

Berichte aus der Biologie

Ralf Moser

Die initialen PAK-Dioxygenasen von Bakterien

D 83 (Diss. TU Berlin)

Shaker Verlag
Aachen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Moser, Ralf:

Die initialen PAK-Dioxygenasen von Bakterien/

Ralf Moser. Aachen: Shaker, 2001

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Berlin, Techn. Univ., Diss., 2001

ISBN3-8265-8961-0

Copyright Shaker Verlag 2001

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-8961-0

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Die initialen PAK-Dioxygenasen von Bakterien

Ralf Moser

Die Gene der Alpha-Untereinheiten initialer ringhydroxylierender Dioxygenasen wurden für die Entwicklung eines kultivierungsunabhängigen molekulargenetischen Nachweisverfahrens von polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)-metabolisierenden Bakterien in Umweltproben verwendet. Über multiple Sequenzvergleiche von Alpha-Untereinheiten initialer PAK-Dioxygenasen mit aromatischen Dioxygenasen wurden spezifische Primer und Oligonukleotid-Sonden entwickelt. Während mit diesen Sonden die hochkonservierten Alpha-Untereinheiten (*nahAc*-Allel) von den untersuchten PAK-abbauenden *Pseudomonas*-Stämmen (Umweltisolate) über PCR und Southern-Analyse detektiert wurden, konnten die Zielgene in PAK-metabolisierenden Stämmen (Umweltisolate) anderer Gattungen, wie z.B. *Comamonas* oder *Rhodococcus* nicht nachgewiesen werden.

Es gelang jedoch Teile des PAK-Genclusters von *Comamonas testosteroni* H und damit auch drei putative Untereinheiten (*pahA_b*, *pahA_c* und *pahA_d*) der initialen PAK-Dioxygenase auf einem 4,2 kb grossen DNA-Fragment zu isolieren. Die Expression der drei Untereinheiten in *E. coli* resultierte in der Umsetzung von Phenanthren oder Indol und damit im Nachweis der initialen PAK-Dioxygenase. Photometrisch wurde zudem gezeigt, dass *C. testosteroni* G und H eine Salicylat-induzierbare Gentisat 1,2-Dioxygenase (G12O) besitzen und PAK über Gentisat als zentralen Metaboliten abbauen. Die Abbaugene der drei untersuchten *Comamonas*-Stämme scheinen dabei, im Vergleich zu *Pseudomonas*-Stämmen, chromosomal kodiert vorzuliegen.

Basierend auf den neuen Sequenzinformationen wurden drei spezifische Primerpaare und Oligo-Sonden entwickelt und damit die Alpha-Untereinheiten der initialen PAK-Dioxygenasen von *Pseudomonas* (*nahAc*-), *Comamonas* (*pahAc*-COM)- und *Rhodococcus* (*pahAc*-RHO)-Stämmen differentiell detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden Gene jeweils in den genannten Gattungen hochkonserviert sind.

Die *nahAc*-Gene wurden kultivierungsunabhängig in Silica-gereinigter Belebtschlamm-DNA der Kläranlage Gießen nachgewiesen. Zusätzlich wurden die *nahAc*- bzw. *pahAc*-COM-Gene in speziell gereinigter BS-DNA der Kläranlage Ruhleben (Berlin) detektiert. Im Gegensatz zu den *nahAc*-Gene, waren die *pahAc*-COM-Gene sowohl in Naphthalin- als auch Phenanthren-induziertem Belebtschlamm nachweisbar. Damit konnte kultivierungsunabhängig gezeigt werden, dass neben dem *nahAc*-Genotyp von *Pseudomonas* auch die *pahAc*-COM-Gene eine wichtige Rolle im Abbau von PAK besitzen.