arbeit ca. 28000 (Summe aus Tabelle 13 und diesem Teil) Kolonien auf Transposasen vom Typ Tn21*tnpA*, Tn3*tnpA*, und Tn501*tnpA* hin untersucht. Hierbei wurden 156 positive Signale erzielt, 91-mal Typ Tn21, dreimal Tn3, und 62-mal Tn501.

Bei den hier dargestellten ca. 21000 geblotteten Kolonien aus unbelasteten Böden kam es zu 66 positiven Signalen. 43-mal vom Typ Tn21, dreimal Tn3, und 20-mal Tn501. Alle Positiv- und Negativkontrollen waren erwartungsgemäß.

Die entsprechenden Kolonien wurden anschließend selektiert, wobei sich 15 der Wildisolate einer DNA Isolierung nicht zugänglich zeigten. So wurden 51 Isolate mittels eines Dot-Blots unter stringenteren Bedingungen als die Koloniehybridisierung (siehe 2.25.2) untersucht. Es zeigte sich bei 16 dieser 51 Isolate ein Signal im Dot-Blot und hiervon wiederum bei dreien in der PCR mit Primern vom Typ Tn21. Diese drei Isolate bekamen die Bezeichnung G16, G26 und G37 und wurden später noch weiter untersucht (siehe Abbildung 21).

Als Positiv- und Negativkontrollen wurden Membranen mit Dot-Blotts von pBR322::Tn2411, pACYC184::Tn501 und pACYC184::Tn3 mitgeführt. Obwohl einige der BMO Plasmide trugen, zeigte keines der Plasmide ein Signal im Southern-Blot. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

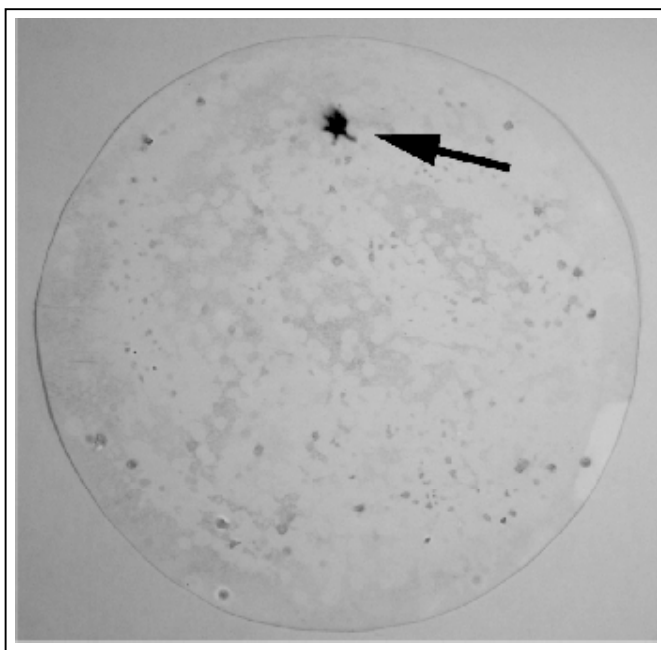


Abbildung 16: Hybridisierung eines Kolonieblots von direkt aus Boden selektierten BMO

Hier exemplarisch dargestellt ein hybridisierter Kolonie-Blot einer über Nacht gewachsenen Selektivplatte. Es wurde ein Abklatsch von dieser Platte durch Auflegen der Membran hergestellt und dieser dann wie unter 2.25.2 beschrieben geblottet und anschließend mit *tnpA* Sonden vom Typ Tn21 wie unter 2.26 beschrieben hybridisiert. Auf der Membran befanden sich ca. 400 Kolonien. Der Pfeil zeigt auf ein positives Signal einer Kolonie. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden auf einem eigenen Membranstreifen mitgeführt. Es wurden immer Chargen von 12 Membranen geblottet und hybridisiert. Kolonien, welche ein Signal ergaben, wurden anschließend vereinzelt und mittels eines zweiten Kolonieblottes auf *tnpA* vom Typ Tn3 und Tn501 hin weiter untersucht.

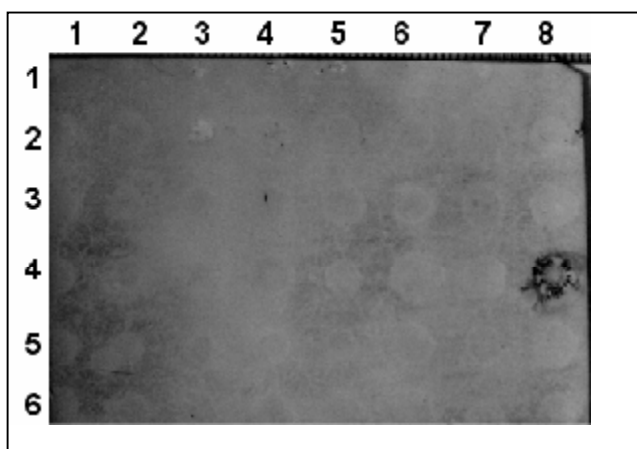


Abbildung 17: Hybridisierung eines Kolonieblots von direkt aus Boden selektierten BMO

Hier exemplarisch dargestellt ein hybridisierter Kolonie-Blot isolierter BMO welche ein Signal auf *tnpA* Typ Tn21 ergaben (siehe Abbildung 16) einer über Nacht bewachsenen Membran auf Selektivmedium. Die Membran wurde wie unter 2.25.2 beschrieben geblottet und anschließend mit *tnpA* Sonden vom Typ Tn501 wie unter 2.26 beschrieben hybridisiert. Auf der Membran befinden sich 64 Kolonien. Ein positives Signal ist ganz rechts in Zeile vier zu sehen. Die Positiv- und Negativkontrollen wurden auf einem eigenen Membranstreifen mitgeführt. Es wurden immer Chargen von 12 Membranen geblottet und hybridisiert.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Isolation von BMO

Bodenproben Nr.	Wachstum auf Medium & Summe der Kolonien welcher per Kolonie-Blot geblottet wurden						Summe der Signale bei Kolonieblot		Sonde vom Typ	Dot - Blot		Signale bei PCR		
	Ap (Tn3)		Su / Sm (Tn21)		Hg (Tn501)		NI			Präparierte Stämme	Signale			
	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot						
1	240	0	110	-	26	-	360	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
2	180	0	120	-	31	-	320	0	-	6	Tn3	3	-	-
		-		-		6		0			Tn501		3	
		-		0		0		0			Tn21		-	
3	280	0	210	-	42	-	340	0	-	8	Tn3	2	-	-
		-		-		2		0			Tn501		0	
		-		4		2		0			Tn21		0	
4	220	0	190	-	19	-	290	0	-	2	Tn3	2	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		2		0			Tn21		0	
5	220	1	260	-	89	-	380	0	1	1	Tn3	1	0	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
6	260	0	180	-	42	-	320	0	-	1	Tn3	1	-	-
		-		-		1		0			Tn501		0	
		-		0		0		0			Tn21		-	
7	180	0	250	-	18	-	340	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
8	280	0	180	-	0	-	290	0	-	4	Tn3	4	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		4		0		4			Tn21		0	
9	120	0	130	-	0	-	240	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
10	140	0	260	-	12	-	210	0	-	7	Tn3	3	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		7		0		7			Tn21		0	
11	90	0	280	-	130	-	180	0	-	5	Tn3	3	-	-
		-		-		5		0			Tn501		3	
		-		0		0		0			Tn21		-	
12	210	0	140	-	54	-	200	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
13	180	0	140	-	180	-	190	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
14	220	0	290	-	25	-	200	0	-	2	Tn3	2	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		2		0		2			Tn21		0	
15	160	0	120	-	13	-	180	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
16	180	0	280	-	37	-	230	0	-	2	Tn3	2	-	-
		-		-		2		0			Tn501		2	
		-		0		0		0			Tn21		-	
17	240	0	120	-	3	-	310	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	
18	270	0	140	-	32	-	320	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		0			Tn501		-	
		-		0		0		0			Tn21		-	

Bodenproben Nr.	Wachstum auf Medium & Summe der Kolonien welcher per Kolonie-Blot geblottet wurden								Summe der Signale bei Kolonieblott		<i>tnpA</i> Sonde vom Typ	Dot - Blot		Signale bei PCR
	Ap (Tn3)		Su / Sm (Tn21)		Hg (Tn501)		NI		E Signale je Sonde / K-Blot Boden	E Signale je Boden		Präparierte Stämme	Signale	
	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot	E geblotteter Kolonien	E Signale auf K-Blot						
19	290	0	80	-	4	-	300	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
20	310	0	170	-	0	-	290	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
21	220	0	130	-	0	-	320	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
22	240	0	150	-	0	-	340	0	-	5	Tn3	2	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		5		0		-			Tn21		2	
23	140	0	120	-	4	-	300	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
24	180	0	130	-	21	-	270	0	-	2	Tn3	6	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		2		-			Tn21		2	
25	240	0	210	-	30	-	210	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
26	180	0	160	-	37	-	270	0	-	8	Tn3	8	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		8		0		-			Tn21		4	
27	250	0	190	-	19	-	310	0	-	6	Tn3	6	-	-
		-		-		4		-			Tn501		-	
		-		2		0		-			Tn21		2	
28	220	0	70	-	10	-	340	0	-	5	Tn3	5	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		5		0		-			Tn21		0	
29	240	0	100	-	9	-	370	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
30	210	2	60	-	10	-	280	0	-	2	Tn3	1	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
31	180	0	70	-	12	-	230	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
32	180	0	50	-	8	-	260	0	-	0	Tn3	0	-	-
		-		-		0		-			Tn501		-	
		-		0		0		-			Tn21		-	
E	6750	3	5090	37	917	26	8990	0	66	66	Tn3= 3 Tn501=62 Tn21=91	51	16	3

3.13 Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionereignissen

Um nachzuweisen ob transponierbare Elemente in der Flora unbelasteter Böden oder evtl. frei vorkommen, wurde ein weiterer Ansatz gewählt und zwar der Einsatz von Plasmiden. Diese Methode wird unter Laborbedingungen angewandt um transponierbare Elemente und deren Fähigkeit zur Transposition nachzuweisen [McGregor, 2003; Bishop u. Sherratt, 1984; Gerlach u. Wiedemann, 1985].

Transponiert ein Element in solch einer Weise in ein Plasmid, dass sich der Phänotyp eines MO ändert, so kann man nach dem veränderten Phänotyp screenen und so eine Transposition nachweisen. Ein Plasmid, welches Positivscreening erlaubt und hier eingesetzt wurde ist pRB2138 (siehe 2.22.4.1). Es ist in der Lage ein transponierbares Element „zu fangen“ bzw. können mittels des Plasmides Transpositionereignisse phänotypisch nachgewiesen werden [Bishop u. Sherratt, 1984]. Da pRB2138 ein positives Screening auf Tc^r Kolonien ermöglicht, können so schnell größere Mengen an Material untersucht werden, was bei nachzuweisenden Phänomenen mit geringer Häufigkeit von großem Vorteil ist (Siehe 2.22.4)

Um festzustellen, ob mit dieser Methode ein Gentransfer mit anschließender Transposition in unbelasteten Böden nachgewiesen werden kann, wurde aufgrund des hohen administrativen Aufwandes kein Freilandversuch durchgeführt, sondern dieser Frage mittels Bodensäulen als einem Modellsystem für Bodenhabitats nachgegangen.

pRB2138 wurde in Vorversuchen auf Eignung hin in Kombination mit Bodensäulen eingesetzt zu werden untersucht. Konjugation an sich findet in Bodensäulen statt (siehe 1.9.1.1).

3.14 Konjugationsversuche: *Pseudomonas* und *E. coli* als Wirte von pRB2138

Da die anschließenden Experimente mittels Bodensäulen durchgeführt wurden, sollten neben *E. coli* sowohl *P. stutzeri* als auch *P. putida*, als zwei Boden-MO, verwendet werden. *P. stutzeri* und *P. putida* sollten in einem Mikrokosmos mit den natürlicherweise vorkommenden BMO bzw. mit der dort vorkommenden DNA in Kontakt gebracht werden. Ziel dieses Ansatzes war es, auf diesem Wege etwas über das Vorhandensein von transponierbaren Elementen in unbelasteten Böden zu erfahren, ein Element zu „fangen“ und es näher zu charakterisieren.

3.15 Herstellung Digoxigenin markierter Sonden zum Nachweis für pRB2138

Zur Überprüfung der folgenden Ergebnisse wurden Gensonden eingesetzt, die wie folgt hergestellt wurden: pRB2138 wurde mit *Pst* I + *Bam*HI verdaut. Dies schneidet ein 1,15 kb Insert dessen Ursprung in pTR262 liegt aus, so dass keine Kreuzreaktionen mit pBR322 oder PACYC184 zu erwarten sind (siehe 2.22.4.1). Die DNA wurde mittels Gelelektrophorese

getrennt, das entsprechende Fragment aufgereinigt und anschließend mit Digoxigenin wie unter 2.26 beschrieben markiert. Die Sonden wurden mittels Dot-Blot auf Spezifität hin (siehe Tabelle 16) überprüft.

Tabelle 16: Überprüfung der pRB2138 DNA – Sonden.

Stamm	Hybridisierungssignal
<i>E. coli</i> C600	-
<i>E. coli</i> Dh5 α	-
<i>P. fluorescens</i> R2f	-
<i>P. putida</i> "Iso"	-
<i>P. putida</i>	-
<i>P. stutzeri</i>	-
Plasmid	
pRB2138	+
PACYC184::Tn3	-
PACYC184::Tn501	-
pBR322::Tn2411	-
RSF1010	-

3.16 Vorversuche zum Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionereignissen

In den Vorversuchen sollte eruiert werden, ob bei Beschickung einer sterilen, autoklavierten Bodensäulen mit zwei definierten und geeigneten MO, welche in der Lage sind zu konjugieren bzw. DNA aufzunehmen, eines dieser Phänomene nachgewiesen werden kann.

In den nachfolgenden, eigentlichen Versuch sollte untersucht werden ob bei Kontakt mit der autochthonen Bakterienflora die Vorgehensweise geeignet ist, ein solches Phänomen nachzuweisen. Hierzu wurden die bereits mit molekularbiologischen Methoden (siehe Tabelle 12) voruntersuchten Böden eingesetzt.

3.17 Nachweis von Transpositionereignissen mittels Plasmid pRB2138

Zur Überprüfung der Funktion von pRB2138 wurden Konjugations- und Elektroporations-Experimente durchgeführt.

Es standen folgende Transposon-tragende Plasmide zur Verfügung: pACYC184::Tn3, pACYC184::Tn501 und pBR322::Tn2411. Es wurde auf Tc^r Kolonien hin gescreent.

Da Tn2411 ebenfalls eine Tc-Resistenz besitzt, kann eine Transposition nicht durch einen Tc^r Phänotyp nachgewiesen werden, sondern durch einen (Tc^r)/Cm^r /Sm^r Phänotyp.

Hierzu wurden die eingesetzten Stämme von *P. stutzeri*, *P. putida* und *E. coli* c600+, Dh5 α und RRI mit pRB2138, pACYC184::Tn3, pACYC184::Tn501 und pBR322::Tn2411 für die Experimente erfolgreich elektroporiert.

Tabelle 17: Zusammenfassung der eingesetzten elektroporierten Stämme.

Plasmid	Elektroporiert in				
	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. putida</i>	<i>E. coli</i> c600+	<i>E. coli</i> Dh5 α	<i>E. coli</i> RRI
pRB2138	+	+	+	+	---
PACYC184::Tn3	---	+	+	---	+
PACYC184::Tn501	---	+	+	---	+
pBR322::Tn2411	---	---	+	---	---

3.18 Vorversuch Konjugation: *Pseudomonas* und *E. coli* als Wirte von pBR2138

Es wurden die Elektroporanten mit Transposon-beherbergenden Stämmen in einem Agarplattenmating wie unter 2.22.1 beschrieben 5 h bei 37 °C inkubiert. Da sich bei 5 h Inkubationszeit keine Transpositionereignisse nachweisen ließen, wurden die Inkubationsbedingungen für eine höhere Transpositionsrate der hier eingesetzten zur Tn3 Familie gehörenden Transposons auf mindestens 35 Generationen erhöht und die Temperatur (auch für *E. coli*) auf RT geändert [Bennett u. Grinstead, 1988].

3.19 Vorversuch Elektroporation

Eine weitere Kontrolle wurde durch Elektroporation der gleichen, oben eingesetzten Transposon-beherbergenden Plasmide in die pRB2138 beherbergenden Stämme durchgeführt. Die Elektroporation wurde wie unter 2.22.3 beschrieben durchgeführt. Abweichend zu der Vorschrift wurden die Elektroporanten nicht 1 h auf einem Roller inkubiert sondern jeweils auf einer NI –Agarplatte.

Da sich bei 5 h Inkubationszeit keine Transpositionereignisse nachweisen ließen wurden die Inkubationsbedingungen analog zu den Konjugationsversuchen auf 25 Generationen erhöht und die Temperatur (auch für *E. coli*) auf RT geändert.

3.19.1 Ergebnisse zum Nachweis von Transpositionereignissen mit Plasmid pRB2138

Bei den ersten experimentellen Ansätzen (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15) konnten sowohl bei den Konjugationsexperimenten, als auch bei den Elektroporationen keine Tc^r bzw. Cm^r/Sm^r Kolonien nachgewiesen werden. Nach drei Tagen waren die Tc-Platten mit zahlreichen, streuenden Satellitenkolonien rasenartig überzogen. Diese Kolonien wurden isoliert und auf Plasmide hin präpariert. Es konnte mittels Agarosegel-Elektrophorese und Dot-Blot keine Transpositionen nachgewiesen werden.

Nach Veränderung der Bedingungen fand in sieben Fällen (3, 5, 6, 11, 13, 14, 15), wie unter 3.18 und 3.19 beschrieben, Transposition erfolgreich statt. Es konnte mittels Agarosegel-Elektrophorese und Dot-Blot Transposition nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18).

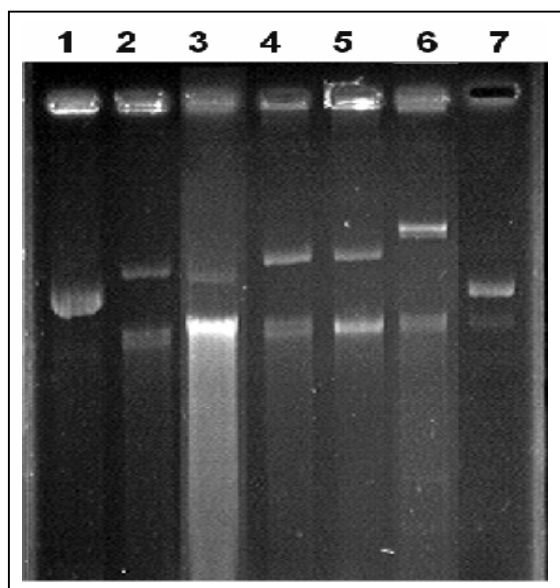


Abbildung 18: pRB2138 nach Transposition von Tn3, Tn21 und Tn 501

Plasmid pRB2138 nach Transposition im Elektroporationsexperiment und Konjugationsexperiment, verschiedene Bahnen aus einem Agarosegel. Bahn 1 und 7 pRB2138 ohne Transpositionereignis. Bahn 2 Transposition von Tn3 in pRB2138 aus Elektroporationsexperiment. Bahn 3 Transposition von Tn3 in pRB2138 aus Konjugationsexperiment. Bahn 4 Transposition von Tn501 in pRB2138 aus Elektroporationsexperiment. Bahn 5 Transposition von Tn501 in pRB2138 aus Konjugationsexperiment. Bahn 6 Transposition von Tn2411 in pRB2138 aus Konjugationsexperiment.

Tabelle 18: Ergebnisse der Vorversuche Konjugation und Elektroporation mit Plasmid pRB2138

Nr.	Konjugation	Plasmid	Genera- tionen	CFU	Resis- tente	Veruchs- sansätze	Genera- tionen	CFU	Resis- tente	Veruchs- sansätze	Selektiv Medium	Transpo- sition
	Stamm											
1	<i>E. coli</i> Dh5w	pRB2138	23	10 ⁸	0	5	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> RRI	pACYC184::Tn3										
2	<i>E. coli</i> Dh5w	pRB2138	23	10 ⁸	0	5	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> RRI	pACYC184::Tn501										
3	<i>E. coli</i> C600	pRB2138	-	-	-	-	40	>10 ⁸	+	3	Tc	+
	<i>E. coli</i> C600	pACYC184::Tn3										
4	<i>E. coli</i> C600	pRB2138	-	-	-	-	40	>10 ⁸	-	3	Tc	-
	<i>E. coli</i> C600	pACYC184::Tn501										
5	<i>E. coli</i> C600	pRB2138	-	-	-	-	40	>10 ⁸	+	-	Cm / Sm	+
	<i>E. coli</i> C600	pBR322::Tn2411										
6	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	15	10 ⁸	0	3	40	>10 ⁸	+	3	Tc	+
	<i>P. putida</i>	pACYC184::Tn3										
7	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	15	10 ⁸	0	3	40	>10 ⁸	-	3	Tc	-
	<i>P. putida</i>	pACYC184::Tn501										
	Elektroporation											
	Stamm	Plasmid										
8	<i>E. coli</i> Dh5w	pRB2138	15	10 ⁶	0	5	-	-	-	-	Tc	-
		pACYC184::Tn3										
9	<i>E. coli</i> Dh5w	pRB2138	15	10 ⁶	0	5	-	-	-	-	Tc	-
		pACYC184::Tn501										
10	<i>E. coli</i> Dh5w	pRB2138	15	10 ⁶	0	5	-	-	-	-	Cm / Sm	-
		pBR322::Tn2411										
11	<i>E. coli</i> C600	pRB2138	-	-	-	-	25	>10 ⁶	+	5	Tc	-
		pACYC184::Tn3										
12	<i>E. coli</i> C600	pRB2138	-	-	-	-	25	>10 ⁶	-	5	Cm / Sm	-
		pBR322::Tn2411										
13	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	10	10 ⁵	0	5	28	>10 ⁶	+	5	Tc	+
		pACYC184::Tn3										
14	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	10	10 ⁵	0	5	28	>10 ⁶	+	5	Tc	+
		pACYC184::Tn501										
15	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	10	10 ⁵	0	5	28	>10 ⁶	+	5	Cm / Sm	+
		pBR322::Tn2411										

In der Tabelle links jeweils die Stämme mit denen ein Konjugations- bzw. Elektroporationsexperiment durchgeführt wurde mit den jeweiligen Plasmiden. Als Generationszeit wurden für *E. coli* 20 min und für *P. stutzeri* 30 min angesetzt. CFU bezieht sich auf die Anzahl der jeweilig eingesetzten Zellen. In der Spalte Selektiv-Medium ist das für das entsprechende Experiment gewählte Medium angegeben.

3.20 Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionereignissen

3.20.1 Vorversuch: Überprüfung des Systems in sterilen Bodensäulen

Anschließend wurde mittels Bodensäulen in sterilem Boden überprüft, ob mit diesem Ansatz auch im Boden transponierbare Elemente nachgewiesen werden können. Es wurden für dieses Experiment zwei Säulen wie unter 2.23 beschrieben angesetzt.

Die Säulen wurden mit ca. 5×10^{10} Zellen von *P. stutzeri* (pRB2138), sowie mit ca. 10^{10} Zellen von *P. putida* (pACYC184::Tn3, pBR322::Tn2411) in 15 ml sterilem Leitungswasser beimpft. Die Säulen wurden täglich mit 5 ml sterilem Leitungswasser befeuchtet und die sich im unteren Sammelgefäß befindliche Flüssigkeit abgezogen, zentrifugiert und zur Überprüf-

ung ausplattiert. Die so ankonzentrierten MO wurden auf Tc- bzw. Cm/Sm-Platten ausplattiert und überprüft.

3.20.2 Ergebnisse zu Vorversuch: Überprüfung des Systems in sterilen Bodensäulen

Die oben beschriebenen Zahlen an eingebrachten Zellen ergaben bereits nach einem Tag einen ersten Durchfluss von eingespülten Zellen. Nach ca. drei bis vier Wochen Verweildauer in der Säule konnten die ersten Cm^r/Sm^r bzw. Tc^r Kolonien, welche auf Transposition zurückzuführen waren, detektiert werden. Diese wurden mittels Dot-Blot und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die Banden der DNA lagen so, dass eine Transposition von Tn3 in pRB2138 sowie von Tn2411 in pRB2138 stattgefunden haben muss (siehe Abbildung 19). Es hat also in der sterilen Säule im Ansatz 1 eine Konjugation mit anschließender Transposition stattgefunden, welche nach 23 Tagen nachgewiesen werden konnte. Nach 27 Tagen konnte dies für Ansatz 2 nachgewiesen werden.

Um die Persistenz der MO in der Säule zu überprüfen wurden nach 5 Wochen die Matrizes der Säulen aufgeschlämmt und auf Selektivmedium ausplattiert. Es konnten in der ersten Säule 9×10^4 *P. stutzeri* und 6×10^5 *P. putida*, in der zweiten Säule 6×10^4 *P. stutzeri* und 4×10^5 *P. putida* je 5g Matrix nachgewiesen werden. Wegen der Zugabe des Kieses entsprechen 5 g Säulenmatrix ca. 1g Boden.

P. stutzeri (pRB2138) wurde als Cm^r / Tp^r -, *P. putida* (pBR322::Tn2411) als Sm^r / Hg^r -und *P. putida* (pACYC184::Tn3) als Ap^r -CFU nachgewiesen.

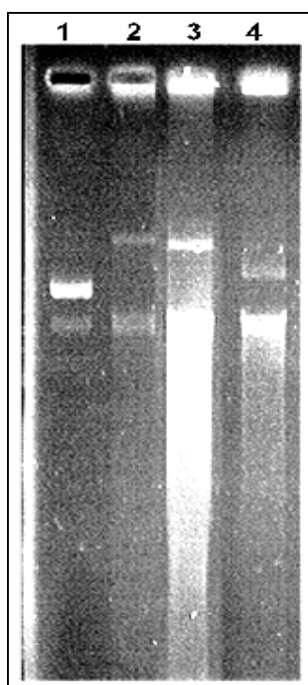


Abbildung 19: pRB2138 im Transpositionsexperiment in Bodensäulen

Plasmid pRB2138 nach Transposition im Konjugationsexperiment in Bodensäulen, verschiedenen Bahnen aus einem Agarosegel. Bahn 1 pRB2138 ohne Transpositionereignis. Bahn 1 und 2 Transposition von Tn2411 in pRB2138 aus Konjugationsexperiment in Bodensäule. Bahn 4 Transposition von Tn3 in pRB2138 aus Konjugationsexperiment in Bodensäule.

Tabelle 19: Überprüfung des Systems mit sterilen Bodensäulen

Säule Nr.	Stamm	Plasmid	Versuchsdauer in d	CFU auf entsprechendem Selektivmedium nach 21 d				Hybridisierungssignal zu pRB2138 Sonden	Transposition	Cm ^r / Tp ^r	Ap ^r	Cm ^r / Tp ^r	Sm ^r / Hg ^r
				Tc ^r + Cm ^r 1 - 22 d	Tc ^r + Cm ^r nach 23 d	Cm/Tc ^r + Sm ^r 1 - 26 d	Cm/Tc ^r + Sm ^r nach 27 d						
1	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	35	0	+	---	---	+	+	9x10 ⁴	---	---	---
	<i>P. putida</i>	pACYC184::Tn3								---	6x10 ⁵	---	---
2	<i>P. stutzeri</i>	pRB2138	35	---	---	0	+	+	+	---	---	6x10 ⁴	---
	<i>P. putida</i>	pBR322::Tn2411								---	---	---	4x10 ⁵

In der Tabelle links jeweils die Stämme mit den jeweiligen Plasmiden mit denen die Bodensäule beschickt wurde. Spalte 5+6, 7+8 = Auftreten erster resistenter Kolonien auf Selektivmedium in Tagen des Säulenlaufes. Zu Versuchsende sind jeweils die CFU auf Selektiv-Medium angegeben. --- = nicht ermittelt.

3.21 Screening von Bodenproben in Bodensäulen auf transponierbare Elemente mittels pRB2138

Es wurden insgesamt 6 Säulen mit 10¹⁰ *P. stutzeri* (pRB2138) und 8 Säulen mit 10¹⁰ *P. putida* (pRB2138) wie unter 2.23 beschrieben angesetzt und anschließend mit *P. stutzeri* bzw. *P. putida* beimpft. Der Durchfluss wurde täglich entnommen, abzentrifugiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Das Auffangbehältnis wurde nach jeder Probennahme gegen ein neues, steriles ausgetauscht.

Da bei Bodenmikroorganismen Tetracyclinresistenz natürlicherweise vorkommt, wurde auf Tc + Cm + Act-Medium mit Zusatz von 2,5 mM Natriumpyrophosphat ausplattiert. Durch dieses doppelte Selektivmedium wurde die Zahl an falschpositiv wachsenden CFU möglichst gering gehalten.

Zum Ende des Experiments wurde die Säulenmatrix auf Cm + Tp Medium ausplattiert und mit pRB2138 Sonden geblottet (siehe Tabelle 16) um zu überprüfen, ob *P. stutzeri* bzw. *P. putida* in der Säulenmatrix bis zum Ende des Experiments persistent sind.

3.21.1 Ergebnisse zu Screening von Bodenproben in Bodensäulen auf transponierbare Elemente mittels pRB2138

Ein paralleles, direktes Ausplattieren der in den Säulen verwendeten Bodenproben auf Tc-Medium zeigte bei allen Böden in der Tat ein Wachstum morphologisch verschiedenster MO. Ein Ausplattieren auf Tc + Cm – Medium brachte hingegen kein Wachstum.

Die Säulen wurden über einen Zeitraum von 3-6 Wochen wie oben beschrieben betrieben. Es erschienen bei zwei Säulen vereinzelt nach der ersten Woche des Säulenlaufes am ersten und zweiten Tag der Bebrütung auf den Selektivplatten CFU auf Tc + Cm Selektivmedium.

Nach 3-4 Tagen Bebrütungszeit der Platten entwickelte sich bei einigen Versuchsansätzen ein inhomogenes Bakterienkollektiv auf den Platten.

Diese wurden, wie auch die sich bereits nach 1-2 Tagen entwickelnden Kolonien, durch Kolonie-Blots mit pRB2138 Sonden mit negativem Ergebnis hin überprüft. Alle Kontrollen waren wie erwartet, bei den Isolaten erschien kein Signal.

Das Wachstum der Kolonien war nicht auf eine Transposition in pRB2138 zurückzuführen.

Bei den Säulen 6, 11 und 13 entwickelte sich nach 2-3 Wochen ein nicht mehr verschwindender Bakterien-Film auf dem Tc + Cm Selektivmedium, so dass diese Versuche abgebrochen wurden.

Das Wachstum der Kolonien wurde durch Kolonie-Blots mittels pRB2138 Sonden mit negativem Ergebnis hin überprüft und war nicht auf eine Transposition in pRB2138 zurückzuführen. Alle Kontrollen waren wie erwartet.

Die Zahl der morphologisch unterschiedlichen MO, wie auch die gesamte Zahl an CFU auf NI-Agarplatten nahm bei allen Versuchen leicht ab.

Eine Transposition und damit ein transponierbares Element konnte mittels dieses Systems nicht nachgewiesen werden.

Die Persistenz von pRB2138 beherbergenden Stämmen von *P. stutzeri* bzw. *P. putida* konnte am Ende des Experimentes mittels Gensonden (siehe 3.21) nachgewiesen werden. Es konnten für *P. stutzeri* maximal 6×10^4 und minimal 2×10^3 und für *P. putida* maximal 8×10^4 und minimal 2×10^3 CFU je 5g Matrix nachgewiesen werden. Wegen der Zugabe des Kieses entsprechen 5 g Säulenmatrix ca. 1g Boden (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenens von unbelasteten Bodenproben auf transponierbare Elemente mittels pRB2138

Säule Nr.	Bodenprobe Nr.	Stamm mit pRB2138	Versuchs-Dauer in Wochen	Über Zeitraum des gesamten Säulenlaufes				Versuchsbeginn		Versuchsende			
				Tc ^r + Cm ^r 1 - 2 d nach Ausplattieren	Tc ^r + Cm ^r 3 - 4 d nach Ausplattieren	Untersuchte Isolate	Hybridisierungs - signal zu pRB2138	CFU auf NI vor Versuch	Morphologisch verschiedene MO	CFU auf Tp + Cm + Act + 2,5 mM NaPO	CFU auf NI nach Versuch+ Pseudom.	Morphologisch verschiedene MO	Nachgewiesene Transposition
1	1	<i>P. stutzeri</i>	4	-	+	12	-	9x10 ⁸	14	6x10 ⁴	6x10 ⁷	8	-
2	2	<i>P. stutzeri</i>	4	-	+	12	-	8x10 ⁹	22	5x10 ⁴	2x10 ⁹	14	-
3	3	<i>P. stutzeri</i>	5	+	+	12	-	2x10 ¹⁰	8	2x10 ³	4x10 ⁸	6	-
4	4	<i>P. stutzeri</i>	5	-	+	6	-	4x10 ⁸	12	3x10 ³	5x10 ⁷	8	-
5	8	<i>P. stutzeri</i>	6	-	+	6	-	7x10 ⁷	10	4x10 ⁴	2x10 ⁶	7	-
6	9	<i>P. stutzeri</i>	2*	-	+	6	-	3x10 ⁷	6	---	6x10 ⁶	6	-
7	1	<i>P. putida</i>	4	-	+	6	-	8x10 ⁸	16	8x10 ⁴	8x10 ⁷	8	-
8	2	<i>P. putida</i>	3	-	-	6	-	4x10 ⁹	21	7x10 ⁴	8x10 ⁸	12	-
9	14	<i>P. putida</i>	6	-	+	6	-	9x10 ⁸	10	7x10 ³	7x10 ⁶	6	-
10	15	<i>P. putida</i>	5	+	+	6	-	8x10 ⁸	9	2x10 ³	3x10 ⁷	8	-
11	16	<i>P. putida</i>	2*	-	+	6	-	2x10 ⁸	9	---	1x10 ⁸	7	-
12	23	<i>P. putida</i>	6	-	+	12	-	3x10 ⁹	12	9x10 ³	2x10 ⁷	9	-
13	24	<i>P. putida</i>	3*	-	+	12	-	4x10 ⁸	14	---	3x10 ⁸	9	-
14	25	<i>P. putida</i>	5	-	-	12	-	9x10 ⁹	15	2x10 ⁴	2x10 ⁸	11	-

In der Tabelle links jeweils die Stämme mit denen die Bodensäule beschickt war. „Untersuchte Isolate“ bezieht sich auf Hybridisierungsexperimente mit pRB2138 Sonden mit den Tc^r + Cm^r Kolonien nach 1-2 bzw. 3-4 d auf Selektivmedium. Zu Versuchsbeginn und Versuchsende sind jeweils die CFU auf Selektiv- und NI-Medium angegeben. * = Versuch abgebrochen, da Tc^r + Cm^r Stamm sinnvolles Screenen unterband. --- = nicht ermittelt.

3.22 Überprüfung vorhandener Bakterienkollektive auf *tnpA* vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21

Im Zuge des Screenings von unbelasteten Böden auf das Vorhandensein von Transposasegenen wurden auch die in der Arbeitsgruppe von Bräuning [1998] und Günther [1996] erstellten Bakterienkollektive untersucht. Diese Bakterienkollektive wurden im Rahmen von Diplomarbeiten aus Böden isoliert und schon auf Antibiotikaresistenzen (Su, Sm, Hg, Th, Ap, Cb, Sp, Rif, Tc, Ak, Km, Gm, Nal, Tob) vorgescrönt, sowie mittels Gensonden (1385 *merB*, Tn21*mer*, Tn501*mer*, Tn21*tnpA*, Tn5041*tnpA*, 5053*tniA*) auf das Vorhandensein von Quecksilberresistenz vermittelnden Transposons hin untersucht [Bräuning, 1998; Günther, 1996].

Von den 164 untersuchten Stämmen von Bräuning zeigten 110 Isolate ein oder mehr Signale bei der Hybridisierung mit Gensonden auf Transposons. Bei Tn21*mer* zeigten sich 19 Signale,

bei Tn501_{mer} 104 und 20 bei Tn21_{tnpA}. Alle Stämme hatten Resistenzmuster, welche auch bei Tn3, Tn501 und Tn21 gefunden werden.

Von den 87 Stämmen von Günther hatten alle einen Teil des Resistenzmuster von Tn21 (Su/Sm), 62 von Tn501 (Hg). 8 Stämme reagierten positiv auf Sonden vom Typ *aadA* (Sm^r) und 21 auf *sulI* (Su^r), beides Antibiotikaresistenzen von Tn21.

Die vorhandenen Kollektive wurden auf das Vorhandensein der für Tn3, Tn501 und Tn21 charakteristischen Resistenzen Ap, Hg, Sm und Su, hin untersucht. Nach Sp, für welches Tn21 auch kodiert, wurde nicht gescreent, da es bei Tn21 von *aadA* zusammen mit der Sm-Resistenz expremiert wird.

Da es sich um teilweise uncharakterisierte Wildisolate handelte, welche nicht jeder Präparationsmethode zugänglich waren, wurden die Bakterienkollektive mit verschiedenen Methoden präpariert. Die so erhaltene DNA wurde mittels Dot-Blot wie unter 2.25.4 beschrieben auf Membranen übertragen und mit Gensonden vom Typ Tn3_{tnpA}, Tn21_{tnpA} und Tn501_{tnpA} wie unter 2.26 beschrieben hybridisiert. Die Stämme bei denen ein starkes Signal auf eine der Sonden erhalten wurde, wurden einer weiteren Untersuchung mittels Agarosegel-Elektrophorese und PCR unterzogen. Einige Stämme wurden hieraufhin mittels Southern-Blot weiter charakterisiert und aus dem Stamm Hg17.6 (siehe Tabelle 21 und Abbildung 20) anschließend ein genomischer Klon hergestellt und anschließend sequenziert.

3.22.1 Ergebnisse zu Überprüfung vorhandener Bakterienkollektive auf *tnpA* vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21

Es konnten nicht alle Resistenzen wie für die Kollektive beschrieben wiedergefunden werden. Im Speziellen konnten 7 Ap-Resistenzen von 28, 37 Su-Resistenzen von 150, 40 Sm-Resistenzen von 143 und 48 Hg-Resistenzen von 199 nicht nachgewiesen werden.

Die Bakterienkollektive wurden mittels Dot-Blot auf das Vorhandensein von Transposasen gescreent und es wurden keine Signale vom Typ Tn3_{tnpA}, 59 von Tn21_{tnpA} und 39 Tn501_{tnpA} detektiert (siehe Tabelle 21). Alle Kontrollen waren wie erwartet. Bei einigen (elf) Stämmen konnten bei einigen Vorversuchen Plasmide festgestellt werden, diese wurden jedoch nicht weitergehend untersucht, da sich die DNA dieser Wildisolate zum Teil nur sehr schwer isolieren ließ. Anschließend wurden PCRs mit den Stämmen von welchen ein positives Signal erhalten wurde durchgeführt und es wurden 12 Signale vom Typ Tn21_{tnpA} und 7 Tn501_{tnpA} detektiert (siehe Tabelle 21).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die 12 und 7 Stämme, bei welchen ein Signal auf Transposase von Typ Tn21 bzw Tn501 detektiert wurde mittels Gelelektrophorese und Southern-Blot wie unter 2.19.2 und 2.25.3 beschrieben weiter untersucht. Auf dem anschließenden Southern-Blot konnten 12 chromosomale Hybridisierungssignale mit Sonden vom Typ Tn21_{tnpA} und 7 vom Typ Tn501_{tnpA} festgestellt werden. Von den untersuchten Stämmen

wurden Hg16.1 und Hg17.6 weitergehend untersucht. Die DNA der beiden Stämme wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend geblottet. Beim Schneiden von Hg16.1 mit *EcoRI* entstanden zwei Fragmente mit der Größe von 2,8 und 2,1 kb (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22).

Das Isolat Hg17.6 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *PstI* geschnitten und geblottet. Hierbei konnte ein Fragmente mit der Größe von 2,55 kb detektiert werden (siehe Abbildung 20). Diese Bande wurde anschließend für eine Sequenzierung in pUC19 kloniert (siehe 2.24).

Der Stamm Hg17.6 wurde anschließend mittels API 20 NE wie unter 2.29 beschrieben mit einer Sicherheit von 95 % als *Pseudomonas fluorescens* bestimmt.

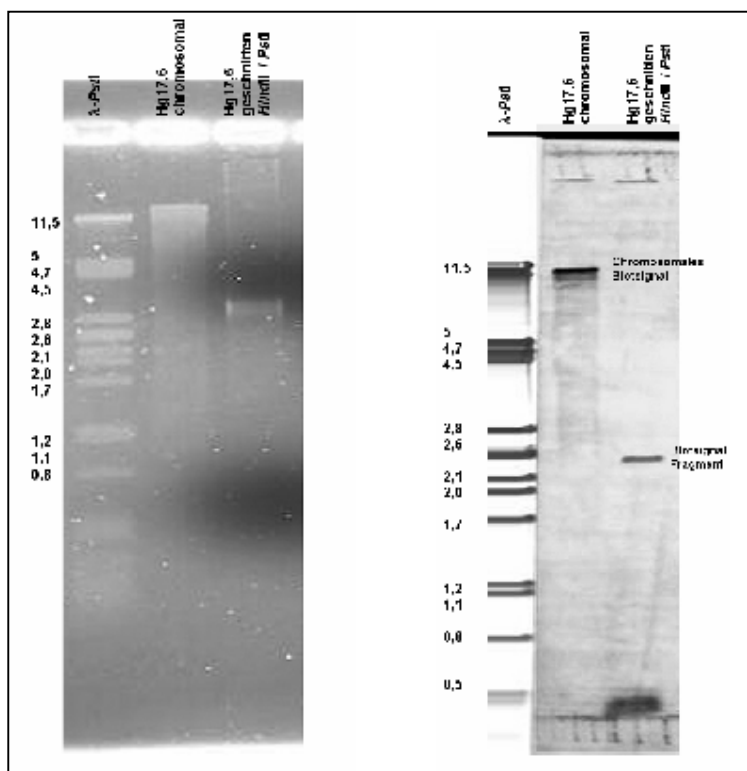


Abbildung 20: Agarosegel mit Hg17.6 geschnitten *HindIII* / *PstI* und dazugehöriger Southernblot

Die linke Seite zeigt das Agarosegel in dem Hg17.6 (siehe Tabelle 21) in der mittleren Bahn ungeschnitten und in der rechten Bahn mit *HindIII* / *PstI* geschnitten aufgetrennt wird. Dieses Gel wurde anschließend wie unter 2.25.3 beschrieben geblottet und mit Sonden vom Typ *Tn21tnpA* wie unter 2.26.2 beschrieben hybridisiert. Man erkennt auf Höhe der chromosomalen Bande und auf Höhe von 2,55 kb ein Signal. Diese Bande wurde anschließend wie unter 2.21 beschrieben eluiert und zur Sequenzierung in pUC19 kloniert (siehe 3.23).

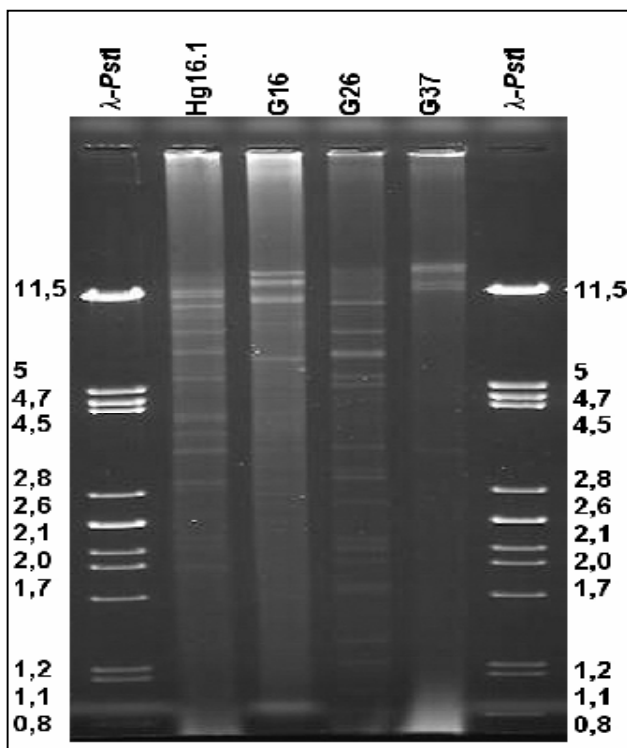


Abbildung 21: Agarosegel-Elektrophorese interessanter Stämme

Mittels Agarosegel-Elektrophorese wurde die mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnittene DNA der Stämme aufgetrennt um anschliessend im Southern Blot-Verfahren (siehe 2.25.3) geblottet zu werden. In der ersten und letzten Bahn jeweils Marker 8-*PstI*, in den mittleren Bahnen jeweils die geschnittene DNA der Isolate. Hg16.1 aus den untersuchten Kollektiven, G16, G26, G37 aus Koloniehbridisierung (siehe Tabelle 21)

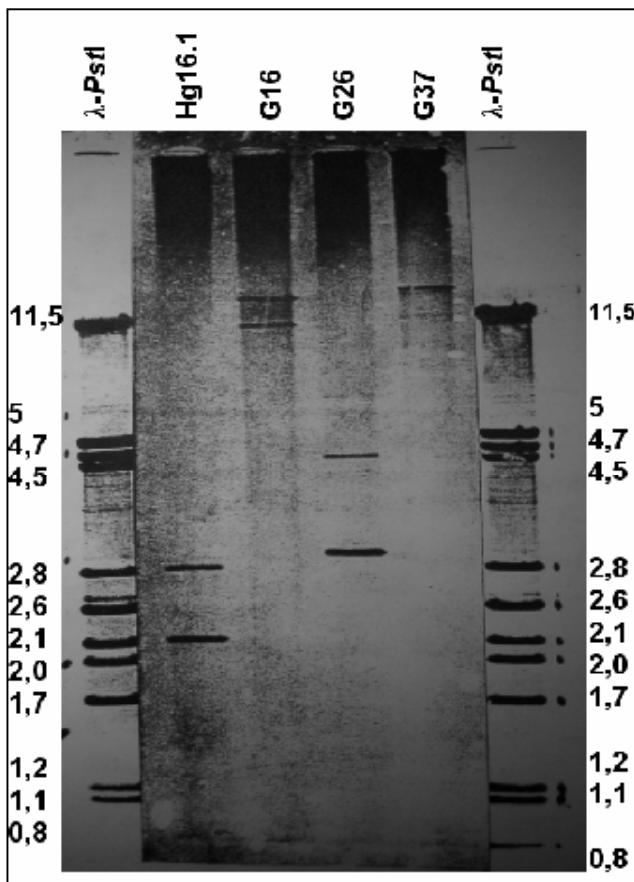


Abbildung 22: Southern-Blot des Agarosegels interessanter Stämme

Die mittels der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnittene DNA der Stämme wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung 21) und im Southernblot-Verfahren (siehe 2.25.3) geblottet. In der ersten und letzten Bahn jeweils Marker 8-*PstI*, in den mittleren Bahnen jeweils die geschnittene DNA der Isolate. Bei dem Stamm Hg16.1 gab es zwei Signale auf der Höhe von 2,8 und 2,1 kb. Bei G16 gab es zwei Signale eines oberhalb des Laufes der chromosomalen Bande bei 13 kb und eins bei 10,3 kb. Bei G26 gab es ebenfalls zwei Signale, ein schwächeres bei 4,6 kb und ein starkes bei 2,9 kb. Das Isolat G37 zeigte ein starkes Hybridisierungssignal oberhalb des Laufes der chromosomalen Bande bei 13,4 kb und eins bei 11,5 kb. Hg16.1 aus den untersuchten Kollektiven, G16, G26, G37 aus Koloniehbridisierung (siehe Tabelle 21)

Tabelle 21: Zusammenfassung der Überprüfung vorhandener Bakterienkollektive auf *tnpA* vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21.

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten								
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21 <i>tnpA</i>	Tn3 <i>tnpA</i>	Tn501 <i>tnpA</i>	<i>aadA</i> Tn21	<i>sulI</i> Tn21	1385 <i>merB</i>	Tn21 <i>mer</i>	Tn501 <i>mer</i>	Tn21 <i>tnpA</i>	Tn5041 <i>mpA</i>	5053 <i>tniA</i>
1	PPT1.1	-	-	-		++	+							-	-	+			2		2			
2	PPT1.2	++	-	-		++	+	+						-	-	-			1		2			2
3	PPT1.3	++	-	-		++	+	+						-	-	+			1		2			2
4	PFT1.1	++	-	-		++	+	+						-	-	+			1		2			2
5	PFT1.2	-	-	-		++	+							-	-	P			3		2			2
6	PFT1.3	++	-	-		+	+	+						-	-	-			1		2			2
7	PFT1.4	+-	-	-		++	+	+						-	-	-			1		2			2
8	PPT2.1	-	-	-		+	+							-	-	-					1			
9	PPT2.2	-	-	-		+	+							-	-	+					1		1	
10	PFT2.1	-	-	-		++	+							-	-	-					1		1	
11	PFT2.2	+-	-	-		++	+	+						-	-	+			1		1			1
12	PFT2.3	-	-	-		++	+							-	-	+					1		1	
13	PPT3.1	-	-	-		++	+							+	-	-					1		1	
14	PFT4.1	-	-	-		++	+							-	-	-					1		1	
15	PFT4.2	-	-	-		+	+							-	-	-					1		1	
16	PFT4.3	-	-	-		++	+							-	-	-					1		1	
17	PFT5.1	++	++	++	+	++	+	+	+					-	-	-			1		1	1		1
18	PFT5.2	++	++	++	+	++	+	+	+					-	-	-			1	1	1	1		1
19	PFT5.3	++	++	++	+	++	+	+	+					-	-	+			1		1			1
20	PFT9.1	-	++	+		++	+							-	-	-			1		1		1	
21	PFT9.2	-	++	++		+	+							P	-	-			1		1		1	
23	Th 9.1	-	++	++		++	+							-	-	+			1		3		2	
24	PFT 16.1	-	-	-		++	+							-	-	-			2		1		1	
25	PFT16.2	++	-	-	+	++	+	+						+	-	-			1	1	1	1		1
26	PFT16.3	++	-	-	+	++	+	+	+					+	-	-			1	3	1	1		1
27	PFT16.4	++	-	-	+	++	+	+						+	-	-			1	1	1	1		1
28	PFT16.5	-	-	-		++	+							-	-	-			1	1	1	1		1
29	Hg 1.1	+-	++	+-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+			1		2			1
30	Hg 1.2	-	-			+								-	-	-								
31	Hg 1.4	+-	++		+	++	+	+						-	-	+			1		2			1
32	Hg 1.6	-	-			++	+							-	-	-								
33	Hg 1.7	-	-			++	+							+	-	-			1		3	3		
34	Hg 1.8	-	-			++			+	+				-	-	+			1		2			1
35	Hg 1.9	+-	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	P	-	+			1		2			1
36	PFHG 1.1	+-	-			++	+	+						-	-	-			1		2			1
37	PFHG 1.2	-	-			++	+							-	-	-			1		2			
38	PFHG 1.3	++	-			++	+	+						-	-	P			2		2			1
39	PFHG 1.4	++	-			++	+	+						-	-	-			1		2			1
40	PFHg1.5	++	-			++	+	+						-	-	+			1		2			1
41	PFHg1.6	++	-			++	+	+						+	-	-			1		2			1
42	PFHg1.7	-	-			++	+							-	-	-			2		2			1
43	Hg 2.2	++	++		+	++	+			+				-	-	+			1		1			1
44	Hg 2.3	-	-			++	+							-	-	-					1		1	
45	Hg 2.4	-	-			++								-	-	-					1		1	
46	Hg 2.5	-	-			+	+							-	-	-					1		1	
47	Hg 2.6	-	-			+	+							-	-	-			1		1			1
48	PFHg2.1	-	-			++	+							-	-	-			1		1			1
49	PFHg2.2	-	-			++	+							-	-	-			1		2			1

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten									
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21mpA	Tn31mpA	Tn501mpA	aadA Tn21	sulI Tn21	1385 merB	Tn21mer	Tn501mer	Tn21mpA	Tn501mpA	5053 tniA	
50	PFHg2.3	-	-	-		++								-	-	-						1		1	
51	PFHg2.4	-	-	-		++	+							-	-	-						1		1	
52	PFHg2.5	-	-	-		++	+							-	-	-						1		1	
53	Hg 3.9	-	-	-		++								-	-	-									
54	Hg 4.1	-	-	-		++	+							-	-	-						1		1	
55	Hg 4.2	-	-	-		+-	+							-	-	-						1		1	
56	Hg 4.3	++	++	-	+	++	+	+						P	-	-			1		1				1
57	Hg 5.1	++	+-	-	+	++	+	+						-	-	-			2	1	1	1			1
58	Hg 5.2	-	-	-		+-								-	-	-				1	1	1			1
59	Hg 6.1	-	-	-		++	+							-	-	-					1		1		
60	Hg 6.2	-	-	-		++								-	-	+					2		2		
61	Hg 6.3	-	-	-		++								-	-	+					3		2	1	
62	Hg 6.4	-	-	-		++								-	-	-									
63	Hg 6.5	-	-	-		+-								-	-	-									
64	Hg 6.6	-	-	-		+-								-	-	-					1		1		
65	Hg 7.1	-	-	-		++	+							-	-	-					3				
66	Hg 7.2	-	-	-		++								-	-	-					3				
67	Hg 7.3	-	-	-		++								-	-	P					3				
68	Hg 7.4	-	-	-		++								-	-	P					3				
69	Hg 7.5	-	-	-		++								-	-	-									
70	Hg 8.1	-	++	++		+-								P	-	-					1		1		
71	Hg 8.2	-	-	-		++								+	-	-					1		1		
72	Hg 8.3	-	-	-		++								-	-	-					1		1		
73	Hg 9.1	-	-	-		++	+							-	-	+					1			1	
74	Hg 9.2	-	-	-		++								-	-	-					1			1	
75	Hg 9.3	-	-	-		+-								-	-	+					3				
76	Hg 9.4	-	-	-		+-								-	-	-			1	1					
77	Hg 9.5	-	-	-		++								-	-	-									
78	Hg 9.6	-	-	-		++								-	-	-									
79	Hg 9.7	-	-	-		+-								-	-	-									
80	Hg 9.8	++	++	-		++	+	+	+					-	-	-			1		1				1
81	Hg 9.9	-	-	-		++								-	-	-					1			2	
82	Hg 10.1	-	-	-		++	+							-	-	+					2			2	
83	Hg 10.2	++	-	++	+	+-	+	+						-	-	-			1		1			1	
84	Hg 10.4	-	-	-		++								-	-	-					1			1	
85	Hg 10.5	-	-	-		++								-	-	-					1			1	
86	Hg 10.6	+-	++	++		++	+	+						-	-	-			1		1			1	
87	Hg 10.7	-	-	-		++								-	-	-									
88	Hg 10.8	++	++	-	+	+-	+	+						-	-	-			1		1			1	
89	Hg 10.9	-	++	++		++								-	-	-					1		1		
90	Hg10.10a	-	-	-		++								-	-	+					3		1		
91	Hg10.10	-	-	-		+-								-	-	+			1		3				
92	Hg 10.11	-	-	-		++								-	-	-			3		3				
93	Hg 10.12	-	-	-		+-								-	-	-									
94	Hg10.13	-	++	++		++								-	-	-					1			1	
95	Hg10.14	-	-	-		++								P	-	-				1	1	1			
96	Hg10.15	-	-	-		++								+	-	-				1	1	1			
97	Hg10.16	-	-	-		++								+	-	-			3		3				
98	Hg11.1	-	-	-		++								-	-	-			1		3				
99	Hg11.2	-	-	-		++								-	-	+			1		3				

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten								
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21mpA	Tn31mpA	Tn501mpA	aadA Tn21	sulI Tn21	1385 merB	Tn21mer	Tn501mer	Tn21mpA	Tn5041mpA	5053 tniA
100	Hg16.1	-	++	++		++								PS	-	-			1	3	2	2		
101	Hg16.2	-	++	++		++								-	-	-				1	1	2		
102	Hg16.4	-	-	-		++								-	-	-			1					
103	Hg16.5	-	++	++		++								+	-	-				1	1	2		
104	Hg16.6	-	-	-		++								+	-	-			1	1	1	2		
105	Hg16.7	-	-	-		++	+							-	-	-					1		1	
106	Hg 16.8	-	-	-		++								-	-	-								
107	Hg 16.9	-	-	-		++	+							-	-	+					1		1	
108	Hg16.10	+-	++	-	+	++	+	+						-	-	-			1		3			2
109	Hg16.13	-	-	-		+-								-	-	-							2	
110	Hg16.14	-	-	-		+-	+							+	-	-					1		1	
111	Hg16.15	-	-	-		+-								-	-	-							3	
112	Hg17.3	-	-	-		++								-	-	-								
113	Hg 17.6	-	-	-		++								PS	-	-				1	1	1		
114	Hg 18.1	-	-	-		++								-	-	-								
115	Hg 18.2	-	-	-		++								-	-	-					3		1	
116	Hg18.10	-	-	-		++								-	-	-				1	1	1		
117	Hg18.11	-	-	-		++	+							-	-	P			2		3			
118	Hg 19.1	-	-	-		+-								-	-	-				1	2	2		
119	Hg 19.2	-	-	-		++								-	-	-					2		1	
120	Hg 19.3	-	-	-		++	+							-	-	-					1			1
121	Hg 19.8	-	-	-		+-								-	-	-				1	1	1		
122	Hg19.12	-	-	-		++								-	-	-							1	
123	Hg19.13	-	-	-		++								-	-	-							1	
124	Hg19.17	-	-	-		++	+							+	-	-			1	1	1	1		1
125	SS 1.1	-	+-	+-		+-								-	-	-								
126	SS 1.2	-	+-	+-		++								+	-	-								
127	SS 1.4	-	+-	+-		++								-	-	-								
128	SS 1.6	-	++	++		++								-	-	-								
129	SS 1.8	-	++	++		+-								-	-	-								
130	SS 2.1	-	++	+-		++								-	-	+								
131	SS 2.3	-	++	++		++								-	-	-								
132	SS 2.4	-	++	++		++								-	-	-								
133	SS 3.1	-	++	+-		++								-	-	-								
134	SS 3.2	-	++	++		++								-	-	-								
135	SS 3.4	-	++	++		++								-	-	-								
136	SS 3.5	-	++	+-		+-								-	-	-								
137	SS 3.6	-	++	++		+-								-	-	-								
138	SS 5.2	-	++	++		-								-	-	-								
139	SS 6.1	-	++	++		++								-	-	-								
140	SS 6.2	-	+-	+-		-								-	-	-								
141	SS 8.1	-	++	++		++								-	-	+								
142	SS 9.1	-	++	+-		-								-	-	-								
143	SS 10.1	-	+-	++		++								-	-	-								
144	SS 10.2	-	++	++		-								-	-	-								
145	SS 10.3	-	++	++		-								-	-	-								
146	SS 10.4	-	+-	+-		-								-	-	-								
147	SS 10.5	-	++	++		-								-	-	-								
148	SS 10.7	-	++	+-		-								-	-	-								
149	SS 16.3	-	+-	++		-								-	-	-								

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten											
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21mpA	Tn31mpA	Tn501mpA	aadA Tn21	sulI Tn21	1385 merB	Tn21mer	Tn501mer	Tn21mpA	Tn5041mpA	5053 tniA			
150	SS 17.3	-	++	++		-								-	-	-											
151	SS 17.4	-	+	++		-								-	-	-											
152	SS 18.1	-	++	++		++								-	-	-											
153	SS 18.2	-	+	++		-								-	-	-											
154	SS 18.3	-	++	++		-								-	-	-											
155	SS 18.4	-	++	+		-								-	-	-											
156	SS 18.5	-	++	++		-								-	-	-											
157	SS 18.6	-	++	++		++								-	-	-											
158	SS 19.1	-	++	++		-								-	-	-											
159	SS 19.3	-	++	++		-								-	-	-											
160	SS 19.5	-	++	+		-								-	-	-											
161	SS 19.6	-	++	++		-								-	-	-											
162	SS 19.7	-	+	++		-								-	-	-											
163	SS 19.8	-	++	++		-								-	-	-											
164	SS 19.9	-	++	+		-								-	-	-											
165	NG1	-	++	+		-								-	-	-				+		+					
166	NG2	-	++	+		-								P	-	-											
167	NG3	-	+	+		-								-	-	-	+	+									
168	NG4	-	++	+		-								-	-	-											
169	NG5	-	++	++		-								-	-	-		+									
170	NG6	-	++	++		-								P	-	-											
171	NG7	-	++	++		-								-	-	P											
172	NG8	-	+	++		-								+	-	+											
173	NG9	-	++	++		-								-	-	-											
174	NG10	-	++	++		-								+	-	-											
175	NG11	-	+	+		-								+	-	-											
176	NG12	-	++	++		-								-	-	-											
177	NG13	-	++	+		-								-	-	-											
178	NG14	-	+	+		-								-	-	-											
179	NG15	-	++	++		-								+	-	-											
180	NG16	-	++	+		-								+	-	-	+		+		+						
181	NG17	-	++	++		-								+	-	-	+		+		+						
182	NG18	-	++	++		-								-	-	-											
183	NG19	-	+	++		-								+	-	-											
184	NG20	-	++	++		-								-	-	-		+									
185	NG21	-	++	+		-								-	-	-											
186	NG23	-	+	++		-								-	-	-											
187	NG24	-	++	++		-								+	-	-							+				
188	NG25	-	+	++		-								+	-	-								+			
189	NG26	-	++	+		-								-	-	-		+					+				
190	NG27	-	++	++		-								-	-	-								+			
191	NG28	-	+	++		-								+	-	-		+						+			
192	NG29	-	+	+		-								-	-	-											
193	NG30	-	++	++		-								+	-	-		+						+			
194	NG31	-	++	++		++								-	-	-											
195	NG32	-	++	++		+								+	-	-								+			
196	NG33	-	++	++		++								+	-	-		+						+			
197	NG34	-	+	++		++								-	-	-											
198	NG35	-	++	+		+								-	-	-											

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten									
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21mpA	Tn31mpA	Tn501mpA	aadA Tn21	sulI Tn21	1385 merB	Tn21mer	Tn501mer	Tn21mpA	Tn5041mpA	5053 tniA	
199	NG36	-	++	+		+								-	-	-		+							
200	NG37	-	+	++		+								+	-	-		+				+			
201	NG38	-	+	++		++								-	-	-									
202	NG39	-	++	++		++								-	-	-									
203	NG40	-	++	++		+								+	-	-									
204	NG41	-	++	+		++								-	-	-									
205	NG42	-	++	++		++								+	-	-		+							
206	NG43	-	+	++		++								+	-	+									
207	NG44	-	++	+		++								-	-	-									
208	NG45	-	++	+		+								+	-	-									
209	NG46	-	+	++		++								-	-	-									
210	NG47	-	++	++		++								+	-	-									
211	NG48	-	+	++		++								-	-	-									
212	NG49	-	++	++		++								-	-	-		+							
213	NG50	-	++	++		+								-	-	-									
214	NG51	-	+	+		+								-	-	-									
215	NG52	-	++	++		+								P	-	-									
216	NG53	-	++	++		++								-	-	-									
217	NG54	-	++	++		+								-	-	-									
218	NG55	-	+	++		++								-	-	-	+	+							
219	NG56	-	++	+		++								+	-	-									
220	NG57	-	++	++		+								-	-	-									
221	NG58	-	+	++		++								-	-	P									
222	NG59	-	++	++		+								+	-	-									
223	NG60	-	++	++		++								+	-	-									
224	NG61	-	++	+		++								+	-	-									
225	NG62	-	+	++		+								+	-	-		+							
226	NG63	-	++	++		+								+	-	-									
227	NG64	-	++	+		++								+	-	+									
228	NG65	-	+	++		+								+	-	+									
229	NG66	-	++	++		+								+	-	-									
230	NG67	-	++	++		+								-	-	-									
231	NG68	-	++	++		++								+	-	-	+	+	+						
232	NG69	-	++	+		++								-	-	-									
233	NG70	-	++	++		++								+	-	-									
234	NG71	-	+	++		++								-	-	-									
235	NG72	-	++	++		++								-	-	-									
236	NG73	-	++	++		++								-	-	-									
237	NG74	-	++	++		++								-	-	+									
238	NG75	-	+	+		++								-	-	-									
239	NG76	-	++	++		++								+	-	-		+							
240	NG77	-	+	++		++								-	-	-		+							
241	NG78	-	++	++		++								P	-	-	+	+							
242	NG79	-	+	+		+								p	-	-	+	+							
243	NG80	-	+	++		++								+	-	-		+							
244	NG81	-	++	++		++								-	-	+		+							
245	NG82	-	+	++		+								-	-	+									
246	NG83	-	++	++		++								-	-	-	+	+							
247	NG84	-	++	++		++								+	-	-	+	+	+			+			
248	NG85	-	++	+		++								-	-	-									

Nr.	Stamm	Vorhandene und überprüfte Resistenzen											Neue Sonden			Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten									
		Ap	Su	Sm	Sp	Hg	Th	Cb	Rif	Tc	Ak	Km	Gm	Tn21mpA	Tn31mpA	Tn501mpA	aadA Tn21	sulI Tn21	1385 merB	Tn21mer	Tn501mer	Tn21mpA	Tn5041mpA	5053 tniA	
249	NG86	-	++	++		++								-	-	-		+							
250	NG87	-	++	++		++								-	-	-		+							
Γ														59	0	39									

Stämme 1-164 aus der Sammlung Bräuning [1998], Stämme 165-251 aus der Sammlung Günther [1996]. Einträge unter „Vorhandene und überprüfte Resistenzen“: + = wurde als positiv überprüft, - = wurde negativ überprüft, ++ = überprüfte Eigenschaft wie bekannt, +- = überprüfte Eigenschaft nicht wie beschrieben vorhanden. Einträge unter „Neue Sonden“: + = erhaltenes Signal mit den unter 3.10 hergestellten Sonden. P = Signal mittels Sonde und PCR erhalten und S = mittels Southern-Blot überprüft (siehe Abbildung 22 und Abbildung 20). Einträge unter „Hybridisierungsergebnisse der Ursprungsarbeiten“: Die Zahlen unter den Gensonden 1-3 bezeichnen die Intensität des erhaltenen Signals, bzw. + ein detektiertes Signal bei Erstellung des Kollektivs.

3.23 Sequenzstrategie und Herstellung eines genomischen Klonen von Isolat Hg17.6

Die DNA von Hg17.6 wurde mit *HindII* und *PstI* geschnitten und mittels Agarosegel-Elektrophorese ein 2257 kb großes Fragment herauspräpariert. Dies erfolgte mittel Vergleich eines zuvor geblotteten und mit Tn21mpA-Sonden hybridisierten Elektrophoresegels (siehe Abbildung 20). Dieses Fragment wurde in den Vektor pUC19 kloniert, nachdem dieser mit *HindII* und *PstI* geschnitten worden war. Anschließend wurde dieser Vektor in *E. coli* Dh5 α transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte mittels Insertionsinaktivierung des β -Gal-Systems des Vektors. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pFLHG176HP und hat eine Größe von 4943 bp. Anschließend wurde dieser Klon sechs mal subkloniert, um mit kürzeren Fragmenten auch die Mitte der Sequenz gut abdecken zu können. So entstanden durch Subklonierungen sechs weitere Klone (siehe Abbildung 23 und 2.24). Hierzu wurde pFLHG176HP mit den Restriktionsenzymen *PaeI*, *EcoRI* und *AvaI* geschnitten, welche jeweils eine Schnittstelle in der Multicloningsite von pUC19 und eine im inserierten Hg 17.6 Fragment besitzen. Das jeweilige aus pFLHG176HP herausgeschnittene Fragment wurde wiederum in pUC19 kloniert, während der jeweilige Rest von pFLHG176HP religiert wurde. So konnten aus einem Ansatz je zwei neue Konstrukte zur Sequenzierung gewonnen werden.

Es entstand durch Schneiden von pFLHG176HP mit *PaeI* und anschließendes Klonieren des 1441 bp großen Fragmentes in pUC19 der Klon pFLHG176HPP mit einer Größe von 4127 bp. Der Klon, welcher durch Religation entstand, erhielt die Bezeichnung pFLHG176HPPR und hatte eine Größe von 3502 bp mit einem Insert von 816 bp aus Hg17.6.

Es entstand durch Schneiden von pFLHG176HP mit *EcoRI* und anschließendes Klonieren des 1367 bp großen Fragmentes in pUC19 der Klon pFLHG176HPE mit einer Größe von 4053 bp. Der Klon, welcher durch Religation entstand, erhielt die Bezeichnung pFLHG176HPPER und hatte eine Größe von 3576 bp mit einem Insert von 890 bp aus Hg17.6.

Es entstand durch Schneiden von pFLHG176HP mit *AvaI* und anschließendes Klonieren des 1048 bp großen Fragmentes in pUC19 der Klon pFLHG176HPA mit einer Größe von 3734 bp. Der Klon, welcher durch Religation entstand, erhielt die Bezeichnung pFLHG176HPPAR und hatte eine Größe von 3859 bp mit einem Insert von 1209 bp aus Hg17.6. Die Teilsequenzen dieser Klone wurden anschließend zur Sequenz mit der Bezeichnung „HG176TNPAHP“ zusammengefügt.

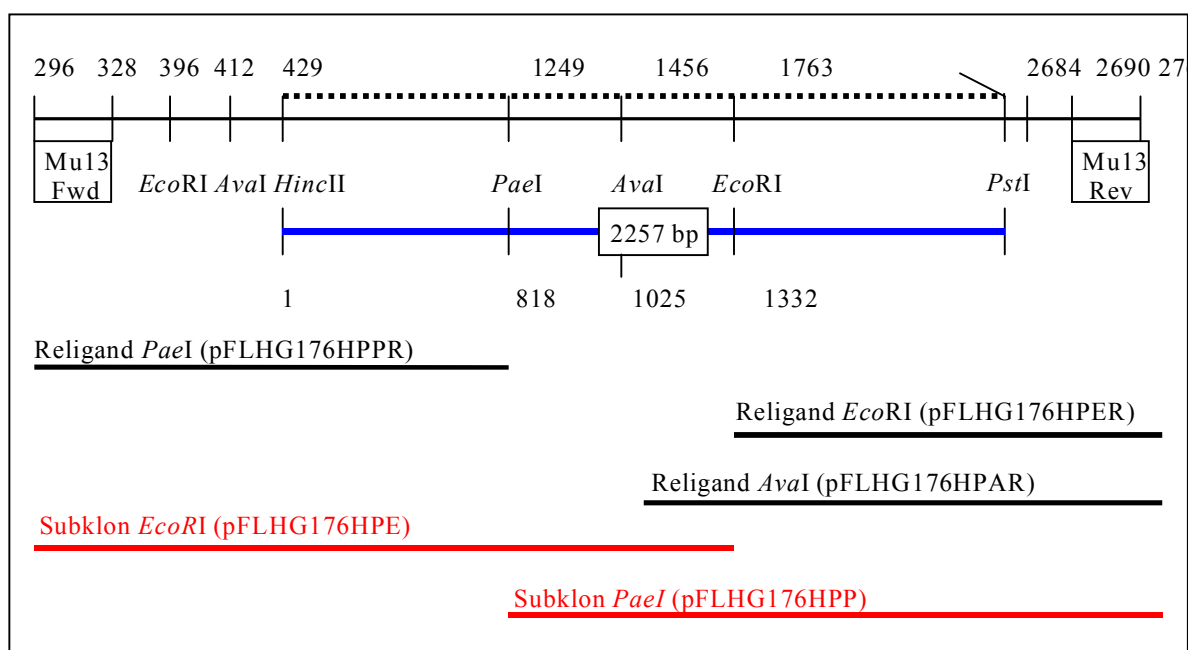


Abbildung 23: Die Lage der Schnittstellen in pFLHG176HP und die daraus resultierenden, oben beschriebenen Fragmente für die anschließende Sequenzierung. Die Religanden pFLHG176HPPR und pFLHG176HPPER dienen primär der Sequenzierung der Randbereiche des Hg17.6 Inserts, während mittels der Subklone pFLHG176HPE und pFLHG176HPP der Mittelteil des Gesamtklones sequenziert werden konnte. Zur Überprüfung und Absicherung dieser Sequenzierungen wurden der Religand pFLHG176HPPAR eingesetzt. Mu13 Fwd / Rev = Sequenzierungsprimer vor Multikloningsite in pUC19

Ergebnisse:

3.24 Sequenzierung des genomischen Klonen von Hg17.6

Die Sequenzierungen fanden wie unter 2.28.1 und 2.28.2 beschrieben statt. Hierbei wurde folgende Sequenz ermittelt:

1	CTGCAAGGCG	ATTAAGTTGG	GTAACGCCAG	GGTTTTCCCA	GTCACGACGT
	GACGTTCCGC	TAATTCAACC	CATTGCGGTC	CCAAAAGGGT	CAGTGCTGCA
51	TGTAAAACGA	CGGCCAGTGA	ATTCGAGCTC	GGTACCCGGG	GATCCTCTAG
	ACATTTTGCT	GCCGGTCACT	TAAGCTCGAG	CCATGGGCC	CTAGGAGATC
101	AGTCAACGCA	CAGTTCCGCC	ATCCCTTCGC	CGAGCACTGG	GGCGACGGCA
	TCAGTTGCGT	GTCAAGGCGG	TAGGGAAGCG	GCTCGTGACC	CCGCTGCCGT
151	CCACCTCATC	GTCGGACGGC	CAGAACTTCC	GCACCGGCAG	CAAGGCCGAG
	GGTGGAGTAG	CAGCCTGCCG	GTCTTGAAGG	CGTGGCCGTC	GTTCCGGCTC
201	AGCACCGGCC	ACATCAACCC	GAAATACGGG	AGCAGCCCAG	GGCGGACGTT
	TCGTGGCCGG	TGTAGTTGGG	CTTTATGCC	TCGTGGGTC	CCGCCTGCAA
251	CTACACCCAC	ATTTCTGACC	AGTACGCGCC	ATTTACACACC	AAGGTCGTGA
	GATGTGGGTG	TAAAGACTGG	TCATGCGCGG	TAAAGTGTGG	TTCCAGCACT
301	ACGTCGGCGT	GCGCGATTCG	ACCTACGTGC	TTGACGGCCT	GCTGTACCAC
	TGCAGCCGCA	CGCGCTAAGC	TGGATGCACG	AACTGCCGGA	CGACATGGTG
351	GAGTCCGACT	TGCGGATCGA	GGAGCATTAC	ACCGACACGG	CGGGCTTCAC
	CTCAGGCTGA	ACGCCTAGCT	CCTCGTAATG	TGGCTGTGCC	GCCCCAAGTG
401	CGATCACGTC	TTCGCCCTGA	TGCACCTCCT	GGGCTTCCGC	TTCGCGCCGC
	GCTAGTGCAG	AAGCGGGACT	ACGTGGAGGA	CCCGAAGGCG	AAGCGCGGCG
451	GCATCCGCGA	CCTGGGCGAC	ACCAAGCTCT	ACATCCCGAA	GCGACGCCGC
	CGTAGGCGCT	GGACCCGCTG	TGGTTCGAGA	TGTAGGGCTT	CGCTGCGGCG
501	CTATGACGCG	CTGAAACCCA	TGATCGGCGG	CACGTGAACA	TCAAGCACGT
	GATACTGCGC	GACTTTGGGT	ACTAGCCGCC	GTGCACCTGT	AGTTTCGTGCA
551	CCGCGCCCAT	TGGGACGAAA	TCCTGCGGCT	GGCCACCTCG	ATCAAGCAGG
	GGCGCGGGTA	ACCCTGCTTT	AGGACGCCGA	CCGGTGGAGC	TAGTTCGTCC
601	GCACGGTGAC	GGCCTCCCTG	ATGCTCCGAA	AGTTCGGCAG	CTACCCACGC
	CGTGCCACTG	CCGGAGGGAC	TACGAGGCTT	TCAAGCCGTC	GATGGGTGCG
651	CAGAACGGGC	TGGCGTGGCG	CTCCGCAGCT	GGGCCGCATC	GAGCGCACGC
	GTCTTGCCCC	ACCGCACCGC	GAGGCGTCGA	CCCGGCGTAG	CTCGCGTGCG
701	TGTTCATCCT	GGA CTGGCTG	CAAAGCGTGG	AACTGCGCCG	CGCGTGACAG
	ACAAGTAGGA	CCTGACCGAC	GTTCGCACC	TTGACGCGGC	GCGCACGTGC
751	CGGCTGAACA	AGGCGAGCGC	GCAATGCTGG	GCCAGGGCAG	TGTTTTTCGA
	GCCGACTTGT	TCCGCTCGCG	CGTTACGACC	CGGTCCCCTC	ACAAAAAGCT
801	ACGCTGGGTG	AAATCGCGAC	GCAGTTTCGA	GCAGCAGCGT	ACCGGGCTAG
	TGCGACCCAC	TTTAGCGCTG	CGTCAAAGCT	CGTCGTCGCA	TGGCCCGATC
851	CGGCTCAATC	TGGTACGGCT	GCGTCGTGTT	GTTGAACGGT	CTACTTGATC
	GCCGAGTTAG	ACCATGCCGA	CGCAGCACAA	CAACTTGCCA	GATGAAGTAG
901	GGCTGCGACG	CTGCTGCAAC	GGCATGCGTA	TGACGCGCTG	TTGCAGTACT
	CCGACGCTGC	GACGACGTTG	CCGTACGCAT	ACTGCGCGAC	AACGTCATGA
951	GTCAGCGCTG	GTGGAGCATA	TGCTCACTGC	GATGATCGCG	GCGACGATGC
	CAGTCGCGAC	CACCTCGTAT	ACGAGTGACG	CTACTAGCGC	CGCTGCTACG

1001	GCAGCCGAAC CGTCGGCTTG	GCACGTCAGA CGTGCAGTCT	CTTCTCTTTT GAAGAGAAAA	AATACTCACT TTATGAGTGA	CTCAATACGA GAGTTATGCT
1051	TTGTGTTTGT AACACAAACA	GAAATAGCAC CTTTATCGTG	GACACCTGCG CTGTGGACGC	GTCGAACACA CAGCTTGTGT	GCGTCACACT CGCAGTGTGA
1101	GTCAGAGACG CAGTCTCTGC	CGGCTCTCGG GCCGAGAGCC	TGCACCAGCT ACGTGGTCEA	CGGGCGAAGG GCCCCTTCC	CACTCGCGCC GTGAGCGCGG
1151	GCGAGCGCGA CGTCTGCGCT	AACGGCTCAC TTGCCGAGTG	GCGCTCCTCA CGCGAGGAGT	CGTGTGCACT GCACACGTGA	ACCCTGGGGT TGGGACCCCA
1201	TCCAGGAACA AGGTCCTTGT	GATTGCACGG CTAACGTGCC	TCAGTGTGCT AGTCACACGA	GGTTAATTTT CCAATTAAG	ACTGATGCAC TGACTACGTG
1251	GGATCAAGGA CCTAGTTCCT	CGTATTTGCG GCATAAACGC	CAGGTCTTTG GTCCAGAAAC	ACGTTCGGGT TGCAAGCCCA	ATTTCTTTTC TAAAGAAAAG
1301	AAGCTGGAGC TTCGACCTCG	AGTTCGCGCA TCAAGCGCGT	GTCGCGATAG CAGCGCTATC	CTCGAAATCG GAGCTTTAGC	CGCTCACCAA GCGAGTGGTT
1351	ACTTCTTGTG TGAAGAACAC	CTGCACTGTC GACGTGACAG	AGCTCATAACA TCGAGTATGT	GGCGGAATGC CCGCCCTTACG	GTAGAAGCTA CATCTTCGAT
1401	TTCAACTGGC AAGTTGACCG	TGATATGCTT ACTATACGAA	CAACGTGTAG GTTGCACATC	CCGGTGAATT GGCCACTTAA	CGCGATTCAA GCGCTAAGTT
1451	CAGCGTCAGG GTCGCAGTCC	TGCGGGAGGA ACGCCCTCCT	TCGTGGGAGA AGCACCCCTCT	GAAACCTATC CTTTGGATAG	TCTACACAGC AGATGTGTCC
1501	CCTCTACGGC GGAGATGCCG	CAAGTATTCC GTTCATAAAG	TTCTTGTAGA AAGAACATCT	TCCAGCGCAT AGGTCGCGTA	GGCCTCGACT CCGGAGCTGA
1551	TCTTTGCTGC AGAAACGACG	GCTCGTAACG CGAGCATTGC	CTTTATCTCG GAAATAGAGC	CGGCCCCACA GCCGGGGTGT	GGCGCTCTAC CCGCGAGATG
1601	GGCTTCGGCA CCGAAGCCGT	AGAATGCCGT TCTTACGGCA	AAGCGTGGCG TTCGCACCCG	CACCTCAACC GTGGAGTTGG	CCGAAGACCG GGCTTCTGGC
1651	AGGCAAAGGC TCCGTTTCCG	ATCGGCAGAC TAGCCGTCTG	ACCTTAACAA TGGAATTGTT	GACCGTCTTT CTGGCAGAAA	AGGTGCTTCC TCCACGAAGG
1701	TTCTTGAGT AAGAACCTCA	CGATAAGCGA GCTATTGCT	AGCGGCAAGT TCGCCGTTCA	AACACCAGCC TTGTGGTCCG	GCTTTTCTTG CGAAAAGAAC
1751	AAGCGTCAGC TTCGCAGTCG	GTATAGGACG CATATCCTGC	CTTCAATGAG GAAGTTACTC	CTTGTTCGAC GAACAAGCTG	TGATAGACCC ACTATCTGGG
1801	GGTCTTATC CCAAGAATAG	AACTTCCGAT TTGAAGGCTA	ACGTTTGCCA TGCAAACGGT	CGTTAGCCAC GCAATCGGTG	TCCTGTATGC AGGACATACG
1851	GTCTGAGTGG CAGACTCACC	CACAGTAAAG GTGTCATTTT	GGGAATAGGG CCCTTATCCC	AAAGCGTCAA TTTCGCAGTT	TACCCTTTCC ATGGGAAAGG
1901	CCTTTATCG GGGAAATAGC	TAATTTTGTG ATTAATAACAC	CATATCATGT GTATAGTACA	GCGTAAGCTG CGCATTGAC	TTGATAAGCA AACTATTCTG
1951	AGGGATAATA TCCCTATTAT	GCCGGAATCC CGGCCTTAGG	TTCCCCTAT AAGGGGGATA	TACCGGAATC ATGGCCTTAG	CCTCCCTTTC GGAGGGAAAG
2001	AATAGCCGGA TTATCGGCCT	ATCCTTCCCC TAGGAAGGGG	TTAACAGCC AAATTGTCCG	GGAATGTTTC CCTTACAAAG	CCTCAAAAGC GGAGTTTTTC

```

2051  CGGAATCCCT  CCCCCCAGTG  TGGATAAATC  ACGAAAAAAA  GCCTTTAAAA
      GCCTTAGGGA  GGGGGGTAC  ACCTATTTAG  TGCTTTTTTT  CGGAAATTTT

2101  TCAGGCTGTT  ACAGATCCAT  CCACAAGGGT  AAAACAAGTA  GATAAAAGAA
      AGTCCGACAA  TGTCTAGGTA  GGTGTTCCCA  TTTTGTTCAT  CTATTTTCTT

2151  AAGCAAAAAA  AGCTTTAAAA  CAAGCTTTAA  AACACGCTCA  GGGCTCACAA
      TTCGTTTTTT  TCGAAATTTT  GTTCGAAATT  TTGTGCGAGT  CCCGAGTGTT

2201  ACTTTCACCT  GGCCGAAAAT  TTGCGCGGTG  CGTCCGCCTA  CCCTCGCCAT
      TGAAAGTGGA  CCGGCTTTTA  AACGCGCCAC  GCAGGCGGAT  GGGAGCGGTA

2251  CCATGGCTCG  CCGCTTCGGC  GGCCTGTCTG  TGGGCATCCA  TGCCCATCTT
      GGTACCGAGC  GGCGAAGCCG  CCGGACAGCT  ACCCGTAGGT  ACGGGTAGAA

2301  GTTAATGCTC  GTTCCGGCCT  CTCTTTACCT  AGCGCGGTGT  GCTCACTCTC
      CAATTACGAG  CAAGGCCGGA  GAGAAATGGA  TCGCGCCACA  CGAGTGAGAG

2351  ACCGTCTCTG  AGGCATGCAA  GCTTGCGGTA  ATCATGGTCA  TAGCTGTTTC
      TGGCAGGACG  TCCGTACGTT  CGAACCGCAT  TAGTACCAGT  ATCGACAAAG

2401  CTGTGTGAAA  TTGTTATCCG  CTCACAATTC  CACACAACAT  A
      GACACACTTT  AACAATAGGC  GAGTGTTAAG  GTGTGTTGTA  T

```

Abbildung 24: Zusammengesetzte, 2257 bp lange Sequenz HG176TNPAHP aus Subklonen von Isolat Hg17,6.

3.25 Sequenzanalyse des genomischen Klones von Hg17.6

Die Sequenzanalysen, der insgesamt 2257 bp langen Sequenz, erfolgten mit den Gendatenbankenprogrammen Blast, FastA und TIGR.

Die Ergebnisse der Analysen welche mittels der verschiedenen Programme erhalten wurden sind aufgrund der den Programmen zugrunde liegenden Algorithmen leicht unterschiedlich, wobei sich die Ergebnisse im Wesentlichen nur im „Ranking“ der homologen Sequenzen unterscheiden. Ein kleiner weiterer Unterschied ist, dass ein von FastA einteiliger homologer Bereich von Blast in zwei, einen Hauptteil und einen sehr kleinen zweiten Teil unterteilt wurde, dem wurde nicht weiter nachgegangen.

Sequenzvergleiche über FastA ergaben Homologien von Base 1 bis ca. 660, während Blast neben diesem Bereich, noch einen weiteren Homologiebereich findet, der bis ca. 750 bp reicht und somit nahe dem Haupthomologiebereich liegt. Allerdings ist der in dieser Region gefundene Homologiebereich nur ca. 40 bp lang (siehe Abbildung 25). Für die Darstellung der Homologien und weiteren Diskussionen der Ergebnisse der Sequenzanalysen wurden die Blast Ergebnisse verwendet. Es wurde sowohl die Sequenz als Ganzes als auch in Teilsequenzen analysiert.

Relevante Homologien zu bekannten prokaryotischen Sequenzen sind ausschließlich innerhalb der ersten 750 bp der Sequenz zu finden. Alle Homologien dieses Bereiches sind solche zu *tnpA* oder als mit dieser eng verwandt beschriebene Transposasogene bzw. nicht genau identifiziert aus verschiedenen MO (siehe Tabelle 22 und Abbildung 25).

Diese gehören unterschiedlichen Familien an, die meisten den *Enterobacteriales* und *Pseudomonadales*. Es finden sich aber auch einzelne von z.B. *Burkholderiales* (*Delftia*), *Acidithiobacillales* (*Thiobacillus*) und *Oceanospirillales* (*Halomonas*) (siehe Tabelle 22).

tnpA liegt in diesen MO in Kombination mit verschiedenen Transposons vor und wurde an verschiedenen Orten des Genoms gefunden. So befinden sich in der Menge der Homologie-Daten solche von Plasmid- oder Genomsequenzierungen, direkte Sequenzierungen bestimmter Transposons, oft gekoppelt mit Quecksilberresistenz oder Sequenzierung einzelner Gene, wie z.B. *tnpA* als Bestandteil des Genoms eines bestimmten MO. So ergaben die ersten Scores bei der Homologiesuche Homologien zu Tn2680, Tn5060, Tn5075, C6 Transposase Gen, TnSF1, *tnpA* vom Typ Tn21 und Tn21 als Gesamtsequenz.

Tabelle 22: Ergebnisse der Sequenzhomologieabfrage vom 29. 04. 2004 bei NGFN BLAST bei der GBF (BLASTN 2.2.2) [Altschul et al., 1997]. Beschreibung der Homologien der ersten zwölf Ranking Positionen.

Ranking Position Accession Number	Element	Organismus	Homologe Basen (Score in bits)	Wahrschein- lichkeitswert (E Value)
1 AL513383	Tn21 <i>tnpA</i> Pseudogen auf Plasmid pHCM1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhii CT18	755 48	0,0 0,006
2 AJ551280	Tn5060	<i>Pseudomonas</i> sp.	755 48	0,0 0,006
3 AF457211	Tn5075	<i>Escherichia coli</i>	755 48	0,0 0,006
4 AF380359	Transposase Gen	<i>Halomonas</i> sp. C6	755 48	0,0 0,006
5 AF188331	TnSF1 „vermutliche Transposase“	<i>Shigella flexneri</i>	755 48	0,0 0,006
6 X04891	<i>tnpA</i> vom Typ Tn21	<i>Escherichia coli</i>	716 48	0,0 0,006
7 AF071413	Tn21	<i>Escherichia coli</i>	716 48	0,0 0,006
8 AF326777	<i>Shigella flexneri</i> 2a SRL pathogenicity island	<i>Shigella flexneri</i> 2a	696 48	0,0 0,006
9 AJ251743	Tn5037	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> G66	686 40	0,0 1,5
10 AJ431260	Plasmid pB4	unkultiviertes Bakterium	680 50 42	0,0 0,002 0,38
11 AY078159	IS1071 Transposase Gen vom Typ Tn21	<i>Delftia acidovorans</i>	573 573	e-161 e-161
12 Y09209	Tn5041 <i>tnpA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	545 48	e-152 0,006

Der Score ist in bits angegeben. Zur Berechnung des Scores wird für jede Übereinstimmung in den beiden Sequenzen 1 gezählt, jede Fehlpaarung erhält den Wert 0. Je höher der Score ist, desto ähnlicher sind die Sequenzen. Der Wert hängt jedoch direkt mit der Länge der Sequenz zusammen, daher kann kein allgemein gültiger Wert festgelegt werden. Der E-Wert in der fünften Spalte steht für die Wahrscheinlichkeit, dass die Übereinstimmung der eigenen Daten mit der entsprechenden Sequenz auf reinem Zufall beruht. Je kleiner der E-Wert ist (bei identischen Sequenzen ist er 0), desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Übereinstimmung der beiden Sequenzen auf echte Homologie zurückzuführen ist.

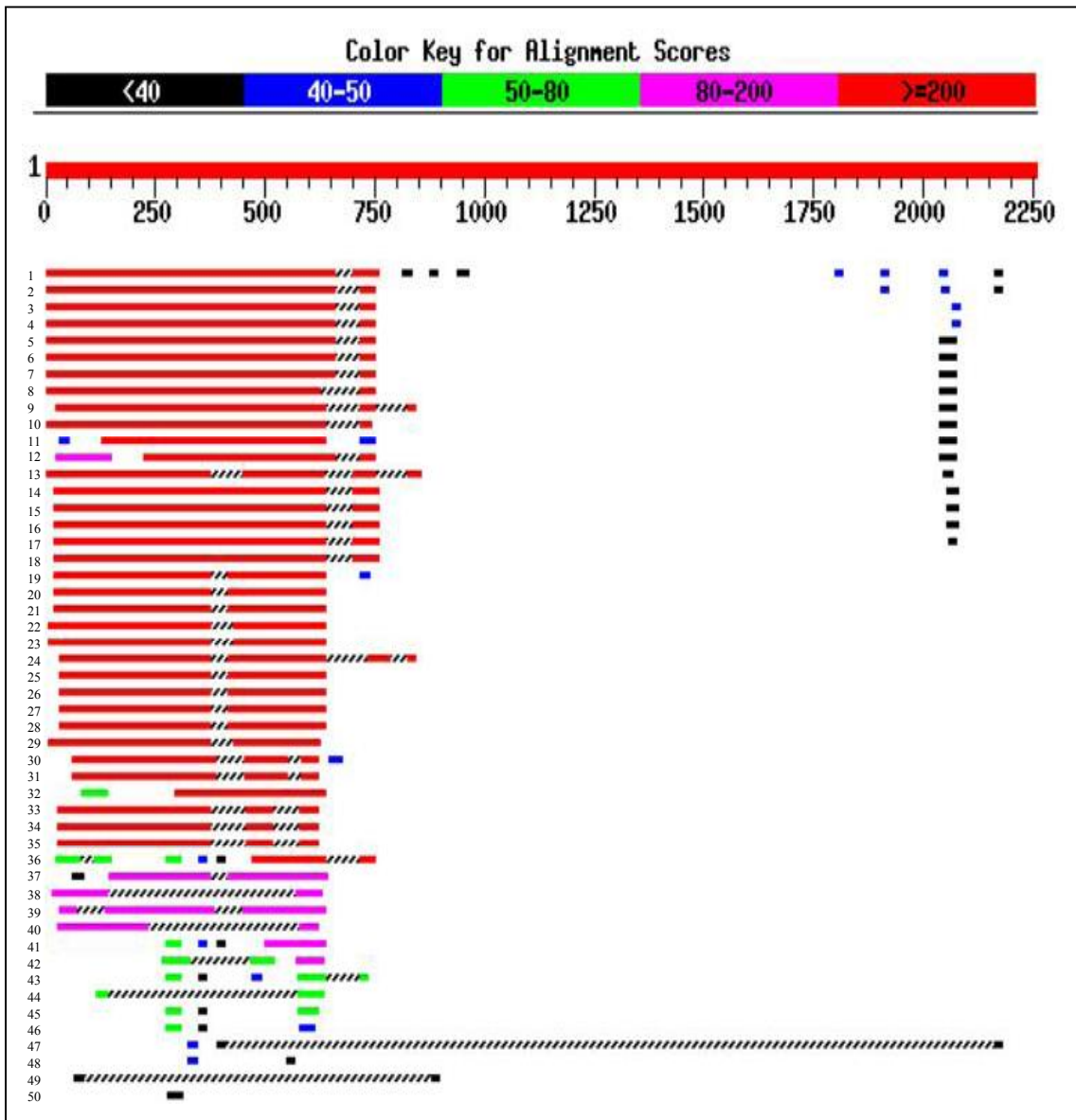


Abbildung 25: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Sequenzhomologieabfrage vom 29.04.2004 bei NGFN=BLAST bei der GBF (BLASTN 2.2.2) [Altschul et al., 1997]. Beschreibung der ersten zwölf Ranking Positionen in Tabelle 22. Der obere dicke Balken entspricht der in dieser Arbeit erhaltenen Sequenz HG176TNPAHP. Die Farben entsprechen, wie in der Abbildung beschrieben, den Homologiewerten innerhalb der Sequenzen, schraffierte Balken entsprechen Lücken in der Sequenz.

Tabelle 23: Ergebnisse der Sequenzhomologieabfrage vom 29. 04. 2004 bei NGFN BLAST bei der GBF (BLASTN 2.2.2) [Altschul et al., 1997]. Herkunft der verwandten Sequenzen mit Original Zitat.

Ranking Position Accession Number	Element	Organismus	homolog zu	Original Zitat
1 AL513383	Tn21 Pseudogen auf Plasmid pHCM1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi CT18	<i>tnpA</i> Typ Tn21 Pseudogen	Parkhill, J. et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi CT18. Nature 2001, 413 (6858):848-52
2 AJ551280	Tn5060	<i>Pseudomonas</i> sp.	älteres Transposon. verwandt mit Vorfahren von Tn21 dem TnY welches als Vorfahre von TnX postuliert wird.	Kholodii G. et al. Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition. FEMS Microbiol Lett 2003, 226 (2):251-5
3 AF457211	Tn5075	<i>Escherichia coli</i>	Tn21 <i>tnpA</i>	Essa A. et al. Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in enterobacteria from the preantibiotic era. Antimicrob Agents Chemother 2003, 47 (3):1115-9
4 AF380359	Transposase Gen Fragment	<i>Halomonas</i> s sp. C6	unbestimmte <i>tnpA</i>	Yang,S., Wang,H., Dou,Y., Submitted MAY-2001 to the EMBL GenBank DDBJ databases
5 AF188331	TnSF1 vermutete Transposase	<i>Shigella flexneri</i>	Typ Tn21 <i>tnpA</i> nur Sequenz	„unveröffentlicht.“ Chen,J.-H., Chen,J.-Y., TnSF1, a Tn21- like transposon in <i>Shigella flexneri</i> .Submitted SEP-1999 to the EMBL GenBank DDBJ databases
6 X04891	<i>tnpA</i> vom Typ Tn21	<i>Escherichia coli</i>	Tn21 <i>tnpA</i>	Ward E., Grinsted J.; "The nucleotide sequence of the <i>tnpA</i> gene of Tn21",Nucleic Acids Res. 15(4):1799- 1806(1987).
7 AF071413	Tn21	<i>Escherichia coli</i>	Tn21 <i>tnpA</i>	Diver W.P., Grinsted J., Fritzing D.C., Brown N.L., Altenbuchner J., Rogowsky P., Schmitt R.; "DNA sequences of and complementation by the <i>tnpR</i> genes of Tn21, Tn501 and Tn1721"; Mol. Gen. Genet. 191(2):189-193(1983).
8 AF326777	<i>Shigella flexneri</i> 2a SRL pathogenicity	<i>Shigella flexneri</i> 2a	homolog zu Tn21 <i>tnpA</i>	Luck S.N et al. Ferric Dicitrate Transport System (Fec) of <i>Shigella flexneri</i> 2a YSH6000 Is Encoded on a Novel Pathogenicity Island Carrying Multiple Antibiotic Resistance Genes. (2001) Infect. Immun. 69:6012-6021

Ranking Position Accession Number	Element	Organismus	homolog zu	Original Zitat
9 AJ251743	Tn5037	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> G66	<i>tnpA</i> vom Typ Tn21 ca. 90% homolog zu Tn21	Kalyaeva E.S., Kholodii G.Y., Bass I.A., Gorlenko A.M., Yurieva O.V., Nikiforov V.G.; "Tn5037, a Tn21-like mercury resistance transposon from <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> "; Russ. J. Genet. 37:972-975(2001).
10 AJ431260	Plasmid pB4	unkultiviertes Bakterium	TNPA2 Homologie auf Proteinbasis zu Tn3 Familie <i>tnpA</i>	Tauch A., Schluter A., Bischoff N., Goesmann A., Meyer F., Puhler A.; "The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 beta backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene blaNPS-1, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family"; Mol. Genet. Genomics 268(5):570-584(2003).
11 AY078159	IS1071 transposase Gen vom Typ Tn21	<i>Delftia acidovorans</i>	gleich zu Tn21 <i>tnpA</i>	Hoffmann D., Kleinstaub S., Muller R.H., Babel W.; "A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali-tolerant strain <i>Delftia acidovorans</i> P4a"; Microbiology 149(Pt 9):2545-2556(2003).
12 Y09209	Tn5041	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	homolog zu Tn21 <i>tnpA</i>	Kholodii G., Gorlenko Z., Mindlin S., Hobman J., Nikiforov V.; "Tn5041-like transposons: molecular diversity, evolutionary relationships and distribution of distinct variants in environmental bacteria."; Microbiology 148(11):3569-3582(2002).

4 Diskussion

4.1 Entwicklung eines Protokolls zur einfachen Isolierung von Boden-Gesamt-DNA

Ziel dieser Arbeit war es terrestrische Habitate auf das Vorhandensein von Transposase-Genen vom Typ Tn3, Tn501 und Tn21 mittels PCR zu screenen, um Aussagen über das Vorhandensein und die Verteilung von transponierbaren Elementen in Bodenlebensgemeinschaften zu erhalten. Hierzu musste ein möglichst schnelles, preiswertes und universell einsetzbares Protokoll zur Isolierung von Boden-Gesamt-DNA bei verschiedenen Böden zum Einsatz kommen.

Es wurde Mitte 1998 eine Marktsichtung mittels Internet und Literaturstudien durchgeführt, welche kommerziellen Kits zur Isolierung von DNA aus Boden erhältlich sind. Es stellte sich heraus, dass genau ein Kit zur Isolierung von DNA aus Boden am Markt erhältlich war, namentlich das der ehemaligen Firma Bio101 jetzt Qbiogene. Das Kit war seinerzeit noch nicht auf dem deutschen Markt erhältlich und wurde von Bio101 in zwei Probeversionen zur Verfügung gestellt. Mit dem Kit ließen sich auch nach wiederholtem Kontakt mit dem technischen Kundendienst keine befriedigenden Ergebnisse erzielen, so stimmten z.B. die Volumina nicht mit den mitgelieferten Cups überein. Auch nach Variation der Volumina ließ sich kein besseres Ergebnis erzielen (siehe 3.1).

So wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedenste Methoden zu Präparation von Boden-Gesamt-DNA aus Boden evaluiert. Diese Methoden waren zum Teil in Veröffentlichungen als geeignet zur Isolierung von DNA aus Boden beschrieben [Frostegard et al., 1999; Garcia-Pedrajas et al., 1999; Lloyd-Jones et al., 2001; Romanowski et al., 1993; Trevors u. Cook 1992; Torsvik u. Goksoyr, 1978; Torsvik et al., 1995; Qbiogene, 2000] oder es wurden geläufige Methoden zur Präparation von DNA aus Zellen zur Isolation von DNA aus Boden in geeigneter Weise adaptiert und eingesetzt.

Hierbei stellte sich heraus, dass den Präparationsmethoden ein geeigneter und möglichst schneller Aufschluss des Boden vorausgehen muss, um gute und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Deswegen wurden den eigentlichen Präparationsmethoden verschiedene Aufschlussmethoden vorgeschaltet. Im Speziellen wurden fünf verschiedene Methoden zum Aufschluss von Boden und sechs Methoden zur Isolation der DNA aus diesem so aufgeschlossenen Boden in verschiedenen Kombinationen evaluiert (siehe Tabelle 11).

Es stellte sich die Methode „Fastprep System nach Günther“ als am besten geeignet heraus (siehe Tabelle 11). Diese Methode ist ein modifiziertes Qiagen Genomic Tip Protokoll, dem ein Aufschluß mit der Fastprep Schüttelmühle vorgeschaltet ist (siehe 2.17.1).

Die Menge an isolierter DNA aus Boden ist zwar ähnlich hoch wie bei den anderen Methoden, mit Ausnahme der Methode „FastDNA SPIN Kit for Soil“, jedoch lag die DNA hier in

solch einer Form vor, dass eine PCR i.d.R. ohne Verdünnung und bis auf wenige Ausnahmen immer nach Verdünnung stattfinden konnte. Die Guanidiniumhydrochloridmethode war eine weitere Methode welche brauchbare Ergebnisse lieferte, jedoch nicht reproduzierbar und die Signale waren auch nicht so stark wie bei der oben genannten.

Auffallend ist, dass die Menge der erhaltenen DNA in direkter Korrelation zu der Aufschlussmethode steht. Bei Isolierung von DNA aus dem Boden ohne vorherigen Aufschluss des Bodens ist die Menge an erhaltener DNA bei der Methode 2, „DNA-Präparation nach Allen mit Proteinase K“ und 6, „Guanidiniumhydrochloridmethode“, am höchsten (Tabelle 11, Zeile 1). Alle Methoden erzielten jedoch die größten Mengen an präparierter DNA nach einem mechanischem Aufschluss mittels automatischer Mühlen. Hierbei war die eingesetzte Mühle „Mill MM301“ der Fa. Retsch gleich gut wie die Fastprep Schüttelmühle. Beide schüttelten die aufzuschließenden Proben in einem Zylinder. Bei der Fastprep Schüttelmühle geschieht dies in 2 ml fassenden, verschraubbaren Tubes, welche mit kleinen Keramik oder Glasperlen gefüllt sind (siehe 2.17.1). Es können 12 Proben gleichzeitig aufgeschlossen werden. Bei der Retsch Mühle findet der Aufschluss in einem ca.100 ml fassenden Behälter aus Teflon mittels einer 4 cm großem Achatkugel statt. Das Ganze erfolgt in der vorgekühlten Mühle unter Zulauf von ca. 300ml flüssigen Stickstoff je Probe. Es kann immer nur eine Probe auf einmal aufgeschlossen werden und das Behältnis muss danach wieder gereinigt werden. Aufgrund der besseren Handhabung und des schnelleren Probenaufschlusses wurde der Aufschluss des Bodens mit der Fastprep Schüttelmühle durchgeführt.

Auffallend ist ebenfalls, dass nach dem Einsatz der Mühlen bei den Präparationsmethoden 1, 2 und 3 auch nach der Zugabe von externer DNA keine Signale bei der PCR erhalten wurden, obwohl dies vorher der Fall. Dies kann nur an störenden Substanzen in der aufgereinigten Boden-Gesamt-DNA liegen, den beim Aufreinigen mitgeschleppten Huminsäuren. Hierfür spricht auch, dass bei den Methoden „Fastprep System nach Günther“ (FSG) und „Guanidiniumhydrochloridmethode“ bei Einsatz der Mühlen und damit zunehmender DNA-Konzentration die Signalstärken zunahm (siehe Tabelle 11). Dieser Effekt wurde auch von Frostegard et al. [1999] beschrieben. Weiterhin sehen auch Frostegard et al. im Mahlen von Bodenproben die geeignete Methode um Boden aufzuschließen. Die DNA wird zwar starken Scherkräften ausgesetzt, andererseits würde sie ohne diesen Aufschluss aber auch zum großen Teil nicht zugänglich sein. Weiterhin würde ein Aufschluss, der nur auf einer chemischen oder enzymatischen Lyse basiert in erster Linie die DNA Gram-negativer BMO zugänglich machen und somit das Ergebnis verfälschen.

Eine Überprüfung der Vollständigkeit der Bakterienlyse (siehe 3.7) ergab, dass bei dieser Methode des mechanischen Aufschlusses von 10^6 eingesetzten Zellen annähernd alle Zellen aufgeschlossen wurden. Der Rest der Zellen wurde durch die anschließende alkalische Lyse aufgeschlossen.

Dem FSG war weiterhin eigen, dass es 1996 als einziges der Systeme mit einer Magermilchpulverlösung während des Aufschlusses arbeitete. Während der Suche nach Detergenzien zur Aufreinigung von DNA aus Bodenproben hatte sich Magermilchpulver empirisch als geeignet herausgestellt, DNA in einer solchen Form aus dem Boden zu isolieren, dass sie einer anschließenden PCR zugänglich ist. Dies was schon unmittelbar nach der Lyse eines Bodenextraktes sichtbar, da die Lysate mit Milchpulverzusatz farblos waren, während die Extrakte der anderen Methoden, speziell auch das abgeänderte Qiagenprotokoll hellbraun gefärbt waren. Hier werden mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit Huminsäuren durch die Milchpulverlösung gebunden und im Zentrifugationsschritt vom Überstand größtenteils abgetrennt. Weiterhin, so stellen Garcia-Pedrajas et al. [1999] heraus, würde das Milchpulver ebenfalls an Bodenpartikeln binden und diese so gegenüber der Bindung von DNA abblocken, so dass mehr ungebundene DNA isoliert werden kann. Sowohl Garcia-Pedrajas et al. [1999] als auch Wang u. Chang [2003] berichten über die positive Auswirkung des Zusatzens von Milchpulver auf eine PCR mit aus Boden isolierter DNA. Dies liegt in erster Linie daran, dass die Huminstoffe so nicht mehr in der Lage sind mit den Mg^{2+} Kationen des PCR Ansatzes Wechselwirkungen einzugehen [van den Hoop et al. 1990] und dadurch die PCR zu stören.

4.2 Kontrollen

Bei allen der 32 untersuchten Böden konnte mit dem FSG die Bodenprobe so aufgearbeitet werden, dass sie anschließend einer Untersuchung mittels PCR zugänglich war, wenn auch in fünf Fällen (siehe Tabelle 13) erst nach einem Verdünnungsschritt ein Signal erhalten werden konnte. Der Aufbau der Kontrollen war durch eine Negativkontrolle und zwei Positivkontrollen so angelegt, dass zum einen erkannt werden konnte, ob die PCR an sich stattfinden konnte und ob sie nicht kontaminiert war, also eine Überprüfung des Mastermixes. Zum anderen fand in einer zweiten Positivkontrolle eine Überprüfung der aus dem Boden isolierten DNA statt. Um zu erkennen ob sie frei von Hemmstoffen war, so dass eine PCR stattfinden konnte (siehe Abbildung 14 und Tabelle 13, Kontrollen), wurde diesem Ansatz mit der aus Boden isolierten DNA extern Template für die PCR zugesetzt. Fand unter diesen Bedingungen keine PCR statt, wurde eine Verdünnungsstufe angelegt und/oder der Boden nochmals präpariert. Die Kontrollen waren so angelegt, dass immer mit Sicherheit gesagt werden konnte, ob die PCR mit Boden-Gesamt-DNA gültige Ergebnisse brachte oder nicht.

Die Überprüfung der Präparation von Boden-Gesamt-DNA mittels PCR erfolgte analog dem Vorgehen des „MECBAD Konsortiums“ (Mobile Genetic Element's Contribution to Bacterial Adaptability and Diversity“) [MECBAD, 2003; Smalla et al., 2000]. Bei diesen Arbeitsgruppen wurde ebenfalls die Durchführbarkeit der PCR zur Verifizierung der Präparation herangezogen.

4.3 Vergleich der entwickelten Methode mit anderen

Die untere Nachweisgrenze des „Fastprep Systems nach Günther“ liegt bei 6×10^2 Templates g^{-1} Boden (siehe 3.6). Dies wurde mittels PCR mit 32 verschiedenen Böden verifiziert. Der mittlere Wert liegt bei 9×10^3 Templates g^{-1} Boden, was im Bereich der sensitiven Methoden zum Nachweis von DNA aus Boden liegt. Ein Vergleich dieser Nachweisgrenze mit der anderer Autoren ist nicht immer möglich. Viele Autoren machen bei einer Validierung ihres Systems Prozentangaben der wiedergefundenen DNA, was keinen Rückschluss zulässt, ob diese DNA der PCR zugänglich ist, oder es wurde freie DNA zugesetzt, was dann wiederum keinen Rückschluss zulässt ob die Methode geeignet ist, auch Zellen so zu lysieren, dass ihre DNA zugänglich wird. Die Methode soll dennoch mit einigen Veröffentlichungen verglichen werden.

So entwickelten Zoll et al. [2002] aus den QIAamp Kit, einer Weiterentwicklung des Qiagen Genomic Tip Protokolls, auf dem auch das FSG basiert, eine Methode mit der aus 5g lehmigen Boden 10^5 Zellen nachgewiesen werden können, also rechnerisch 10^1 Zellen g^{-1} Boden. Diese Methode ist deswegen interessant, da sie vom „Wehrwissenschaftlichen Institut für Schutztechnologien“ der Bundeswehr entwickelt wurde um *Bacillus anthracis* in Bodenproben nachzuweisen und somit einen Standard darstellt [Zoll et al., 2002]. Tebbe et al. [1995] entwickelten ein Verfahren mit magnetischen Partikeln mit dem sie eine Nachweisgrenze zwischen 10^3 und 10^4 g^{-1} Boden für mRNA erreichten, welches aber in der Handhabung mehr Schritte beinhaltet und damit länger dauert als das FSG. Mit dieser Methode konnte auch nur eine Probe auf einmal aufgeschlossen werden. Frostegard et al. evaluierten mehrere Methoden und kamen auf Nachweisgrenzen die wiederum vom Boden abhängig waren. Die Nachweisgrenzen bewegten sich im Bereich von 10^5 und 10^7 g^{-1} Boden. Bei Zugabe von größeren Mengen externer DNA konnte die Nachweisgrenze auf 10^3 g^{-1} Boden heruntergebracht werden. Frostegard et al. führen dies auf ein statistisches Binden von DNA an Tonmineralien innerhalb der Matrix zurück. So wird weniger Target-DNA gebunden und steht somit einer weiteren Analyse zur Verfügung.

Sowohl vor dem Hintergrund des Vergleichs mit anderen Aufschlussmethoden, als auch alleinstehend gesehen, stellt sich das FSG mit seinen Kontrollen als sehr gut geeignet für die Isolierung von DNA aus Böden mit anschließender PCR dar.

4.4 Bewertung der erzielten Ergebnisse

Von den 32 untersuchten unbelasteten Böden zeigten fünf positive Signale, 27 Böden zeigten kein Signal. Es wurde mittels PCR dreimal ein Signal vom Typ Tn21*tnpA* und zweimal bei *tnpA* vom Typ Tn501 erhalten. Da dies die erste Untersuchung ist, die sich mit dem Nachweis von Transposasegenen in unbelasteten terrestrischen Habitaten beschäftigt hat, ohne eine

Isolierung von BMO vorher durchzuführen, ist es überraschend, dass sich hier eine ähnliche Mengenverteilung wie bei belasteten Habitaten eingestellt hat.

Das Vorkommen von Tn21 oder Tn501 *tnpA* bedeutet nicht, dass die Transposase auch immer mit einer Hg- oder Antibiotika- Resistenz gekoppelt sein muss. Vielmehr drückt sich hierin die Fähigkeit von Tn21 und dessen Derivaten aus, andere Gene zu „assimilieren“, diese anderen BMO zur Verfügung zu stellen und so deren Fitness erhöhen. Grinsted et al. [1990] sehen gerade in diesem Mechanismus den Grund der großen Verbreitung der Tn21 Familie.

Roux et al. [1993] untersuchten 60 Isolate mittels Hybridisation auf das Vorhandensein von *tnpA* des Typs Tn3 und Tn21 und fanden keine *tnpA*-positiven Isolate. Demgegenüber standen drei *tnpA* positive Isolate vom Typ Tn21 bei 40 Isolaten aus dem Mittelmeer. Dieses Resultat erscheint sehr hoch, wenn man es mit den Ergebnissen von Dahlberg et al. [1995] vergleicht. Dahlberg et al. [1995] waren die ersten, welche das Vorkommen von Transposasen des Typs Tn21 und Tn501 in der Umwelt in belasteten marinen Habitaten mittels PCR untersuchten. Sie fanden für Tn21 *tnpA* eine Häufigkeit von 1×10^{-3} bis $1,1 \times 10^{-4}$, für Tn3 von 1×10^{-4} und für Tn501 eine rechnerische von 1×10^{-6} bezogen auf die Nachweisbarkeit aus Wasser-Gesamt-DNA. Tatsächlich jedoch wurden an erster Stelle *tnpA* vom Typ Tn21, dann von Tn501 und in einer Probe von Tn3 nachgewiesen.

Weitere Untersuchungen hierzu legten Pearson et al. [1996] vor. Sie wiesen in einem Teil ihrer Untersuchungen zum ersten Mal in unbelastetem Boden bei Hg-resistenten Isolaten Transposasegene von Tn21 und Tn501 nach. Von 10 Isolaten wurden fünf Signale mit *tnpA* Sonden vom Typ Tn501 und sechs vom Typ Tn21 erhalten, wobei fünf Isolate mit beiden Sonden hybridisierten. Bei allen untersuchten Böden konnten insgesamt 23 Hybridisierungssignale für *tnpA* Typ Tn21 und 21 für Tn501 detektiert werden.

Smalla et al. [2000] berichteten von dem Auftreten von Tn21 und Tn501 *tnpA* in 13 von 17 unterschiedlichen Habitaten. Zwölf der 17 Habitate waren terrestrischer Natur. Hiervon wiederum waren drei unbelastete Habitate und in einem dieser konnte Tn21 und Tn501 *tnpA* in starken Signalen nachgewiesen werden.

Verglichen mit den Ergebnissen andere Arbeiten liegen die in dieser Arbeit mittels PCR nachgewiesenen Transposasegene in ihrer Verteilung wie bei den beschriebenen Untersuchungen vor. Am Häufigsten tritt Transposase vom Typ Tn21 *tnpA* auf, gefolgt vom Typ Tn501. Tn3 *tnpA* konnte mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Sie trat aber auch, wie oben beschrieben, in anderen Untersuchungen nur vereinzelt auf. Dies könnte daran liegen, dass das Beharbergen eines Transposons vom Typ Tn3 einen geringeren Vorteil für einen BMO mitbringen würde, da es keine Hg-Resistenz besitzt und auch nicht, wie bei Tn21 beschrieben, in der Lage ist Gene zu assimilieren.

Bei den, im Rahmen aller Experimente dieser Arbeit geblotteten, schätzungsweise 28000 Kolonien wurden mittels Hybridisierung 156 positive Signale erhalten (Siehe 3.12). 91 mal Typ Tn21, drei mal Tn3, und 62 mal Tn501. Damit läge die Häufigkeit der Transposasen bei $1,8 \times 10^{-2}$, was verglichen mit anderen Untersuchungen ein hoher Wert wäre.

So fanden Dahlberg et al. [1995] in der obersten, Schwermetall belasteten Wasserschicht, für Tn21 *tnpA* eine Frequenz von 1×10^{-3} bis $1,1 \times 10^{-4}$, für Tn3 von 1×10^{-4} und für Tn501 eine rechnerische von 1×10^{-6} bezogen auf die Nachweisbarkeit aus Wasser-Gesamt-DNA. Man sollte zu Recht erwarten, dass die Frequenz in unbelasteten Habitaten geringer ist. Diese unerwartet hohe Frequenz hat folgende Ursachen:

Zum einen fand durch das Ausplattieren an sich, aber gerade auch durch das Ausplattieren auf Selektionsmedium, eine entscheidende Selektion statt (siehe 1.10).

Die ca. 28000 Kolonien stellen keinen Querschnitt durch die vorhandene Population an BMO dar, sondern nur einen, durch zwei Selektionsschritte eingeschränkten, winzigen Ausschnitt der tatsächlichen Population. Dahlberg et al. rechneten aufgrund der isolierten Mengen an DNA auf die vorhandene Anzahl an Mikroorganismen zurück, was bei ihrer Art der Probennahme aus Wasser in erster Näherung zulässig ist.

Da sie alle im Habitat vorkommenden MO aufschlossen, erhielten sie so auch die ungefähre Anzahl aller im Habitat vorkommender MO als DNA-Äquivalent. Aus diesen Werten konnten sie dann eine genauere Abschätzung zur Frequenz des Vorkommens der Transposasen in belasteten Gewässern machen.

Ein weiterer Beweis für die Richtigkeit dieser These ist, dass kein einziges positives Signal erzielt wurde, wenn auf NI-Medium gewachsene Kolonien geblottet wurden.

Weiterhin vermuten Dahlberg et al., dass Transposasen häufiger mit der kultivierbaren Fraktion der MO assoziiert seien; ein weitere Grund quantitativ nur mit der Gesamt-DNA eines Habitates zu arbeiten.

Vor dem Hintergrund, dass unter Selektionsdruck transponierbare Elemente verstärkt auftauchen und normalerweise kein zielgerichteter Influx von BMO in natürliche Habitate erfolgt, ist davon auszugehen, dass diese Elemente in unbelasteten Habitaten, wenn auch in geringen Konzentrationen und somit schwer nachzuweisen, vorkommen.

Dies ist auch die Aussage vieler Untersuchungen zu Freisetzungsversuchen in denen festgestellt wurde, dass einmal ausgebrachte Gene noch nach Jahren, wenn auch in geringer Anzahl, nachweisbar sind [Tebbe et al.,1995].

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Aussagen.

4.5 Isolierung von potentiell Transposon-beherbergenden Stämmen

Um mehr über die Struktur der in terrestrischen Habitaten vorhandenen transponierbaren Elemente zu erfahren, wurden BMO, welche diese Elemente beherbergen könnten, aus den

entsprechenden Böden isoliert und die genetischen Elemente anschließend charakterisiert. Hierzu wurden zwei äußerst unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen ein klassisches Vorgehen mit Isolierung von BMO auf Selektivmedien, zum anderen der Einsatz von Mikrokosmen um transponierbare Elemente mittels Gentransfer nachzuweisen. Weiterhin wurden zwei aus vorhergehenden Arbeiten zur Verfügung stehende Bakterienkollektive auf das Vorhandensein von Transposasen gescreent.

4.6 Screening von Böden auf Transposasen mittels Koloniehybridisierung

Im Verlauf dieser Arbeit wurden in einem separaten Experiment (siehe 3.12) ca. 21000 Kolonien aus unbelasteten terrestrischen Habitaten geblottet und auf das Vorhandensein von Transposasen gescreent. Bei diesen, unter 3.12 dargestellten Ergebnissen der geblotteten Kolonien, kam es zu 66 positiven Signalen. 43 mal vom Typ Tn21, drei mal Tn3, und 20 mal Tn501. Alle Positiv- und Negativkontrollen waren erwartungsgemäß.

Was auf den ersten Blick erstaunt, ist das Verhältnis zwischen den in der Koloniehybridisierung erhaltenen Signalen und den Ergebnissen mittels PCR, dargestellt in Tabelle 15. Hier wurde bei 66 positiven Signalen im Kolonie-Blot nur dreimal ein positives Ergebnis mittels PCR erzielt. Konkret wurden 66 Stämme isoliert, aber nur 51 Isolate waren einer DNA-Präparation zugänglich. Mit dieser DNA wurde unter stringenteren Bedingungen ein Dot-Blot durchgeführt und wiederum 16 Signale erhalten. Mit dem Einsatz der DNA dieser Stämme wurden anschließend drei Signale mittels PCR erzielt.

Dieses Phänomen ist sowohl von Dahlberg et al. [1995] als auch Pearson et al. [1996] beschrieben. Bei den Untersuchungen der beiden Arbeitsgruppen kam es ebenfalls zu einer Divergenz in den Ergebnissen, welche mittels Hybridisierung und PCR erhalten wurden. Alle mittels PCR erhaltenen Fragmente wurden auch bei gleicher Fragmentlänge mittels Hybridisierung, Denaturierende-Gradienten-Gelelektrophorese oder geschachtelten Primern auf Homologie überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass eine große Menge an homeologen Transposasen nachgewiesen werden konnten. Beide Autoren führen dies auf eine „rege Evolution“ innerhalb des Transposase-Gens an sich, aber auch der sie beherbergenden genetischen Elemente wie Transposons, Integrons und defekte Transposons zurück [Dahlberg et al., 1995; Pearson et al., 1996].

So stellten Pearson et al. [1996] in 23 isolierten Stämmen sechs verschiedene zur Tn21 Familie gehörende, vorher nicht beschriebene Transposasen fest und ordneten diese sich aus Tn501 oder Tn21 entwickelten „Hybrid-Transposons“ zu. Dahlberg et al. [1995] beschreiben, dass selbst bei Hybridisierung unter niedrig stringenten Bedingungen die PCR Fragmente nicht mit den *tnpA*-Sonden hybridisierten. Holt et al. [1999a] unterstützen dieses Argument mit ihren Ergebnissen, indem sie feststellten, dass auch sie mittels PCR nicht alle ihre mit Gensonden erhaltenen Ergebnisse verifizieren konnten.

Man kann sich der Forderung von Smalla et al. [2000] nur anschließen, die Ergebnisse der PCR mittels Sonden zu überprüfen, was in dieser Arbeit auch geschehen ist.

Der Einsatz beider Methoden genetische Elemente nachzuweisen, sowohl die der Gensonden, welche auch in der Lage ist homologe DNA nachzuweisen, als auch die der PCR, welche nur sehr genaue Sequenzen nachweist, ist unerlässlich bei der Isolierung und Vorauswahl von weiter zu charakterisierenden Isolaten.

In dem Fall dieser Arbeit wurden die drei Stämme G16, G26 und G37, bei welchen mittels PCR ein Signal mit Tn21 *tnpA* Primern erzeugt wurde, als *Pseudomonas sp* wie unter 2.29 beschrieben bestimmt und mittels Southern-Blot weiter charakterisiert (siehe Abbildung 22).

Bei dem erfolgten Screening konnten die zwei Isolate G16 und G37 durch Vorselektion auf einem kombinierten Streptomycin- und Sulfonamid- Medium und das Isolat G26 auf Quecksilber-Medium isoliert werden. Das Screening auf Hg-Medium bzw. in Hg belasteten Gewässern ist auch in anderen Arbeiten bei der Suche nach *tnpA* vom Typ Tn21 und Tn501 beschrieben worden [Pearson et al., 1996; Holt et al., 1999a; Dahlberg et al., 1995]. Dies erscheint sinnvoll, da sowohl Tn21 als auch Tn501 eine Quecksilberresistenz besitzen. Das Screening mit Streptomycin und Sulfonamid Medium auf Transposasegene wurde für Umweltproben hingegen noch nicht beschrieben, führte aber in zwei Fällen zu der Isolierung eines Stammes mit Tn21 *tnpA* Charakteristika. Resistenz gegen Sulfonamid und Streptomycin wird jedoch von Tn21 kodiert und ein Screening auf diesem Medium führte zum Erfolg.

Es konnten drei Signale im Kolonie-Blot beim Screening mit Ap-Medium vom Typ *tnpA* Tn3 detektiert werden, welche sich auch im Dot-Blot bestätigten, jedoch mittels PCR nicht verifiziert werden konnten. Auf NI- Medium wurde kein einziges Signal mittel Kolonie-Hybridisierung erhalten.

Die Verteilung der Hybridisierungsergebnisse ist wie oben bereits erwähnt in der Reihenfolge Tn21, Tn501 und dann Tn3. Dies entspricht der Verteilung des Vorkommens dieser Transposasen wie sie in belasteten Habitaten in den dazu erfolgten Untersuchungen beschrieben ist [Dahlberg et al., 1995; Pearson et al., 1996; Holt et al., 1999a; Smalla et al., 2000]. Das mittels PCR dreimal Tn21 *tnpA* nachgewiesen werden konnte und Tn501 nicht, ist aufgrund der geringen Zahl an positiven Ergebnissen nicht weiter zu bewerten.

4.7 Screening von vorhandenen Bakterienkollektiven

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch die von Bräuning [1998] und Günther [1996] erstellten Bakterienkollektive auf Transposasen vom Typ Tn3 Tn21 und Tn501 gescreent. Diese Kollektive wurde bei Untersuchung von Böden auf das Vorhandensein von mobilen genetischen Elementen angelegt.

Die von den Erstellern der Bakterienkollektive beschriebenen Resistenzen ließen sich nur zum Teil wiederfinden, was ein bekanntes Phänomen bei der Isolierung und der damit einhergehenden Überimpfung von Wildstämmen ist. Da der Selektionsdruck nicht für jede Resistenz aufrecht erhalten werden kann, verschwindet auch aus diesem Grund ein zunehmender Teil der Resistenzen. Auch das Aufbewahren als Dauerkultur kann dazu führen, dass Resistenzen verloren gehen.

Der Anteil an Signalen, welche mittels Sonden und PCR erhalten wurden, lag mit ca. 8% höher als bei den unter Tabelle 15 vorgestellten Ergebnissen. Dies liegt daran, dass es sich bei den hier untersuchten Kollektiven schon um erheblich vorselektierte Stämme handelt (Bräuning S., 1998; Günther N., 1996), welche alle wenigsten eine Resistenz von Tn21 oder Tn501 aufweisen. Das Verhältnis der erhaltenen PCR-Signale, zwölf von Tn21, sieben von Tn501 und keine von Tn3, liegt ebenfalls in dem oben beschriebenen Verhältnis von Tn21 zu Tn501 (zu Tn3) [Dahlberg et al., 1995; Pearson et al., 1996; Holt et al., 1999a; Smalla et al., 2000].

Auch die Differenz zwischen Hybridisierungsergebnissen und PCR lässt sich mit den gleichen Gründen wie unter 4.6 erklären. Dieses Phänomen ist von Dahlberg et al. [1995] und auch von Pearson et al. [1996] beschrieben. Die Divergenz zwischen den Hybridisierungsergebnissen der *tnpA* Sonden von Bräuning [1998] und Günther [1996] zu den in dieser Arbeit eingesetzten, kann an den von den Sonden unterschiedlichen abgedeckten Bereichen des Transposasegens liegen.

Die Wahl von Hg17.6 zur späteren Sequenzierung lag zum einen in der zum Sequenzieren gerade noch gut geeigneten Größe des erhaltenen Fragments, zum anderen daran, dass größere Mengen an DNA aus den anderen Wildisolaten teilweise nur mit größeren Schwierigkeiten zu isolieren waren.

4.8 Einsatz von Bodensäulen zum Nachweis von Transpositionseignissen

Neben den eigentlichen molekularbiologischen Arbeiten zum Nachweis von transponierbaren Elementen in terrestrischen Habitaten wurde auch dieser klassische mikrobiologische Ansatz gewählt, bei dem zum Nachweis von Transpositionseignissen das Plasmid pRB2138 eingesetzt wurde. Mittels dieses Plasmides war ein einfaches Positivscreening auf transponierbare Elemente möglich und wurde mit diesem Plasmid auf Agarplatten und Filtern durchgeführt [Bishop u. Sherratt, 1984; Gerlach u. Wiedemann, 1985]. In dieser Arbeit wurde pRB2138 zum Nachweis von Transpositions-Funktion und -Frequenzen eingesetzt und nicht zum „Einfangen“ von Transposons aus einer autochthonen Flora wie der eines terrestrischen Habitates in Form einer Bodensäule. Plasmide werden standardmäßig zum Nachweis von Transposons eingesetzt, jedoch i.d.R. so, dass ein Transposon in ein Resistenzgen transponiert und so einen „Resistenz minus“ Phänotyp entstehen lässt, welcher dann über Replikatechnik nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis eines seltenen Ereignisses wie dem Vorkommen von Transposons in unbelasteten terrestrischen Habitaten mit einem hohen erwarteten

Durchsatz an Zellen, erscheint ein Positivscreening wie mit pRB2138 durchführbar und ein gut geeigneter Ansatz zu sein.

4.9 Vorversuche

Bishop R. und Sherratt D. [1984] führten ihre Experimente mit zwei *E. coli* K12 *recA*⁻ Derivaten durch. Dies ist von Vorteil, da pRB2138 aus verschiedenen Plasmiden konstruiert worden war (siehe 2.22.4.1) und es so potentiell zu weniger unerwünschten Rekombinationsergebnissen bei Konjugations Experimenten mit eben diesen häufig verwendeten Plasmiden kommt. Gerlach A. und Wiedemann B. [1985] benutzten für ihre Experimente zwei *E. coli* C600 Derivate welche *recA*⁺ waren.

Da im eigentlichen Bodensäulenexperiment später eine längere Persistenz der eingesetzten Stämme im Boden von Vorteil ist und ein Abnehmen der Zahl von *E. coli* im Boden zu erwarten ist [Henschke u. Schmidt, 1989], wurden in den Vorversuchen neben *E. coli* (600+, Dh5 α und RRI) auch *P. putida* und *P. stutzeri* eingesetzt. Im Gegensatz zu den eingesetzten *E. coli* Stämmen (600+, Dh5 α und RRI) sind sie nicht beschrieben was *recA* angeht, aber dafür gut charakterisiert. *Pseudomonas stutzeri* ist ein BMO, welcher sich durch eine hohe natürliche Kompetenz auszeichnet [Lorenz und Wackernagel, 1991]. *P. putida* ist ebenfalls ein BMO, mit natürlicherweise hoher Persistenz im Boden. In diesem Falle wurde abgewägt zwischen der Möglichkeit einer MO vermittelten Rekombination innerhalb des Plasmides, was die Ergebnisse negativ beeinflussen könnte und der Persistenz der MO im Boden, was zum Gelingen des Experimentes beiträgt. Aus diesem Grunde wurden die Vorexperimente mit Boden- und Enterobakterien durchgeführt. Letztendlich haben jedoch die beiden oben zuerst erwähnten Untersuchungen gezeigt, dass sowohl mit *recA*⁺ als auch mit *recA*⁻ Stämmen Ergebnisse erzielt wurden.

Zum Einsatz für die Transpositionsexperimente kamen die Plasmide pACYC184::Tn3, pACYC184::Tn501 und pBR322::Tn2411. Die Plasmide pACYC184::Tn3 und pACYC184::Tn501 gehören der gleichen Inkompatibilitätsgruppe an wie pRB2138, da pRB2138 u.a. aus dem *ori* von pACYC184 konstruiert wurde. Gerlach & Wiedemann [1985] weisen in ihren Arbeiten auf diesen Sachverhalt hin. Im Gegensatz hierzu führten Bishop R. und Sherratt [1984] ihre Experimente explizit mit Plasmiden der gleichen Inkompatibilitätsgruppe (pACYC184::Tn103) erfolgreich durch. Plasmide gleicher Inc-Gruppe einzusetzen hat weiterhin den Vorteil, dass bei gleichzeitiger Selektion auf ein Antibiotikum, wie in dieser Arbeit geschehen, das zweite Plasmid verschwindet und nur noch das Plasmid mit dem entsprechenden Transpositionsprodukt vorliegt [Bennett u. Grinsted, 1988].

Die ersten unter 3.13 dargestellten Experimente waren nicht erfolgreich, da die Generationszeiten zu kurz und die Temperatur zu hoch gewählt wurde. Eine Generationszeit von ca. 35 Generationen [Bishop u. Sherratt, 1984] und die Inkubation bei RT [Bennett u. Grinsted,

1988] brachten jedoch positive Ergebnisse (siehe Tabelle 18). Auf Abbildung 18 sieht man einen deutlichen Shift, der aus den entsprechenden Ansätzen isolierten Plasmide gegenüber pRB2138 ohne Transpositionereignis, so dass eine Transposition stattgefunden haben muß. Die in dieser Arbeit unter 3.19 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass in den Vorversuchen eine Transposition von Tn3, Tn2411 und Tn501 in pRB2138 sowohl mit *Pseudomonas sp.* als auch mit *E. coli* als Wirten im Elektroporations- und im Konjugations-Versuch nachgewiesen werden konnte.

4.10 Vorversuche in sterilen Bodensäulen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sich pRB2138 erfolgreich in *Pseudomonas sp.* etablieren ließ, wurden Vorversuche in sterilen Bodensäulen durchgeführt. In Bodensäulen dieses Typs wiesen Brokamp et al. [1991] horizontalen Gentransfer von *Alcaligenes xylosoxidans* u.a. auf *Pseudomonas sp.* nach. Bei sterilen Bodensäulen gibt es einige Parameter, welche die Ergebnisse zu beeinflussen scheinen.

Der erste Parameter ist, dass die Säulenmatrizes steril sind. Dies erhöht die Transferfrequenz, da keine Konkurrenz durch andere BMO vorhanden ist. Des Weiteren werden beim Autoklavieren des Bodens mehr Nährstoffe zugänglich, was der Konjugation zuträglich ist [Hill u. Top, 1998]. Autoklavierter Boden wird als artifiziell betrachtet und ein Rückschluss auf Bedingungen in nicht sterilem Boden sei schlecht möglich. Gentransfer ist auch in sterilen Bodensäulen beschrieben [Hill u. Top, 1998]. Weitere Parameter sind die Säulengröße und die Aufarbeitung der eingefüllten Bodenmatrix. Die Probleme bei der Säulengröße sind zum einen beschrieben als „Wandeffekte“ wenn das Verhältnis von Volumen zur Grenzfläche der Säule zu groß ist. Diese bezieht sich aber in erster Linie auf kleinste Mikrokosmen im Grammbereich. Bei einem wie dem hier vorliegenden Säulenvolumen von mindestens 250 ml kommen diese Effekte nicht zum Tragen. Ein weiteres Problem kann bezüglich der Feuchtigkeit der Säulenmatrix auftreten. Es darf keine anaerobes Milieu herrschen, die Säule darf aber auch nicht austrocknen. Dies wurde in diesen Experiment zum einen dadurch verhindert, indem der Boden mit feinem, sterilem Kies gemischt wurde was kein anaerobes Milieu entstehen lässt, zum anderen durch das tägliche Spülen mit Flüssigkeit (siehe 3.20.1).

Dadurch, dass der Boden in die Säule gefüllt und anschließend mit Kies gemischt wurde, kam jedoch ein anders, nach Meinung von Angle et al. [1995] grundlegendes Problem beim Arbeiten mit Bodensäulen zum Tragen. Angle J.S. et al. berichten davon, dass durch die mechanische Aufbereitung des Bodens durch z.B. Sieben ein grundlegend anderes Bild, was die Persistenz von BMO angeht, geschaffen wird. Die Persistenz von BMO sei in „gestörten“ Böden in einer solchen Säule so grundlegend niedriger, dass dies eine neue Betrachtung aller durchgeführten Säulenexperimente zur Folge haben sollte. Dieses Argument ist für diese Untersuchungen jedoch nicht so gewichtig, da es hier nicht in erster Linie um die quantitative Erarbeitung eines Phänomens ging, sondern um den Nachweis als solchen. *Pseudomonas sp.*

ist in einigen Bodensäulen erfolgreich zum Nachweis von Gentransfer eingesetzt worden [Hill u. Top, 1998].

Ob *P. stutzeri* auch in der Lage gewesen wäre, aus diesem im Säulenexperiment benutzten autoklaviertem Boden nackte DNA aufzunehmen, wurde nicht überprüft, da die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dann bei diesem Fragment auch noch um eins mit einem transponierbaren Element handeln könnte als zu gering angesehen wurde. Es wurde auch keine Transposon-beherbergende DNA der Säule zugegeben. Sollte es durch ein solches Phänomen hingegen zum Nachweis eines Transpositionseignisses kommen, wäre dies ein willkommener Effekt, da es um den Nachweis einer Transposition mittels pRB2138 ging.

Nach 23 bzw. 27 Tagen konnten die ersten Transpositionseignisse nachgewiesen werden. Bennett und Grinstead [1988] geben zwei Wochen Verweildauer zum Nachweis einer Transposition an, nachdem Donor- und Rezipienten-Plasmid in der Zelle etabliert sind. Dieser Wert ist natürlich viel höher als 35 Generationszyklen welche von Bishop und Sherratt [1984] angeführt werden, diese Werte beziehen sich aber auch auf Transposition auf Filtermembranen, wo eine wesentlich kleinere Oberfläche zum Tragen kommt, welche eine bedeutend geringere Entfernung zwischen Rezipientenzelle und Donorzelle bedingt. Diese Rahmenbedingungen berücksichtigend erscheint eine Zeitspanne von drei bis vier Wochen als sehr gering. Das eine Transposition stattgefunden hat zeigt das Bild der Gelelektrophorese unter Abbildung 19. Hier ist wiederum ein Schiff in den Plasmiden zu erkennen, dessen Ursprung in der Transposition von Tn2411 bzw. Tn3 in pRB2138 zu sehen ist.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass dieses Verfahren auch im Kontakt mit transposontragenden BMO der autochthonen Bakterienflora geeignet sein kann um eine Transposition nachzuweisen.

4.11 Screening von Bodenproben in Bodensäulen mittels pRB2138 auf transponierbare Elemente

Mit dem gewählten Ansatz konnte kein Transpositionseignis nachgewiesen werden.

Der Ansatz der Säulen mit unsterilen Bodenproben erfolgte wie unter 2.23 beschrieben. Damit gelten auch alle oben (siehe 4.10) beschriebenen Einschränkungen bis auf die, dass kein steriler Boden verwendet wurde. Das heißt, dass durch das Autoklavieren keine Anreicherung mit Nährstoffen erfolgte und dass sich die eingebrachten MO dem Wettbewerb mit den vor-handenen BMO stellen mussten. Verschieden Studien haben gezeigt, dass sich die Anwesenheit der autochthonen Bakterienflora negativ auf die Konjugationsraten von Experimenten sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Systemen auswirkt [Top et al., 1990; O'Mochoe et al., 1988]. Im Boden unterliegen MO einer Vielfalt von Einflüssen wie Wettbewerb, Konkurrenz oder Fraßfeinden. Der Zellmetabolismus und das Überleben sind also stark schwankenden Einflüssen ausgesetzt, welche sich negativ auf

Konjugationsereignisse auswirken. So konnte in einigen Experimenten Plasmidtransfer im Boden erst nachgewiesen werden nachdem dieser durch Autoklavieren sterilisiert wurde [Hill u. Top, 1998; Top et al., 1990; Neilson et al., 1994].

Die eingesetzten Bakterienstämme waren jedoch bis zum Schluss des Experimentes in der Bodensäule in einer für Konjugationsexperimente unter diesen Bedingungen beschriebenen Konzentration persistent (siehe 3.21) [Hill u. Top, 1998]. Mit *P. putida* fiel die Wahl auf einen BMO welcher zuvor in Konjugationsexperimenten erfolgreich eingesetzt wurde (siehe 3.19). Mit *P. stutzeri* kam ein BMO zum Einsatz, welcher sich, wie oben bereits beschrieben, darüber hinaus durch eine extrem hohe natürliche Kompetenz auszeichnet [Lorenz und Wackernagel, 1991]. Des Weiteren gehört pRB2138 zur Inkompatibilitätsgruppe IncW, welche als promiskuitiv beschrieben ist, so dass dieses Plasmid in einem großen Teil der autochthonen Flora etabliert werden kann [Thomas, 1989]. Diese Parameter sollten ein erfolgreiches Experiment eigentlich ermöglicht haben.

Eine weitere Begründung dafür, dass kein Transpositionseignis nachgewiesen werden konnte, könnte in der räumlichen Verteilung der pRB2138 tragenden BMO gelegen haben. Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass schon ein getrenntes Applizieren von MO in solch eine Matrix aufgrund der extrem hohen Oberfläche dazu führen kann, dass die MO einfach aufgrund der räumlichen Distanz zueinander keine Konjugation durchführen können. Dies könnte auch hier der Fall gewesen sein, da selbst ein Eintrag von 10^{10} Zellen nur einen geringen Teil der vorhandenen Flora darstellt. Einige Autoren gehen hier auf den Eintrag der MO in die Bodenprobe ein. So beschreiben van Elsas et al. das Phänomen, dass kein Gentransfer zwischen zwei Stämmen beobachtet werden konnte, sofern diese getrennt in eine Bodenprobe eingebracht wurden und diese Probe dann anschließend gemischt wurde [Van Elsas et al., 1990]. Da der Auftrag der MO in den Experimenten jedoch unmittelbar nacheinander in Flüssigkeit erfolgte, kann ein Grund eher in der anschließenden räumlichen Verteilung zu suchen sein, denn in dem Applizieren der MO. Ein weiterer Grund kann in dem Fehlen eines Selektionsdruckes bei diesem Experiment liegen, da sich unter diesen Bedingungen das Plasmid ausdünnst bzw. sich in einer Stresssituation die Konjugationsfrequenz erhöht (siehe 1.9.1), was dem Experiment zuträglich gewesen wäre. Auch stellen Holt R.J. et al. [1999] bei ihren Untersuchungen zur Verteilung von *tnpR* bei Quecksilber-resistenten Stämmen fest, dass diese ebenfalls ohne Selektionsdruck nicht sonderlich aktiv sind. Das pBR322 und seine Derivate in *Pseudomonas* sp. etabliert werden können, ist bekannt [Fukumoto et al., 1997; Gantotti et al., 1979]. Jedoch sollte pBR322::Tn2411 als pBR322 Derivat in *P. putida* nicht zu etablieren sein, Yee u. Smith [1990] weisen explizit auf diesen Umstand hin. Es muß im Laufe dieses Teils des Experimentes mit einem anderen Stamm als *P. putida* gearbeitet wurden sein. Die Ergebnisse sollten hier aber dennoch dargestellt werden, da sich aus den Vorversuchen gezeigt hat, dass mit diesem Stamm die Vorversuche erfolgreich durchgeführt werden konnten. Der Stamm wurde nachträglich nicht bestimmt.

Fest steht aber, dass die das Plasmid beherbergenden MO und pRB2138 bis zum Ende des Experimentes in der Bodensäule persistiert haben (siehe 3.21).

Der wahrscheinlichste Grund dafür, dass keine Transpositionsergebnisse nachzuweisen waren, liegt sicherlich in der Kombination der nachzuweisenden Ereignisse. Soll mittels dieses Systems eine Transposition nachgewiesen werden, so muss vorher eine Konjugation und danach eine Integration in die *cI*-Region stattgefunden haben. Das heißt, drei Ereignisse einer bestimmten Frequenz müssen nacheinander stattgefunden haben. Eine grobe Abschätzung unter Einbeziehung aller Faktoren auf Basis bekannter Daten ergibt im optimalen Fall für die erste Näherung einen noch realistischen Erwartungswert von 25 für die Transposition eines transponierbaren Elementes vom Typ *Tn21* in den Säulen unter den gewählten Bedingungen:

Dröge M. et al. [1999] geben für Plasmidtransfer im Mikrokosmos $1 \cdot 10^{-3}$ bei *Pseudomonas* sp an. *Tn21* wird mit einer Transpositionsfrequenz von $10^{-2} - 10^{-3}$ angegeben [Sambrook et al., 1989] und eine Transposition in die *cI*-Region von pRB2138 mit einer Frequenz von 10^{-2} [Bishop u. Sherratt, 1984]. Hieraus ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit für eine Transposition nach einer Konjugation der MO in die *cI*-Region von:

Plasmidtransfer 10^{-3} x Transposition 10^{-2} x Transposition in *cI* Region $10^{-2} = 10^{-7}$.

Unter Erweiterung auf die eingesetzte Zahl der Zellen kommt man zu folgendem Verhältnis: Berücksichtigt man nun den Einsatz von 10^{10} Zellen (siehe 3.21) in mindestens 250 g Boden in der Säule mit je $10^{10} - 10^{11}$ MO g^{-1} [Torsvik et al., 1995] und einem Vorkommen von transponierbaren Element (*Tn21*) in einer Frequenz von $10^{-3} - 10^{-4}$ / MO [Dahlberg u. Hermansson, 1995], so entsteht folgendes Verhältnis von pRB2138 zu den im Boden vorhandenen Zellen mit transponierbarem Element.

MO mit pRB2138 10^{10} zu $250 \times$ MO/g Boden 10^{10} x Vorkommen *Tn21* $10^{-4} = 10^{10}$ zu $2,5 \times 10^8$.

Das heißt rechnerisch tragen ca. $2,5 \times 10^8$ von den $2,5 \times 10^{12}$ in der Bodensäule vorkommenden MO ein transponierbares Element. Weiter angenommen wird, dass sie mit einem pRB2138 tragendem MO in Kontakt kommen.

Multipliziert man anschließend die Wahrscheinlichkeiten so erhält man: $2,5 \times 10^8 \times 10^{-7} = 25$.

Diese Rechnung ist natürlich idealisiert, vereinfachend und geht von optimalen, aber durch Literatur gestützten, realistischen Werten aus. Rechnerisch hätte der Erwartungswert noch zwei Potenzen höher liegen können. Dies wäre dann hingegen keine realistische Abschätzung mehr gewesen, da sich die bei der Rechnung angenommenen Werte nicht exakt auf die eingesetzten Stämme, Plasmide Verteilungen in der Bodensäule usw. beziehen. Diese grobe Berechnung zeigt aber hingegen, dass der Nachweis eines Transpositionsergebnisses theoretisch möglich ist, selbst wenn man den Erwartungswert noch eine Potenz nach unten korrigieren würde.

Nichtsdestotrotz ist in der Kombination der hier eben diskutierten Faktoren mit Sicherheit der Grund zu sehen, dass das Experiment andere Ergebnisse brachte als die Vorversuche unter 3.20.1. Es ist jedoch ein in der Literatur beschriebenes Phänomen, dass sich sterile Bodensäulen anders verhalten als die, bei denen nicht sterilisierter Boden eingesetzt wird [Henschke u. Schmidt, 1989; Hill u. Top, 1998; Dröge et al., 1999].

Es wäre vorstellbar, dass das Experiment bei Zugabe von zusätzlichen Nährstoffen, durch Aufbau von Selektionsdruck durch Schwermetalle oder Antibiotika positiv verlaufen wäre. Auch wäre der Einsatz von einer noch größeren Anzahl „Fängerplasmiden“ wie pBR2138 vorstellbar, auch wenn der Einsatz von 10^{11} oder 10^{12} pRB2138 tragenden Stämmen die Aufarbeitung von einigen Litern an Nährlösung bedingen würde und zu einem lokalen Verschwinden der autochthonen Flora führen könnte.

Dass dieses Experiment prinzipiell so durchführbar ist zeigen die Vorversuche und die Ergebnisse anderer Autoren, welche alle an diesem Experiment beteiligten Schritte Konjugation, Transposition und den Einsatz von pRB2138 erfolgreich durchgeführt haben.

4.12 Sequenzierung einer Transposase vom Typ Tn21

Die für die Ergebnisse relevanten Sequenzanalysen der insgesamt 2257 bp langen Sequenz (Abbildung 24) erfolgten mit den Gendatenbankenprogramm Blast, FastA und (TIGR) wurden auch zur anfänglichen Homologiesuche benutzt. Die Ergebnisse der Analysen (Tabelle 23), welche mittels der verschiedenen Programme erhalten wurden, sind aufgrund der den Programmen zugrunde liegenden Algorithmen leicht unterschiedlich, wobei bei den Ergebnissen aber keine gravierenden Abweichungen gefunden wurden, so dass das weitere Arbeiten mit Blast erfolgte.

Es gibt keine Daten in der Datenbank, welche über die ganze Länge des Genabschnittes starke Homologie zeigen, in einem Teil der Sequenz findet man jedoch sehr gute Homologien über einen Bereich von 700 bis 750 bp von 80 bis über 90 % mit *tnpA* der Tn21 Familie. Wie man aus (Abbildung 25) erkennen kann, ist der zur Sequenz homologe Bereich bei allen gefundenen Transposasestrukturen der Tn21 Familie nahezu gleich. Dies stimmt auch mit den Literaturergebnissen zu den Transposasen der Tn21 Familie [Liebert et al., 1999] überein. Nach ca. 750 bp sind keine relevanten Homologien mehr zu finden.

Die Tatsache, dass ab 750 Basen der Sequenz keine wirklich relevanten Homologien zu den bei Tn21 *tnpA* zu erwartenden Nachbarstrukturen wie z.B. *tnpR* zu finden sind, ist dadurch zu erklären, dass der Klon in dem Transposasegen beginnt und in Richtung IR läuft. Der Klon liegt so, dass er in *tnpA* beginnt und in Richtung Inverted Repeat (IR) läuft, wenn man ihn mit einer Tn21 verwandten Sequenz vergleicht. In diesem Bereich sollte sich eigentlich ein IR befinden und in der Sequenz zu erkennen sein, dies ist aber nicht der Fall.

Der darauf folgende Sequenzteil ist zu keiner bekannten Sequenz homolog. Auch ist der Übergang von dem bekannten Teil der Sequenz zum unbekanntem Teil der Sequenz so, dass es kein ersichtliches Motiv am Ende der bekannten Sequenz gibt, welches eine wirkliche Erklärung liefern könnte wieso die Sequenz hier endet. Ein solches Motiv wäre ein IR. Eine Erklärung hierfür wäre, dass es sich um die Sequenz eines defekten Transposons ohne IR handelt (s.u.). Es ist bekannt, dass Transposons vom Typ Tn21 und Tn501 aufgrund der Anordnung ihrer Transposase und Resolvase, welche bei Tn3 durch die *res* site getrennt sind (siehe Abbildung 4), häufiger zu Rekombinationen mit den assoziierten Genen neigen, während dies bei Tn3 eher zu Rekombinationen mit dem Transposon selbst führt [Holt et al., 1999]. Daraus kann sich schließen lassen, dass Tn21 häufiger Rekombination mit unbekanntem Sequenzen unterliegt als z.B. Tn3, was hier der Fall sein könnte. Auch sind in dem unbekanntem Teil keine der erwarteten bekannten prokaryotischen Nukleotidsequenzen zu finden mit denen z.B. Tn21 häufig assoziiert gefundenen wird, wie z.B. die Quecksilberresistenz verleihenden *mer* Gene.

Im einzelnen zeigten die ersten Ergebnisse Homologien zu *tnpA* aus Tn2680, Tn5060, Tn5075, C6 Transposase Gen, TnSF1, *tnpA* vom Typ Tn21 und Tn21. Wie in Tabelle 22 beschrieben stehen fast alle homologen Sequenzen der *tnpA* von Tn21 sehr nahe, auch wenn die Homologie zur Sequenz von Tn21 erst auf Rang sechs genannt wird. Aber bei den vorher folgenden Sequenzen besteht jeweils ein unmittelbarer Zusammenhang zu Tn21 bzw. einmal, auf Position 4 ist die Sequenz nicht weiter benannt wurden.

Die gefundenen Homologien zu Tn2680 auf Platz 1 wird von Parkhill et al. [2001] als nicht näher charakterisiertes Pseudogen vom Typ Tn21 *tnpA* beschrieben welches bei der Sequenzierung des Genoms von *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 entdeckt wurde.

Tn5060 auf Platz zwei wird als verwandt zu TnY [Kholodii et al., 2003], einem Vorfahren von TnX (Tn21 Δ), welches wiederum als Vorfahre von Tn21 postuliert wird, beschrieben und wurde in 8000-10000 Jahre altem Permafrostboden aus *Pseudomonas* sp. isoliert. Die *tnpA* von Tn5075 auf Platz drei wird als Tn21 *tnpA* beschrieben [Essa et al., 2003] und stammt aus einem *Escherichia coli* Stamm aus der „Murray Collection“ [Hughes u. Datta, 1983]. Die *tnpA* von Platz vier wird nicht weiter beschrieben, aber als unbestimmtes „Transposasegenfragment“ beschrieben [AF380359]. Auf Platz fünf folgt wiederum nur ein Genbankeintrag [AF188331] welcher sich wiederum auf Typ Tn21 *tnpA* bezieht. Auf Platz sechs und sieben folgen *tnpA* als Gen und *tnpA* als Teil von Tn21 [Ward et al., 1987; Diver et al., 1983].

Homologien zu Tn501 folgen erst auf späteren Plätzen, so dass alle Homologien dieses Bereiches zu *tnpA* Typ Tn21 (oder als mit dieser eng verwandt beschrieben bzw. nicht genau identifiziert) aus verschiedenen MO sind. Diese gehören unterschiedlichen Familien an, die meisten den *Enterobacteriales* und *Pseudomonadales*. Es finden sich aber auch einzelne von z.B. *Burkholderiales* (*Delftia*), *Acidithiobacillales* (*Thiobacillus*) und *Oceanospirillales* (*Halomonas*).

P. fluorescens, der Stamm aus dem der genomische Klon gewonnen wurde, ist hingegen von Kholodii G. et al. [2002] bereits als Träger von *tnpA* beschrieben. Da es sich bei Hg17.6 um einen *P. fluorescens* Stamm handelt, soll auch diesem Hinweis nachgegangen werden. Auf Position 12 der Ranking Liste befindet sich ebenfalls *P. fluorescens*. Die Homologie besteht hier zu dem Stamm *P. fluorescens* KHP22 welcher das Plasmid pKLH22 trägt. In diesem Plasmid befindet sich ein Derivat von Tn5041 welches mit einem Tn21 homologen Element, dem das Integron fehlt (siehe 1.1.2) und als Tn5043 beschrieben ist, assoziiert ist [Yurieva O. et al., 1997]. Zu der Transposase dieses als *tnpA* Arm von Tn21 beschriebenem Elements besteht nun eine Homologie, welche von ihrer Länge und ihrem E-Wert jedoch so ist, dass sie im Ranking erst auf Platz 12 kommt. Daher ist die Wahrscheinlichkeit nicht sehr groß, dass es sich um dieses Element handelt. Da es sich jedoch auch um einen *P. fluorescens* handelt und dieses Element im Zusammenhang mit seiner Quecksilberresistenz, welche ja auch in dem hier untersuchten Wirtstamm vorhanden war, als ubiquitär verbreitet beschrieben wurde und der Transpositionsapparat als defekt beschrieben ist, könnte es sich, wenn auch eher unwahrscheinlich, um ein Derivat der Transposase von Tn5041 handeln.

Abschließen lässt sich nicht absolut sagen um was für ein Transposasegen es sich handelt. Mit Sicherheit lässt sich sagen, dass es ein Transposasegen oder Teil eines Genes der Tn21 Familie ist. Da der Stamm aus dem das Transposasegen isoliert wurde *P. fluorescens* ist und Tn5075 aus einem *Escherichia coli* isoliert wurde, könnte man mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen, dass es sich um *tnpA* vom Typ Tn5060 handeln könnte. Jedoch nur um ein Fragment, da die Sequenz des Transposasegens plötzlich endet, ohne dass sich aus der Sequenz hierfür ein ersichtlicher Grund ableiten ließe.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von mobilen genetischen Elementen: Transposons, speziell in unbelasteten Böden.

Hierzu wurden unterschiedliche Ansätze gewählt:

Es wurden verschiedenste unbelastete Böden mittels PCR auf das Vorhandensein von Markergenen, in diesem Fall Transposase vom Typ *Tn3*, *Tn21* und *Tn501*, hin untersucht.

Hierzu wurde ein System entwickelt, welches es ermöglichte die Gesamt-DNA aus verschiedensten Böden mit einem System einfach und reproduzierbar zu extrahieren und anschließend mittels PCR zu untersuchen. Die mittlere Nachweisgrenze dieses Systems lag bei 9×10^3 Templates g^{-1} Boden.

Ein paralleler Ansatz erfolgte, indem aus den gleichen, unbelasteten Böden MO mittels Selektivmedien isoliert wurden. Diese Isolate wurden anschließend auf genetische Marker hin untersucht.

Transposons, bzw. Transposasen konnten in den unbelasteten Böden in weitaus geringerer Zahl als aus belasteten Böden bekannt nachgewiesen werden. Jedoch verhielten sich die unterschiedlichen Elemente in der Verteilung wie aus belasteten Böden bekannt. Am häufigsten wurde *Tn21* dann *Tn501* nachgewiesen. *Tn3*, nach dem auch gescreent wurde, konnte nicht nachgewiesen werden.

Daraufhin wurde der Frage nachgegangen, ob sich diese transponierbaren Elemente mittels Bodensäulen unter Laborbedingungen nachweisen lassen.

Zwei Experimente wurden hierzu durchgeführt: Eins zum Nachweis der Konjugation mit anschließender Transposition in diesem System an sich und ein weiteres zum Nachweis der Übertragung von potentiell transponierbaren Elementen aus der autochthonen Flora unbelasteter Böden.

Mittels dieses Experimentes konnte kein transponierbares Element nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden zwei vorhandene Bakterienkollektive auf das Vorhandensein von Transposons mittels Gensondentechnik und PCR auf Transposasen hin gescreent.

Auch hier konnten wiederum Signale zu *Tn21*, *Tn501* und in diesem Falle auch *Tn3* erhalten werden.

Einige dieser Isolate wurden mittels Southern-Blot näher charakterisiert und aus einem Isolat ein genomischer Klon hergestellt der anschließend sequenziert wurde.

Bei den Sequenzvergleichen dieser so erhaltenen 2257 bp langen Sequenz wurde diese als Transposase der *Tn21*-Familie mit großer Homologie zur Transposase von *Tn5060* bestimmt.

Aussicht:

Mit dieser Arbeit konnte der wirklich vorhandene Pool nur ansatzweise umrissen werden, jedoch bestätigen die erhaltenen Ergebnisse durchaus, dass auch in unbelastetem Boden ein nachweisbares Reservoir an transponierbaren Elementen persistiert.

Eine wirkliche Einschätzung der Größe des vorhandenen Pools läßt sich jedoch noch nicht machen. Die hierfür benötigten Methoden sind noch nicht ausgereift genug und es erscheint zur Zeit nur unter größtem Aufwand durchführbar, die in einem Gramm Boden enthaltene DNA zu sequenzieren und einzelnen Organismen zuzuordnen.

Mit der hier entwickelten Methode zum Aufreinigen von Bodenproben steht ein Werkzeug zur Verfügung, welches es ermöglicht DNA verschiedenster Böden schnell und effektiv zu untersuchen. Sicher wäre es interessant zu erfahren wie die Verteilung von bestimmten genetischen Elementen im Boden ist. Hierzu wäre es interessant einige hundert Gramm der gleichen Bodenprobe aufzureinigen um Informationen über die Verteilung dieser Elemente auch in einer so kleinen Skalierung zu erfahren.

Auch wäre es sicher ebenfalls interessant zu beobachten, wie sich ein solcher unbelasteter Boden verhält, wenn die an transponierbare Elemente gekoppelten Resistenzgene sich ausgelöst durch Selektionsdruck im Boden zu verbreiten beginnen. Diese Experiment könnte gut in Mikrokosmen durchgeführt werden und dabei versucht werden diese mobilen genetischen Elemente zu isolieren. Hierzu wäre ein ähnlicher Ansatz wie der durchgeführte vorstellbar.

Ebenfalls interessant wäre eine weitere Charakterisierung des Isolates Hg17.6, bei dem sich Teile einer Transposase mit großer Homologie zu Tn5060 nachweisen ließen. Dies ist insofern von Interesse, da es sich bei Tn5060 um einem Vorfahren von TnX handelt, welches als Ursprung aller Transposons der Tn21 Familie postuliert wird. Somit könnte weitere Erkenntnis über die Evolution dieser Klasse II Transposons gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

Aardema BW, Lorenz MG, Krumbein WE (1983) Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Appl Environ Microbiol* 46 : 417–420

Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (eds), (1985). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Wiley & Sons Inc., New York. 1985: 692 S.

Ahn B.Y., Dornfeld K.J., Fagrelus T.J., u. Livingston D.M. (1988) Effect of limited homology on gene conversion in a *Saccharomyces cerevisiae* plasmid recombination system. *Mol Cell Biol* 8: 2442-2448.

Akiba, T., Koyama, K., and Ishiki, Y. (1960) On the mechanism of the development of multiple- drug-resistant clones of *Shigella*. *Japan. J. Microb.* 4: 219-227

Alberti, S., u. Fornando M. (1990). Higher transfection efficiency of genomic DNA purified with a guanidiniumthiocyanate based procedure. *Nucleic Acids Res.* 18 (2): 351-353

Altherr M.R., Kasweck K.L. (1982) In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 44 : 838–843

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Amann R.L., Ludwig W., Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59 : 143–169

Andersen, B.M., Skjærten, F., and Solberg, O. (1979) Electron microscopical study of *Neisseria meningitidis* releasing various amounts of free endotoxin. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B Sect. B*,87: 109-115.

Angle J.S., Levin M.A., Gagliardi J.V. und McIntosh M.S. (1995) Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2835 - 2839

Arber W., Iida S., Jutte H., Caspers P., Meyer J. u. Hanni C. (1980). Rearrangements of genetic material in *Escherichia coli* as observed on the bacteriophage P1 plasmid. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1197-1208.

Arber W. und Dussoix D. (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 5: 18-36.

Arthur A, Sherratt D. (1979) Dissection of the transposition process: a transposon encoded site specific recombination system. *Mol Gen Genet.* Oct 1;175(3):267-74

Ausubel, F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidmann J.G., Smith J. u. Struhl K. (1998): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, USA

Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance-inducing transformation of Pneumococcal types. *J Exp Med* 79 : 137–158

Barany F., Kahn M.E. und Smith H.O. (1983) Directional Transport and Integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* Transformation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 80:7274-7278

Barcus V.A. und Murray N.E. (1995) Barriers to recombination: restriction. In: *Population genetics of bacteria*. Baumberg, S., Young, J.P.W., Wellington, E.M.H., and Saunders, J.R. (eds). Cambridge: Cambridge University press, pp. 31-58.

Bale M.J., Fry J.C., Day M.J. (1987) Plasmid transfer between strains of *Pseudomonas aeruginosa* on membrane filters attached to river stones. *J Gen Microbiol* 133 : 3099–3107

- Bale M.J., Fry J.C., Day M.J.** (1988a) Transfer and occurrence of large mercury resistance plasmids in river epilithon. *Appl Environ Microbiol* 54 : 972–978
- Bale M.J., Day M.J., Fry J.C.** (1988b) Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Appl Environ Microbiol* 54: 2756–2758
- Barry T., u. Gannon F.** (1991). Direct genomic DNA amplification from autoclaved infectious microorganisms using PCR technology. *PCR Methods Appl.* 1: 75
- Barkay, T., Liebert C., und Gillman M.** (1989). Environmental significance of the potential for *mer* (Tn21) - mediated reduction of Hg21 to Hg0 in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1196–1202.
- Barkay, T., Liebert C., und Gillman M.** (1989a). Hybridization of DNA probes with whole-community genome for detection of genes that encode microbial responses to pollutants: *mer* genes and Hg21 resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1574–1577.
- Bennett, P.M. (2000)** Transposable elements. In *Encyclopaedia of Microbiology*, Second edition, Vol.4 Ed. J. Lederberg. Pp704-724. Publ. Academic Press, San Diego
- Bennett, P. M., Grinstedt J., Choi C. L., u. Richmond M. H.** (1978) Characterization of Tn501, a transposon determining resistance to mercuric ions. *Mol. Gen. Genet.* 159:101–106.
- Bennett, P. M. und Grinstedt, J.** (eds) (1988) Detection and use of transposons. (2nd edition), 205pp: Vol. 21 in *Methods in Microbiology*, published by Academic Press.
- Beneveniste R. u. Davies J.** (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in Actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 2276-2280
- Berg Ø., Børsheim K.Y., Bratbak G., Haldal M.** (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467–468
- Bergy's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1**, Eds: Krieg, N.R., Holt, J.G., 1th ed. (1984). Williams a. Wilkins, Baltimore
- BFR** (2001): Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E. coli*-Isolaten vom Tier, aus Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. In 1. Zwischenbericht zum Forschungsvorhaben vom 21. Juli 2001 Teil 1: Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
- Bishop R. u. Sherratt D.** (1984). Transposon Tn1 intramolecular transposition. *Mol Gen Genet.* 196:117-122
- Björklöf K., Suoniemi A., Haahtela K., Romantschuk M.** (1995) High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations. *Micro-biology* 141 : 2719–2727
- Bleakley B.H., Crawford D.L.** (1989) The effect of varying moisture and nutrient levels on the transfer of a conjugative plasmid between *Streptomyces* species in soil. *Can J Microbiol* 35: 544–549
- Blin N. u. Stafford D.W.** (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3 (9): 2303-2308
- Blum S.A.E., Lorenz M.G., Wackernagel W.** (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Syst Appl Microbiol* 20 : 513–521
- Bollet C., Gevaudan M.J., De Lamballerie X., Zandotti C. u. De Micco P.** (1991): A simple method for the isolation of chromosomal DNA from gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Res.* 19 (8): 1955
- Boom, R., Sol C., Beld M., Weel J., Goudsmit J. u. Wertheim – van Dillen P.** (1999): Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* 37 (3): 615-619
- Borst M., u. Miller D.M.** (1990): DNA isolation and southern analysis: a clinician's view. *Am. J. Med. Sci.* 299 (5): 356-360

- Bowtell D.D.** (1987). Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* 162: 463-465
- Bratbak G, Heldal M, Norland S, Thingstad TF** (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl Environ Microbiol* 56 : 1400-1405
- Brayton P.R., Tamplin M.L., Huq A., Colwell R.R.** (1987) Enumeration of *Vibrio cholerae* 01 in Bangladesh waters by fluorescent antibody direct viable count. *Appl Environ Microbiol* 53: 2862-2865
- Bräuning S.** (1998) Charakterisierung mobiler DNA in ausgewählten Bodenmikroorganismen-Gemeinschaften Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Kassel
- Brieske, N., Schenker, M., Schnibbe, T., Quentin-Millet, M.-J., and Achtman, M.** (1999) Human antibody responses to A and C capsular polysaccharides, IgA1 protease and transferrin-binding protein complex stimulated by infection with *Neisseria meningitidis* of subgroup IV-1 or ET-37 complex. *Vaccine* 17: 731-744
- Brisson-Noel, A., Arthur, M., und Courvalin, P.** (1988) Evidence for natural gene transfer from gram-positive Cocci to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 1739-1745
- Brokamp A. und Schmidt F.R.J.** (1991) Survival of *Alcaligenes xylosoxidans* degrading 2,2-dichloropropionate and horizontal transfer of its halidohydrolase gene in a soil microcosm. *Curr. Microbiol.* 22, 299-306.
- Brown N. L., Winnie J. N., Fritzinger D., u. Pridmore R. D.** (1985) The nucleotide sequence of the *tnpA* gene completes the sequence of the *Pseudomonas* transposon Tn501. *Nucleic Acids Res.* 13:5657-5669.
- Brown H.J., Stokes H.W., u. Hall R.M.** (1996) The Integrons In0, In2 and In5 are defective Transposon Derivates. *J. Bacteriol* 178: 4429-4437
- Brown N.L. und Evans L.R.** (1991) Transposition in prokaryotes: transposon Tn501. *Res. Microbiol.* 142: 689-700
- Calos M.P. u. Miller J.H.** (1980). Transposable elements. *Cell* 20: 579-595.
- Catlin, B.W.** (1960) Transformation of *Neisseria meningitidis* by deoxyribonucleates from cells and from culture slime. *J Bacteriol* 79: 579-590.
- Charter K.F., Henderson D.J., Bibb M.J. u. Hopwood D.A.** (1988) Genome flux in *Streptomyces coelicolor* and other Streptomycetes and ist possible relevance to the evolution of mobile antibiotic resistance determinants. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 43: 7-42
- Chao L. u. McBroom S.** (1985). Evolution of transposable elements: an *IS10* insertion increases fitness in *E. coli*. *Mol. Biol. Evol.* 2: 359-269.
- Campbell J.I.A., Albrechtsen M., Sørensen J.** (1995) Large *Pseudomonas* phages isolated from barley rhizosphere. *FEMS Micro-biol Ecol* 18 : 63-74
- Chamier B., Lorenz M.G., Wackernagel W.** (1993) Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl Environ Microbiol* 59 : 1662-1667
- Chomczynski P. u. Sacchi N.**(1987). Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Clark, J.M., u. Switzer R.L.** (1977) *Experimental Biochemistry.* 2 nd ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco
- Claverys J.P. u. Lacks S.A.** (1986) Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* 50: 133-165.
- Clewell, D.B. und Gawron-Burke, C.** (1986) Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Ann Rev Microbiol* 40: 635-659.

- Cohan, F. M.** (2004) Concepts of bacterial biodiversity for the age of genomics. In: *Microbial Genomes*, (C. M. Fraser, T. Read, and K. E. Nelson, editors), Humana Press, pp. 175-194.
- Cohan, F.M.** (1996) The role of genetic exchange in bacterial evolution. *Amer. Soc. for Microbiol. News* 62: 631-636.
- Cohen S.N.** (1976) Transposable genetic elements and plasmid evolution *Nature* 263: 731-738
- Colwell, R. R.** (2000) Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother.* 6:121-125
- Couturier M., Bex F., Bergquist P.L., Maas W.K.** (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 52: 375-395
- Courvalin P.** (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul; 38(7): 1447-1451
- De la Cruz F. und Davies J.** (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria *Trends in Mikrobiologie* Vol . 8 No. 3: 128-134
- De la Cruz, F., u. Grinsted, J.** (1982) Genetic and molecular characterisation of Tn21, a multiple resistance Transposon from R100.1. *J. Bacteriol.* 151: 222-228
- Dahlberg C. u. Hermansson C.** (1995). Abundance of Tn3, Tn21, and Tn501 Transposase (tnpA) Sequences in Bacterial Community DNA from Marine Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 3051-3056
- Dahlberg C, Bergström M, Andreason M, Christensen BB, Molin S, Hermansson M** (1998) Interspecies bacterial conjugation by plasmids from marine environments visualized by *gfp* expression. *Mol Biol Evol* 15: 385-390
- Dahlberg C, Bergström M, Hermansson M** (1998a) In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 64: 2670-2675
- DasGupta C. u. Radding C.M.** (1982) Lower fidelity of RecA protein catalysed homologous pairing with a superhelical substrate. *Nature* 295: 71-73.
- Davidson N., Deonier R.C., Hu S. u. Ohtsubo E.** (1975). Electron microscopic heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. X. Deoxyribonucleic acid sequence organization of F and of F-primes, and the sequences involved in Hfr formation. In: *Microbiology-1974*, 56-65, Schlessinger D. (ed.), Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- DeFlaun M.F., Paul J.H.** (1989) Detection of exogenous gene sequences in dissolved DNA from aquatic environments. *Microb Ecol* 18 : 21-28
- Devanas M.A., Stotzky G.** (1988) Survival of genetically engineered microbes in the environment: effect of host/vector relationship. In: Pierce G (ed) *Developments in industrial microbiology*. Elsevier, Amsterdam, pp 287-296
- DeVoe, I.W. und Gilchrist, J.E.** (1973) Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 138: 1156-1167
- Diver W.P., Grinsted J., Fritzing D.C., Brown N.L., Altenbuchner J., Rogowsky P., Schmitt R.** (1983) DNA sequences of and complementation by the tnpR genes of Tn21, Tn501 and Tn1721 *Mol. Gen. Genet.* 191(2):189-193(1983).
- Doerfler W., Schubert R.** (1997) Fremde DNA im Säugersystem. *Dt Ärztebl*; 94: A-3465-3470 [Heft 51-52]
- Dorward, D.W. und Garon, C.F.** (1989) DNA-binding proteins in cells and membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171: 4196-4201.
- Dorward, D.W., Garon, C.F., und Judd, R.C.** (1989a) Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171 : 2499-2505.

- Dröge M., Pühler A., und Selbitschka W.** (1999). Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biol Fertl Soils* 29: 221-245
- DuBose, R.F., Dykhuizen, D.E., und Hartl, D.L.** (1988) Genetic exchange among natural isolates of bacteria: Recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 85: 7036-7040.
- Dussoix D. und Arber W.** (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J Mol Biol* 5: 37-49.
- Ebeling. W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D., u. Lang H.** (1974). Proteinase K from *Tritirachium album Limber*. *Eur. J. Biochem.* 47: 91-97
- Van Elsas, J.D., Govaert J.M., Veen J.A. van** (1987) Transfer of plasmid pFT30 between bacilli in soil as influenced by bacterial population dynamics and soil conditions. *Soil Biol Biochem* 19: 639–647
- Van Elsas J.D., Trevors J.T. und Starodub, M.E.** (1988) Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 299-306.
- Van Elsas J.D., Nikkel M., Overbeek L.S. van** (1989) Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. *Curr Microbiol* 19: 375–381
- Van Elsas J.D., McSpadden - Gardener B.B., Wolters A.C., Smit E.** (1998) Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 64: 880–889
- Van Elsas J.D., Trevors J.T., Starodub M.E. und Van Overbeek, L.S.** (1990) Transfer of plasmid RP4 between pseudomonads after introduction into soil ; influence of spatial and temporal aspects of inoculation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 1-12
- Essa A.M., Julian D.J., Kidd S.P., Brown N.L., Hobman J.L.** (2003) Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in *enterobacteria* from the preantibiotic era. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(3):1115-1119
- Ewert D.L., Paynter M.J.B.** (1980) Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated sludge treatment process. *Appl Environ Microbiol* 39: 576–583
- Feng G., Hammmar S., u. Grumet R.** (1992): A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques* 13 (1): 52-56
- Fernandez-Herrero L.A., Olabarria G., Caston J.R., Lasa I. u. Berenguer J.** (1995) Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol* 177: 5460-5466
- Fibi M.R., Bröker M., Schulz R., Johannsen R., Zettlmeissl G.** (1991) Inactivation of recombinant plasmid DNA from a human erythropoietin - producing cell mouse line grown on a large scale. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 622–630
- Firth, N.** (1996) Structure and Function of the F-Factor and mechanisms of conjugation. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular Biology*, F. Neidhardt et al., eds.(Washington D.C.: American Society for Microbiology) pp 2377-2382
- Fjerdugstad E.** (1975) Bacteria and fungi. In: Whitton BA (ed) *River ecology*. University of California Press, Berkeley, pp 129–140
- Fleming A.** (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with a special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10: 226
- Fluit AC, Schmitz F.J.** (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* Apr;10(4):272-88.
- Fooken U.** (1999) Huminsäuren in Oberflächensedimenten der Nordsee – Indikatoren für terrestrischen Eintrag? Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

- Foster, T.J.** (1983) Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Bacterial Microbiol. Rev.* 47: 361-409
- Frischer M.E., Stewart G.J., Paul J.H.** (1994) Plasmid transfer to indigenous marine bacterial populations by natural transformation. *FEMS Microbiol Ecol* 15: 127–136
- Frosch M. und Meyer T.F.** (1992) Transformation-mediated exchange of virulence determinants by cocultivation of pathogenic *Neisseriae*. *FEMS Microbiol Lett* 100: 345-350.
- Frostegard A., Courtois S. Ramisse V. Clerc S., Bernillon D. Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., und Simonet P.** (1999) Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. *Appl Environ Microbiol* 1999:5409–5420
- Fujita M., Ike M.** (1994) Wastewater treatment using genetically engineered microorganisms. Technomic, Lancaster
- Fukumoto F., Sato M., Minobe Y** (1997) Transformation of pBR322-Derived Plasmids in Phytopathogenic *Pseudomonas avenae* and Enhanced Transformation in Its Proline-Auxotrophic Mutant *Curr Microbiol. Mar*;34(3):138-43
- Galas D. J., und Chandler M.** (1989). Bacterial insertion sequences, p. 109–162. *In* D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Galas D.J. und Chandler M.** (1982). Structure and stability of Tn9-mediated cointegrates. evidence for two pathways of transposition. *J. Mol. Biol.* 154: 245-272.
- Gallori E., Bazzicalupo M., Dal Canto L., Fani R., Nannipieri P., Vettori C., Stotzky G.** (1994) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol Ecol* 15 : 119–126
- Gantotti B.V., Patil S.S., Mandel M.** (1979) Genetic transformation of *Pseudomonas phaseolicola* by R-factor DNA. *Mol Gen Genet.* 1979 Jul 2;174(1):101-3
- García-Pedrajas M.D., Bainbridge B.W., Heale J.B., Perez-Artes E., Jimenez-Diaz R.M.** (1999) A simple PCR-based method for the detection of the chickpea-wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in artificial and natural soils. *Euro. Jour. Plant Patho.* 105: 251–259
- Gerlach, B. u. Wiedemann B.** (1985) Tn3 as the Molecular Basis of Ampicillin resistance in *E.coli* – An Epidemiological Survey. *Zbl. Bakt.Hyg. A* 260, 139-150
- Germida J.J., Casida L.E.** (1981) Isolation of *Arthrobacter* bacteriophage from soil. *Appl Environ Microbiol* 41 : 1389–1393
- Germida J.J., Casida L.E.** (1983) *Ensifer adhaerens* predatory activity against other bacteria in soil, as monitored by indirect phage analysis. *Appl Environ Microbiol* 45 : 1380–1388
- Goodman S.D. und Scocca J.J.** (1988) Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 85: 6982-6986.
- Goodwin, D.C., u. Lee S.B.** (1993) Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *BioTechniques* 15 (3): 438-444
- Götz A., Smalla K.** (1997) Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Appl Environ Microbiol* 63 : 1980–1986
- Goodman AE, Hild E, Marshall KC, Hermansson M** (1993) Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl Environ Microbiol* 59: 1035–1040
- Gormley, E.P., und Davies, J.** (1991) Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 173: 6705-6708
- Graham J.B., u. Istock C.A.** (1978) Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. *Mol Gen Genet* 166: 287-90

- Greaves M.P., Wilson M.J.** (1969) The adsorption of nucleic-acids by montmorillonite. *Soil Biol Biochem* 1 : 317–323
- Greaves M.P., Wilson M.J.** (1970) The degradation of nucleic-acids and montmorillonite-nucleic-acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biol Biochem* 2 : 257–268
- Grimme, S.** (1995) Untersuchungen zur Resistenz von Bodenbakterien gegenüber Streptomycin und Sulfonamiden. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie/Chemie der Universität-Gesamthochschule Kassel
- Grinsted, J., De La Cruz, F., und Schmitt, R** (1990) The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 24: 163-189
- Gronenborn, B., und Messing, J.** (1978) Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites. *Nature* 272: 375-377
- Gross-Bellard M., Oudet P., u. Chambom P.** (1973). Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 36: 32-38
- Günther E.** (1991) In: *Transponierbare Elemente und Transposition. Lehrbuch der Genetik*: 395-404, 6.Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Günther N.** (1996) Untersuchung zur genetischen Grundlage der gekoppelten Streptomycin- und Sulfonamid-Resistenzen in terrestrischen Mikroorganismen und ihre Verwandtschaft zu RSF1010 und Tn21. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Kassel
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, M., Kilger, K., Simanainen, J., Georgiev, O., Bauer, K., Hedges, R., and Schaffner, W.** (1994) Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man, *Science* 264, 1775-1778.
- Hall R.M., Brown H.J., Brookes D.E. u. Stokes H.W.** (1994) Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol* 176: 6286-6294
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Haas D., Holloway B.** (1976) R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 144: 243–251
- Hamaguchi, K., u. Geiduschek E.P.** (1962). The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix. *J. Am Chem. Soc.* 84 (8): 1329-1338
- Hansen, J.N.** (1974). Isolation of higher molecular weight DNA from *Bacillus cereus* T using Proteinase K. *Prep. Biochem.* 4 (6): 473-488
- Hara S., Terauchi K., Koike I.** (1991) Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl Environ Microbiol* 57 : 2731–2734
- Hayes W.** (1964) *The genetics of bacteria and their viruses.* Wiley, New York
- Hebeler, B.H. und Young, F.E.** (1975) Autolysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 122: 385-392.
- Heffron F., McCarthy J., Ohtsubo H., a. Ohtsubo E.** (1979) DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* 18:1153–1163.
- Henschke R.B., und Schmidt F.R.J.** (1989) Survival, distribution, and gene transfer in bacteria in a compact soil microcosm system. *Biol. Fertil. Soils* 8: 19-24
- Henschke R. B. E., Nucken E. und Schmidt F. R. J.** (1989) Fate and dispersal of recombinant bacteria in a soil microcosm containing the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biol. Fertil. Soils* 7:374–376.
- Henschke R.B., und Schmidt F.R.J.** (1990) Screening of soil bacteria for plasmids carrying antibiotic resistance. *Biol. Fertil. Soils* 9: 257-260

- Henschke R.B., Schmidt F.R.J.** (1990a) Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora in situ. *Curr Microbiol* 20 : 105–110
- Hill K., und Top E.,** (1998) Gene transfer in soil systems using microcosms *FEMS Microbiology Ecology* 25 319-329
- Hirsch P.** (1996) Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol* 133 : 159–171
- Hoffmann A., Thimm T., Dröge M., Moore E.R.B., Munch J.C., Tebbe C.C.** (1998) Intergeneric transfer of conjugative and mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola). *Appl Environ Microbiol* 64: 2652–2659
- Holt R.J., Bruce K.D., Strike P.** (1999) Phylogenetic analysis of *tnpR* genes in mercury resistant soil bacteria: the relationship between DNA sequencing and RFLP typing approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 30:25-37
- Holt R.J., Bruce K.D., Strike P.** (1999a) Conservation of transposon structures in soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 30:25-37
- Van den Hoop, M.A.G.T., van Leeuwen, H.P., Cleven, R.F.M.J.** (1990) Study of the polyelectrolyte properties of humic acids by conductimetric titration. *Anal. Chim. Acta* 232: 141-148.
- House Rpt.108-037** (2003) House of Representatives Report.108-037 03.17 2003 – Concurrent resolution on the budget—Fiscal Year 2004: Report of the Committee on the budget house of Representatives to accompany H. Con. Res. 95
- Howeler M, Ghiorse W.C., Walker L.P.** (2003) A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *J Microbiol Methods*. 2003 Jul;54(1):37-45.
- Hughes, V. M., und N. Datta.** (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. *Nature* 302:725–726.
- Hurley S.S., Splitter G.A. u. Welch R.A.** (1987): Rapid lysis technique for mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 25 (11): 2227-2229
- Ibelgaufth H.** (1993) *Gentechnologie von A bis Z*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- I.H.S.S.** 1998. Introduction to the International Humic Substances Society.
<http://www.gatech.edu/ihss/intro.html>
- Iriberry J., Unanue M., Barcina I., Egea L.** (1987) Seasonal variation in population density and heterotrophic activity of attached and freeliving bacteria in coastal waters. *Appl Environ Microbiol* 53 : 2308–2314
- Jenal U.,** 2002, Vorlesungsskript, <http://www.biozentrum.uniba.ch/Teaching/Lectures/lectures.html>
- Kado, C.L, und Liu, S.-T.** (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373
- Kauri T.** (1978) Aerobic bacteria in the horizons of a beech forest soil. In: Loutit MW, Miles JAR (eds) *Microbial ecology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 110–112
- Kellenberger, E.** (1994) Genetic ecology: a new interdisciplinary science, fundamental for evolution, biodiversity and biosafety evaluations. *Experientia* 50: 429-37
- Khanna M., Stotzky G.** (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbiol* 58 : 1930–1939
- Kholodii G., Mindlin S., Petrova M., Minakhina S.** (2003) Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 226 (2):251-5

- Kholodii G., Gorlenko Z., Mindlin S., Hobman J., Nikiforov V.** (2002) Tn5041-like transposons: molecular diversity, evolutionary relationships and distribution of distinct variants in environmental bacteria. *Microbiology* 148(11):3569-3582
- Kidambi S.P., Ripp S., u. Miller R.V.** (1994) Evidence for phagemediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Appl Environ Microbiol* 60: 496-500
- Kirby K.S.** (1957): A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acids and proteins. *Biochemistry* 66: 495-504
- Klingmüller W., Dally A., Fentner C., Steinlein M.** (1990) Plasmid transfer between soil bacteria. In: Day, M. and Fry, J. (eds.) *Bacterial Genetics and Natural Environments*. Marius Press, Lancashire, pp 133-151
- Kobayashi I. und Nakayama Y.** (1998) Restriction-modification gene complexes as selfish gene entities: Roles of a regulatory system in their establishment, maintenance, and apoptotic mutual exclusion. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 95: 6442-6447.
- Kokjohn T.A., Saylor G.S., Miller R.V.** (1991) Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. *J Gen Microbiol* 137: 661-666
- Kolter R., Siegle D.A., Tormo A.** (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47 : 855-874
- Kopecko D.J., u. Cohen S.N.** (1975) Site-specific *recA*-independent recombination between bacterial Plasmide: Involvement of palindromes at the recombinational loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1373-1377
- Koomey M., Gotschlich E.C., Robbins K., Bergstrom S., u. Swanson, J.** (1987) Effects of *recA* mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* 117: 391-398.
- Kosovich, P.V. u. Prozorov A.A.** (1990) Natural transformation in bacteria. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 3-6
- Kowalczykowiak S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., u. Rehrauer W.M.** (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58: 401-465.
- Kratz, J., Schmidt, F.R.J., und Wiedemann, B.** (1983a) Characterisation of Tn2411 and Tn2410, two transposons derived from R-plasmid R1767 and related to Tn2603 and Tn21. *J. Bacteriol.* 155: 1333-1342
- Kroer N., Barkay T., Sørensen S., Weber D.** (1998) Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiol Ecol* 25 : 375-384
- Lafuente R., Maymo-Gatell X., Mas-Castella J., Guerrero R.** (1996) Influence of environmental factors on plasmid transfer in soil microcosms. *Curr Microbiol* 32: 213-220
- Lanning S., Williams S.T.** (1982) Methods for direct isolation and enumeration of actinophages in soil. *J Gen Microbiol* 128: 2063-2071
- Lederberg J., Tatum E.L.** (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158 : 558
- Leff, L. G., J. R. Dana, J. V. McArthur, und L. J. Shimkets.** 1993. Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:417-421
- Lévesque C., Piché L., Larose C. u. Roy H.** (1995) PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combination of Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother* 39: 185-191
- Lewecke F.M.** (1993) Genetische Charakterisierung eines neuen IS-Elementes bei Enterobacter agglomerans 339. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften Universität Bayreuth
- Liebert C.A., Hall R.M., Summers A.O.** (1999) Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome *Microb Molec Biol Rev*, Sept. 1999, p. 507-522

- Lilley A.K., Bailey M.J.** (1997) The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Appl Environ Microbiol* 63 : 1577–1583
- Lilley A.K., Fry J.C., Day M.J., Bailey M.J.** (1994) In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology* 140 : 27–33
- Lipson S.M., Stotzky G.** (1984) Adsorption of viruses to particulates: possible effects on virus survival. In: Misra AH, Polasa H (eds) *Viral ecology*. South Asia, New Delhi, pp 165–178
- Lipson S.M., Stotzky G.** (1987) Interactions between viruses and clay minerals. In: Rao VC, Melnick JL (eds) *Human viruses in sediments, sludges and soils*. CRC, Boca Raton, Fla., pp 198–229
- Liskay R.M., Letsou A., u. Stachelek J.L.** (1987) Homology requirement for efficient gene conversion between duplicated chromosomal sequences in mammalian cells. *Genetics* 115: 161-167.
- Lorenz, M.G. u. Wackernagel W.** (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl Environ Microbiol* 53: 2948-52
- Lorenz, M.G. Aardema, B.W. und Wackernagel W.** (1988) Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J Gen Microbiol* 134: (Pt 1): 107-12
- Lorenz, M.G. u. Wackernagel W.** (1990) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch Microbiol* 154: 380-5
- Lorenz, M.G., Gerjets, D. u. Wackernagel W.** (1991) Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured bacteria. *Arch microbiol* 156: 319-26
- Lorenz M.G., Wackernagel W.** (1991b) High frequency of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extract supplemented with a carbon/energy and phosphorus source. *Appl Environ Microbiol* 57 : 1246–1251
- Lorenz M.G., Reipschlag K., u. Wackernagel W.** (1992) Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch Microbiol* 157: 355-60
- Lorenz M.G., Wackernagel W.** (1992) Stimulation of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in extracts of various soils by nitrogen or phosphorus limitation and influence of temperature and pH. *Microb Releases* 1 : 173–176
- Lorenz, M.G. und Wackernagel, W.** (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Micobiol Rev* 58: 563-602
- Lloyd-Jones G., Hunters D.W.F.** (2001) Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biol Biochem* 33:2053-2059
- Mach P.A., Grimes D.J.** (1982) R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* 44 : 1395–1403
- Mack A.** (1996). Kits and other new developments streamline DNA purification process. *The Scientist* April 26: 17-18
- Maeda M. u. Taga N.** (1973) Deoxyribonuclease activity in seawater and sediment. *Mar Biol* 20: 58–63
- Maeda M. u. Taga N.** (1974) Occurrence and distribution of deoxyri-bonucleic acid-hydrolyzing bacteria in sea water. *J Exp Mar Biol Ecol* 14 : 157–169
- Mahillon, J., u. Chandler M.** (1998). Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725-774
- Marcinek H., Wirth R., Muscholl-Silberhorn A., Gauer M.** (1998) *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 64: 626–632

- Margolin P** (1987) Generalized transduction. In: Ingraham JL, Low KB, Majasanik B, Schaechter M, Umbarga HE, Neidhardt FC (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1154–1168
- Marmur, J.** (1961) A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3:208-218
- Marsh P., Wellington E.M.H.** (1992) Interactions between acino-phage and their streptomycete hosts in soil and the fate of phage-borne genes. In: Gauthier MJ (ed) *Gene transfers and environment*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp135–142
- Masters, M.** (1996) Generalized transduction. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Washington D.C.: ASM Press, pp. 2421-2441.
- McClintock B.,** (1961) Further studies of the *Suppressor-mutator* system of control of gene action in maize. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 60: 469–476.
- McGregor A.** (2003) Transposon and Transposome Mutagenesis of Plasmids, Cosmids, and BACs. *Methods Mol Biol.* 2003;235:233-46.
- McKane, M. and Milkman, R.** (1995) Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*. *Genetics* 139: 35-43.
- Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B. u. Haynes C. A.** (1996) Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 181: 635-644
- Merk S.** (2000), Dissertation; Einfluss von Probenaufbereitung und Probenmatrix auf die PCR-Diagnostik von bakteriellen Zoonoseerregern am Beispiel der Modellpathogene *Burkholderia cepacia* und *Yersinia enterocolitica*
- Metting F.B. Jr** (1993) Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: Metting FB Jr (ed) *Soil microbial ecology*. Dekker, New York, pp 3–25
- Miller S.A., Dykes D.D. u. Polesky H.F.** (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3): 1215
- Miller R.V., Saylor G.S.** (1992) Bacteriophage/host interactions in aquatic systems. In: Wellington EMH, Elsas JD van (eds) *Genetic interactions among microorganisms in the natural environment*. Pergamon, Oxford, pp 176–193
- Mindlin S., Kholodii K., Gorlenko Z., Minakhina S., Minakhin L., Kalyaeva E., Kopteva A., Petrova M., Yurieva O., Nikiforov V.** (2001) Mercury resistance transposons of Gram-negative environmental bacteria and their classification *Res. Microbiol.* 152:811–822
- MECBAD** (2003) ‘Mobile Genetic Elements’ Contribution to Bacterial Adaptability and Diversity ‘ <http://mecbad.bba.de>
- Mézard C., Pompon D., u. Nicolas A.** (1992) Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity. *Cell* 70: 659-670.
- Morrison W.D., Miller R.V., Saylor G.S.** (1978) Frequency of F116- mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a fresh-water environment. *Appl Environ Microbiol* 36: 724–730
- Muela A., Pocino M., Arana I., Justo J.I., Iriberry J., Barcina I.** (1994) Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 60 : 4273–4278
- Mülhard C.** (1999): *Der Experimentator: Molekularbiologie* 1. Aufl., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Gustav Fischer Verlag.

- Mullis K.B.** (1990): Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum der Wissenschaft Juni 1990: 60-67
- Munch-Petersen, E., and Boundy, C.** (1962) Yearly incidence of penicillin resistant Staphylococci in man since 1942. Bull. W.H.O. 26: 241
- Naito T., Kusano K., u. Kobayashi I.** (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267: 897-899.
- Neilson J.W., Josephson K.L., Pepper I.L., Arnold R.B., Di Giovanni G.D. u. Sinclair N.A.** (1994) Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl Environ Microbiol* 60: 4053-4058
- Nielsen K.M., Bones A.M., Elsas J.D. van** (1997) Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* 63 : 3972–3977
- Nevers P. u. Saedler H.** (1978). Mapping and characterization of an *E.coli* mutant defective in *IS1*-mediated deletion formation. *Mol. Gen. Genet.* 160: 209-214.
- Normander B., Christensen B.B., Molin S., Kroer N.** (1998) Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environ Microbiol* 64 : 1902–1909
- Norrander, J., Kempe, T., and Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106
- Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss m, R. Datta, N., and Falkow, S.** (1976) Uniform nomenclature of bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40: 168-189
- Novick R.P.** (1980) Plasmids. *Scientific American* 243: 103 - 127
- Nwosu V.** (2001) Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms *Res. Microbiol.* 152 (2001) 421–430
- Ochiai, K., Yamanaka, K., Kimura, K., and Sawada, O.** (1959) Studies on the inheritance of drug-resistance between *Shigella* strains and between *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *Nippon Iji Shinpo* 1861: 34
- Ogram A., Sayler G.S., Barkay T.** (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7 : 57–66
- Ogram A.V., Mathot M.L., Harsh J.B., Boyle J., Pettigrew C.A. Jr** (1994) Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Appl Environ Microbiol* 60 : 393–396
- Ogunseitan O.A., Sayler G.S., Miller R.V.** (1992) Application of DNA probes to analysis of bacteriophage distribution patterns in the environment. *Appl Environ Microbiol* 58 : 2046–2052
- Ohtsubo H. u. Ohtsubo E.** (1978). Nucleotide sequence of an insertion element, *IS1*. *Proc. Acad. Sci. USA* 75: 615-619.
- Olson, B.H., Cayless S.M., Ford S. u. Lester J.N.** 1991. Toxic element contamination and the occurrence of mercury-resistant bacteria in Hg-contaminated soil, sediments, and sludges. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20:226–233.
- O'Morchoe S.B., Ogunseitan O., Sayler G.S., Miller R.V.** (1988) Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 54 : 1923–1929
- Pääbo, S.** (1985). „Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA." *Nature* 314(6012): 644-5.
- Paget E., Simonet P.** (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 15 : 109–118
- Paget E., Simonet L.J., Monrozier P.** (1992) Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNaseI and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol Lett* 97 : 31–40

- Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T.G., Sebaihia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connor P., Cronin A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413(6858):848-852)
- Paul J.H., Jeffrey W.H., DeFlaun M.F. (1987) Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 53 : 170–179
- Paul J.H., DeFlaun M.F., Jeffrey W.H. (1988) Mechanisms of DNA utilization by estuarine bacterial populations. *Appl Environ Microbiol* 54: 1682–1688
- Paul J.H., Jeffrey W.H., David A.W., DeFlaun M.F., Cazares L.H. (1989) Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of southwest Florida. *Appl Environ Microbiol* 55: 1823–1828
- Paul J.H., Jiang S.C., Rose J.B. (1991b) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl Environ Microbiol* 57 : 2197–2204
- Paul J.H., Rose J.B., Jiang S.C., Kellogg C.A., Dickson L. (1993) Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Appl Environ Microbiol* 59 : 718–724
- Phillips S.J., Dalgarn D.S., Young S.K. (1989) Recombinant DNA in wastewater: pBR322 degradation kinetics. *J Water Pollut Control Fed* 61 : 1588–1595
- Prentki P., Chandler M. u. Galas D. (1987). *Escherichia coli* integration host factor bends the DNA at the ends of *IS1* and in an insertion hotspot with multiple IHF binding sites. *EMBO J.* 6: 2479-2487.
- Primrose S.B., Seeley N.D., Logan K.B., Nicolson J.W. (1982) Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. *Appl Environ Microbiol* 43: 694–701
- Pearson J., Bruce K.D., Osborn A.M., Ritchie D.A., u. Strike P. (1996) Distribution of Class II Transposase and Resolvase Genes in Soil Bacteria and Their Association with *mer* Genes *Appl and Environ Microb*, Aug. 1996, p. 2961–2965
- Pepper, I.L., C. Rensing, and C.P. Gerba. (2004). Microbial properties and processes. In *Environmental Monitoring*. Eds. J. Artiola, I.L. Pepper, M. Brusseau. Academic Press, San Diego. 263-280.
- Porwollik S., Wong R.M., u. McClelland M. (2002) Evolutionary genomics of *Salmonella*: Gene acquisitions revealed by microarray analysis *Proc Natl Acad Sci* 25; 99 (13): 8956–8961
- Price, C. and Bickle, T.A. (1986) A possible role for DNA restriction in bacterial evolution. *Microbiological Sciences* 3: 296-299.
- Proctor L.M., Fuhrman J.A. (1990) Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343 : 60–62
- The Prokaryotes Vol. 3**, Eds.: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H., 2nd ed. (1992). Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg
- Pukall R., Tschäpe H., Smalla K. (1996) Monitoring the spread of broad host and narrow host range plasmids in soil micro-cosms. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 53–66
- Qbiogene (2000)** FastDNA SPIN Kit for Soil: <http://www.qbiogene.com/fastprep/protocols.shtml>
- Radman M. (1989) Mismatch repair and the fidelity of genetic recombination. *Genome* 31: 68-73.
- Rayssiguier C., Dohet C., u. Radman M. (1991) Interspecific recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* occurs by the RecABCD pathway. *Biochimie* 73: 371-374.

- Rayssiguier C., Thaler D.S. u. Radman M.** (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342: 396-401.
- Rashid, M.A.** 1985. Geochemistry of Marine Humic Compounds. Springer-Verlag, Berlin
- Reaney D.C., Marsh S.C.N.** (1973) The ecology of viruses attacking *Bacillus stearothermophilus* in soil. *Soil Biol Biochem* 5: 399–408
- Redaschi N. u. Bickle T.A.** (1996) DNA restriction and modification systems. In *Escherichia coli and Salmonella*. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Brooks Low, K., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: ASM press, pp. 773-781.
- Redfield R.J.** (1993) Genes for breakfast: the have-your-cake-and eat-it-too of bacterial transformation. *J Hered* 84: 400-4
- Resning C., Newby D.T., Pepper I.L.** (2002) The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil. Biol. Biochem.* 34:285-296
- Richaume A., Angle J.S., Sadowsky M.J.** (1989) Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl Environ Microbiol* 55 : 1730–1734
- Rinkel M., Hubert J.-C., Roux B., and Lett M.-C.** (1994). Transposon Tn5403, a mobilization-helper element: complete nucleotide sequence and distribution in aquatic strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:89–96.
- Ripp S., Miller R.V.** (1995) Effects of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Appl Environ Microbiol* 61: 1214–1219
- Roberts R.J.** (1989) Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res* 17 Suppl: 347-387.
- Romanowski, G. Lorenz, M.G. and Wackernagel W.** (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl Environ Microbiol* 57: 1057-61
- Romanowski G., Lorenz M.G., Saylor G., Wackernagel W.** (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl Environ Microbiol* 58 : 3012–3019
- Romanowski, G. Lorenz, M.G. and Wackernagel W.** (1993a) Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl Environ Microbiol* 59: 3438-46
- Romanowski, G. Lorenz, M.G. and Wackernagel W.** (1993b) Plasmid DNA in groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol Ecol* 2: 171-81
- Roux, B., P. Lebaron, J.-C. Hubert, and M.-C. Lett.** (1993). Occurrence of transposable elements in aquatic bacteria strains: involvement in the mobilization of pBR-type plasmids. *Microb. Releases* 1:223–228.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.** (1985): Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354
- Saye D.J., Miller R.V.** (1989) The aquatic environment: consideration of horizontal gene transmission in a diversified habitat. In: Levy SB, Miller RV (eds) Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York, pp 223–259

- Saye D.J., Ogunseitan O., Saylor G.S., Miller R.V.** (1987) Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 53: 987–995
- Saye D.J., Ogunseitan O.A., Saylor G.S., Miller R.V.** (1990) Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in situ in a freshwater habitat. *Appl Environ Microbiol* 56 : 140–145
- Schachtschabel P. and Scheffer F.** (1992) Lehrbuch der Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Schenker, M.** (1999) Mikroevolution in *Neisseria meningitidis* am Beispiel der 25 kb Region zwischen *tbpAB* und *opaA*. Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin
- Schrader H.S., Schrader J.O., Walker J.J., Wolf T.A., Nickerson K.W., Kokjohn T.A.** (1997) Bacteriophage infection and multiplication occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years. *Can J Microbiol* 43: 1157–1163
- Schütte G., Heidenreich B., Beusmann V.** (1998) In: Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA. Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. Publikationen des Umweltbundesamtes Berlin 47/98
- Shen P. u. Huang, H.V.** (1986) Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* 112: 441-457.
- Sherratt D.** (1989). *Tn3* and related transposable elements: site-specific recombination and transposition, p. 163–184. In D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Schmidt, F.R.J.** (1984) Untersuchungen zur Evolution von Klasse II -Transposons und ihre Bedeutung für die Ausbreitung von Gentamicin-Resistenzgenen in Prokaryonten. Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* für das Lehrgebiet "Molekularbiologie". Math.-Nat. Fak. der Universität Bonn
- Schmidt, F.R.J., Nücken, E.J., and Henschke, RB.** (1989a) Structure and function of hot spots providing signals for site-directed specific recombination and gene expression in *Tn21* transposons. *Mol. Microbiol.* 3: 1545-1555
- Schmidt, F.R.J, Rosien, J., and Brokamp, A.** (1989) The role of soil bacteria in risk assessment analysis. In: Day, M. and Fry, J. (eds.) *Bacterial Genetics and Natural Environments*. Marius Press, Lancashire, pp 207-215
- Schmidt, F.R.J., Henschke, R. and Brokamp, A.** (1990) Möglichkeiten und Risiken der landwirtschaftlichen Nutzung gentechnologisch veränderter Mikroorganismen: Molekulare Ökologie und genetische Kommunikation bei Bodenmikroorganismen. In: Bundesministerium für Forschung und Technologie (ed) *Biologische Sicherheit*, Band 2, pp 51-77
- Schmidt, F.R.J.** (1991) Die Bewertung von Daten zu den Risiken bei der Freisetzung von gentechnisch veränderten Bodenmikroorganismen. *BIOforum* 9/91: 312-319
- Schmitt, R.** (1986) Molecular biology of transposable elements. *Jur. of Antimic. Chemotherapy* 18: 25-34
- Scholz P., Haring V., Wittmann-Liebold B., Ashman K., Bagdasarian M., u. Scherzinger E.** (1989) Complete nucleotide sequence and gene organization of the broadhost-range plasmid RSF1010. *Gene* 75: 271-288
- Schumann W.** (1990) *Biologie bakterieller Plasmide*. Verlag Vieweg
- Seeley N.D., Primrose S.B.** (1980) The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J Gen Virol* 46 : 87–95
- Selenska S. , Klingmüller W.** (1991) DNA recovery and direct detection of *Tn5* sequences in soil. *Lett Appl Microbiol* 13:21-24

- Senghas E., Jones J.M., Yamamoto M., Gawron-Burke C., Clewell D.B.** (1988) Genetic organization of the bacterial conjugative transposon Tn916. *J. Bacteriol.* Jan;170(1):245-9.
- Simon, R. Priefer, U., and Pühler, A.** (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *BioTechnol.* November, 784-795
- Singleton P., Anson A.E.** (1983) Effect of pH on conjugal transfer at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 46 : 291–292 Skujins J (1984) Microbial ecology of desert soils. In: Marshall KC (ed) *Advances in microbial ecology*. Plenum, New York, pp 49–91
- Sikorski, J., Graupner S., Lorenz M. G., and Wackernagel W.** 1998. Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in non-sterile soil. *Microbiology* 144: 569–576.
- Smalla K., Overbeek L.S., Pukall van, R., u. Elsas J. S. van.** 1993. Prevalence of *ntp* II and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13:47–58.
- Smalla K., Krogerrecklenfort E., Heuer H., Dejonghe W., Top E., Osborn M., Niewint J., Tebbe C., Barr M., Bailey M., Greated A., Thomas C., Turner S., Young P., Nikolakopoulou D., Karagouni A., Wolters A., van Elsas J.D., Drönen K., Sandaa R., Borin S., Brabhu J., Grohmann E., und Sobczyk P.** (2000) PCR-based detection of mobile genetic elements in total community DNA. *Microbiology* 146, June 2000:1256
- Smit E., Elsas J.D. van, Veen J.A. van, deVos W.M.** (1991) Detection of plasmid transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous bacteria in soil by using bacteriophage fR2f for donor counterselection. *Appl Environ Microbiol* 57 : 3482–3488
- Smit E., Wolters A., Elsas J.D. van** (1998) Self-transmissible mercury resistance plasmids with genobilizing capacity in soil bacterial populations: influence of wheat roots and mercury addition. *Appl Environ Microbiol* 64 : 1210–1219
- Sparling P.F.**(1966) Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* 92:1364-1371
- Starlinger P. u. Saedler H.** (1976). IS-Elements in microorganisms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 75: 111-152.
- Stein D.C., Gunn J.S., Radlinska M., u. Piekarowicz, A.** (1995) Restriction and modification systems of *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* 157: 19-22.
- Steinberg C., Bittl T., Burnison B.K., Haitzer M., Höss S., Lorenz R., Meinelt T., Sachse A.** (1997). Einfluß von Huminstoffen auf limnische Systeme in verschiedenen Raum- und Zeitskalen. *Berl. Inst. Gewässerökol. Binnenfisch.* Berlin, 1997/4: 34-48.
- Steelink C.** 1985. Implications of elemental characteristics of humic substances. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., (eds). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Wiley & Sons Inc., New York: 457-476.
- Steward, G.J. and Carlson C.A.** (1986) The biology of natural transformation. *Annu Rev Microbiol* 40: 211-35
- Stewart G.J., Sinigalliano C.D.** (1990) Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Appl Environ Microbiol* 56: 1818–1824
- Stewart G.J., Sinigalliano C.D., Garko K.A.** (1991) Binding of exogenous DNA to marine sediments and the effect of DNA/sediment binding on natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell in sediment columns. *FEMS Microbiol Ecol* 85: 1–8
- Stevenson, F.J.** (1985). Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P., (eds). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Wiley & Sons Inc., New York: 13-52.
- Stockwell V.O., Kawalek M.D., Moore L.W., Loper J.E.** (1996) Transfer of pAgK84 from the biocontrol agent *Agrobacterium radiobacter* K84 to *A. tumefaciens* under field conditions. *Phytopathology* 86 : 31–37

- Stokes H.W. u. Hall R.M.** (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12):1699-1683
- Stotzky G** (1986) Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and vi-ruses. In: Huang PM, Schnitzer M (eds) Interaction of soil minerals with natural organics and microbes. Soil Science Society of America, Madison, Wis., pp 305–328
- Stotzky G** (1989) Gene transfer among bacteria in soil. In: Levy SB, Miller RV (eds) Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York, pp 165–222
- Stotzky G., Babich H.** (1986) Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments. *Adv Appl Microbiol* 31 : 93–138
- Stotzky G., Schiffenbauer M., Lipson S.M., Yu B.H.** (1981) Surface interactions between viruses and clay minerals and microbes: mechanisms and implications. In: Goddard M, Butler M (eds) Viruses and wastewater treatment. Pergamon, Oxford, pp 199–204
- Sugawara N., u. Haber J.E.** (1992) Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* 12: 563-575.
- Sullivan J.T., Eardly B.D., Berkum P. van, Ronson C.W.** (1996) Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2818–2825
- Syvanen M.** (1984). The evolutionary implications of mobile genetic elements. *Ann. Rev. Genet.* 18: 271-293.
- Tebbe C., Wenderoth D., Vahjen W., Lubke K., u. Munch J.C.** (1995) Direct Detection of Recombinant Gene Expression by Two Genetically Engineered Yeasts in Soil on the Transcriptional and Translational Levels. *Applied Environ Microbiol*, p. 4296–4303 Vol. 61, No. 12
- Thomas C.M.,** (1989) In: Promiscuous Plasmids of Gram-negative Bacteria (Thomas, C.M., Ed.). Academic Press, London.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., and Courvalin, P.** (1987) Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* 48: 289-294
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., and Courvalin, P.** (1988) Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 4388-4391
- Van Treeck, U.** (1981) Variabilität und Stabilität von Resistenzplasmiden . Dissertation. Hohe Math.-Nat. Fak. der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn
- Trevors J.T., Cook S.**(1992) Direct extraction of DNA from Soil. *Microbial Rel* 1:111-115
- Trevors J.T. und van Elsas J.D.** Herausgeber (1995) Nuclie Acids in the Enviroment Methods and Applications. Springer Verlag, Berlin
- Trevors J.T. und van Elsas J.D.** (1995) Introducion to Nuclie Acids in the Enviroment: Methods and Applications. In Nuclie Acids in the Enviroment Springer Verlag, 1995
- Thompson C.J. und Gray G.S.** (1983) Nucleotide sequence of a streptomycete aminoglycoside phosphor-transferase gene and its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5190-5194
- Top E, Mergeay M, Springael D, Verstraete W** (1990) Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Appl Environ Microbiol* 56 : 2471–2479
- Torsvik V.L. u. Goksoyr J.** (1978) Isolation of bacterial Dna from Soil. *Soil Biol Biochem* 10: 7-12
- Torsvik V., Daae F.L. u. Goksoyr J.** (1995) Extraction, Purification, and Analysis of DNA from Soil Bacteria. In Nuclie Acids in the Enviroment Springer Verlag, 1995

- Trevors J.T. und van Elsas J.D.** (Eds) (1995) *Nucleic Acids in the Environment*, Springer Lab Manual, Heidelberg, Germany
- Troxler J., Azelvandre P., Zala M., Defago G., Haas D.** (1997) Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol* 63 : 213–219
- Turk V., Rehnstam A.S., Lundberg E., Hagström A.** (1992) Release of bacterial DNA by marine nanoflagellates, an intermediate step in phosphorus regeneration. *Appl Environ Microbiol* 58: 3744–3750
- Wallace D.M.** (1987). Large- and small- scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* 152: 33-41
- Wang P.H. u. Chang C.W.** (2003) Detection of the low-germination-rate resting oospores of *Pythium myriotylum* from soil by PCR. *Letters in Applied Microbiology* Volume 36 Issue 3 Page 157 - March 2003
- Ward E., u. Grinsted J.** (1987) The nucleotide sequence of the *tnpA* gene of Tn21. *Nucleic Acids Res.* 15:1799–1806.
- Wassenaar, T.M., Fry B.N., Van der Zeijst, B.A.** (1995) Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Micobiology* 141: 95-101
- Wagner W.-H.** (1978) Die gegenwärtige Resistenzsituation. *Immunität und Infektion* 6: 180-193
- Watanabe T.** (1963) Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev* 27: 87-115
- Watt V.M., Ingles C.J., Urdea M.S. u. Rutter, W.J.** (1985) Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 82: 4768-4772.
- Weber J.** (1999). Soil humic substances. <http://www.messiah.org/p13470.htm>.
- Weisberg R.A.** (1987) Specialized transduction. In: Ingraham JL, Low KB, Majasanik B, Schaechter M, Umbarga HE, Neidhardt FC (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1169–1176
- Wiedemann B.** (1974) Die Ausbreitung der extrachromosomalen Antibiotikaresistenz im Krankenhaus. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 228: 11-15
- Wiggins B.A., Alexander M.** (1985) Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 49: 19–23
- Wilkins, B., u. Lanka E** (1993) DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria. In D. Clewell (ed.), *Bacterial Conjugation*, p. 105-136. Plenum Publishing, NY.
- Williams H.G., Day M.J., Fry J.C., Stewart G.J.** (1996) Natural transformation in river epilithon. *Appl Environ Microbiol* 62: 2994–2998
- Willetts N.** (1993) Bacterial conjugation: a historical perspective p. 1-17. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N.Y
- Wilson I.G.** (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751
- Wilson G.G. u. Murray N.E.** (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
- Winnacker, E.-L.** (1985) *Gene und Klone*. VCH-Verlag, Weinheim, FRG
- Wommack K.E., Hill R.T., Kessel M., Russek-Cohen E., Colwell R.R.** (1992) Distribution of viruses in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* 58: 2965–2970
- Wright P.A. u. Wynford-Thomas D.** (1990): The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J. Pathol.* 162: 99-117

Yee T.W., Smith DW. (1990) Pseudomonas chromosomal replication origins: a bacterial class distinct from Escherichia coli-type origins. Proc Natl Acad Sci Feb;87(4):1278-82

Yin X., Zeph L.R., Stotzky G. (1997) A simple method for enumerating bacteriophages in soil. Can J Microbiol 43 : 461–466

Yurieva O., Kholodii G., Minakhin L., Gorlenko Z., Kalyaeva E., Mindlin S., Nikiforov V. (1997) Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. Mol Microbiol. Apr;24(2):321-9.

Zeph L.R., Onaga M.A., Stotzky G. (1988) Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. Appl Environ Microbiol 54: 1731–1737

Zinder N.D., Lederberg J. (1952) Gene exchange in *Salmonella*. J Bacteriol 64 : 679–699

Zoll G., Grote G., Dierstein R., Köhne S. (2002) Rapid isolation of anthrax DNA from large-volume soil samples using QIAamp Kits. In: Qiagen News 1, 2002 ; http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/0102/1019238_QNews12002_22_23.pdf

Ich danke allen,
die mich während dieser Arbeit ermutigt und unterstützt haben,
ganz besonders Conny.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, den

Normann Günther