





U
N
D
A
U
S
S
E
R
E
M

5 GENETIK & ÖKOLOGIE

2 ANALYTIK

4 BUCHENWÄLDER

3 BERGBAUFOLGE

6 KIESABBAU

7

GEWÄSSERSCHUTZ

3 ÖKOTOXIKOLOGIE

4 SCHWERMETALLE

5 UFERFILTRATE

4 GEOLOGIE

1 UFZ-ÜBERBLICK



5 KATALYSATOREN

6 MIKROORGANISMEN

5 LANDNUTZUNGSÄNDERUNG

6 SUPER-BAKS

MIKROBIOLOGEN BRINGEN BAKTERIEN ZUM LEUCHTEN

Bärbel Kiesel und Sabine Kleinstaub



Bild 1: Qualle *Aequorea victoria*

Bild 2: Struktur des Grün Fluoreszierenden Proteins nach Faltung. In der Mitte befindet sich der Lichtimpulse erzeugende Chromophor. (Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, New York).

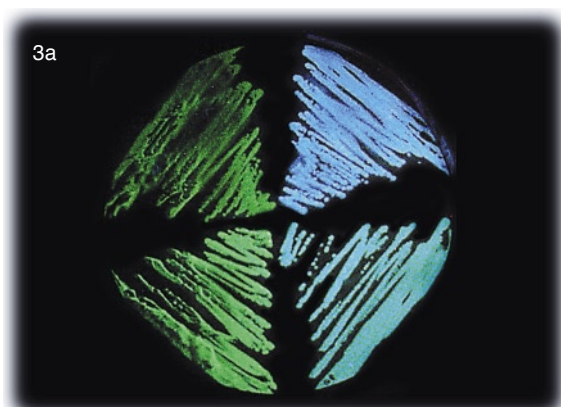
Aequorea victoria ist eine Tiefseequalle, die in der Nähe der kleinen Insel Victoria, British Columbia, in Canada gefangen wurde. Wie viele Tiefseelebewesen war auch diese Qualle zunächst durch ihre Leuchtorgane aufgefallen, die eine Biolumineszenz – wie von den Glühwürmchen bekannt – aussenden. Bei Versuchen zur Isolierung dieses selbst leuchtenden, blau lumineszierenden Proteins (Aequorin genannt) entdeckten amerikanische Wissenschaftler (Shimomura und Mitarbeiter) 1962 ein weiteres, nach UV-Anregung grün fluoreszierendes Protein (GFP oder Grün Fluoreszierendes Protein).

Sie fanden zunächst heraus, dass das von dem blau lumineszierenden Protein ausgestrahlte Licht das grün fluoreszierende Protein zum Leuchten anregt.

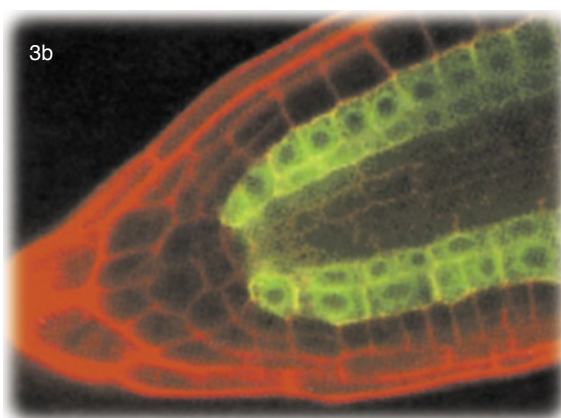
Als ideales Werkzeug für die Molekularbiologie entwickelte sich diese Entdeckung jedoch erst viele Jahre später, als es wiederum Amerikanern (Chalfie und Mitarbeitern) 1994 gelang, den genetischen Hintergrund des GFP herauszufinden und das Gen erstmals außerhalb der Qualle zur Expression zu bringen. Inzwischen ist es möglich, das GFP-Gen auch in Zellen von Bakterien, Pflanzen und Tieren zu übertragen.

Erstmals können damit lebende Zellen markiert und dann sowohl als einzelne Zellen als auch als Zellhaufen im lebenden Zustand wiedergefunden bzw. unterschieden werden. Auch Produkte einer Zelle lassen sich mit dem GFP markieren und auf diese Weise schnell und effizient isolieren und reinigen. Aus diesen Gründen hat sich das GFP innerhalb der letzten 5 Jahre zu dem am häufigsten genutzten Protein in der Biochemie und Molekularbiologie entwickelt.

Auch in der Sektion Umweltmikrobiologie des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle ist die Lebendmarkierung mit dem Grün Fluoreszierenden Protein etabliert. Dieses Protein wird unter anderem dazu genutzt, zu klären, wie häufig die Weitergabe von genetischer Information zum Abbau von Schadstoffen innerhalb von Bakterienpopulationen erfolgt und ob die mit dieser zusätzlichen Information ausgestatteten Bakterien in der Lage sind, Schadstoffe



3a



3b



3c



zu mineralisieren und damit unschädlich zu machen. Das Grün Fluoreszierende Protein soll diese Vorgänge sichtbar machen.

Die negativen Hinterlassenschaften von Industrie und Landwirtschaft stehen seit vielen Jahren und in vielen Regionen der Erde im Zentrum von Diskussionen der verschiedensten Interessengruppen. Mehr und mehr sind kostengünstige Sanierungsmethoden gefragt, die auf die Selbstheilungskräfte der Natur bauen, sogenannte Ökotechnologien. Diese Verfahren setzen in hohem Maße auf die Leistung von Mikroorganismen zum Abbau der Schadstoffe bzw. deren Fixierung. Da Mikroorganismen fast überall vorkommen, auch in stark kontaminierten Ökosystemen, kommt es darauf an sie zu aktivieren, ihre Leistungen optimal auszuschöpfen beziehungsweise zu erweitern. Gentechnische Methoden spielen bei der Aufklärung dieser Leistungen und für Modelluntersuchungen im Labor eine entscheidende Rolle.

Konkreter Schadensfall – herbizidbelasteter Bauschutt

1992 erfolgte der Abriss des Synthesewerkes Schwarzheide (Brandenburg), eines Betriebes, in dem jahrzehntelang Unkrautvernichtungsmittel (Herbizide) hergestellt wurden. Die giftigen Überreste chlororganischer Verbindungen, unter anderem 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), sind nun in ca. 24.000 Kubikmetern Bauschutt zu finden, mit Konzentrationen von bis zu 1,5 Gramm pro Kubikmeter.

Als Alternative zur Deponierung als Sondermüll stellt die Sanierung dieser Altlast mit Hilfe von Mikroorganismen eine besondere Herausforderung dar, da die wässrigen Eluate aus dem kontaminierten Bauschutt stark basisch sind und die Mikroorganismen an das Leben unter diesen

Bild 3: Das Grün Fluoreszierende Protein wird zur Lebendmarkierung von Bakterien, Pflanzen und Tieren eingesetzt.

- a) Escherichia coli-Zellen, die vier verschiedene GFP-Varianten exprimieren (Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, New York).*
- b) Grüne Fluoreszenz in der Wurzelspitze einer transgenen Arabidopsis-Pflanze (Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons, New York).*
- c) Grüne Fluoreszenz in der Fruchtfliege Drosophila (Mit freundlicher Genehmigung von Steve A. Kay, La Jolla und Academic Press, San Diego).*

Bild 4: Bauschutthalde nach Abriss von Produktionshallen des ehemaligen Synthesewerkes Schwarzheide (Foto: Norma Neuheiser).

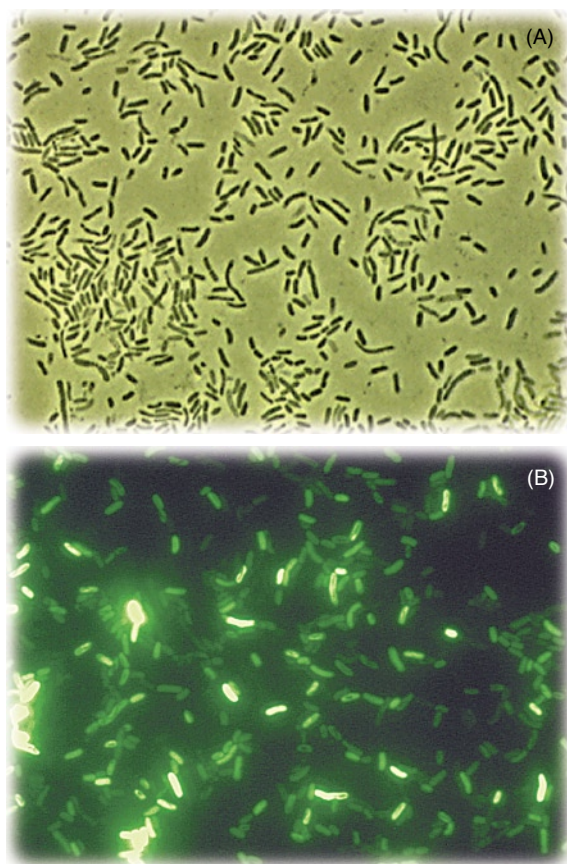
Bedingungen besonders angepasst sein müssen. Bakterien, die bei hohen pH-Werten existieren können und diese Bedingungen sogar bevorzugen, bezeichnet man als alkaliphil. Während alkaliphile Bakterien zur Produktion bestimmter Enzyme, z. B. für die Textil- und Waschmittelin-
dustrie, schon biotechnologisch genutzt werden (Grant et al. 1990), ist noch sehr wenig bekannt über ihre Rolle bei der Entgiftung von anthropogenen Schadstoffen, besonders in alkalischen Standorten. Insbesondere die Fähigkeiten alkaliphiler Bakterien zum Abbau von Chlororganika, wie dem Herbizid aus Schwarzweide, sowie ihre »Lernfähigkeit« beim Umgang mit diesen Schadstoffen sind von großem wissenschaftlichen und irgendwann auch wirtschaftlichen Interesse.

Die Markierung von genetischer Information und deren Einschleusung in andere Bakterien

Um herauszufinden, welche Bakterien in der Lage sind, zusätzliche genetische Information in Form von Plasmiden aufzunehmen und zu realisieren, muss diese auszutauschende Information durch Markierung wiederfindbar gemacht werden. Es gibt zwei etablierte Methoden. Eine ist die Markierung mit Antibiotika-Resistenzgenen, das heißt, ein auf dem Plasmid bereits vorhandenes oder eingepflanztes Gen für die Inaktivierung eines bestimmten Antibiotikums wird zum Nachweis der Weitergabe an einen anderen Bakterienstamm eingesetzt. Nur die Bakterien, die die so markierten Plasmide erhalten haben, können dann in Gegenwart des Antibiotikums überleben. Für den vorliegenden konkreten Schadensfall ist diese Methode jedoch nicht geeignet, da die Mehrzahl der Antibiotika im alkalischen Milieu instabil ist und damit für das Wiederfinden nicht mehr zur Verfügung steht. Eine weitere etablierte Technik zum Wiederfinden von genetischer Information ist die DNA-Sondentechnik. Dabei wird isolierte Plasmid-DNA markiert und mit freigesetzter Gesamt-DNA aus solchen Bakterienstämmen gepaart, in die man glaubt, das Plasmid zuvor übertragen zu haben. Ist die Übertragung geglückt, bindet das markierte Plasmid fest an sein unmarkiertes Gegenstück und gibt ein Signal. Andernfalls wird das markierte Plasmid durch Waschen entfernt. Diese Technik ist sehr spezifisch, aber auch aufwendig und erfordert zudem die Freisetzung der genetischen Information aus dem Untersuchungsobjekt, also dessen Abtötung.
Die Molekularbiologen der Sektion Umweltmikrobiologie

setzen auf die Lebendmarkierung der Bakterien durch Einpflanzen des GFP-Gens in sogenannte degradative Plasmide. Dadurch eröffnen sich ganz neue Möglichkeiten zum Beobachten der Weitergabe dieser Plasmide in Biozöosen und Zellgemischen. Der verwendete Marker, das Grün Fluoreszierende Protein (GFP), zeichnet sich durch eine ganze Reihe von Vorteilen gegenüber den anderen beiden Techniken aus. Bekannt ist beispielsweise, dass die genetische Information für das GFP und weitere Farbvarianten in alle Organismen übertragen werden kann und das Protein in diesen Organismen produziert wird. Bekannt ist auch, dass die grüne Fluoreszenz im Gegensatz zu anderen Markern die Zelle in Wachstum und Vermehrung nicht beeinträchtigt. Auch wird zum Leuchten keine Energie aus dem Zellstoffwechsel verbraucht, sondern das speziell gefaltete Protein wechselt durch den UV-Licht-Einfluss zwischen reduziertem und oxydiertem Zustand und sendet dabei Lichtimpulse aus. Somit ist einzige Bedingung für das Funktionieren des Systems, dass in begrenztem Umfang Sauerstoff für die Zelle zur Verfügung steht, also aerobe Verhältnisse vorliegen. Die Zellen sind nach einer kurzzeitigen UV-Be-

Bild 5: GFP-markierte alkaliphile Bakterien im Phasenkontrast-Mikroskop (A) und im Fluoreszenzmikroskop (B).



strahlung weiter lebensfähig und können anhand ihres grünen Leuchtens sowohl als Einzelzelle als auch als Einzelkolonie von anderen Zellen/Kolonien unterschieden werden.

Doch wie gelangt die genetische Information für die GFP-Synthese in die Bakterienzelle?

Verantwortlich dafür sind spezielle Transportplasmide – sogenannte Vektoren – die das GFP-Gen tragen und die in den Zielorganismus eingeschleust werden können. Diese Vektoren arbeiten nach zwei unterschiedlichen Methoden. Klonierungs- und Expressionsvektoren bleiben auch nach Erfüllung ihrer Transportaufgabe im Zielorganismus erhalten. Suizidvektoren dagegen lassen sich zwar in viele Wirte einschleusen, können sich dort jedoch nicht etablieren. Sie tragen sogenannte »springende Gene« (Transposonen), die die Eigenschaft besitzen, ins Chromosom oder Plasmid des Zielorganismus zu springen. Dabei nehmen sie in diesem Falle das GFP-Gen mit, der Rest des Suizidvektors geht verloren.

Für die spezielle Aufgabe der Isolation von alkaliphilen Bakterien, die lernen können, das Herbizid 2,4-D abzubauen, wurde ein von Suarez und anderen (1997) konstruierter Suizid-Vektor mit der Bezeichnung pAG408 ausgewählt. Mit Hilfe dieses Vektors wurde ein Plasmid, das die genetische Information für den Herbizid-Abbau trägt, mit dem GFP-Gen markiert und in alkaliphile Bakterien, die das Herbizid bisher nicht abbauen konnten, übertragen.

Dreh- und Angelpunkt der Lernfähigkeit von Bakterien – die Plasmide

Plasmide sind DNA-Moleküle, die neben dem Chromosom in den meisten Bakterien sowie einigen Hefearten vorkommen und zusätzliche genetische Information wie Resistenzfaktoren tragen können. Sie unterliegen häufig Gentransferprozessen und wandern dabei von einer Zelle in eine andere. Die so transportierte Information kann, muss aber nicht im neuen Wirt exprimiert werden. Neben Resistenzfaktoren können Plasmide auch Informationen für den Abbau verschiedener Substanzen, auch von Schadstoffen tragen. Durch die Eigenschaft, zwischen unterschiedlichen Bakterienarten übertragen werden zu können, werden solche degradativen Plasmide zu einer Quelle zusätzlicher genetischer Information bei der Anpassung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften an veränderte Umweltbedingungen. Bakterien können so »lernen« mit Schadstoffen

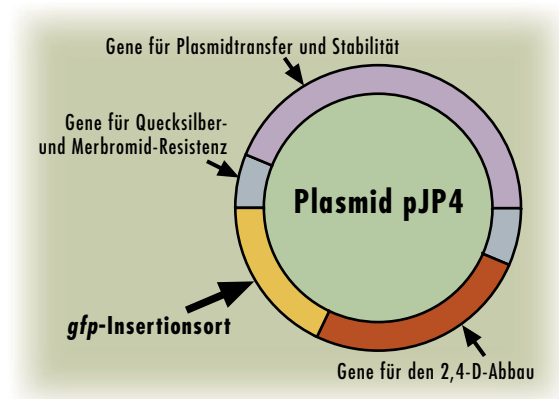


Bild 6: Karte des degradativen Plasmids pJP4. Die Lage der Gene, die den 2,4-D-Abbau codieren, sowie der Integrationsort des gfp-Gens sind gekennzeichnet.

umzugehen und sie abzubauen. Die Markierung solcher Plasmide mit dem GFP ermöglicht es nun, die Weitergabe und Verbreitung von genetischer Information zum Schadstoffabbau in mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Labor direkt und an lebenden Einzelzellen oder Einzelkolonien zu verfolgen. Ein Modell für das Studium des mikrobiellen Schadstoffabbaus ist das Plasmid pJP4, das die genetische Information für den Abbau des Herbizids 2,4-D trägt (Don u. Pemberton 1981).

Die Lernfähigkeit der alkaliphilen Bakterien

Ziel des Projektes ist es zu klären, ob das GFP-markierte degradative Plasmid pJP4 in Bakterien aus unbelasteten alkalischen Standorten übertragen und dort stabil weitervererbt werden kann und ob dann die genetische Information zum Abbau des 2,4-D unter alkalischen Bedingungen realisiert wird. Doch wo findet man alkaliphile Bakterien, die sich als Modellorganismen für diese Untersuchungen eignen?

Die stabilsten alkalischen Umgebungen, die in der Natur vorkommen, sind die Sodaseen – Binnengewässer, die auf Grund von geologischen und klimatischen Besonderheiten einen sehr hohen Gehalt an Natriumcarbonaten aufweisen und teilweise auch für die Sodagewinnung wirtschaftlich genutzt werden. Die bekanntesten Sodaseen mit pH-Werten bis zu 11,5 sind im Ostafrikanischen Grabenbruch gelegen (Grant et al. 1990), z. B. der Lake Natron in Tansania. Auf Grund der hohen Sonneneinstrahlung und des Nährstoffreichtums zeichnen sich diese Lebensräume durch eine sehr hohe Biomasseproduktion aus. Als Primärproduzenten



Bild 7: (A) Sodaboden im Gebiet des Szegedi Fehértó, Ungarische Tiefebene, (B) Sodasee bei Gatér, Ungarische Tiefebene

ten fungieren Cyanobakterien und anoxygen-phototrophe Purpurbakterien, die jahreszeitlich bedingte Blüten entwickeln und die Grundlage der Nahrungskette bilden. Die Zwergflamingo-Population im Ostafrikanischen Grabenbruch ist direkt von der Biomasse-Produktion dieser photosynthetisch aktiven Bakterien abhängig. So wurden am Nakuru-See in Kenia bis zu einer Million Zwergflamingos gezählt, die pro Tag etwa 180 Tonnen Biomasse konsumieren. Diese besteht zum größten Teil aus Cyanobakterien der Gattung *Spirulina* (Brown 1959).

Auch in Europa, in der Ungarischen Tiefebene, findet man einige kleinere Sodaseen mit nicht ganz so extrem hohen pH-Werten wie die der afrikanischen Sodaseen.

Dort wurden Wasser- und Sedimentproben aus 6 verschiedenen Gewässern mit pH-Werten von 9 bis 10 sowie eine Bodenprobe aus der Umgebung der Sodaseen entnommen. Bakterielle Mischkulturen, die aus diesen Proben unter alkalischen Bedingungen im Labor angereichert wurden, bildeten die Grundlage für die Experimente zur Übertragung des GFP-markierten degradativen Plasmides pJP4. Die Ergebnisse sprechen für die Bestätigung der Annahme, dass das Plasmid pJP4 auch in solche Bakterien aus extre-

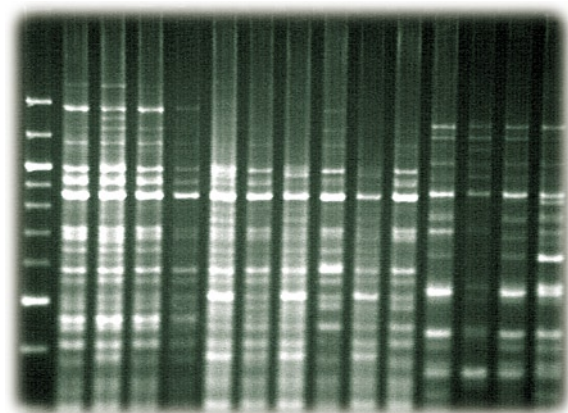


Bild 8: Bakterienstämme, die das GFP-markierte Plasmid tragen (im UV-Licht grün leuchtend) und unmarkierte Kontrollstämme (nicht leuchtend)

Bild 9: Zur Differenzierung von Bakterienstämmen werden DNA-Finger-Print-Methoden eingesetzt. Dazu werden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmte Abschnitte des Bakteriengenoms vervielfältigt. Die entstandenen PCR-Produkte können elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. So entsteht für jeden Bakterienstamm ein spezifisches Bandenmuster, ein genetischer »Fingerabdruck«, anhand dessen man entscheiden kann, ob es sich bei einer Anzahl von Umweltsisolaten um unterschiedliche Stämme handelt oder ob ein Stamm aus einer Probe mehrfach isoliert wurde.

men Standorten übertragen werden kann.

Aus allen Proben konnte eine Vielzahl von Bakterienstämmen isoliert werden, die das markierte Plasmid erhalten haben.

Die grüne Fluoreszenz als Indikator für das Vorhandensein des Plasmides zeigte, dass das Plasmid pJP4 in der Mehrzahl der Stämme stabil ist. Gegenwärtig wird untersucht, in welchem Umfang die Isolate in der Lage sind, die neu erworbene genetische Information auch auszuprägen, also ob sie den Schadstoff 2,4-D auch abbauen.

Außerdem werden die Isolate mit Hilfe der DNA-Sequenzierung identifiziert. Zu erwarten ist ein Einblick in das taxonomische Spektrum alkaliphiler Bakterien, die potenziell zum Abbau von Schadstoffen, wie Chlororganika in alkali-

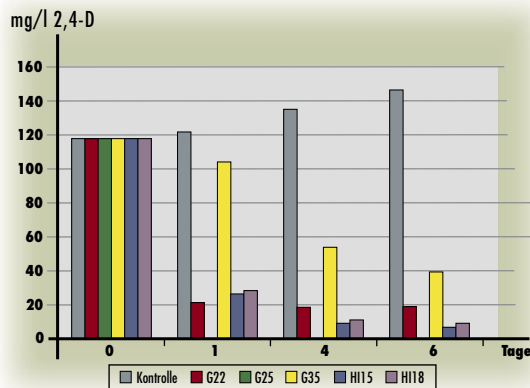


Bild 10: Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure durch verschiedene gfp-markierte Bakterienstämme (R2A-Medium, pH 10)

schem Milieu in der Lage sind.

Erste Ergebnisse zeigen, dass einige der isolierten Bakterienstämme 2,4-D unter alkalischen Bedingungen abbauen können und eng verwandt sind mit Stämmen, die auch schon aus anderen Sodaseen isoliert wurden (Duckworth et al. 1996).

Fazit

Das Grün Fluoreszierende Protein ist als Lebendmarker für Gentransferprozesse im alkalischen Milieu gut geeignet. Die Übertragbarkeit eines degradativen Plasmids in alkaliphile Bakterien aus unbelasteten Standorten wurde durch GFP-Markierung nachgewiesen. Die Expression der genetischen Information zum Herbizid-Abbau unter alkalischen Bedingungen zeigt, wie sich mikrobielle Lebensgemeinschaften aus Extremstandorten an toxische Substrate anpassen und ist damit ein Modell für die mikrobielle Dekontamination von herbizidbelastetem Bauschutt.

Literatur

- Brown, L. (1959) The Mystery of the Flamingoes. Hamlyn, London
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, S. 802-805
- Don, R. H., Pemberton, J. M. (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145, S. 681-686
- Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., van Steenberg, R. (1996) Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, S. 181-191
- Grant, W. D., Mwatha, W. E., Jones, B. E. (1990) Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, S. 255-270
- Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. (1962) Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, S. 223-239
- Suarez, A., Güttler, A., Strätz, M., Staendner, L. H., Timmis, K. N., Guzman, C. A. (1997) Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* 196, S. 69-74

English Abstract

Microbiologists make bacteria glow

The Green Fluorescent Protein (GFP), also called Living Colour, was originally isolated from a luminous hydromedusa and has become a powerful tool in molecular biology for the last 5 years. Cells tagged with an active GFP gene glow green under UV light. Scientists of the Department of Environmental Microbiology use the GFP as a genetic marker for monitoring plasmid transfer processes in bacterial biocenoses. Broad host range plasmids like the degradative plasmid pJP4, encoding the pathway for the degradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), are sources of genetic information for bacterial adaptation to changing environmental conditions and can enable bacteria to degrade toxic substrates like chloro-organic compounds. Microbial performances like the degradation of chloro-organics are of great interest for the development of bioremediation techniques. A special remediation problem is the microbial decontamination of residues of pesticide producing factories, since aqueous eluates from building rubble are highly alkaline. Alkaline sites occurring in natural ecosystems (soda lakes) as well as in places of human activities (buildings and building rubble) are habitats of alkaliphilic bacteria. In order to elucidate the adaptive potential of alkaliphilic bacteria coming from pristine environments to toxic substrates like the phenoxyherbicide 2,4-D, the microbiologists of the UFZ used a GFP-tagged pJP4 to establish the 2,4-D degradative trait in alkaliphilic bacteria enriched from water and sediment samples from soda lakes in the South Hungarian Lowlands. Various green glowing bacterial strains stably maintaining the plasmid were isolated. Some of them are able to degrade 2,4-D under alkaline conditions. Identification of the isolates by 16S rDNA sequencing gives insights into the taxonomic spectrum of alkaliphiles which are potential 2,4-D degraders in alkaline environments.