

**Methylierung von anorganischem Quecksilber im Intestinaltrakt
des Kompostwurms *Eisenia foetida***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität
In Mainz

Burkhard Knopf
Geboren am 14.03.1977 in Frankfurt/Main

Mainz 2010

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2010

Abkürzungen:

| | |
|---------------------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| A | Ampere |
| AAS | Atomabsorbtionsspektrometrie |
| Abb. | Abbildung |
| AD | Außendurchmesser |
| AFS | Atomfluoreszenzspektrometrie |
| Aux | Auxillary Gas |
| Bp | Basenpaare |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| cps | counts per second |
| demin. Wasser | deminaeralisiertes Wasser |
| DNA/DNS | Desoxyribonukleinacid/Desoxyribonukleinsäure |
| EB | Ethidiumbromid |
| EtHgCl | Ethylquecksilberchlorid |
| g | Gramm |
| G | Gravitationskraft |
| GC | Gaschromatographie |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| He | Helium |
| Hg | Quecksilber |
| Hg ₂ Cl ₂ | Quecksilber(I)chlorid |
| HgCl ₂ | Quecksilber(II)chlorid |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| ICP-MS | induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie |
| ID | Innendurchmesser |
| K | Kelvin |
| KOH | Kaliumhydroxid |

| | |
|--------------------|--|
| L | Liter |
| LC | Liquidchromatochraphy (Flüssigchromatographie) |
| M | Molar |
| MeHg ⁺ | Monomethylquecksilber |
| mg | Milligramm |
| MHz | Mega Hertz |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| Mm | Millimeter |
| MS | Massenspektrometrie |
| mV/s | Millivolt pro Sekunde |
| N ₂ | molekularer Stickstoff |
| NAD ⁺ | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADP ⁺ | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NCBI | National Center for Biotechnology information |
| Neb | Nebuliser Gas |
| ng | Nanogramm |
| O ₂ | molekularer Sauerstoff |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| pg | Picogramm |
| Ph ₂ Hg | Diphenylquecksilber |
| ppb | parts per billion (Teile pro Milliarden) |
| ppm | parts per million (Teile pro Millionen) |
| ppt | parts per trillion (Teile pro Billionen) |
| RPD | Ribosomal Database Projekt |
| rpm | rounds per minute |
| s | Sekunde |
| t | Tonne |
| TMAH | Tetramethylammoniumhydroxid |
| V | Volt |
| v/v | volume/volume |
| W | Watt |
| Xe | Xenon |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Metalle in der Umwelt | 2 |
| 1.1.1. Die Geschichte des Quecksilbers | 3 |
| 1.1.2. Quecksilberkreislauf | 5 |
| 1.1.3. Chemische und physikalische Eigenschaften von Quecksilber | 9 |
| 1.1.4. Toxizität von Quecksilber | 10 |
| 1.1.5. Akkumulation von Quecksilber | 13 |
| 1.1.6. Methylierung und Demethylierung von Quecksilber | 15 |
| 1.2. Methylierende Mikroorganismen | 19 |
| 1.3. Der Kompostwurm <i>Eisenia foetida</i> | 19 |
| 1.4. Analytische Methoden zur Bestimmung von Methylquecksilber | 21 |
| 2 Material und Methode | 23 |
| 2.1. Vorarbeiten für die Messungen | 23 |
| 2.2. Chemikalienliste | 23 |
| 2.3. <i>Eisenia foetida</i> als Modellorganismus..... | 27 |
| 2.3.1. Kultur | 27 |
| 2.3.2. Versuchsansätze | 27 |
| 2.3.3. Gewebegewinnung..... | 29 |
| 2.4. Mikrobiologische Methoden | 29 |
| 2.4.1. Kulturmedien | 29 |
| 2.4.2. Isolierung von Mikroorganismen aus dem Wurmdarm..... | 37 |
| 2.4.3. DNA-Isolierung..... | 38 |
| 2.4.4. PCR | 42 |
| 2.4.5. Gelelektrophorese | 46 |
| 2.4.6. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese | 47 |
| 2.4.7. Elution der DNA aus dem DGGE-Gel | 49 |
| 2.4.8. Aufreinigung der DNA | 49 |
| 2.4.9. Sequenzierung | 50 |
| 2.5. Analytische Methoden..... | 50 |
| 2.5.1. Extraktionsmethoden | 50 |
| 2.5.2. Kapillar-Gaschromatographie..... | 56 |
| 2.5.3. Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie | 57 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 2.5.4. | Isotopenverdünnungsmethode..... | 65 |
| 2.5.5. | Atomfluoreszenzspektroskopie | 68 |
| 3 | Ergebnisse | 73 |
| 3.1. | Wurmversuche | 73 |
| 3.1.1. | Optimierung der Kulturbedingungen..... | 73 |
| 3.1.2. | Validierung der Extraktionsmethode..... | 75 |
| 3.1.3. | Konzentrationsabhängigkeit..... | 76 |
| 3.1.4. | Unsterile Ansätze..... | 80 |
| 3.1.5. | Sterile Ansätze | 82 |
| 3.2. | Vergleich der unsterilen und sterilen Ansätzen | 85 |
| 3.3. | Isolierung von Darmmikroorganismen | 87 |
| 3.4. | Screening auf quecksilbermethylierende Bakterien..... | 90 |
| 3.4.1. | Screeningergebnisse mit Reinkulturen | 90 |
| 3.4.2. | Screeningversuche von Mischkulturen | 90 |
| 3.4.3. | Identifizierung der Bakterien in der Mischkultur..... | 96 |
| 4. | Diskussion | 99 |
| 4.1. | Kultivierungsoptimierung von <i>Eisenia foetida</i> | 99 |
| 4.2. | Methylquecksilber in <i>Eisenia foetida</i> | 102 |
| 4.2.1. | Abhängigkeit Methylquecksilber zu anorganischem Hg ²⁺ im Bodenmaterial | 103 |
| 4.2.2. | Gesamtquecksilber im Wurmgewebe..... | 104 |
| 4.2.3. | Methylquecksilber im Wurmgewebe..... | 106 |
| 4.3. | Methylierung durch Bakterien..... | 109 |
| 4.3.1. | Methylierung von Quecksilber durch Neuisolate | 112 |
| 4.3.2. | Methylierung von Quecksilber neuisolierter Mischkulturen..... | 114 |
| 5. | Ausblick | 117 |
| 6. | Zusammenfassung | 118 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 121 |
| 9. | Anhang | 135 |

1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, die Methylierung von Quecksilber im Intestinaltrakt und die Akkumulation des gebildeten Monomethylquecksilbers im Gewebe des Kompostwurms *Eisenia foetida* nachzuweisen. Von weiterem Interesse waren die Isolierung und die Identifizierung der für die Methylierung verantwortlichen Mikroorganismen. Diese durch Mikroorganismen hervorgerufene Speziesumwandlung von anorganischem Quecksilber in die organische Form ist besonders wegen dem erhöhten toxischen Potentials von Bedeutung. Die Aufnahme von Methylquecksilber durch Tiere und durch Menschen kann bei diesen zu schweren Vergiftungen führen, die im Endstadium den Tod des Patienten bedeuten.

In der chemischen Analytik bezeichnet man als Elementspezies die unterschiedlichen Formen in dem ein Element auftreten kann. Als Speziationsanalyse wird das Identifizieren von unterschiedlichen chemischen Formen eines Elements und die Messung dieser definiert. Laut der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ist eine chemische Verbindung, welche sich durch ihre isotopische Zusammensetzung, ihre Konformation, Wertigkeit (Oxidationszustand) und ihrer Substituenten unterscheidet, eine unterschiedliche chemische Spezies (Templeton et al., 2000).

Sowohl abiotische wie auch biotische Prozesse werden für die Methylierung von Quecksilber verantwortlich gemacht. Bermann und Bartha (1986) beschrieben jedoch, dass hauptsächlich Mikroorganismen für eine Methylierung von Quecksilber in Sedimenten verantwortlich sind. Vor allem Sulfat-reduzierende Bakterien sind zu dieser Reaktion befähigt und am aquatischen Quecksilber Kreislauf beteiligt. Choi und Bartha (1993) konnten einen quecksilbermethylierenden Stamm von *Desulfovibrio desulfuricans* LS aus einem marinen Habitat isolieren. An diesem Stamm wurden verschiedene Untersuchungen zum biochemischen Weg der Quecksilbermethylierung durchgeführt, die zeigten, dass Methylcobalamin als Cofaktor hierbei eine entscheidende Rolle spielt.

Hamdy und Noyes (1975) untersuchten die Bildung von Methylquecksilber durch 23 unterschiedliche Quecksilber resistente Stämme und konnten zeigen, dass ein

Einleitung

Enterobacter aerogenes Stamm Hg²⁺ zwar methylierte, jedoch unfähig war, dieses in Hg⁰ zu reduzieren. Fleming et al. (2005) konnten einen Eisen-reduzierenden *Geobacter spec.* aus einem Frischwasser-Sediment isolieren, der eine ähnlich hohe Ausbeute an Methylquecksilber aufwies wie der Sulfat-reduzierende *Desulfolobus propionicus* Stamm 1pr3. Diese Studien zeigten, dass die Methylierung von Quecksilber nicht alleine von Sulfat-reduzierenden Bakterien durchgeführt werden kann, sondern noch weitere Mikroorganismen die Fähigkeit und auch die Ausstattung für diese Reaktion besitzen.

1.1. Metalle in der Umwelt

Verschiedene Elemente sind für alle Lebewesen auf der Erde von entscheidender Bedeutung. So ist z.B. Kohlenstoff und Wasserstoff für den Zellaufbau, verschiedene Ionen sind Na⁺, K⁺ und Cl⁻ am Ionenhaushalt und auch an katalytischen Reaktionen beteiligt. Bei katalytischen Reaktionen spielen auch Metalle in der belebten Welt eine entscheidende Rolle. Sie können sowohl essentiell für das Leben sein, zum Beispiel Eisen, Kupfer, Mangan und viele weitere Metalle, die in Enzymen im katalytischen-Zentrum vorkommen. Dort werden die Substrate gebunden und zu den gewünschten Edukten umgesetzt. So ist Eisen ein essentielles Element beim Transport von Sauerstoff durch das Hämoglobin im Menschen. An das zentrale Eisenatom wird der Sauerstoff gebunden und über den Blutkreislauf in die entsprechenden Gewebe transportiert. In Mollusken und Arthropoden übernimmt diese Funktion das Kupfer im Hämocyanin, weshalb bei diesen Tieren das Blut auch bläulich gefärbt erscheint. Aber Eisen und Kupfer spielen nicht nur im Sauerstofftransport eine entscheidende Rolle, sondern sind essentiell für den Elektronentransport in der Atmungskette. Hier liegt Eisen sowohl in Häm-Gruppen vor als auch in Eisen-Schwefel-Clustern.

Ein weiteres Beispiel für ein Metall, das eine essentielle Rolle spielt ist Mangan. Dieses wird von Pflanzen für die Bindung und Spaltung von Wasser am Photosystem II benötigt. An diesem Mangancluster wird H₂O gebunden und die Elektronen von diesem nacheinander auf den Photokomplex II übergeben. Eine zu frühe Freigabe des Sauerstoffes kann zur Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikalen führen, die auf die Zellen toxisch wirken.

Einleitung

Ähnliche Beispiele gibt es noch für eine weitere große Zahl an Metallen, die für das Überleben der Organismen auf der Erde unabdingbar sind. Dabei ist jedoch immer zu beachten, dass diese Elemente zu den Mikronährelementen gehören. Dies bedeutet, sie sind nur in geringen Konzentrationen (<50 mg/kg für den Menschen) notwendig und in höheren Dosen sind sie für die Organismen toxisch. Eine Ausnahme bildet Eisen, da dieses Element für den menschlichen Organismus in höheren Konzentrationen benötigt wird. Es steht somit zwischen den Mikro- und den Makronährelementen.

Auf der anderen Seite gibt es aber auch eine Reihe von Metallen, die keine lebenswichtige Rolle für Organismen spielen. Diese Vertreter sind ausnahmslos toxisch, wie zum Beispiel Quecksilber, Cadmium oder Chrom. Bei diesen Metallen kommt es allerdings auch auf die Form an, in der sie dem Organismus angeboten werden. So ist z.B. Quecksilber in der elementaren Form nicht so toxisch wie in seiner ionischen oder sogar in der organischen Form. Bei Chrom muss unterschieden werden, ob es in der Oxidationsstufe 3⁺ oder 6⁺ vorliegt, da sich diese in der Toxizität stark unterscheiden.

In den folgenden Abschnitten wird das Augenmerk auf das Schwermetall Quecksilber gerichtet, da es sowohl in der Industrie als auch in der Landwirtschaft, z.B. als Fungizid in unserer Gesellschaft eine wichtige Rolle gespielt hat und somit in einem großen Umfang in die Natur gelangen konnte.

1.1.1. Die Geschichte des Quecksilbers

Quecksilber gehört neben Gold, Silber, Antimon, Zinn, Schwefel und Eisen mit zu den Elementen, die den Menschen schon vor mehr als 2000 Jahren bekannt waren. Schon in Werken von Aristoteles (384 v. Chr.- 322 v. Chr.) wurde Quecksilber erwähnt und im Abendland füllten sich Edelleute Teiche mit Quecksilber als eine besondere Attraktion. Die frühesten Aufzeichnung für die Gewinnung von Quecksilber aus Zinnober (Quecksilbersulfid) stammt aus dem Jahr 315 v. Chr. von Theophrast. Für die Darstellung von Quecksilber verwendete er spanischen Zinnober und verrieb diesen mit Essig in einem Bronzemörser. Auch Plinius (23 n. Chr. – 79 n. Chr.) und

Einleitung

Dioskurides (1. Jh. n. Chr.) beschrieben die Quecksilber Darstellung durch eine thermische Zersetzung aus Zinnober. Allerdings wurde Zinnober nicht alleine für die Gewinnung von flüssigem Quecksilber verwendet. Schon im alten China und im römischen Reich wurde es als Schminke und als Farbe für Wandgemälde eingesetzt.

Gegen Ende des 6. Jahrhunderts wurde Quecksilber dann auch für die Gewinnung von Gold aus Erzlagerstätten benutzt. Im Mittelalter wurde der größte Teil, der aus der Quecksilberverhüttung gewonnene Rohstoff, zur Edelmetallgewinnung nach der bekannten Amalgam-Methode eingesetzt. Diese Technik wird noch heute in Entwicklungsländern angewendet, um Gold aus Erzen zu erhalten.

Eine weitere wichtige Bedeutung erlangte Quecksilber in der Medizin. Ein bekanntes Beispiel hierfür war eine Salbe aus Quecksilber und Quecksilberoxid die von Paracelsus (1493 - 1541) gegen Syphilis eingesetzt wurde. Nicht erst im Mittelalter, sondern schon in der traditionellen chinesischen Medizin nahm Quecksilber eine überaus wichtige Rolle ein. Dort wurde z. B. Zinnober verwendet, um Schlaflosigkeit zu kurieren. Eine entzündungshemmende Wirkung sagte man dem Zinnober nach, wenn dies auf die Wunden aufgetragen wurde.

Später machte man sich dann die physikalischen Eigenschaften von Quecksilber für verschiedene Apparaturen zu nutze. Fahrenheit (1686 - 1736) verwendete das elementare Quecksilber für sein Thermometer und auch in Barometern wurde es eingesetzt. Allerdings konnte erst 1759 der genaue Schmelzpunkt von Quecksilber bestimmt und somit dieses dann eindeutig den Metallen zugeordnet werden. In der modernen Zeit erhielt Quecksilber noch größere industrielle Bedeutung. Zum Beispiel in der chemischen Industrie wird Quecksilber für die Chloralkalielektrolyse zur Herstellung von Chlor und Alkalilauge verwendet. In der Landwirtschaft wurden verschiedene Quecksilberverbindungen als Fungizide und sogar als Saatgutbeizmittel eingesetzt, welche jedoch seit 1980 verboten sind. Auch in Knopfzellen wurde Quecksilber eingesetzt. In der Physik bekam 1911 das Quecksilber eine besondere Bedeutung. Der Physiker Heike Kamerling Onnes entdeckte, dass bei einer Temperatur von $4,2^{\circ}$ Kelvin ($-268,9^{\circ}$ C) der elektrische Widerstand von Hg vollständig verschwindet und legte so den Grundstein für die Supraleiter.

Einleitung

Heute verliert Quecksilber in den Industriestaaten immer mehr an Bedeutung, da die Toxizität im Vergleich zur Nutzbarkeit schwerer wiegt. In den meisten Produktionswegen ist Quecksilber durch ungefährlichere Stoffe ersetzt worden oder soll laut eines EU-Gesetzes in den nächsten Jahren ersetzt werden.

1.1.2. Quecksilberkreislauf

In der Erdkruste kommt das Element Sauerstoff mit ca. 47 Gewichtsprozent mengenmäßig am häufigsten vor, Silicium bildet mit ca. 27% das zweithäufigste (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Folgend sind die Elemente Aluminium (8%), Eisen (6%), Calcium (5%), Magnesium (2,3%), Natrium (2,1%) und Kalium (1,9%). Quecksilber gehört mit einem mittleren Gehalt von 0,02 mg/kg ($4 \cdot 10^{-5}\%$) an der kontinentalen Kruste nur zu den mengenmäßig gering vorkommenden Metallen, allerdings ist es ubiquitär zu finden (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Im Wesentlichen ist der Eintrag von Quecksilber in die Umwelt durch zwei Faktoren bestimmt, den natürlichen und den anthropogenen. Zu den natürlichen Quellen gehören z.B. Vulkanemission oder Ausdampfen aus der Erdkruste und dem Meerwasser, wobei diese ca. 40000 t/a (Fahti und Lorenz, 1980) betragen. Der anthropogene Eintrag kommt hauptsächlich aus verschiedenen Industrien wie z.B. in Form von Metalllegierungen in der Zahnmedizin oder als Katalysatoren in der Chemie und beträgt zwischen 6000 t bis 10000 t. In Deutschland betrug 1996 die Gesamtdeposition 15,3 t. Bezogen auf die Gesamtfläche von Deutschland ergibt sich eine Deposition von 0,4 g/ha im Jahr (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Wegen neuen Richtlinien und des so verminderten Einsatzes von Quecksilber geht der anthropogene Eintrag seit 1989 immer weiter zurück.

In normalen Böden, die keine Quecksilber Kontamination aufweisen, kann eine Konzentration von 0,05 bis 0,5 mg Hg pro kg Boden gefunden werden, jedoch meistens weniger als 0,1 mg/kg. Allerdings konnte in Böden, die mit quecksilberreichem Ausgangsmaterial wie Zinnober belastet waren, Konzentrationen von bis zu 40 mg Quecksilber pro kg nachgewiesen werden (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Auch in Böden, die durch vulkanische Emission belastet sind, können höhere Konzentrationen gefunden werden.

Einleitung

In anthropogen beeinflussten Böden beträgt die Quecksilberkonzentration für gewöhnlich 0,1 bis 0,4 mg/kg und in der Umgebung von erzverarbeitenden Industrien können Konzentrationen von bis zu 1,8 mg/kg (Tabelle 1) nachgewiesen werden. Auf landwirtschaftlich genutzten Böden können die Konzentrationen etwa 1,6 mg/kg betragen (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Durch die Anwendung von Fungiziden kann dieser Wert jedoch stark variieren. Auf Golfplätzen in Kanada wurden Konzentrationen von 180 mg/kg Quecksilber gemessen (Fushtey und Frank, 1981). Auch Flusssedimente in Deutschland wiesen eine hohe Konzentrationen an Quecksilber auf (Tabelle 1). In Elbe und Rhein betragen diese 20 bis 30 mg Hg pro kg Sediment (Fahit und Lorenz, 1980). Ein extremeres Beispiel ist die Bucht von Minamata, wo 2 g Hg pro kg Meerwasser gemessen wurden.

Tab. 1: Konzentration von organischem oder anorganischem Quecksilber in verschiedenen Böden und Sedimenten.

| | Konzentration [mg/kg] | | Literatur |
|------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------|
| | MeHg | Hg | |
| Böden: | | | |
| Unbelasteter Boden | n.b. | 0,05 - 0,5 | Scheffer & Schachtschabel, 2002 |
| Belasteter Boden | n.b. | 0,1 - 1,8 | Scheffer & Schachtschabel, 2002 |
| Sedimente: | | | |
| Bilboa | | | |
| Asua | 19 - 84 | n.b. | Raposo et al., 2008 |
| Galindo | 3,4 - 35 | n.b. | Raposo et al., 2008 |
| Zorozza | 2,4 - 62 | n.b. | Raposo et al., 2008 |
| Lavaca Bucht, Texas | 0,005 | 0,4 | Bloom et al., 1999 |
| Sagurnay Fjord, Kanada | n.b. | 0,1 - 9 | Gagnon et al., 1996 |
| Everglades | 0,21 - 0,29 | 2,2 | Liu et al., 2008 |

n.b. = nicht bestimmt

Einleitung

In Böden liegt das anorganische und organische Quecksilber meist stark gebunden an die Mineralien oder an organische Substanzen vor. Auch durch hohe Sulfidkonzentrationen kann Quecksilber als schwer lösliches Quecksilbersulfid ausgefällt werden. Bermann und Bartha (1986) untersuchten die Methylierung von Quecksilber in Böden und konnten nachweisen, dass über 90% biotischen Ursprungs ist.

Die Hauptform von Quecksilber in der Atmosphäre ist das elementare Hg^0 . Dieses kann photochemisch zu Hg^{2+} oxidiert werden und so wieder in die Meere und auch in die Böden zurückgelangen. Neben dem elementaren Quecksilber können auch noch organische Quecksilberspezies auftreten, die dann photochemisch zu Hg^0 reduziert werden. Allerdings können auch organische Spezies wie MeHg^+ durch nasse oder trockene Deposition wieder in das aquatische und terrestrische Habitat zurückgelangen (Beispiele für Konzentrationen siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Elementares Quecksilber in der Atmosphäre.

| Atmosphäre | Konzentration [ng/m^3] | Literatur |
|----------------------|--|------------------------|
| Ozeane: | | |
| Nördliche Hemisphäre | 1,96 | Slemr und Langer, 1992 |
| Südliche Hemisphäre | 1,33 | |

In Gewässern tritt Quecksilber am häufigsten als anorganisches Hg^{2+} auf (Beispiele für Konzentrationen siehe Tabelle 3). Dieses liegt entweder gelöst oder an Partikel gebunden vor (Logar et al., 2002). In dieser Form kann es durch Mikroorganismen methyliert und durch die Aufnahme von diesen in höheren Organismen akkumuliert werden. Die Mikroorganismen werden anschließend von höheren Organismen aufgenommen und das Methylquecksilber wird im Laufe der weiteren Nahrungskette angereichert. So kann das toxische organische Quecksilber zu dem Menschen gelangen.

Tab. 3: Organisches und anorganische Quecksilber in verschiedenen Gewässern.

| Gewässer | Konzentration (ng/L) | | Literatur |
|--------------------------|----------------------|-------------|--|
| | MeHg | Hg | |
| Meerwasser: | n.b. | <4 | Fitzgerald und Clarkson, 1991 Mason et al., 1995a |
| Atlantik | n.b. | 1,5 - 4,25 | |
| Gewässer: | | | |
| Patuxant Fluss, Maryland | n.b. | 0,2 - 1,5 | Benoit et al., 1998 |
| Lake Michigan, USA | n.b. | 500 - 1000 | Mason und Sullivan, 1997 |
| Wisconsin Flüsse, USA | n.b. | 0,3 - 45,9 | Barbiarz et al., 1998 |
| Anacostia Fluss, USA | <0,1 - 1,8 | 8,72 - 39,5 | Mason und Sullivan, 1997 |
| Scheldt, Belgien | 0,12 - 0,39 | 0,5 - 5,2 | Leermakers et al., 1995 |
| Finnische Seen | 10,3 - 19,3 | 57,4 - 196 | Verta und Matalianen, 1995 |

In der Abbildung 1 ist der biogeochemische Kreislauf schematisch dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, wie die verschiedenen Kompartimente miteinander verknüpft sind und wie die einzelnen Redoxreaktionen, Methylierungs- und Demethylierungsschritte zusammenhängen.

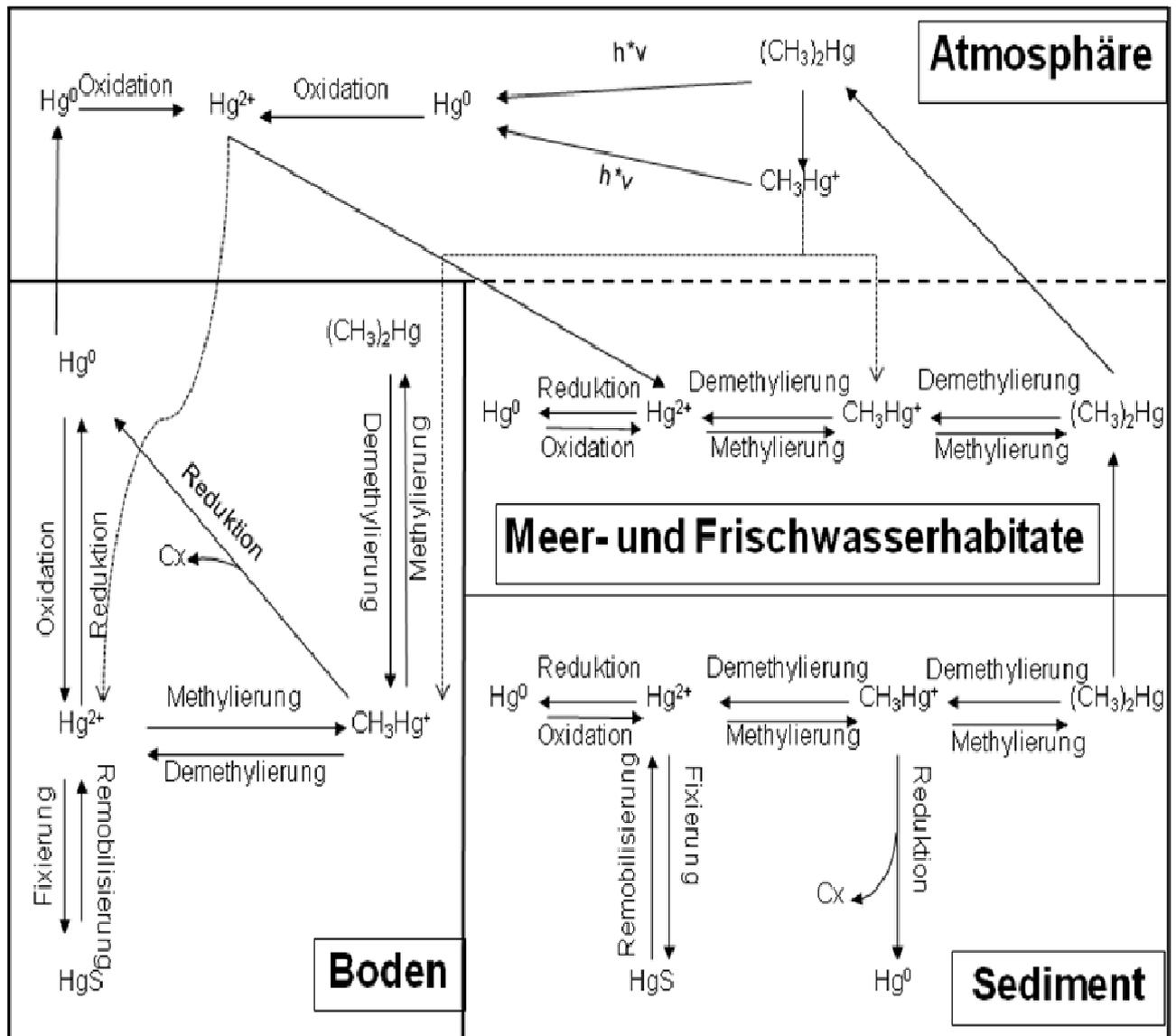


Abb. 1: Biogeochemischer Quecksilberkreislauf.

1.1.3. Chemische und physikalische Eigenschaften von Quecksilber

Quecksilber steht im Periodensystem in der II. Nebengruppe. Es wird mit dem Symbol Hg beschrieben und hat eine Ordnungszahl von 80. Der Name Quecksilber leitet sich aus dem althochdeutschen quecsulbar ab, was soviel bedeutet wie lebendig. Das im Periodensystem verwendete Kürzel Hg steht für hydrargyrum, was vom griechischen hydor für Wasser und argyros für Silber und dem lateinischen Suffix -um kommt. Dies bedeutet soviel wie flüssiges Silber. Dieser Name beschreibt genau die Eigenschaft von Quecksilber, da es bei Normalbedingungen flüssig

Einleitung

vorliegt. Die Dichte beträgt $13,6 \text{ g/cm}^3$ und durch seinen Schmelzpunkt von $-38,84 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt es flüssig vor und ist das einzige Metall, das diesen Aggregatzustand besitzt. Bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ fängt Quecksilber aufgrund der Dichte, an zu verdampfen und kann so elementares Hg^0 in die Umgebung abgeben. Der Siedepunkt von Quecksilber liegt bei $356,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (Holleman - Wiberg, Auflage 101).

Quecksilber tritt in verschiedenen Isotopen auf, wobei diese jedoch im Vergleich zu anderen Metallen alle stabil sind. Zu den sieben Isotopen gehören das ^{196}Hg (0,14 %), ^{198}Hg (10,02 %), ^{199}Hg (16,84 %), ^{200}Hg (23,13 %), ^{201}Hg (13,22 %), ^{202}Hg (29,80 %) und ^{204}Hg (6,85 %). Aus dieser Isotopenverteilung ergibt sich das mittlere Atomgewicht von $200,59 \text{ g/mol}$. Es gibt noch zwei weitere Nuklide, die hauptsächlich für Tracerexperimente in der Medizin verwendet werden. Dazu gehört das ^{197}Hg (Halbwertszeit = 65 h) und das ^{203}Hg (Halbwertszeit = 46,59 Tage).

In chemischen Verbindungen kann Quecksilber mit den Oxidationsstufen +1 und +2 auftreten. Dabei sind die Verbindungen des einwertigen Quecksilbers immer bimolekular, die des zweiwertigen monomolekular. Die organischen Quecksilberverbindungen entstehen vorwiegend aus anorganischem Quecksilber mit der Oxidationsstufe 2+. Quecksilberorganische Verbindungen R_2Hg sind farblose, geruchslose und toxisch wirkende Substanzen. Sie sind in Wasser schlecht lösliche Flüssigkeiten, wie z.B. Dimethylquecksilber (Me_2Hg , Siedepunkt $92,5 \text{ }^\circ\text{C}$) oder tiefschmelzende Feststoffe wie z.B. Diphenylquecksilber (Ph_2Hg , Schmelzpunkt $121,8 \text{ }^\circ\text{C}$). Sie sind hydrolyse- und luftbeständig, können allerdings durch Zufuhr von Wärme oder Licht leicht zerfallen, da die Bindungsenthalpie der HgC Bindungen vergleichsweise sehr gering ist (60 kJ/mol). Im Gegensatz zu den R_2Hg Verbindungen stellen die RHgX (X = z.B. Halogenide) kristalline Feststoffe dar, die in Wasser löslich sind (Holleman und Wiberg, 1995).

1.1.4. Toxizität von Quecksilber

Bei der Toxizität von Quecksilber ist nicht nur die Konzentration, Aufnahmeart und Inkubationszeit relevant, sondern auch die Spezies, die in den Körper aufgenommen wird. Elementares Hg^0 wird hauptsächlich über die Atemwege aufgenommen und

Einleitung

gelangt auf diesen Weg in den Körper. Für Hg^0 ist eine maximale Arbeitsplatzkonzentration von $0,1 \text{ mg/m}^3$ festgelegt und bei der Arbeit mit diesem oder auch mit quecksilberhaltigen Stäuben muss ein Mundschutz getragen werden.

Anders als bei dem Hg^0 ist bei dem Arbeiten mit Hg^{1+} oder Hg^{2+} eine Vergiftung über die Atemwege weniger gegeben. Diese Formen des Quecksilbers können hauptsächlich über die orale Aufnahme oder auch über die Hautresorption in den Körper gelangen. Aufgrund der Eigenschaft von Quecksilber, eine hohe Affinität zu Schwefelverbindungen zu haben, ist es für fast alle Organismen extrem toxisch. So geht (aufgrund der Thiophilie) Hg^{2+} mit katalytischen Zentren oder strukturgebenden Bereichen von Enzymen, welche eine SH-Gruppe tragen, eine Bindung ein und verhindert so die Funktionalität des Enzyms. Beim Arbeiten mit diesen anorganischen Formen des Quecksilbers reicht allerdings schon der Schutz mit einer Atemmaske, um mögliche Stäube nicht einzuatmen und die Verwendung von Nitrilhandschuhen, die eine Resorption über die Haut verhindern.

Weitaus gefährlicher sind die organischen Formen des Quecksilbers. Bei diesen Verbindungen bieten Nitrilhandschuhe keinerlei Schutz, da die Organo-Quecksilberverbindungen durch diese hindurch diffundieren können. Der Hauptunterschied von Hg^{2+} und MeHg^+ ist, dass die organische Form aufgrund der Lipophilie auch Membrangrenzen wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und so direkt das Zentralnervensystem schädigt. Der Weg des Methylquecksilbers in das Gehirn ist sehr gut untersucht (Clarkson, 1994). Dabei bildet das MeHg^+ einen Cysteinkomplex, der der Aminosäure Methionin strukturähnlich ist. Somit kann der giftige Quecksilberkomplex mit den gleichen Transportmechanismen in das Gehirn gelangen. Im Gegensatz dazu geht das Hg^{2+} mit dem Gluthation einen Komplex ein, der einem Oxidationsprodukt des Gluthations ähnelt und somit ausgeschieden wird. Auch in ihrer Halbwertszeit unterscheiden sich die beiden Quecksilberformen. So gibt es für das organische Methylquecksilber variierende Angabe über dessen Halbwertszeit im Körper. Dabei reichen die Angaben von etwa 230 - 240 Tagen im Gehirn und ca. 65 Tagen in den anderen Organen (Tsubaki, 1971) bzw. 70 bis 75 Tagen (Elhassani et al., 1978) und 40 - 105 Tagen im Blut (Bakir et al., 1973).

Einleitung

Ein bekanntes Beispiel für eine solche Vergiftung ist die Professorin Karen Wetterhahn (Dartmouth College, Hanover, New Hampshire), die bei dem Arbeiten mit Dimethylquecksilber einen Tropfen der Lösung auf einen Latexhandschuh bekam. Die Quecksilberverbindung diffundierte durch den Handschuh und nach einigen Monaten wurde sie in ein Krankenhaus gebracht, allerdings war die Vergiftung schon soweit fortgeschritten, dass eine Entgiftung nicht mehr erfolgreich war. In der Tabelle 4 sind die LD₅₀ Werte für verschiedene Quecksilberverbindungen dargestellt.

Tab. 4: LD₅₀ und LD_{low} Werte einiger Quecksilberverbindungen (Greenwood und von Burg, 1984).

| Verbindung | Ratte (oral LD₅₀) [mg/kg] | Mensch (oral LD_{low}) [mg/kg] |
|---------------------------------|---|---|
| Hg ₂ Cl ₂ | 210 | 5 |
| HgCl ₂ | 37 | 29 |
| MeHgCl | 10 | 5 |
| EtHgCl | 40 | 5 |
| Ph ₂ Hg | 60 | 5 |

Der größte Vergiftungsfall mit Quecksilberverbindungen ereignete sich 1956 in Minamata, Japan. Eine chemische Industrieanlage, die Acetaldehyd herstellte und dafür Quecksilber als Katalysator verwendete, leitete die Abwässer in die Bucht von Minamata (Ekino et al., 2007). Bei einer Vielzahl der Einwohner von Minamata tauchten die typischen Symptome einer Quecksilbervergiftung auf. Zu den Symptomen gehören Sprachstörungen, die Bewegungskoordination ist eingeschränkt, Zittern in den Händen (Tremor), Verlust des Tastsinnes, Seh- und Hörstörungen, sowie charakteristische Symptome einer Schädigung des zentralen Nervensystems (Ekino et al., 2007). An der Vergiftung starben mehr als 3000 Menschen. Viele Kinder wurden mit schweren Missbildungen geboren und selbst heute leiden noch viele Einwohner an den Folgeschäden durch die Vergiftung.

Einleitung

Um die Schwermetallionen aus dem Körper zu entfernen, gibt es heute einige Therapien, die auf der Einnahme von Chelatbildnern beruhen. Dazu gehört 2,3-Dimercaptopropylsulfonat oder die meso-2,3-Dimercaptobernsteinsäure. In einigen Studien (Keith et al., 1997; Flora et al., 2008) konnten sehr gute Ergebnisse in einer Kombination dieser Substanzen zusammen mit Liponsäure nachgewiesen werden. Dabei soll die Liponsäure den Chelatbildnern dazu verhelfen, auch in neuronales Gewebe zu gelangen und so das toxische organische Quecksilber zu binden. Ein entschiedener Nachteil dieser Therapie ist, dass ein optimaler Erfolg nur gewährleistet ist, wenn der Einsatz sehr früh erfolgt. Dies bedeutet, bevor die ersten typischen Symptome auftreten, muss mit der Behandlung begonnen werden. Wie schon im Beispiel von Karen Wetterhahn konnte mit dieser Behandlung keine Verbesserung erzielt werden, da bei ihr die Vergiftung schon zu weit fortgeschritten war.

1.1.5. Akkumulation von Quecksilber

Quecksilber kann von den Organismen in verschiedenen Geweben akkumuliert werden und somit nicht nur zu einer akuten, sondern auch zu einer chronischen Vergiftung führen. Diese Eigenschaft führt auch zu dem Problem, dass Quecksilber von niederen Organismen angereichert wird und über die Nahrung von höheren Organismen aufgenommen werden kann. Watras und Bloom (1992) zeigten, dass die Quecksilberkonzentration in Raubfischen um das millionenfache im Vergleich zu dem Meerwasser, in dem diese leben, ansteigen kann.

Auf der Stufe des Phytoplanktons ist das Verhältnis von anorganischem zu organischem Quecksilber durch die passive Aufnahme auf der Seite des anorganischen Quecksilbers (Mason et al., 1995c; Harms und Bunke, 2002). Jedoch wird durch die Nahrungsquelle (Harm und Bunke, 2002) Methylquecksilber effektiver an die höheren Organismen weitergegeben, wodurch in diesen das organische Quecksilber überwiegt. In der Tabelle 5 sind die Konzentrationen von anorganischem und organischem Quecksilber in einigen Organismen aufgezeigt.

Tab. 5: Einige ausgewählte Organismen und deren Konzentration an Methylquecksilber in Prozent.

| Organismus | Anteil MeHg am Gesamtquecksilber [%] | Literatur |
|---|--------------------------------------|--|
| Phytoplankton und Makroalgen | <10 | Mason und Sullivan, 1997 MacGrimmon et al., 1983; |
| Zooplankton | 35 | Hudson et al., 1995 |
| Mollusca | < 1-35 | Wren et al., 1983 |
| <i>Rangia cuneata</i> | 5-25 | Mason und Lawrence, 1999 |
| Crustacea | | |
| <i>Crangon Crangon</i> (Sandgarnele) | 75 | Anderson und Baatrup, 1988 |
| <i>Palaemonetes paludosus</i> (Glas Garnele) | 87±12 | Mason et al., 1988 |
| <i>Callinectes sapidus</i> (Blaue Krabbe) | 88±16 | Mason et al., 1988 |
| Flusskrebse | 50-75 | Mason et al., 1999 |
| Verschiedene Krustaceen | 65-90 | Wren et al., 1983 |
| Annelida | | |
| <i>Nereis diversicolor</i> (Seeringelwurm) | 18 | Muhaya et al., 1997 |
| Verschiedene | 4-36 | Gardner et al., 1978 |
| Pisces | | |
| Hering, Kabeljau, Schellfisch | 95 | Harms und Bunke, 2002 |
| Thunfisch | | |
| Scholle | 98 | Harms und Bunke, 2002 |

Einleitung

1.1.6. Methylierung und Demethylierung von Quecksilber

Im biogeochemischen Kreislauf spielen die methylierten Quecksilberverbindungen MeHg^+ und auch Me_2Hg eine wichtige Rolle. Diese Verbindungen können sowohl durch biotische als auch durch abiotische Prozesse entstehen. Nach Bentley und Chasteen (2002) ist eine biotische Methylierung, wenn diese innerhalb einer Zelle stattfindet, die abiotische wenn die Methylgruppe außerhalb der Zelle übertragen wird. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass es auch extrazelluläre Reaktionen gibt, die durch Mikroorganismen katalysiert werden. Somit ist eine geeignetere Definition, dass biotische Prozesse all diejenigen sind, bei denen sich Organismen beteiligen. Abiotische Prozesse dagegen, bei denen keine Organismen etwas beisteuern. Als Gegenpol zur Methylierung gibt es auch noch die Demethylierung von Quecksilber, bei der die organische Quecksilberform abgebaut wird.

Biotische Methylierung:

Bei der biotischen Methylierung übertragen Mikroorganismen auf verschiedenen biochemischen Wegen eine Methylgruppe auf Hg^{2+} . Dabei gehören drei Methylgruppenüberträger zu den Relevantesten: Co-Enzym N5-Methyltetrahydrofolat, S-Adenosylmethionin und Methylcobalamin (Gadd, 1993). Allerdings ist zu beachten, dass für die Methylierung von Quecksilber bisher nur das letztere als Co-Enzym identifiziert wurde. S-Adenosylmethionin kommt dagegen bei der Methylierung von Selen vor (Thompson-Eagle et al., 1989).

Das Methylcobalamin ist ein Vitamin-B₁₂-Derivat und kann ausschließlich von Mikroorganismen gebildet werden. Es besteht aus einem Corrin-Ringsystem mit einem zentral angeordneten Kobaltatom (Abb.2). Das Corrinringsystem besteht aus vier Pyrroleinheiten wie beim Porphyrin, dabei sind zwei Ringsysteme direkt, die anderen mit Methinbrücken verbunden. Der Corrinring ist allerdings stärker reduziert als der Porphyrinring und auch die Substituenten unterscheiden sich. Das Kobaltatom wird von vier Stickstoffatomen der Pyrrolringe gebunden und als fünfter Ligand tritt ein Derivat des Dimethylbenzimidzols auf. Das eine der Stickstoffatome des Dimethylbenzimidzols ist mit dem Kobalt verknüpft. Der sechste Ligand kann eine $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$ Gruppe oder 5'Desoxyadenosineinheit sein.

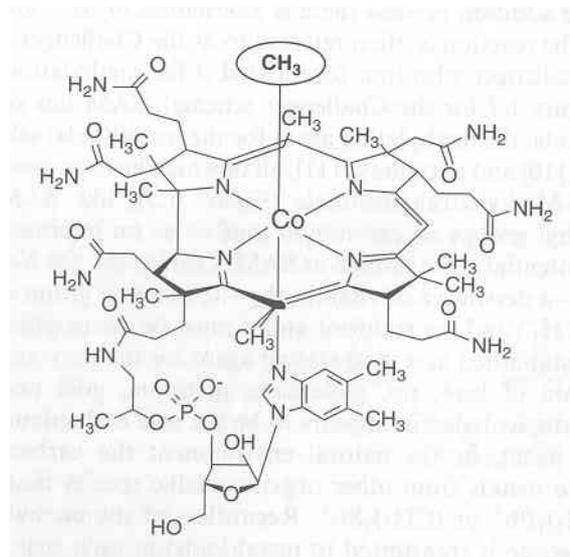
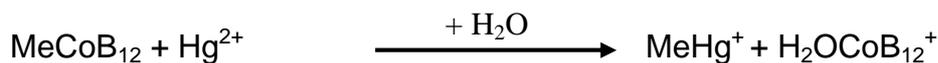


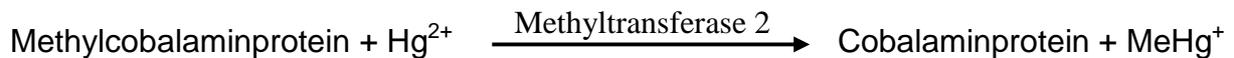
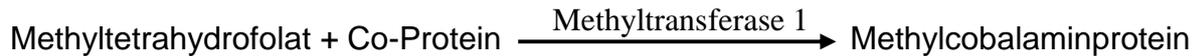
Abb. 2. Struktur von Cobalamin (Vitamin B₁₂) mit Kobalt als Zentralatom und 5'-Desoxyadenosin als 6. Ligand (Craig, 2003)

Die Methylgruppe wird infolge eines nukleophilen Angriffs des Carbanions (CH₃⁻) auf das Hg²⁺ übertragen und Monomethylquecksilber entsteht (Craig, 1986; Choi und Barta, 1993; Bertilsson und Neujahr, 1971).



Bei dieser Reaktion liegt der optimale pH-Wert bei 4,5 (Choi et al., 1994), während im basischen Me₂Hg entsteht (Wood und Wang, 1983). Choi et al. (1994) konnten an dem isolierten *Desulfovibrio desulfuricans* LS Stamm zeigen, dass die Methylierung von Quecksilber nicht in einem einstufigen Prozess erfolgt, sondern in einem zweistufigen. Dabei wird im ersten Schritt eine Methylgruppe durch Methyltetrahydrofolat auf ein Cobalaminprotein übertragen. Für diese Reaktion ist ein Enzym notwendig, welches als eine Methyltransferase (I) identifiziert wurde. Im anschließenden Schritt wird die Methylgruppe durch eine zweite Methyltransferase auf das Hg²⁺ übertragen (Choi et al., 1994).

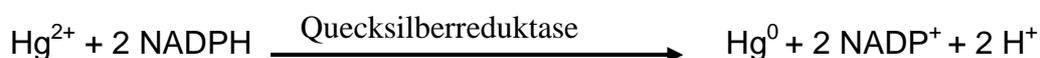
Einleitung



Der physiologische Grund für diese Reaktionsfolge ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Man geht davon aus, dass es sich um eine Nebenreaktion der intrazellulären Methylierung handelt, die für die Bildung von Polysacchariden, Fettsäuren, Aminosäuren und auch Nukleinsäuren zuständig ist (Gadd, 1993; Willams, 1988).

Biotische Demethylierung:

Neben der biotischen Methylierung kann auch eine Demethylierung erfolgen. Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage, die Methylgruppe von Quecksilber abzuspalten und so Hg^{2+} und Methan zu bilden. (Stein et al., 1996; Gadd, 1993; Spangler et al., 1973). Das gebildete Hg^{2+} wird durch Enzyme, die auf dem *Mer*-Operon liegen, weiter reduziert und so elementares Quecksilber gebildet. Diese Reaktion wird als eine Entgiftung der Zelle angesehen, allerdings sind die genauen Mechanismen bisher weitaus weniger untersucht worden. Dabei konnten in den letzten Jahren vermehrt Mikroorganismen isoliert werden, die eine Quecksilber Resistenz aufweisen und auch das *Mer*-Operon besitzen (Barkay et al., 2003).



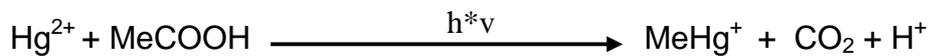
Abiotische Methylierung:

Wie bei der biotischen Methylierung von Quecksilber sind auch bei der abiotischen verschiedene Wege identifiziert worden. Bei einem dieser Wege handelt es sich um eine Transmethylierung zwischen unterschiedlichen Schwermetallspezies. Dabei fungieren organische Zinn- oder Bleiverbindungen als Methylgruppendonatoren, die

Einleitung

ihre Methylgruppe auf Hg^{2+} übertragen. Auch ist es möglich, dass eine Transmethylierung durch einen oxidativen Mechanismus erfolgt. Biogen gebildetes Methyljodid oder Dimethylsulfat fungieren dabei als Methylendonatoren. Diese Reaktion wird auch für die Bildung von MeHg^+ in Sedimenten oder Hg^0 in der Atmosphäre (Hall et al., 1995) verantwortlich gemacht.

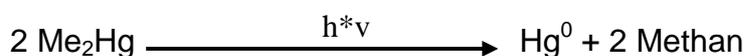
Eine weitere abiotische Reaktion zur Bildung von Methylquecksilber ist die photochemische Methylierung. Dabei können z.B. Carbonsäuren, Alkohole, Ketone, Klärschlämme oder auch Industrierwässer als Methylendonatoren fungieren, die unter Lichteinwirkung das Hg^{2+} zu Methylquecksilber methylieren (Hamasaki et al., 1995).



Abiotische Demethylierung:

Eine Demethylierung kann auch abiotisch stattfinden. Wie bei den schon vorher genannten Prozessen gibt es auch für diese Reaktion verschiedene Wege. Eine Möglichkeit ist ein oxidativer Abbau durch Licht. Dabei können Oxidantien in der Atmosphäre als Katalysatoren dienen wie z.B. Ozon oder auch OH-Radikale (Niki et al., 1983).

Die photochemische Zersetzung findet in der Atmosphäre statt und zu einem kleinen Teil auch im aquatischen System. Bei dieser Zersetzung entsteht Methan oder Ethan und elementares Quecksilber (Sellers et al., 1996; Gadd, 1993)



Wenn Schwermetallspezies methyliert und gleichzeitig demethyliert werden, kann eine Sonderform der Transmethylierung stattfinden. Diese Reaktion kann z.B. für Methylquecksilber ablaufen, wenn Sulfidionen vorliegen (Gadd, 1993).



1.2. Methylierende Mikroorganismen

Wie schon in den vorigen Abschnitten erwähnt, spielen bei der Methylierung von Quecksilber Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Hierbei konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl an unterschiedlichen Stämmen isoliert und identifiziert werden, die diese Fähigkeit besitzen. Dabei fällt auf, dass die gefundenen Mikroorganismen nicht einfach in eine taxonomische Gruppe eingeordnet werden können. So untersuchten Hamdy und Noyes (1975) verschiedene Quecksilber-resistente Stämme und fanden einen *Enterobacter aerogenes*-Stamm, der Quecksilber methylieren kann. Holm und Cox (1975) fanden noch weitere Gattungen, die das Vermögen haben, Methylquecksilber zu bilden, wie z.B. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* und *Bacillus*. Aus Frischwasser-Sediment konnte Fleming et al. (2005) einen Eisen-reduzierenden *Geobacter sp.* isolieren, die Quecksilber methylierte.

Allerdings gehören die Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) zu den am meisten beschriebenen Mikroorganismen, die in der Lage sind Quecksilber, zu methylieren. Aus aquatischen und terrestrischen Habitaten, konnten unterschiedliche SRB Stämme isoliert werden, die die Fähigkeit zur Methylierung von Quecksilber besaßen. Allen gemeinsam war, dass sie als Co-Enzym das Methylcobalamin und größtenteils auch den von Choi und Bartha (1993) beschriebenen biochemischen Weg über die Methyltransferase I und II besitzen (siehe 1.1.6).

1.3. Der Kompostwurm *Eisenia foetida*

Der Kompostwurm *Eisenia foetida* gehört zum Stamm der Anneliden und der Familie der Lumbricidae. Er ist ein typischer Bewohner des Bodens und kommt ubiquitär vor. Meistens wird er für die Kompostierung von Bioabfällen verwendet, was ihm auch den Beinamen Kompost- oder auch Mistwurm verliehen hat. Adulte Würmer können eine Größe zwischen 6 bis 13 cm erreichen. Seine rötlich-bräunliche Färbung gab ihm auch den Beinamen Rotwurm. *Eisenia foetida* ist gegenüber anderen Wurmartarten wie z.B. *Lumbricus terrestris* toleranter gegen verschiedene Umweltfaktoren wie z.B. Hitzeschwankungen, Futterumstellungen und auch Veränderungen des Habitats. Auch kann bei *Eisenia foetida* durch die kürzere

Einleitung

Generationszeit eine höhere Anzahl an Individuen produziert werden. Dies ist für Studien an diesem Wurm von einer entscheidenden Bedeutung. Lowe und Butt (2007) untersuchten, wie sich die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen verhält, wenn man *Eisenia foetida*-Individuen verwendet, die aus unterschiedlichen Bereichen kommen. Häufig werden kommerziell erworbene oder aus Freiland gesammelte Organismen verwendet. Allerdings können sich bei diesen die erhaltenen Ergebnisse unterscheiden, da sich die Individuen an unterschiedliche Habitate angepasst haben. Lowe und Butt (2007) konnten zeigen, dass die sichersten Ergebnisse mit *Eisenia foetida* erhalten werden, wenn man eine Kultur verwendet, die sich erst eine Zeitlang an die Versuchsbedingungen (Bodenbeschaffenheit, Temperatur, Fütterungsbedingungen) angepasst hat. Das heißt, für reproduzierbare Ergebnisse ist es von Nöten, eine eigene Kultur der Modelorganismen anzulegen. Dies ist besonders wichtig, da *Eisenia foetida* und auch *Eisenia andrei* häufig für ökotoxikologische Versuche eingesetzt werden. Ein Beispiel für einen solchen Versuch ist die Bodenkontamination durch Sprengstoffe wie z. B. TNT, bei dem *Eisenia andrei* in kontaminiertes Bodenmaterial inkubiert wurde (Robidoux et al., 1999). Auch Studien zur letalen Dosis von Methylquecksilber bei *Eisenia foetida* wurden durchgeführt, wobei eine Konzentration von 25 - 125 mg MeHgCl pro kg Bodenmaterial innerhalb von 12 Wochen zum Tode aller Versuchsobjekte führte (Beyer et al., 1985). Bei einer Konzentration von bis zu 5 mg/kg betrug die Überlebensrate zwischen 79 bis 97%. Doch nicht nur aus diesem Grund ist der Kompostwurm *Eisenia foetida* ein geeignetes Studienobjekt.

Die Vermehrung von *Eisenia foetida* verläuft wie bei allen anderen Regenwurm. Sie besitzen sowohl weibliche als auch männliche Geschlechtsorgane. Sie sind jedoch in den meisten Fällen nicht in der Lage, sich selbst zu befruchten. Wenn sich die Kompostwürmer paaren, kommen die Geschlechtorgane, die sich im Citellum befinden, zweier Individuen wechselseitig in Kontakt und eine Besamung kann stattfinden. In 61% der Paarungen kommt es nur zu einem Samentransfer. Dabei findet in 88,2% ein wechselseitiger Transfer statt und in 9,8% ein einseitiger (Domiguez et al., 2003). Bei *E. foetida* war erstmals eine Selbstbefruchtung nachzuweisen (Domiguez et al., 2003). Nach einer erfolgreichen Befruchtung wandert der Citellum-Ring innerhalb einiger Tage immer weiter in Richtung des Abdominal-Bereiches des Wurms und wird letztendlich abgestreift, so dass ein

Einleitung

gelblicher Kokon entsteht. Aus diesem schlüpfen nach einer gewissen Zeit die Jungwürmer (Domiguez et al., 2003).

Die Hauptnahrungsquelle des Kompostwurms besteht aus Mikroorganismen und Pilzen (Edwards und Fletcher, 1988; Morgan, 1998). Aus diesem Grund ist angerottetes Pflanzenmaterial zur Fütterung besonders geeignet, da sich auf diesem besonders reichlich Mikroorganismen ansiedeln können. Die Verweildauer des aufgenommenen Materials bei erwachsenen Kompostwürmern beträgt ca. 2,5 bis 3,5 Stunden (Hartenstein et al., 1981). Für andere Wurmspezies wie z.B. *Lumbricus rubellus* oder *Lumbricus festivus* konnten längere Retentionszeiten von bis zu 13 Stunden gemessen werden (Hendrickson, 1991).

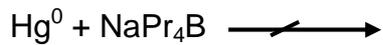
1.4. Analytische Methoden zur Bestimmung von Methylquecksilber

Im Laufe der letzten Jahre haben sich die Methoden der analytischen Chemie zur Detektion von Spurenelementen in der Umwelt erheblich verbessert. Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich auch die experimentellen Hinweise mehren, dass die jeweilige Bindungsform der Schwermetalle für ihre Toxizität ausschlaggebend ist. Somit spielt die Speziation von Schwermetallen z.B. eine Rolle in biogeochemischen Kreisläufen, der Qualitätskontrolle, der pharmazeutischen Industrie oder auch in klinischen Untersuchungen.

Aufgrund des besonderen Interesses an Methylquecksilber wurde in den letzten zehn Jahren eine große Anzahl an Analysemethoden entwickelt. Dies beruht besonders auf der Tatsache, dass zum Nachweis von MeHg^+ für die unterschiedlichen Matrizes in denen es vorkommen kann, auch eine spezielle Abfolge von Analysenschritten, benötigt wird. Dazu sind verschiedene Extraktionsmethoden notwendig, um MeHg^+ mit der besten Effizienz aus der zu untersuchenden Matrix zu extrahieren. Die am häufigsten verwendeten Methoden ist die Behandlung mit Säuren oder Basen bei Raumtemperatur, mit Mikrowellen, Wasser- oder Ultraschallbädern. Bei den meisten Extraktionsmethoden erfolgt dann anschließend eine Derivatisierung von MeHg^+ mit Natriumborhydrid (NaBH_4), Natriumtetraethylborat (NaEt_4B), Natriumtetrapropylborat (NaPr_4B) oder der Grignardreaktion (Demuth und Heumann, 2001; Fent und Müller 1991; Honeycutt und Riddle, 1961; Fernández et al., 2000).

Einleitung

Beispiele der Derivatisierung mit Natriumtetrapropylborat:



Dabei wird die nichtflüchtige, ionische Form des MeHg^+ in eine flüchtige Spezies umgewandelt und kann anschließend durch ein gaschromatographisches Verfahren von anderen Quecksilberspezies getrennt werden.

Die nachweisempfindlichste Detektionsmethode ist die Atomfluoreszenzspektrometrie (AFS) mit einer Kopplung an eine Kapillar-Gaschromatographie. Diese Methode erlaubt die Identifikation verschiedener Quecksilberspezies mit einer absoluten Nachweisgrenze von weniger als 1 pg (Alli et al, 1994). In den letzten Jahren hat sich eine weitere Detektionsmethode immer weiter verbreitet und zwar die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS). Mit dieser Technik können einzelne Isotope nachgewiesen werden und sie ist deshalb auch für die Isotopenverdünnungsmethode geeignet. In Tabelle 6 sind einige Bestimmungsmethoden für Methylquecksilber aufgezeigt.

Tab. 6: Trenn- und Detektionmethoden für die Bestimmung von Methylquecksilber.

| Trennmethode | Detektionsmethode | Literatur |
|--------------|-------------------|-----------------------------|
| GC | AFS | Alli et al., 1994 |
| GC | AAS | Dietz et al., 2000 |
| GC | MS | Dunemann et al., 1999 |
| GC | ICP-MS | Fernández et al., 2000 |
| HPLC | AAS | Falter, 1996 |
| HPLC | AFS | Hintelmann und Wilken, 1993 |
| HPLC | ICP-MS | Rai et al., 2002 |

2 Material und Methode

2.1. Vorarbeiten für die Messungen

Alle verwendeten Glasgefäße wurden vor dem Benutzen 24 h in 1 M HCl gelegt und anschließend in MilliQ Wasser (Millipore, Eschborn) für weitere 24 h. Dieser Schritt ist bei der Spurenanalytik von großer Bedeutung, um mögliche Reste aus Vorversuchen oder auch Spülmittelreste von den Glaswaren zu entfernen. Messungen im Spurenbereich können schon durch geringste Konzentrationen an unerwünschten Elementen eine Verfälschung oder auch eine verminderte Ausbeute erzeugen. Eine Kontamination durch die Umgebungsluft ist bei den Arbeiten mit Methylquecksilber unwahrscheinlich, da dieses dort nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Jedoch ist ein Eintrag durch verunreinigte Chemikalien eine ernstzunehmende Quelle für eine Kontamination. Ähnlich ist es mit einem Quereintrag von Quecksilber durch Parallelproben oder auch Standardlösungen, da bei Quecksilber der sogenannte Memoryeffekt auftritt. Quecksilber hat die Eigenschaft, sich an den Wänden von Glasgefäßen oder auch an verwendeten Plastikspitzen zu binden und kann nur durch längeres Spülen mit Säuren vollständig entfernt werden. Dieses Problem tritt häufiger bei Messungen mit analytischen Instrumenten auf. Wenn Quecksilber in höheren Konzentrationen verwendet wird, müssen die Leitungen erst eine zeitlang gespült werden, bis der Blindwert wieder erreicht wird. Bei chromatographischen Trennungen kann so durch das Einschleppen von Quecksilber (z.B. auch durch das Trägergas) das Untergrundsignal erhöht werden. Dies ist natürlich bei Messungen im Ultraspurenbereich nicht erwünscht, da somit die Analyse durch die Erhöhung der Nachweisgrenze behindert wird.

2.2. Chemikalienliste

Aus den zuvor genannten Gründen muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Chemikalien eine hohe Reinheit aufweisen (p.a. = pro analysis oder suprapur). Auch das verwendete Wasser muss frei von Quecksilber sein. Dies kann dadurch überprüft werden, indem man bei allen Messungen immer eine Reinstwasserblindprobe mit analysiert. Das in dieser Arbeit verwendete Wasser

Material und Methode

(MilliQ; Millipore, Eschborn) wurde bei jeder Analyse einem solchen Schritt unterzogen, um eine Kontamination aus diesem Bereich vorzubeugen.

In der Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gase aufgeführt.

Tab. 7: Verwendete Chemikalien und Gase.

| Chemikalie | Hersteller | Reinheit |
|------------------------------|-----------------------|------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Serva | 37,5:1/40% |
| Ammoniumchlorid | Merck, Darmstadt | p.a. |
| Ammoniumpersulfat | Roth, Karlsruhe | p.a. |
| Ammoniumsulfat | Roth | p.a. |
| Biotin (Vitamin H) | Sigma-Aldrich, Seelze | p.a. |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Fluka, Neu-Ulm | p.a. |
| Calcium-D-Pantothenat | Merck | ≥98% |
| Calciumnitrat-Tetrahydrat | Merck | p.a. |
| Natriumhydrogencarbonat | Roth | p.a. |
| Cobaltchlorid-Hexahydrat | Merck | p.a. |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | Roth | p.a. |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | Roth | p.a. |
| DL-Malat | Roth | ≥98% |
| Eisenammoniumcitrat | Sigma | p.a. |
| Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat | Merck | p.a. |
| Eisen(II)sulfat-Heptahydrat | Fluka | p.a. |
| Eisen(III)chlorid-Hexahydrat | Merck | p.a. |
| Eisessig | Merck | Suprapure |
| Ethanol | Roth | 99% |
| Folsäure | Sigma-Aldrich | 98% |
| Formamid | Sigma-Aldrich | 99,5% |
| Glucose-Monohydrat | Sigma-Aldrich | HPLC-Grade |
| Glycerin | Roth | 99% |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth | p.a. |
| Kaliumhydroxid | Roth | p.a. |
| Cobaltchlorid-Tetrahydrat | Merck | p.a. |

Material und Methode

| | | |
|--|-------------------|------------|
| Kupferchlorid-Dihydrat | Merck | p.a. |
| Kupfersulfat-Heptahydrat | Roth | p.a. |
| L(+) Ascorbinsäure | Roth | p.a. |
| Liponsäure | Sigma-Aldrich | 99% |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Roth | p.a. |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Roth | p.a. |
| Manganchlorid-Tetrahydrat | Merck | p.a. |
| Mangansulfat-Monohydrat | Merck | p.a. |
| Mannitol | Roth | 99% |
| Methanol | Roth | HPLC-Grade |
| Methylquecksilberchlorid (²⁰² Isotop) | ERM | - |
| Natriumacetat | Roth | p.a. |
| Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O) | Roth | p.a. |
| Natriumlactat | Sigma | 60% |
| Natriummolybdat | Merck | p.a. |
| Natriumoxalat | Merck | p.a. |
| Natriumpyruvat | Sigma | 99% |
| Natriumselenat | Fluka | 98% |
| Natriumsuccinat | Sigma | 99% |
| Natriumsulfat | Roth | p.a. |
| Natriumtetrapropylborat | Galab/Merseburger | 98-99% |
| Natriumthioglycolat | Merck | p.a. |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat | Fluka | p.a. |
| Natriumvanadiumoxid-Monohydrat | Merck | p.a. |
| Nickelchlorid-Hexahydrat | Fluka | p.a. |
| Nicotinsäure | Fluka | ≥98% |
| p-Aminobenzoessäure | Sigma-Aldrich | ≥99% |
| Pyridoxinhydrochlorid | Roth | ≥99% |
| Quecksilber(II)chlorid | Sigma | ultrapure |
| Salpetersäure (69%) | Sigma | p.a. |
| Salzsäure (37%) | Roth | p.a. |
| Tetrametyldiamin (TEMED) | Sigma-Aldrich | 99% |

Material und Methode

| | | |
|---|------------------------|------|
| Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH 25% in Wasser) | Sigma-Aldrich | - |
| Thiaminhydrochlorid-Dihydrat | Sigma-Aldrich | ≥99% |
| Trisbase | Roth | p.a. |
| Triton X-100 | Fluka | p.a. |
| Zinkchlorid | Riedel-de Haën, Seelze | p.a. |

| Verwendete Nährmedien | Firma |
|----------------------------------|----------------------------|
| Casein Pepton, tryptisch verdaut | Roth |
| Fleischextrakt | Merck |
| Hefeextrakt | Hartge-Marcor, Hackeensäck |
| Sojaextrakt | Difco |
| Pepton | Roth |
| Trypton | Roth |

| Verwendete Gase | Firma | Reinheit |
|-----------------|--------------|----------|
| Helium | Westfalen AG | 6.0 |
| Argon | Westfalen AG | 4.6 |
| Sauerstoff | Westfalen AG | - |

2.3. *Eisenia foetida* als Modellorganismus

2.3.1. Kultur

Die in dieser Arbeit verwendete *Eisenia foetida* Kultur wurde im Aquaristikmarkt Juma in Mainz erworben. Die Kultivierung der Würmer erfolgte in großen Boxen, die mit Bodenmaterial aus dem Botanischen Garten der Universität Mainz gefüllt wurden. Hierbei handelte es sich um das gleiche Bodenmaterial, das in den nachfolgenden Inkubationsversuchen verwendet wurde, um eine Stabilität der Kultur zu gewährleisten. Alle drei bis vier Tage wurde der Wurmkultur ein Salatkopf sowie trockener Kaffeesatz zusammen mit den verwendeten Kaffeefiltern zugefügt. Die Kultur wurde alle zwei Tage mit ausreichend Wasser begossen, damit der Boden feucht, jedoch nicht nass war, um eine ausreichende Sauerstoffverfügbarkeit für die Würmer zu garantieren. Aus diesem Kulturansatz wurden die Würmer immer am entsprechenden Starttag der folgenden Versuche entnommen.

2.3.2. Versuchsansätze

Die Versuchsansätze mit den Würmern wurden in Kristallisierschalen (Schott, 20 cm Durchmesser, 5 cm Höhe) durchgeführt. Zuvor wurde der verwendete Boden mit einem 2 mm Sieb ausgesiebt, um ein homogenes Probenmaterial zu erhalten. Anschließend wurde die Kristallisierschale mit dem Material gefüllt und die eingesetzte Menge gewogen, um diese später im entsprechenden Verhältnis mit anorganischem Quecksilber zu versetzen. Hierzu wurde die entsprechende Menge Quecksilber aus einer Stammlösung in 200 ml Reinstwasser (MilliQ Wasser, Millipore, Eschborn) eingewogen und diese Lösung in jeweils einen Bodenansatz gegeben, um eine homogene Verteilung des Quecksilbers im Material zu gewährleisten. In den folgenden Kapiteln wird für die Zugabe von Quecksilber zu den jeweiligen Ansätzen der Ausdruck „gespikt“ verwendet. Dieser Ausdruck wird in der analytischen Chemie gebraucht, um die Zugabe von einem bestimmten Element zu einem Ansatz darzustellen.

Quecksilberstammlösung

| | |
|-------------------|-------|
| HgCl ₂ | 10 mg |
| HNO ₃ | 1 g |
| MilliQ Wasser | 99 g |

Die verwendete Bodenmenge lag in allen Ansätzen zwischen 500 und 800 g. Zu den jeweiligen Ansätzen wurden immer je 10 Würmer gegeben und diese 10 Tage in den Böden belassen.

Tab. 8: Bodenansätze für die Inkubationsversuche mit den Würmern.

| Boden Nr. | Hg Konzentration im Boden [mg/kg] | steril | unsteril |
|------------------------|-----------------------------------|--------|----------|
| 1, 2, 3, 4, 5, 6 | 1 - 8 | | + |
| 1a, 2a, 3a, 4a, 5a | 0 | | + |
| 1b, 2b, 3b, 4b,5b, 6b | 4 | | + |
| 1c, 2c, 3c, 4c, 5c, 6c | 0 | + | |
| 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d | 4 | + | |

Für die sterilen Versuchsansätze wurde das eingewogene Bodenmaterial zuerst in Aluminiumfolie eingepackt und anschließend autoklaviert (121 °C, 2 bar, 40 min). Um sicherstellen zu können, dass keine lebenden Mikroorganismen - besonders Sporenbildner - mehr im Boden sind, wurde der Ansatz einen Tag im Brutraum bei 30 °C inkubiert und anschließend erneut autoklaviert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und zum Schluss wurde eine Bodenprobe ausplattiert.

2.3.3. Gewebegewinnung

Für die Gewinnung von Gewebeproben von *Eisenia foetida* mussten die Individuen zuerst vorbereitet werden. Dafür wurden die Würmer zuerst in MilliQ-Wasser kurz gewaschen, um anhaftende Erde von diesen zu entfernen. Anschließend wurden die Würmer in 70%igen Ethanol überführt und für 30 s in diesem belassen. Nach dieser Behandlung wurden sie in eine flache 30 cm Glaspetrischale überführt, die mit MilliQ-Wasser gefüllt war. Mit einem Skalpell wurde der Kopfteil abgeschnitten und anschließend mit einer flachen Pinzette das restliche Bodenmaterial, welches sich im Darmtrakt des Wurms befand herausgedrückt. Das so gewonnene Wurmgewebe wurde in einen sterilen und mit Säure ausgespülten Porzellanmörser gegeben und direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das so eingefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser homogenisiert, bis ein feines Pulver entstand. Dieses wurde in säuregespülte Reaktionsgefäße (15 ml; Fa. Greiner) überführt und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

2.4. Mikrobiologische Methoden

2.4.1. Kulturmedien

In dieser Arbeit wurden größtenteils Flüssigmedien verwendet. Für die selektive Kultivierung und Isolierung der Mikroorganismen wurden auch feste Agarplatten gegossen. In diesen Fällen wurde zu dem jeweiligen Ansatz 16 g Agar auf einen Liter Medium gegeben.

Hefeextrakt-Medium

| | |
|-------------|---------|
| Hefeextrakt | 5,0 g/L |
| Glucose | 2,0 g/L |
| Pepton | 5,0 g/L |
| pH-Wert | 7,0 |

Bacillus-Medium

| | |
|----------------|---------|
| Fleischextrakt | 3,0 g/L |
| Pepton | 5,0 g/L |
| pH-Wert | 7,0 |

Für einige der folgenden Medien musste eine Bodenextrakt-Lösung zugegeben werden. Dafür wurde 400 g des gewünschten Bodens luftgetrocknet und anschließend eine Suspension mit 1000 ml demineralisiertem Wasser angesetzt. Diese Suspension wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung bei Raumtemperatur für einige Stunden abgekühlt und dann zentrifugiert um den Bodensatz zu entfernen. Die fertige Lösung konnte dann den jeweiligen Medien zugesetzt. Zur Aufbewahrung der übrigen Lösung wurde diese erneut autoklaviert. Zur Herstellung des Extraktes wurde Boden verwendet, der auch für die Kultivierung der Würmer eingesetzt wurde, um einheitliche Bedingungen für die Kultivierung der Darmorganismen vorliegen zu haben.

Glycerin-Boden-Medium

| | |
|----------------|----------|
| Pepton | 5,0 g/L |
| Fleischextrakt | 3,0 g/L |
| Glycerin | 20,0 g/L |
| Bodenextrakt | 150 mL |
| demin. Wasser | 850 mL |
| pH-Wert | 7,0 |

Rhizobium-Medium

| | |
|---------------|----------|
| Hefeextrakt | 1,0 g/L |
| Mannitol | 10,0 g/L |
| Bodenextrakt | 200 mL |
| demin. Wasser | 800 mL |
| pH-Wert | 7,0 |

Heterotrophic Medium H3P

Lösung A:

| | |
|---|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 2,3 g/L |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 2,9 g/L |
| demin. Wasser | 50 mL |

Lösung B:

| | |
|--|-----------|
| NH ₄ Cl | 1,0 g/L |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 g/L |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,01 g/L |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,005 g/L |
| NaVO ₃ x H ₂ O | 0,005 g/L |
| Spurenelementlösung | 5 mL |
| demin. Wasser | 850 mL |

Lösung C:

| | |
|---------------------|----------|
| Eisenammoniumcitrat | 0,05 g/L |
| demin. Wasser | 20 mL |

Lösung D:

| | |
|---------------------------|---------|
| Hefeextrakt | 1,0 g/L |
| Na-Acetat | 1,0 g/L |
| Na ₂ -Succinat | 1,0 g/L |
| DL-Malat | 1,0 g/L |
| demin. Wasser | 30 mL |
| pH-Wert | 7,0 |

Lösung E:

| | |
|---------------|---------|
| Na-Lactat | 1,0 g/L |
| Na-Pyruvat | 1,0 g/L |
| Mannitol | 1,0 g/L |
| Glucose | 2,0g/L |
| demin. Wasser | 50 mL |
| pH-Wert | 7,0 |

Material und Methode

Plate-Count-Medium

| | |
|-------------|---------|
| Trypton | 5,0 g/L |
| Hefeextrakt | 2,5 g/L |
| Glucose | 1,0 g/L |
| pH-Wert | 7,0 |

Mineral Medium

| | |
|--|----------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 3,5 g/L |
| KH_2PO_4 | 1,0 g/L |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,5 g/L |
| $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,1 g/L |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,05 g/L |
| Spurenelementlösung | 1 mL |
| pH-Wert | 7,25 |

Die C-Quellen (z.B. Glucose, Lactat, Acetat etc) wurden sterilfiltriert und dem Mineralmedium separat zugegeben (1 g/L).

Tryptisches Soja-Hefe-Medium

| | |
|-------------------------------|---------|
| Sojaextrakt tryptisch verdaut | 30 g/L |
| Hefeextrakt | 3,0 g/L |
| pH-Wert | 7,2 |

Spirillum-Medium

| | |
|---|-----------|
| Pepton | 10 g/L |
| Succinat | 1,0 g/L |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,0 g/L |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 1,0 g/L |
| $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,002 g/L |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 0,002 g/L |
| pH-Wert | 6,8 |

Lactobacillus-Medium

| | |
|--|----------|
| Casein Pepton, tryptisch verdaut | 10,0 g/L |
| Fleischextrakt | 10,0 g/L |
| Hefeextrakt | 5,0 g/L |
| Glucose x H ₂ O | 20 g/L |
| Tween 80 | 1,0 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 2,0 g/L |
| Na-Acetat | 5,0 g/L |
| (NH ₄) ₂ citrat | 2,0 g/L |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,20 g/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 0,05 g/L |
| pH-Wert | 6,3 |

Die bisher aufgelisteten Medien wurden zur Isolierung von aeroben Mikroorganismen verwendet, die nachfolgenden für die Isolierung von anaeroben.

Desulfotomaculum-Medium

| | |
|--|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g/L |
| MgCl ₂ x 6H ₂ O | 0,1 g/L |
| KCl | 0,2 g/L |
| NH ₄ Cl | 1,0 g/L |
| Na ₂ CO ₃ | 0,5 g/L |
| Na ₂ SO ₄ | 5,0 g/L |
| NaCl | 5,0 g/L |
| Na ₂ S x 9 H ₂ O | 0,5 g/L |
| Hefeextrakt | 1,5 g/L |
| Na-Formiat | 5,0 g/l |
| Vitamin Lösung | 10 mL |
| Spurenelementlösung | 1,0 mL |
| demin. Wasser | 989 mL |

Desulfobacter-Medium

Lösung A:

| | |
|--|-----------|
| Na ₂ SO ₄ | 3,0 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20 g/L |
| NH ₄ Cl | 0,30 g/L |
| NaCl | 21,0 g/L |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 3,00 g/L |
| KCl | 0,50 g/L |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,15 g/L |
| Resazurin | 0,001 g/L |
| demin. Wasser | 980 mL |

Lösung B:

| | |
|---------------------|--------|
| Spurenelementlösung | 1,0 mL |
|---------------------|--------|

Lösung C:

| | |
|--------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 2,50 g |
| eemin. Wasser | 50 mL |

Lösung D:

Entsprechende Kohlenstoffquelle (1 g/L): Glucose, Acetat, Lactat, Formiat, Malat

Lösung E:

| | |
|---------------|-------|
| Vitaminlösung | 10 mL |
|---------------|-------|

Lösung F:

| | |
|--|------|
| Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O (3 mg in 1 L 0.01 M NaOH) | 1 mL |
|--|------|

Lösung G:

| | |
|--|--------|
| Na ₂ S x 9 H ₂ O | 0,40 g |
| demin. Wasser | 10 mL |

Material und Methode

Lösung A wurde vorbereitet, mit Stickstoff begast und anschließend autoklaviert. Lösung C wurde sterilfiltriert und für 20 min mit Stickstoff begast. Die Lösungen B, D, E und F werden ebenfalls sterilfiltriert und begast. Lösung G wurde mit N₂ begast und anschließend autoklaviert. Anschließend wurden die Lösungen B bis G zu der abgekühlten Lösung A gegeben und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

MV-Medium

| | |
|--|------------|
| NH ₄ Cl | 1,0 g/L |
| Na ₂ SO ₄ | 2,0 g/L |
| Na-thiosulfat x 5 H ₂ O | 1,0 g/L |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 1,0 g/L |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,1 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g/L |
| Spurenelementlösung | 1,0 mL |
| Vitaminlösung | 10 mL |
| Hefeextrakt | 1,0 g/L |
| NaHCO ₃ | 2,0 g/L |
| Na-Pyruvat | 1,0 g/L |
| Na-Malat | 1,0 g/L |
| Resazurin | 0.0005 g/L |
| Na ₂ S x 9 H ₂ O | 0,075 g/L |
| demin. Wasser | 990 mL |

Die Reagenzien wurden im demin. Wasser gelöst und für 1 min gekocht und anschließend bei Raumtemperatur mit N₂ begast. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Lösung autoklaviert.

Desulfovibrio- Medium

Lösung A:

| | |
|--|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g/L |
| NH ₄ Cl | 1,0 g/L |
| Na ₂ SO ₄ | 1,0 g/L |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,1 g/L |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,0 g/L |

Material und Methode

| | |
|---------------|-----------|
| DL-Na-Lactat | 2,0 g/L |
| Hefeextrakt | 1,0 g/L |
| Resazurin | 0,0001g/L |
| demin. Wasser | 980 mL |

Lösung B:

| | |
|--|-------|
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 g |
| demin. Wasser | 10 mL |

Lösung C:

| | |
|-----------------|-------|
| Na-Thioglycolat | 0,1 g |
| Ascorbinsäure | 0,1 g |
| demin. Wasser | 10 mL |

Die Lösungen wurden separat in demin. Wasser gelöst. Lösung A wurde zuerst noch kurz aufgekocht und nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Lösungen B und C zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,8 eingestellt und das Medium mit N₂ begast und autoklaviert.

Spurenelementlösung

| | |
|---|-----------|
| HCl (25%; 7,7 M) | 10 mL |
| FeCl ₂ x 4 H ₂ O | 1,5 g/L |
| ZnCl ₂ | 0,07 g/L |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 0,1 g/l |
| H ₃ BO ₃ | 0,06 g/L |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,19 g/L |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,02 g/L |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,024 g/l |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,036 g/L |
| demin. Wasser | 990 mL |

Vitaminlösung

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Biotin | 0,002 g/L |
| Folsäure | 0,002 g/L |
| Pyridoxin-HCl | 0,01 g/L |
| Thiamin-HCl x 2 H ₂ O | 0,005 g/L |
| Riboflavin | 0,005 g/L |
| Nicotinsäure | 0,005 g/L |
| D-Ca-Panthothensäure | 0,005 g/L |
| p-Aminobenzoesäure | 0,005 g/L |
| Liponsäure | 0,005 g/L |

2.4.2. Isolierung von Mikroorganismen aus dem Wurmdarm

Für die Kultivierung der Mikroorganismen aus dem Wurmdarm, wurden die unter 2.4.1. angegebenen Medien verwendet. Zuerst wurden jeweils einige Individuen aus den Kulturansätzen entnommen und für die Extraktion vorbereitet. Anschließend erfolgte die Isolierung unter sterilen Bedingungen im Labor. Dafür wurden verschiedene Lösungen benötigt:

Phosphatpuffer pH 7

| | |
|----------------------------------|----------|
| Na ₂ HPO ₃ | 5,2 g/L |
| KH ₂ PO ₃ | 10,8 g/L |

Ethanol 70%ig (v/v)

| | |
|------------------|--------|
| Ethanol (100%ig) | 700 mL |
| MilliQ-Wasser | 300 mL |

Für die aeroben Mikroorganismen wurden die Würmer am Bunsenbrenner unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Dafür wurden sie zuerst in steriles MilliQ-Wasser überführt, um restliches Bodenmaterial von diesen zu entfernen. Anschließend erfolgte der Transfer in 70%iges Ethanol und nach 30 s wurden die Würmer in eine sterile Petrischale überführt, in welcher der sterile Phosphatpuffer enthalten war. Mit

einem sterilen Skalpell wurden die Individuen aufgeschnitten und der Darmtrakt von dem Bodenmaterial entfernt. Für die Isolierung der Mikroorganismen wurde jeweils ein Stück des Darmepithels herausgeschnitten und in die in 2.4.1 genannten aeroben Medien überführt. Von diesen Medien wurden zuvor jeweils 10 ml in sterile Reagenzgläser gefüllt. Die so angeimpften Medien wurden dann im 30 °C Brutraum inkubiert. Für die anaerobe Isolierung von Mikroorganismen wurde die gleiche Prozedur verwendet allerdings erfolgte die Extraktion im Anaerobenzelt (Töpfer Lab Systems, Göttingen). Die verwendeten Medien (20 mL) wurden in Bormioli-Gefäße (Ochs Glasgeräte, 100 mL) überführt und nach Beimpfung mit einem Darmepithelstück mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 30 °C im Brutraum.

Die angeimpften Medien wurden regelmäßig überprüft und sobald eine Trübung erkennbar war, wurden die Kulturen auf einer Agarplatte des jeweiligen Mediums mittels 3-Strich Technik ausgestrichen um Einzelkolonien zu erhalten. Nachdem auf den Agarmedien Kolonien sichtbar waren, wurden von diesen jeweils weitere Verdünnungsausstriche gemacht, um Reinkulturen zu erhalten. Diese Prozedur wurde zwei bis dreimal wiederholt. Für die anaeroben Kulturen wurde die Agarverdünnungsmethode (Widdel und Bak, 1992) verwendet, um Reinkulturen zu erhalten. Dafür wurde in einem anaerobisiertem Reagenzglas 3 mL steriler Agar, 6 mL der jeweiligen Medien und 1 mL der Kultur gegeben. Aus diesem Ansatz wurde wiederum 1 mL entnommen und erneut in 3 mL Agar und 6 mL Medium gegeben. Diese Prozedur wurde 4mal wiederholt um eine geeignete Verdünnung zu erhalten. Die Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und sobald ein Wachstum zu erkennen war wurde im Anaerobenzelt die jeweilige Kultur in ein Flüssigmedium überimpft.

2.4.3. DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung aus den erhaltenen Kulturen wurden zwei verschiedene Extraktions-Kits verwendet. Bei der Extraktion aus Reinkulturen ergab das Kit von Invitrogen die besten Ergebnisse. Im Fall der Mischkulturen konnte mit dem Kit von Quiagen die DNA isoliert werden.

Invitrogen Kit: ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit

Die Extraktion bei dem Kit von Invitrogen beruht auf der Änderung der Ladung der magnetischen Beads bei einer Veränderung des pH-Werts. Bei niedrigen pH-Werten hat die Oberfläche der Beads eine positive Ladung und die DNA der Mikroorganismen nach deren Aufschluss kann an diese binden, da diese eine negative Gesamtladung besitzt. Proteine und andere Verunreinigungen wie z.B. durch die verwendeten Medien, in denen die Organismen wachsen, können nicht an die geladenen Beads binden. Diese Kontaminationen können dann anschließend mit einem wässrigen Puffer herausgewaschen werden, während die magnetischen Beads mit der gebundenen DNA an die Seite eines magnetischen Gestells (MagneticRack) gezogen werden. Um die DNA von den Beads zu entfernen, wird ein Puffer mit einem pH-Wert von 8,5 verwendet, der die Ladung des Beads neutralisiert und die DNA von diesen löst. Mit dieser Extraktions-Methode erhält man DNA, die direkt für eine PCR geeignet ist.

Methode:

Für die Extraktion der DNA mit dem Invitrogen Kit, wurden die mitgelieferten Puffer verwendet. Die einzige Lösung, die noch hergestellt werden musste, war eine frische Lysozym Lösung (50 mg/mL; Lysozym aus Hühnereiweiß, Fluka).

Zell-Lyse:

Für die Zelllyse wurden 0,5 ml einer Bakterienkultur in ein Eppendorfggefäß überführt und bei 8000 rpm (6000 G) (Eppendorf Tischzentrifuge, 5415D) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl des Resuspensions-Puffers aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl der Lysozymlösung zu der Suspension erfolgte anschließend eine Inkubation dieser für 10 bis 20 min bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde zu dem Ansatz 500 µl des Lyse-Puffers gegeben und 10 µl der Invitrogen Proteinase K-Lösung. Diese Suspension inkubierte 20 min bei 55 °C und anschließend für 1,5 h bei 88 °C.

Material und Methode

Bindung der DNA:

Zu der lysierten Bakteriensuspension wurden 40 μl der ChargeSwitch Magnetic Beads gegeben und 300 μl des Binding Puffers. Diese Lösung wurde invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Eppendorfgefäß in einen magnetischen Halter (MagnaRag) gestellt und gewartet bis sich die Beads an die Seite des Gefäßes gelagert hatten. Anschließend konnte der Überstand abgenommen werden.

Waschen der DNA:

Das Waschen der Magnetic Beads erfolgte mit dem Washing Puffer. Dazu wurde zu den Beads 1 mL des Puffers gegeben und die Suspension invertiert. Anschließend konnte das Gefäß wieder in das magnetische Gestell gestellt und die Waschlösung entnommen werden. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt.

Elution der DNA:

Die Elution der DNA von den Beads erfolgte mit dem Invitrogen Elution-Puffer. Zu den gewaschenen Beads wurde die entsprechende Menge an Elutions-Puffer gegeben (20 - 50 μl) und invertiert. Die Suspension inkubierte 10 min bei Raumtemperatur und wurde anschließend in das magnetische Gestell überführt. Nachdem sich die Beads abgesetzt hatten, konnte der Überstand entnommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt werden. Die so gewonnene DNA wurde bis zur PCR bei -20°C gelagert.

Quiagen Kit: DNeasy Blood & Tissue Kit

Ähnlich dem Invitrogen Kit beruht auch bei dem Quiagen Kit die Isolierung der DNA auf deren Ladungszustand bei unterschiedlichen pH-Werten. Nach der Lyse der Bakterien erfolgt ein Einstellen des pH-Wertes mittels der beigefügten Puffer. Im Gegensatz zu dem Invitrogen Kit erfolgt die Bindung der DNA an eine Membran, die in ein spezielles Zentrifugengefäß eingelassen ist. Durch das Einstellen des pH-Wertes kann die geladene DNA an die Membran binden und so aus dem Zellysat

Material und Methode

entfernt werden. Die Elution der extrahierten und gebundenen DNA erfolgt durch eine Veränderung des pH-Wertes in den basischen Bereich.

Methode:

Für die Extraktion der DNA mit dem Quiagen Kit wurden die mitgelieferten Puffer verwendet. Die einzige Lösung die noch hergestellt werden musste, war ein Lyse Puffer.

Lyse-Puffer

| | |
|--------------|----------|
| Tris-HCl | 9,68 g/L |
| EDTA | 0,58 g/L |
| Triton X-100 | 12 mL/L |

Zell-Lyse:

Zuerst wurden 0,5 bis 1,0 ml einer Bakterienkultur abgenommen und in einem Eppendorfgefäß für 10 min bei 5000 rpm (2300 G) (Eppendorf Tischzentrifuge, 5415D) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in 180 µl des Lyse Puffers aufgenommen werden. Die Suspension wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde 25 µl der Proteinase K-Lösung zugegeben und 200 µl des AL Puffers. Die Lösung wurde bei 56 °C für 30 bis 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 200 µl reinen Ethanols und die Lösung wurde in die Quiagen Membran-Tubes überführt.

DNA-Extraktion:

Nach Überführen der lysierten Bakterienkultur in die Membran Tubes wurden diese für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die DNA binden konnte. Anschließend wurde das Tube bei 8000 rpm (6000 G) (Eppendorf Tischzentrifuge, 5415D) für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Membran Tube in ein neues Auffanggefäß überführt.

Material und Methode

Waschen der DNA:

Für das Waschen der DNA wurden 500 µl des Waschpuffers AW1 in das Membran Tube gegeben und dieses erneut für 1 min bei 8000 rpm (6000 G) (Eppendorf Tischzentrifuge, 5415D) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend ein zweites Mal mit 500 µl des AW2 Puffers gewaschen. Das Tube wurde für 3 min bei 13000 rpm (\geq 10000 G) (Eppendorf Tischzentrifuge, 5415D) zentrifugiert und danach der Durchfluss verworfen.

Elution der DNA:

Das Membran Tube wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die entsprechende Menge an Elutionspuffer (20 - 50 µl) zugefügt. Nach 10 min Inkubation wurde erneut zentrifugiert und das Eppendorfgefäß mit der eluierten DNA bei -20 °C gelagert.

2.4.4. PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Dabei wird mit einem spezifischen Primerpaar das gewünschte Fragment flankiert und mittels der Taq-Polymerase die DNA komplementär zu dem freien Strang repliziert. Diese Methode wird heutzutage fast in jedem Gebiet der Naturwissenschaften, welches mit DNA arbeitet, angewendet. Dies beruht darauf, dass mit dieser Methode schnell und auch einfach DNA vervielfältigt werden kann. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit zwei spezifischen Primerpaaren gearbeitet. Diese flankierten ein Stück der 16S rDNA, die für die Identifikation von Eubakterien zu Hilfe genommen wird.

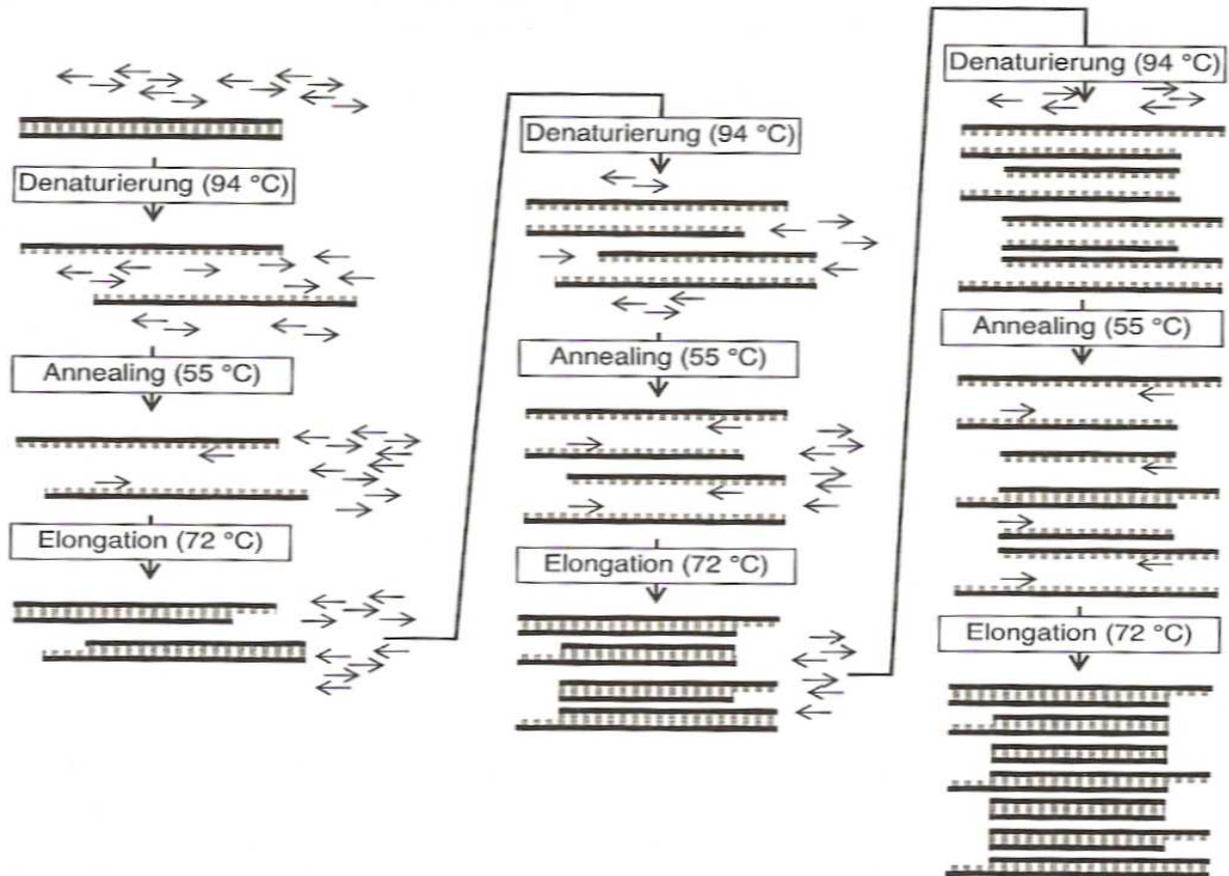


Abb. 3: Prinzip der PCR aus Mülhardt (2003).

Primer:

Die für die PCR verwendeten Primer binden spezifisch in konservierten Regionen der 16S rDNA und sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Verwendete PCR-Primer.

| Primer | Sequenz 5'-3' | Bindestelle der 16S rDNA nach <i>E.coli</i> |
|------------|-------------------|---|
| EuBak3 rev | AGAAAGGAGGTGATCC | 1544-1529 |
| EuBak5 for | AGAGTTTGATCMTGGCT | 8-25 |
| Eubak519f | CAGCAGCCGCGGTAATA | 519-533 |
| Eubak1070r | AGCTGACGACAGCCAT | 1055-1070 |

Material und Methode

PCR-Ansatz/Reagenzien:

Für die PCR Ansätze wurden die Reagenzien von Invitrogen verwendet. Dabei enthielt der Taq-Polymerase Kit folgende Komponenten:

- 10 x PCR-Puffer (ohne Magnesium)
- $MgCl_2$
- Taq-Polymerase

Die dNTPs wurden ebenfalls von Invitrogen bezogen. Das Nukleotid Kit enthielt die einzelnen Nukleotide welche auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurden. In Tabelle 10 ist ein Pipettierschema für einen PCR-Ansatz gezeigt. Bei den verschiedenen PCR Reaktionen wurde nur die Konzentration an DNA-Template variiert, da eine Veränderung der anderen Konzentrationen zu keiner Verbesserung der PCR führte.

Tab 10: Pipettierschema für einen 50 μ l PCR-Ansatz.

| Wasser | Puffer | MgCl | dNTPs | Primer 1 | Primer 2 | DNA- Template | Taq- Polymerase |
|--------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------------|--------------------|
| 36,5 μ l | 5 μ l | 1,5 μ l | 1 μ l | 2,5 μ l | 2,5 μ l | 1 - 3 μ l | 0,2 μ l |

PCR-Programm:

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 11 und 12 mit den jeweiligen Primern angegeben. Für alle PCR-Reaktionen wurde eine Touchdown-Variante verwendet, da mit dieser Methode die besten Ergebnisse erzielt wurden. Zu Beginn der Arbeit wurden auch andere Programme verwendet, da diese aber zu keinen brauchbaren Ergebnissen führten, wurden diese durch eine Touchdown-PCR ersetzt. Aus diesem Grund sind in den Tabellen 10 und 11 auch nur die Touchdown Programme aufgeführt.

Tab.11: Verwendetes Touchdown-PCR Programm für 530 Basenpaare der 16S rDNA.

| PCR-Touchdown mit Primerpaar Eubak 519 for/Eubak 1070 rev | | | |
|--|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Nr. | Reaktionsschritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] |
| 1 | Vordenaturierung | 95 | 10 |
| 2 | Denaturierung | 94 | 1 |
| 3 | Annealing | 60 | 1 |
| Temperaturrampe – 0,5°C pro Cycle | | | |
| 4 | Amplifizierung | 72 | 1 |
| 15 Cyclen beginnend bei Nr. 2 | | | |
| 5 | Denaturierung | 94 | 1 |
| 6 | Annealing | 56 | 1 |
| 7 | Amplifizierung | 72 | 1 |
| 15 Cyclen beginnend bei Nr. 5 | | | |
| 8 | Endamplifizierung | 72 | 10 |

Mit diesem PCR Programm war es möglich DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 530 Basenpaaren zu erhalten. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für eine genauere Sequenzbestimmung zur Identifizierung der einzelnen Mikroorganismen wurde ein weiteres PCR-Programm verwendet, bei dem mit den verwendeten Primerpaar ein ca. 1000 Basenpaar großes Fragment erhalten wurde. Der Unterschied des Programms lag in der verwendeten Annealing Temperatur in der zweiten Zyklenswiederholung. Dabei wurde diese für die jeweiligen Primerpaare auf ihr Optimum angepasst. Das dafür verwendete Programm ist in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 12: Verwendetes Touchdown-PCR Programm für 1000 Basenpaare der 16S rDNA.

| PCR-Touchdown mit Primerpaar Eubak 5 for/Eubak 1070 rev | | | |
|--|-------------------------|------------------------|-------------------|
| Nr. | Reaktionsschritt | Temperatur [°C] | Zeit [min] |
| 1 | Vordenaturierung | 95 | 10 |
| 2 | Denaturierung | 94 | 1 |
| 3 | Annealing | 60 | 1 |
| Temperaturrampe – 0,5°C pro Cycle | | | |
| 4 | Amplifizierung | 72 | 1 |
| 15 Cyclen beginnend bei Nr. 2 | | | |
| 5 | Denaturierung | 94 | 1 |
| 6 | Annealing | 54 | 1 |
| 7 | Amplifizierung | 72 | 1 |
| 15 Cyclen beginnend bei Nr. 5 | | | |
| 8 | Endamplifizierung | 72 | 10 |

2.4.5. Gelelektrophorese

Um zu kontrollieren, ob die PCR die gewünschten DNA-Fragmente amplifiziert hatte, wurde der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 70 - 90V (je nach gewünschter Auftrenngeschwindigkeit) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad gelegt und für 10 - 15 min gefärbt. Die Auswertung erfolgte unter eine Geldokumentationsanlage (BioVison CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell).

Bei Reinkulturen wurden die DNA-Fragmente mittels des Quiagen Purification Kit aufgereinigt und direkt zur Sequenzierung eingeschickt (MWG Eurofin). Bei Mischkulturen wurden die erhaltenen Fragmente erst einer DGGE unterzogen um die möglichen multiplen Banden anhand von Sequenzunterschieden aufzutrennen (siehe Abschnitt 2.4.6.).

2.4.6. Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese

Bei der Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) werden DNA-Fragmente nicht anhand ihrer Größe (Basenpaarlänge) aufgetrennt, sondern anhand ihres Schmelzpunktes. Dabei nutzt man die Tatsache, dass DNA-Fragmente nicht auf einmal denaturieren, sondern in Schmelzdomänen unterteilt werden können, die unterschiedliche Schmelztemperaturen besitzen. Diese teilweise denaturierten Fragmente zeigen dann in einer Elektrophorese ein verändertes Laufverhalten. Dafür wird ausgenutzt, dass sich DNA-Fragmente in ihrer Sequenz unterscheiden und somit auch in ihrem Schmelzverhalten. Mit dieser Methode können sogar Punktmutationen in identischen DNA-Fragmenten nachgewiesen werden, da schon diese eine Änderung im Schmelzverhalten hervorrufen. Für die Trennung wird ein Polyacrylamidgel verwendet, in das ein denaturierender Gradient aus Harnstoff und Formamid eingegossen wird. Um die Fragmente im teilgeschmolzenen Zustand zu halten, wird eine DGGE bei 50 – 60 °C durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, um die erhaltenen PCR-Produkte der Mischkultur Ansätze anhand ihrer Sequenz aufzutrennen. Dafür wurde das System von BioRad (DGGE Maxi) verwendet. Zuerst war es notwendig, die Gelplatten gut mit Ethanol zu säubern, damit an diesen keinerlei Verschmutzung wie z.B. Fett haftet um ein optimales Gel zu erhalten. Die für die Gele benötigten Chemikalien und Puffer können aus der Tabelle 13 und 14 entnommen werden.

Tab. 13: Verwendete Puffer.

| TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 50X | |
|--|---------|
| Trisbase | 242 g/L |
| Eisessig | 57,1 mL |
| 0,5 M EDTA-Lösung | 100 mL |
| pH | 7,4 |

| APS (Ammoniumpersulfatlösung) | |
|-------------------------------|--------|
| Ammoniumpersulfat | 2,28 g |
| demin. Wasser | 10 mL |

Tab.14: Zusammensetzung der 60 – 40 % Gele und der 30 – 70 % Gele.

| Substanz | Lösung A 30 % | Lösung B 70 % | Lösung A 40 % | Lösung B 60 % |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Harnstoff [g] | 2,14 | 5 | 2,85 | 4,29 |
| Formamid [mL] | 2,04 | 4,76 | 2,72 | 4,08 |
| Acrylamid/Bisacrylamid [mL] | 2,77 | 2,77 | 2,77 | 2,77 |
| TAE Puffer 50X [mL] | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 |
| demin. Wasser | 10,15 | 5,17 | 9,6 | 6,9 |
| 1 M APS [μ l] | 100 | 100 | 100 | 100 |
| TEMED [μ l] | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 |

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einem 0,2%igen Ethidiumbromidbad für ca. 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 1xTAE Puffer für weitere 30 Minuten. Nach den Färbeschritten wurde das Gel mit der Geldokumentationkammer ausgewertet und die erhaltenen Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde dann wie in 2.4.7. beschrieben aus dem Gel eluiert.

2.4.7. Elution der DNA aus dem DGGE-Gel

Die DNA in den ausgeschnittenen Banden aus dem DGGE Gel mussten zuerst aus diesem eluiert werden. Dafür wurden diese in ein steriles Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt und mit 50 – 100 µl PCR Wasser versetzt. Dieser Ansatz wurde übernacht bei 4 °C gelagert und die DNA aus dem Gel eluiert. Diese konnte am folgenden Tag erneut mit einer PCR amplifiziert werden und wurde vor der Aufreinigung für die Sequenzierung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Wenn das Gel eine Bande aufwies, erfolgten die Aufreinigungen und das Einsenden der Fragmente zu MWG-Eurofin (Ebersberg) für die Sequenzierung.

2.4.8. Aufreinigung der DNA

Zur Aufreinigung der DNA Fragmente für eine anschließende Sequenzierung wurde das QIAquick Spin Purification Kit verwendet. Dabei wird wie bei der DNA-Extraktion die Eigenschaft von DNA ausgenutzt, bei einem pH-Wert von $\geq 7,5$ negativ geladen vorzuliegen und so an die Kit-Membran zu binden. Fragmente die kleiner als 100 bp lang sind, werden nicht an die Membran gebunden und gelangen so in den Durchfluss. Zuerst wurde die amplifizierte DNA Probe mit dem 5 fachen an Puffer PBI versetzt. Die Lösung wurde invertiert und anschließend in die bereitgestellten Spin Columns gegeben. Nach 1 minütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm (16000 G) wurde der Durchfluss verworfen und 200 µl an Waschpuffer PE zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm (16000 G) wurde der Durchfluss verworfen und das Spin Column noch einmal ohne Zugabe eines Puffers zentrifugiert, um überschüssiges Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die gebundene DNA mit dem Elutions-Puffer EB (20 µl) in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert, indem dieses bei 13000 rpm (16000 G) für 2 min zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde bei -20 °C aufbewahrt oder direkt zur Sequenzierung geschickt.

2.4.9. Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte bei der Firma MWG-Eurofin (Ebersberg). Es wurden jeweils 20 µl der aufgereinigten Probe mit dem entsprechenden Primer eingesendet. Nach ca. 3 Tagen konnte das Ergebnis abgerufen werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm GeneDoc ausgewertet und der Stammbaum mit dem Programm ClustalX erstellt.

2.5. Analytische Methoden

Wie schon in der Einleitung erwähnt, haben sich in den letzten Jahren die Methoden zur Bestimmung von Elementen im Ultraspurenbereich stark weiterentwickelt. Doch nicht nur die Detektion hat sich weiterentwickelt, sondern auch neue Extraktions- und Separationsmethoden haben sich gleichzeitig etabliert. In dieser Arbeit wurden zwei den zu extrahierenden Proben angepasste Methoden angewendet. Als Separationsmethode wurde die Kapillar-Gaschromatographie verwendet. Diese wurde hauptsächlich ausgewählt, da damit schon geringe Konzentrationen eines Analyten im Gegensatz zur HPLC detektiert werden können. Für die Detektion der einzelnen Quecksilberspezies wurden die Atom-Fluoreszenz-Spektrometrie und auch die Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie verwendet. In den folgenden Abschnitten wird genauer auf die Extraktions-, die Separations- und auch die Detektionsmethoden eingegangen.

2.5.1. Extraktionsmethoden

Die Extraktionsmethode spielt eine entscheidende Rolle für die Messung von Methylquecksilber. Im Laufe der letzten Jahre sind viele unterschiedliche Methoden entwickelt worden, jedoch muss für jede Matrix eine andere Prozedur verwendet werden, um die bestmögliche Ausbeute zu erhalten. Eine der ersten Methoden zur Extraktion von Methylquecksilber aus Lebensmitteln wurde von Westöö (1966, 1967, 1968) entwickelt. Dabei wird das Probenmaterial mit einer 6 M HCl behandelt,

wodurch das Methylquecksilber von der Probenmatrix als Methylquecksilberchlorid freigesetzt wird. In einem nachfolgenden Schritt wird das Methylquecksilberchlorid in eine organische Phase überführt, damit der überwiegende Teil an Hg^{2+} und auch Überreste der Probenmatrix entfernt werden. Als Lösungsmittel verwendete Westöö Benzol. In späteren Arbeiten wurde dieses durch ungiftigere Lösungsmittel wie z.B. Toluol (Longbottom et al., 1973), Hexan oder auch Dichlormethan ersetzt. Diese selektive Extraktion der organischen Quecksilberverbindung beruht auf der chemischen Reaktion, dass anorganisches Quecksilber einen Tetrachloromercurat(II)-Komplex ($[\text{HgCl}_4]^{2-}$) mit Halogenidionen bildet und eine höhere Affinität zu hydrophilen Lösungsmittel als zu hydrophoben besitzt. Das organische Quecksilber bindet nur ein Halogenidion und ist somit unpolarer und kann in der organischen Phase besser in Lösung gehen als in der wässrigen. Gegenüber der sauren Extraktionsmethode mit HCl gibt es noch die alkalischen Methoden wie z.B. mit KOH/Methanol oder auch mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH). Eine weitere Methode ist die enzymatische Lyse mit Trypsin. Für biologische Proben haben sich die Extraktionsmethoden mit methanolischer Kali- oder Natronlauge (Ebinghaus et al., 1994) und mit TMAH (Poperechna und Heumann, 2005a; 2005b) als besonders effektiv erwiesen. In der Arbeit von Fischer et al. (1993) konnte festgestellt werden, dass die Extraktion mit KOH/Methanol gut geeignet ist, um biologische Matrices wie z.B. Fischleber oder Fischfilet aufzuschließen und Back et al. (1995) verwendeten diese Extraktion für Zooplankton. TMAH wurde von Chytyk (2001) zur Extraktion von Arsenspezies aus biologischen Matrices verwendet, so wie von Poperechna und Heumann (2005a; 2005b) für Bleiverbindungen aus Fischgewebekompositat. Ebinghaus et al. (1994) führten Stabilitätsuntersuchungen von Methylquecksilber in einer 20%igen TMAH-Lösung durch und konnten zeigen, dass das Methylquecksilber mindestens 10 Tage stabil in der Lösung vorliegt.

Auch erwies sich die Homogenisierung und Gefriertrocknung des verwendeten Gewebes für eine effektivere Freisetzung der Quecksilberspezies von Vorteil (Back et al., 1995). Durch den Wasserentzug bei der Gefriertrocknung und anschließender Zugabe der Extraktionslösungen ist die Wirkung stärker, da diese schneller und auch tiefer in das Probenmaterial eindringen kann.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Extraktionsmethoden verwendet, wobei diese auf die jeweilige Probenmatrix angepasst waren. Für das Wurmgewebe wurde

Material und Methode

die Extraktionsmethode mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH, 25%ig in Wasser, Fluka) ausgewählt, da dieses, wie schon erwähnt, besonders gute Ergebnis bei biologischen Geweben aufweist (Poperechna und Heumann, 2005a; 2005b). Für die Bakterienkulturen wurde die Extraktion mit KOH/Methanol verwendet, die mit einem Zusatz von Kupfer(II)sulfat und Natriumoxalat eine verbesserte Ausbeute von Methylquecksilber in Anwesenheit von Sulfid ergibt (Yang et al., 2009). In der Abbildung 4 ist ein Schema der verwendeten Extraktionsmethoden dargestellt. In der Tabelle 15 sind die für die beiden Extraktionsmethoden verwendeten Puffer aufgeführt. Hier musste speziell darauf geachtet werden, dass diese quecksilberfrei waren, da jede kleinste Verunreinigung zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen konnte. Aus diesem Grund wurden alle Puffer und benötigten Reagenzien soweit möglich frisch angesetzt und auch bei jeder Messung Blindproben von einigen der verwendeten Lösungen mitgeführt.

Tab. 15: Puffer und Lösungen

| | |
|----------------------------|------------------|
| Acetatpuffer | pH 5,6 |
| Natriumacetat | 0,820 g |
| Eisessig | 0,601 g bzw. mL |
| MilliQ-Wasser | 99,499 g bzw. mL |
| 10%ige HNO ₃ | |
| 65-69%ige HNO ₃ | 10 mL |
| MilliQ-Wasser | 100 mL |
| NaOH (1 molar) | |
| Natriumhydroxid | 40 g |
| MilliQ-Wasser | 1 L |
| KOH/Methanol | |
| KOH | 25 g |
| Methanol | 100 mL |

Derivatisierungsreagenz/Natriumtetrapropylborat (2%ig)

| | |
|-------------------------|-------|
| Natriumtetrapropylborat | 1 g |
| MilliQ Wasser | 50 mL |

Kupfersulfat/Natriumoxalatlösung

| | |
|---------------|--------|
| Kupfersulfat | 0,24 g |
| Natriumoxalat | 0,4 g |
| MilliQ-Wasser | 10 mL |

Das Derivatisierungsreagenz wurde aufgrund der leichten Entzündlichkeit mit Sauerstoff im Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Töpfer Lab System, Göttingen) angesetzt. Die Lösung wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße (15 ml; Greiner) überführt und sofort bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden Reste der Lösung direkt entsorgt, da das Derivatisierungsreagenz schnell seine Aktivität verliert. Dies war auch der Grund warum immer nur kleine Mengen angesetzt wurden.

Extraktion des Wurmgewebes:

Für die Extraktion der Quecksilberspezies aus dem homogenisierten und gefriergetrockneten Wurmgewebe wurde TMAH verwendet. Da die Quantifizierung mittels der empfindlichen Isotopenverdünnungsmethode erfolgte, war es bei dieser Extraktion notwendig, dass die einzelnen Dosierungsschritte möglichst genau mit Hilfe einer Waage erfolgten. Zuerst wurde auf der Analysenwaage (Sartorius analytic A 120 S) eine geringe Menge (15 - 30 mg) des Wurmgewebes in ein säuregespültes Glaszentrifugenröhrchen (20 ml mit einem NS15 Glasschliffstopfen) überführt. Zu diesem wurde ca. 3g TMAH zugegeben und anschließend der Methylquecksilberisotopenstandard (ERM-CE464). Die Extraktionslösung wurde 2 h auf einem Überkopfschüttler (GFL 3040) inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Lösung mit 500 µl Acetatpuffer und 400 µl konz. HNO₃ (65%ige HNO₃, Fluka) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 10%iger HNO₃ oder 1 molarer NaOH auf 5,0 eingestellt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes wurde 1 mL Hexan und 500 µl Natriumtetrapropylborat (NaPr₄B) zu der Lösung gegeben (Poperechna und Heumann, 2005b). Die Behälter mit der Lösung wurden sofort

wieder auf den Überkopfschüttler befestigt und für 10 min geschüttelt. Zum Abtrennen der Hexan- und der wässrigen Phase wurden die Behälter anschließend bei 4000 rpm (3200 G) zentrifugiert (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0). Das Abnehmen der Hexanphase erfolgte mit Pasteurpipetten, die eine Füllung aus Glaswolle und Aluminiumoxid enthielten, um noch größere Partikel abzutrennen. Die so gewonnene Hexanphase konnte dann mittels GC-ICP-MS gemessen werden. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Extraktion der Bakterienkulturen:

Die für die Screeningversuche verwendeten Bakterienisolate wurden in dem gleichem Kulturmedium mit dem sie angereichert wurden, auch mit Quecksilber angeimpft. Dafür wurde die isolierte Kultur in eine frisches und säure gespültes Bormioli-Gefäß mit dem entsprechenden Medium überführt und aus der Quecksilber (Hg^{2+}) Stammlösung die gewünschte Menge zugegeben. Für die Versuche wurde immer eine Konzentration von 1 ppm (1 mg/kg) an Quecksilber eingestellt. Die Reinkulturen der aeroben Mikroorganismen wurden wie das Wurmgewebe, mit TMAH extrahiert. Dazu wurden 5 mL der Kulturlösung in 15 mL Greinergefäße überführt und direkt mit 3 mL TMAH versetzt. Ein Isopenstandard wurde hier nicht zugegeben. Die Extraktionslösung wurde anschließend für zwei Stunden geschüttelt und danach der pH-Wert auf 5,0 eingestellt, wie zuvor bei dem Wurmgewebe beschrieben. Nach dem Einstellen des pH-Wertes wurde zu der Lösung 1 ml Hexan und 500 µl NaPr_4B zugegeben und erneut für 10 min geschüttelt. Durch Zentrifugieren wurde die Hexanphase abgetrennt, abgenommen und mittels der GC-AFS auf Quecksilber untersucht. Bei den anaeroben Mischkulturen, die aus dem Darmepithel von *Eisenia foetida* gewonnen wurden, konnten mit dieser Extraktionsmethode keine vollständig klare Lösungen, im Gegensatz zu dem Wurmgewebe und den Reinkulturen erhalten werden. Hier musste aufgrund der hohen Menge an Sulfid eine andere Extraktionsmethode angewendet werden. Aus diesem Grund wurde mit methanolischer Kalilauge die Extraktion durchgeführt (Yang et al., 2009). Dazu wurde 5 ml der Kultur in ein 50 ml Greinergefäße überführt und 2 ml der KOH/Methanol Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Gefäße in ein Wasserbad mit 75 °C überführt und für drei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden diese bei Raumtemperatur abgekühlt, 600 µl Acetatpuffer zugegeben und

der pH-Wert mit HNO_3 auf 5,0 eingestellt. Die Lösung wurde dann auf 25 mL mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Für die Derivatisierung der Quecksilberverbindungen wurde zuerst 1 mL der Kupfersulfat/Natriumoxalat Lösung zu dem Ansatz gegeben und anschließend 500 μL NaPr_4B und 1 mL Hexan. Nach 10 min Schütteln und Abzentrifugieren bei 4000 rpm (3200 G) wurde die Hexanphase abgenommen und für die Messungen verwendet. In der Abbildung 3 sind die beiden verwendeten Extraktionsmethoden dargestellt.

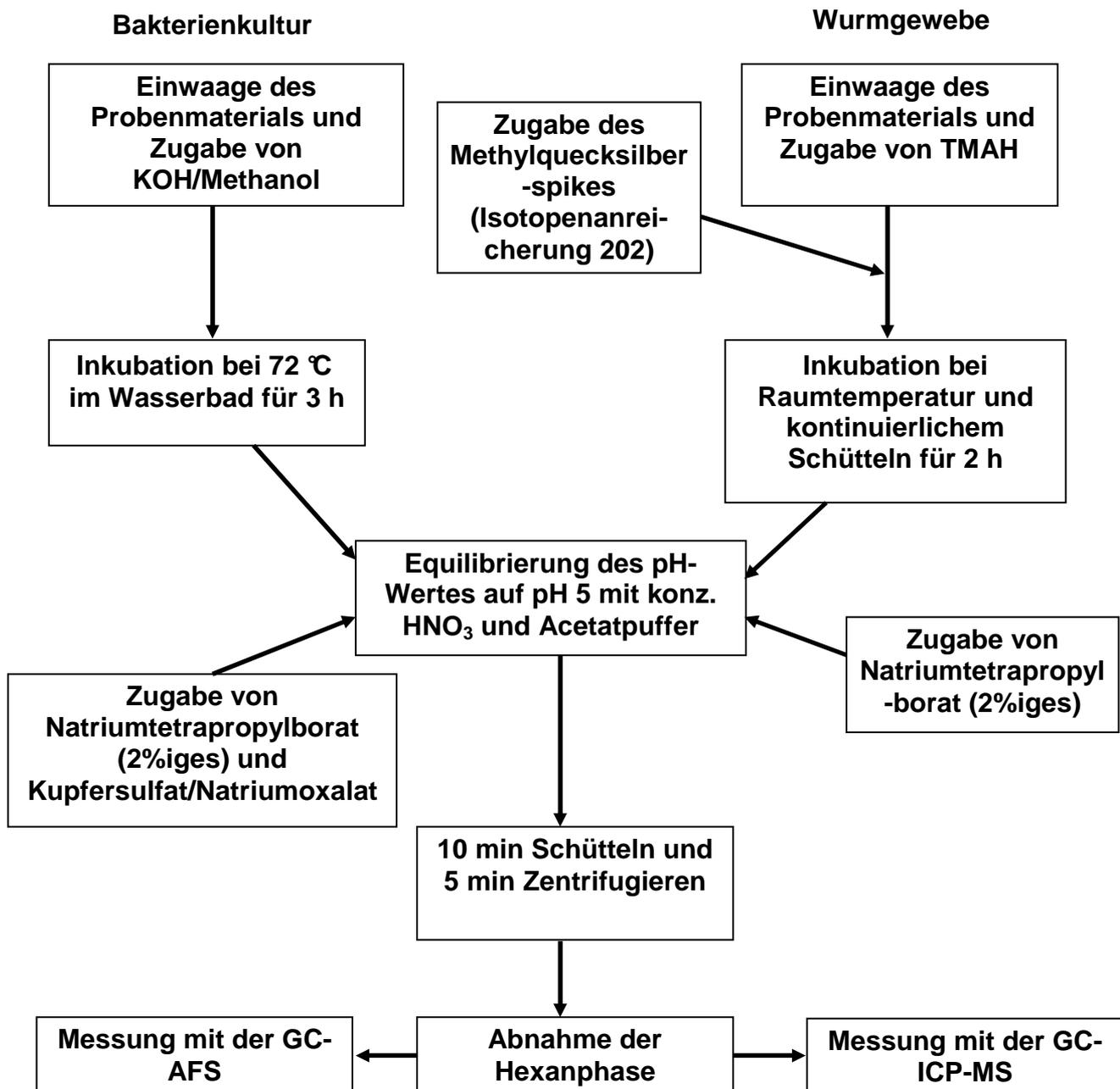


Abb. 4: Schematische Darstellung der Extraktionsmethoden für das Wurmgewebe und die Bakterienkulturen.

2.5.2. Kapillar-Gaschromatographie

Bei der Kapillar-Gaschromatographie erfolgt eine Auftrennung von flüchtigen Analyten anhand ihrer Verteilung in einer mobilen und einer stationären Phase. Als mobile Phase wird ein inertes Trägergas verwendet wie z.B. Helium und als stationäre Phase dient ein dünner Flüssigkeitsfilm (0,17 bis 5,3 μm), der auf der Innenseite der Kapillaren (Durchmesser 0,1 bis 0,53 mm, Länge 10 bis 120 m) aufgetragen ist. Bei diesem handelt es sich häufig um unpolare Substanzen wie z.B. Polydimethylsiloxan (PDMS), Divenylbenzen (DVB) oder auch Carbowax. Um eine Verbesserung der Auftrennung von Analyten zu erreichen, kann die Polarität durch einen Austausch der Methylgruppen des Films mit z.B. Phenylgruppen erhöht werden. Der Analyt steht, während er mit dem Trägergas durch die Kapillare transportiert wird mit der stationären und mobilen Phase im Gleichgewicht, worauf die Trennung beruht. Die Trennleistung wird noch von weiteren Parametern wie z.B. der Säulenlänge, dem inneren Durchmesser und auch der Schichtdicke der stationären Phase bestimmt. Als mobile Phase wurde Helium verwendet, da so eine schnellere Trennung als mit Stickstoff durchgeführt werden konnte.

Ein weiterer Faktor, der die Gaschromatographie beeinflusst, ist die Einspritztechnik und der verwendete Injektor. Bei der verwendeten Split-Injektion wurde eine injizierte Probe (meist 1 μl) durch einen vorher festgelegten Gasfluss nach dem Verdampfen in der Injektorkammer („Liner“, aus desaktivierten Quarzglas) auf die Säule gebracht. Der Verdampfungsschritt ist stark von der Temperatur des Injektors und auch der Geschwindigkeit der Injektion beeinflusst. Bei einer manuellen Injektion können so Probleme bei der Reproduzierbarkeit vorkommen. Im Liner befindet sich desaktivierte Glaswolle, durch deren große Oberfläche gewährleistet wird, dass die Probe komplett verdampft und so gasförmig auf die Säule gelangt. Außerdem dient die Glaswolle auch als ein Schutz für die Säule. Bei der Split-Technik ist auf jeden Fall darauf zu achten, dass sich die Analyten nicht im Injektor zersetzen oder eine Diskriminierung nach den Siedepunkten der Analyten stattfindet. Es muss auch darauf geachtet werden, dass die Säule nicht mit einer zu großen Menge der Probe überladen wird, weshalb nicht mehr als 2 μl Probenmaterial aufgetragen werden kann. Nach der gaschromatographischen Trennung werden die getrennten Spezies in den entsprechenden Detektoren erfasst. Die einzelnen GC Programme und auch

die verwendeten Kapillarsäulen sind in den nachfolgenden Abschnitten der jeweiligen Detektionsverfahren beschrieben.

2.5.3. Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Detektionsverfahren verwendet. In diesem Abschnitt soll zunächst auf die induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) eingegangen werden. Bei der Massenspektrometrie ist das Grundprinzip aus anorganischen oder organischen Substanzen Ionen zu erzeugen, die nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis aufgetrennt werden und mit einem Detektor erfasst werden. Die Ionisation kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch den Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen und Photonen erfolgen. Diese gebildeten Ionen sind im Allgemeinen positiv geladen, es gibt allerdings auch Methoden, negativ geladene Ionen zu erzeugen und diese zu detektieren. Die Ionentrennung erfolgt dann durch statische oder durch dynamische elektrische und magnetische Felder. Aufgrund der Tatsache, dass das Prinzip der massenspektrometrischen Methoden identisch ist, ist auch der grundsätzliche Aufbau eines Massenspektrometers vergleichbar. In der Abbildung 5 sind die Grundbausteine eines Massenspektrometers schematisch dargestellt.

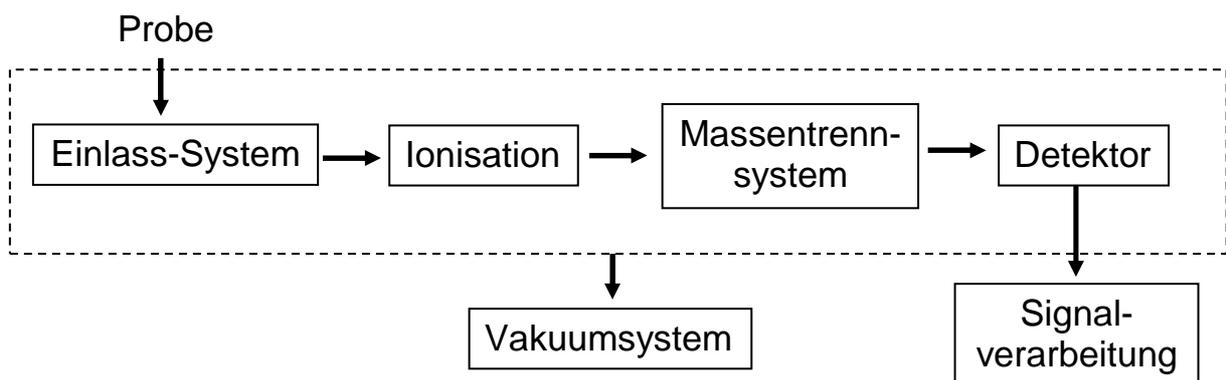


Abb. 5: Schematische Darstellung der Grundelemente eines Massenspektrometers.

Das Einlasssystem hat die Aufgabe die Probe der Ionenquelle zuzuführen. Nach der Ionisierung werden die gebildeten Ionen in dem Massenanalysator nach ihrem

Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und können im Detektor gemessen werden. Eine Auswertung erfolgt dann mit einem dem Gerät entsprechenden Computerprogramm. In den folgenden Abschnitten wird genauer auf die einzelnen Teile des in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometers eingegangen, wobei sowohl allgemeines zu den Grundelementen als auch zu den verwendeten erklärt wird.

Seit 1980 wird das induktiv gekoppelte (Argon)plasma (ICP) in vielen kommerziellen Massenspektrometern eingesetzt. Durch die sehr hohen Temperaturen (6000 - 10000 K), die im Argonplasma entstehen können, ist es möglich viele Elemente effizient zu ionisieren. Nach der Ionisation sind diese dann einer massenspektrometrischen Trennung und Messung zugänglich. Diese Kombination stellt heutzutage eine der modernsten und auch nachweisempfindlichsten Methoden der Massenspektrometrie dar. Die Probenzuführung erfolgt meistens mittels einer peristaltischen Pumpe, die einen flüssigen Analyten in einen Zerstäuber (Nebulizer) schleust. Dieser ist für die Erstellung eines Aerosols notwendig, welches in die Sprühkammer eingeleitet wird (Abb. 6)

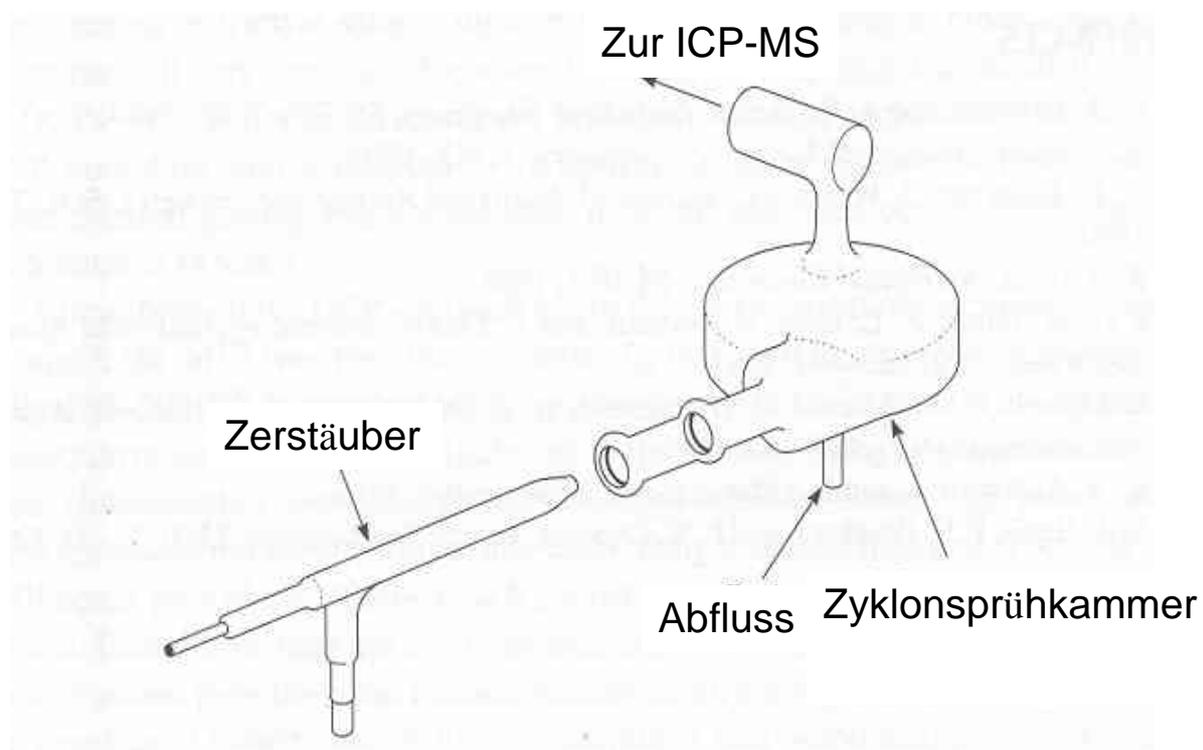


Abb. 6: Darstellung einer Zyklon Sprühkammer mit Zerstäuber (Thomas, 2008).

Material und Methode

Durch einen Gasstrom in der Sprühkammer wird das Aerosol in größere und auch kleinere Tropfen aufgetrennt, wobei nur die kleineren in die Plasmafackel (Torch, Abb. 7) gelangen und im Plasma ionisiert werden. Das Plasma wird durch ein induktives Einkoppeln einer hochfrequenten Wechselspannung (27 oder 40 MHz) durch eine Induktionsspule mit einer Leistung von etwa 750 - 1500 W erzeugt. Der Analyt, der in das Plasma eintritt, wird durch die unterschiedlichen Temperaturzonen (Abb. 6) des Plasmas geleitet und durchgeht so verschiedene Stadien.

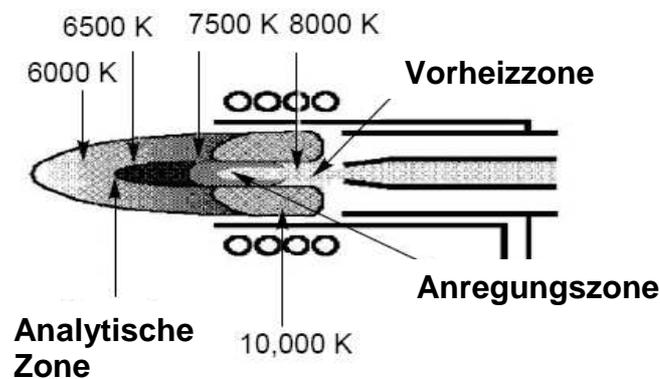


Abb. 7: Schematische Darstellung einer ICP-MS Fackel mit den jeweiligen Plasmazonen und Temperaturen (Thomas, 2008).

Zuerst werden die Wassermoleküle des Tropfens verdampft und es entsteht ein kleiner Festkörper. Weiter im Plasma wird dieser Festkörper in seine gasförmige Form überführt und dann atomisiert. Im letzten Schritt wird das Atom durch Kollision mit energetisch reichen Argonelektronen in ein einfach positives Ion überführt (Abb. 8).

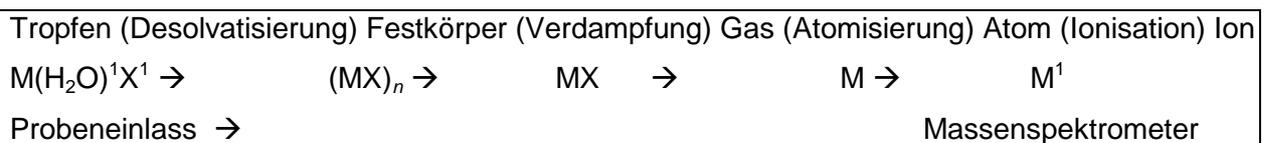


Abb. 8: Darstellung der einzelnen Schritte eines Analyten in der Plasmaflamme.

Aufgrund der hohen Temperaturen ist auch die Ionisierungsausbeute bei den meisten Metallen über 90%, weshalb diese Methode auch eine so hohe Empfindlichkeit besitzt. Bei Nichtmetallen ist allerdings die Ausbeute signifikant geringer, da sie ein höheres Ionisierungspotential besitzen. Nach der Ionisation des Analyten wird dieser durch das Interface in die Ionenoptik eingeschleust. Das Interface besteht aus zwei hintereinander angebrachten Metallkegeln mit konzentrischen Öffnungen (1 mm Durchmesser; Sampler- und Skimmer-Konus) die in den meisten Fällen aus Nickel bestehen. Dieser Interfacebereich ist die Abgrenzung von dem Normaldruck, in dem die Ionisierung des Analyten stattfindet und dem Hochvakuum, indem die Massenseparation erfolgt. In Abbildung 9 ist ein schematischer Aufbau einer Quadrupol ICP-MS mit den beschriebenen Bereichen dargestellt.

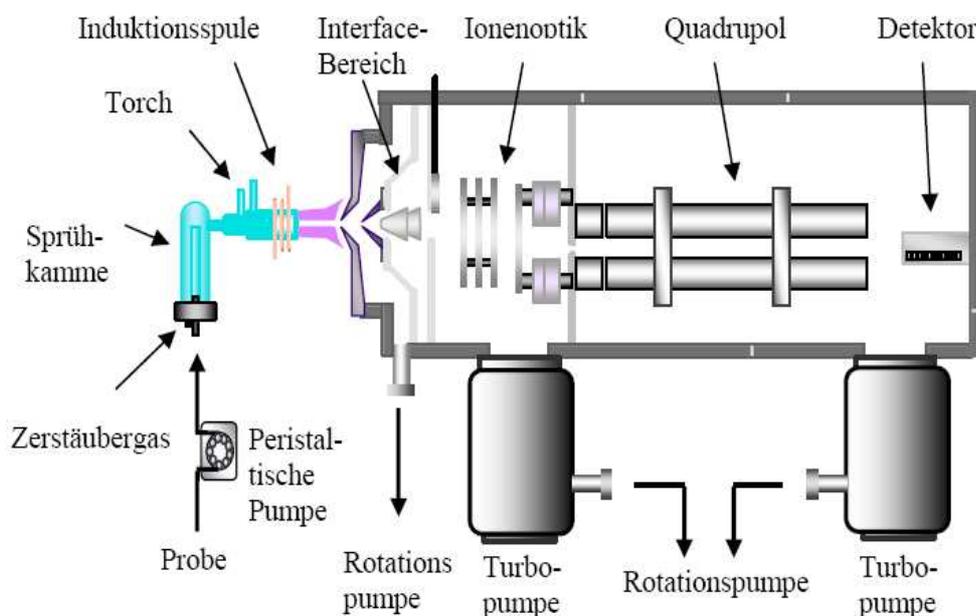


Abb. 9: Darstellung eines Quadrupol-ICP-MS der Firma Agilent, Model HP 4500 (Agilent, Waldbronn).

Nach dem Einschleusen der Ionen durch das Interface werden diese durch die Ionenoptik transportiert. Diese ist dafür verantwortlich, dass ein Maximum an Analytionen vom Interface zu dem Massenseparator kommt. Dabei werden nicht ionische Partikel, neutrale Partikel oder auch Photonen daran gehindert, den

Detektor zu erreichen, da diese die Messung verfälschen würden und sogar zu dessen Schädigung führen könnten. Um dies zu verhindern gibt es unterschiedliche Methoden wie z.B. physikalische Barrieren, das Positionieren des Massenanalysators außerhalb der Achse des Ionenstrahls oder durch das elektrostatische Abwinkeln des Strahls um 90° (Abb. 10).

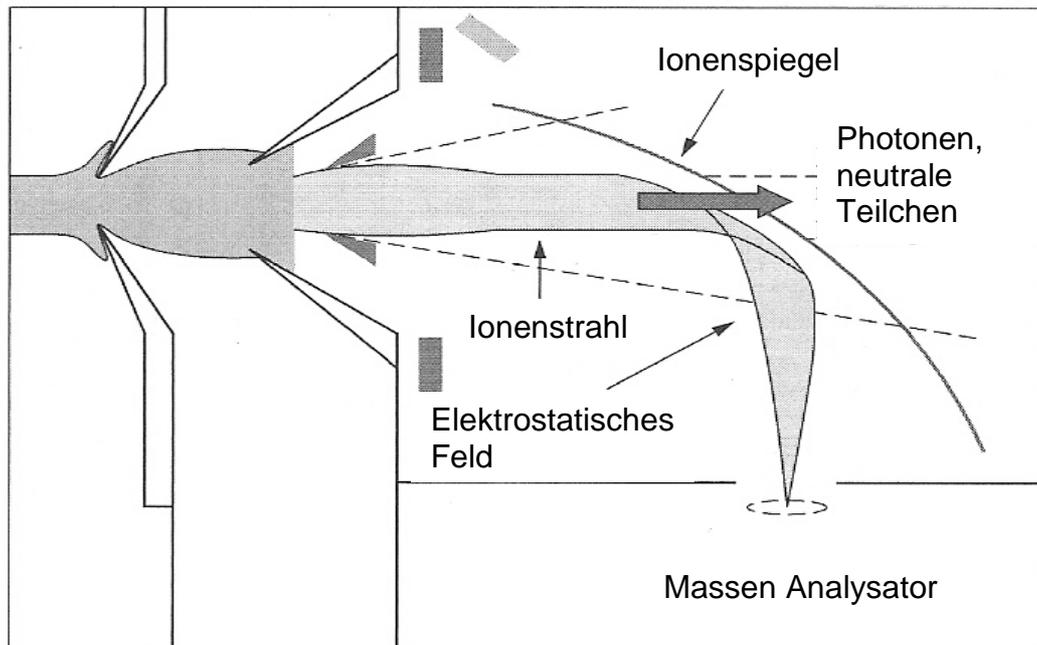


Abb. 10: Schematische Darstellung der Ionenoptik mit elektrostatischer Ablenkung (Thomas, 2008).

Nach der Bündelung des Ionenstrahls durch die Ionenoptik gelangt dieser in den Massenseparator. Bei der Separation können verschiedene Methoden diese bewerkstelligen. In den meisten ICP-MS Geräten ist dies ein Quadrupol, allerdings gibt es auch Sektrofeld ICP-MS, Multikollektor ICP-MS oder Time-of-flight ICP-MS. In dem folgenden Abschnitt wird nur auf die Quadrupol-ICP-MS eingegangen, da diese für diese Arbeit verwendet wurde. Bei der Quadrupol ICP-MS besteht der Massenseparator aus vier zylindrischen oder hyperbolischen Metallstäben von gleicher Länge und Durchmesser. Typischerweise sind sie aus rostfreien Stahl oder Molybdän hergestellt und werden mit einer Frequenz von 2 - 3 MHz betrieben. Dabei werden ein Gleichstrom- und ein zeitabhängiges Wechselstrom-Feld an die entgegengesetzten Paare der vier Quadrupolstäbe angelegt. Durch das Verändern der Felder können nur die Ionen mit dem gewünschten Masse-Ladungs-Verhältnis

(m/z) durch die Mitte der Stäbe in den Detektor gelangen. Ionen die ein anders m/z -Verhältnis besitzen werden abgelenkt und verlassen den Quadrupol (Abb. 11).

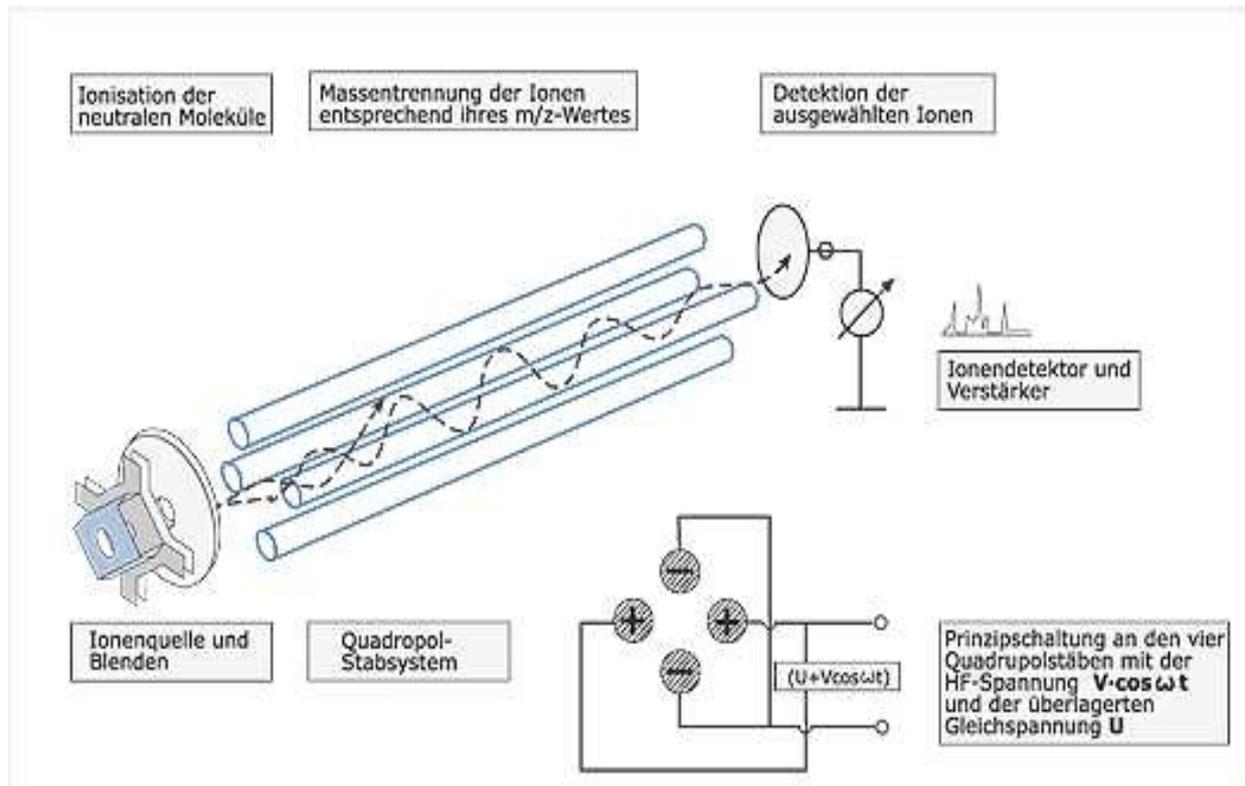


Abb. 11: Schematische Darstellung einer Massenseparierung mittels Quadrupol (www.analyticjournal.de).

Nachdem die gewünschten Ionen durch den Quadrupol fokussiert wurden, werden sie mittels eines Detektors registriert. Auch bei diesen sind verschiedene Varianten auf dem Markt, wobei der diskrete Dynoden Elektron Multiplier am häufigsten verwendet wird. Dieser wird auch als aktiver Film Multiplier bezeichnet und benutzt diskrete Dynoden, um die Multiplikation von Elektronen durchzuführen. Der Detektor wird außerhalb der Ionenstrahl Achse angebracht, um Hintergrundrauschen zu unterbinden. Wenn ein gewünschtes Ion den Quadrupol passiert, wird dieses auf eine Kurvenbahn gebracht und trifft die erste Dynode. Dadurch wird ein zweites Elektron freigesetzt, welches die nächste Dynode trifft und weitere Elektronen freigibt. Ein solcher Detektor ist in Abbildung 12 dargestellt.

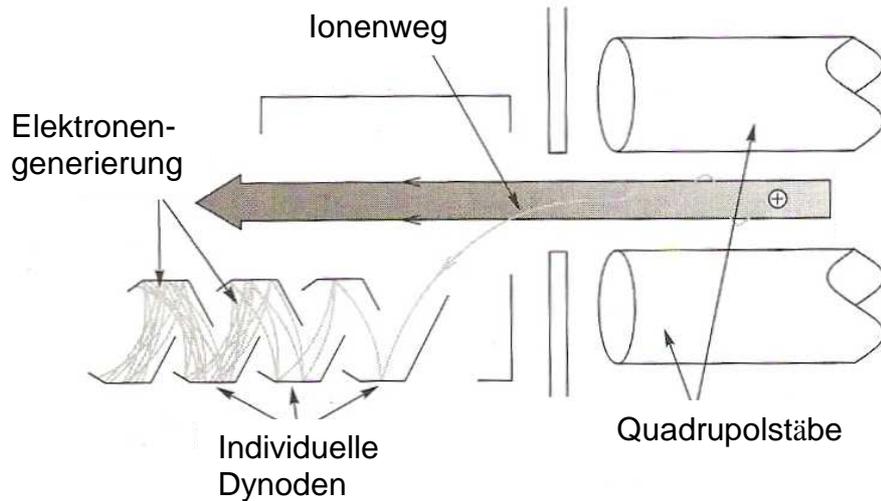


Abb. 12: Darstellung eines Dynoden Elektron Multiplier (Thomas, 2008).

Das so erhaltene Signal wird an einen Rechner weitergeleitet und kann mit dem entsprechenden Programm ausgewertet werden.

Für die Untersuchungen des Wurmgewebes in dieser Arbeit wurde zur Auftrennung der Quecksilberspezies ein Gaschromatograph verwendet, der an eine Quadrupol ICP-MS gekoppelt wurde. Von den extrahierten Proben (Extraktion siehe 2.5.1.) wurde jeweils 1 μl in den Splitlessinjektor der GC injiziert und mit einem GC-Temperatur Programm, das anhand von Standards auf die bestmögliche Auftrennung überprüft wurde, aufgetrennt. Die Kopplung der GC mit der Plasmafackel des ICP-MS erfolgte mit einer beheizten Transferline (Stainless Steel). Die verwendete Transferline endete kurz vor dem Plasma, um ein effizientes Einbringen des Analyten in das Plasma zu gewähren (Abb. 13).

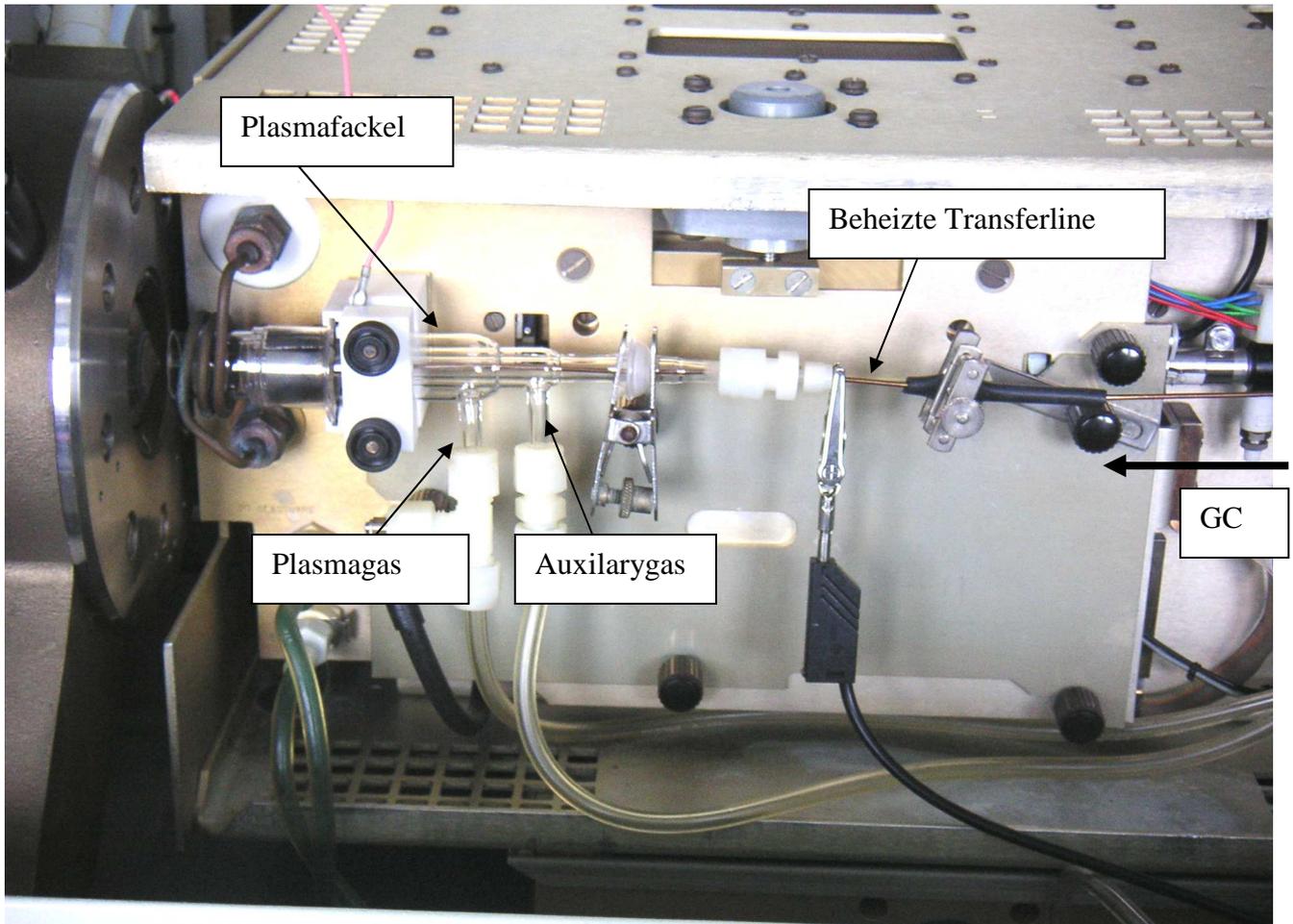


Abb.13: Abbildung der beheizten GC-Transferline zu der Plasmafackel der PQ3.

Anschließend wurden die Analyten mit dem entsprechenden Programm am Rechner ausgewertet. Die genauen Geräteangaben wie auch das verwendete GC-Temperatur Programm sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tab. 16: Verwendete ICP-MS, GC-Säule und Programme.

Gaschromatographie:

| | |
|--------------------|--|
| Gaschromatograph | PerkinElmer GC Autosystem Überlingen |
| Kapillarsäule | CP Sil 5 CB, 30 m x 0.32 mm x 1 Nm 100% PDMS, Restek, Bad Homburg |
| Gasfluss | 2 ml/min He (6.0 Westfalen AG) mit 10% Xe |
| Temperaturprogramm | 40°C 2 min → 20°C pro min → 220 °C 1 min |

ICP-MS System

| | |
|------------------------|--|
| ICP-MS | VG PlasmaQuad 3, Thermo Fisher, Dreieich |
| Transferline GC-ICP-MS | Restek Silcosteel, 1/16" AD, 1 m, Widerstandsheizung 5 V, 5 A |
| Gasfluss | Plasma 14.9 L/min, Aux 0.9 L/min, Neb 0.85 L/min (extern); 6 ml/min O ₂ Zugabe |
| Heizung Nebulizergas | 2 m Edelstahl 1/16" (Swagelok, Maintal) mit Widerstandsheizung 11 V, 10 A |
| RF-Power | 1200 W |
| Gemessene Isotope | ¹⁹⁸ Hg, ²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg, ¹³ C, ¹²⁴ Xe |
| Programme | PlasmaQuad SoftwarePaket Origin 7.5, OriginLab Corporation, USA |

2.5.4. Isotopenverdünnungsmethode

Für die Quantifizierung des gebildeten und akkumulierten Methylquecksilbers im Wurmgewebe wurde die Isotopenverdünnungsmethode angewendet. Die Isotopenverdünnungsmethode gehört zu den zuverlässigsten und genauesten Methoden der Spurenanalyse, da bei dieser hohe Richtigkeit erzielt werden kann (Heumann, 1990; Heumann et al., 1994; de Bièvre, 1997). Allerdings sind dafür einige Grundvoraussetzungen zu beachten. So muss das zu analysierende Element mindestens zwei stabile oder quasistabile Isotope besitzen. Aus diesem Grund können keine monoisotopische Elemente analysiert werden. Weiterhin muss das jeweilige Isotop oder im Falle von organischen Verbindungen wie in dieser Arbeit, die jeweilige organische Verbindung als angereichertes Isotop zur Verfügung stehen. Das Hauptproblem dabei ist, dass nur wenige Labore sich darauf spezialisiert haben, diese angereicherten Isotopenverbindungen herzustellen und auch verifiziert sind. Beim Beispiel von Methylquecksilber ist nicht alleine die Bestimmung des MeHg⁺ Gehalts mit dieser Methode vereinfacht, sondern ermöglicht es auch Methylierungs- und Demethylierungsprozesse nachzuvollziehen (Hintelmann und Evans, 1997). Quecksilber besitzt sieben stabile Isotope, die in Tabelle 17 dargestellt sind. Es kann aus diesem Grund auch für die Isotopenverdünnungsmethode verwendet werden.

Auch das organische Methylquecksilber ist als ein angereicherter Isotopenstandard käuflich.

Tab. 17: Natürliches Isotopenmuster von Quecksilber.

| Massenzahl | natürliche Häufigkeit [%] |
|------------|---------------------------|
| 196 | 0,15 |
| 198 | 9,97 |
| 199 | 16,87 |
| 200 | 23,10 |
| 201 | 13,18 |
| 202 | 29,86 |
| 204 | 6,87 |

Das Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse beruht darauf, dass zu einer exakt eingewogenen Probe, die meistens eine natürliche Isotopenzusammensetzung des gesuchten Elements besitzt, auch eine exakt eingewogene Menge eines Indikators (angereichertes Isotop) mit einer nicht natürlichen Isotopenzusammensetzung und bekannter Konzentration zugegeben wird.

$$R = \frac{{}^{200}\text{Hg}}{{}^{202}\text{Hg}} = \frac{{}^{200}h_P \cdot N_P + {}^{200}h_I \cdot N_I}{{}^{202}h_P \cdot N_P + {}^{202}h_I \cdot N_I}$$

${}^{200}h_P, {}^{202}h_P$: Häufigkeiten der Isotope ${}^{200}\text{Hg}$ und ${}^{202}\text{Hg}$ in der Probe [%]

${}^{200}h_I, {}^{202}h_I$: Häufigkeit der Isotope ${}^{200}\text{Hg}$ und ${}^{202}\text{Hg}$ im Indikator [%]

N_P : Zahl der Quecksilberatome in der Probe

N_I : Zahl der Quecksilberatome im Indikator

Material und Methode

Durch das Auflösen der Gleichung nach der Anzahl an Hg-Atomen in der Probe N_P erhält man:

$$N_P = N_I \cdot \frac{{}^{200}h_I - R \cdot {}^{202}h_I}{R \cdot {}^{202}h_P - {}^{200}h_P}$$

Die beiden Größen h_P und h_I können durch die Isotopenverhältnismessungen der Probe und des Indikators ermittelt werden. Die Anzahl, der bei der Isotopenverdünnung zugegeben Indikatoratome kann mit folgender Gleichung berechnet werden.

$$N_I = E_I \cdot G_I$$

E_I : Einwaage Indikator [g]
 G_I : Indikatorgehalt [Atome/g]

Aus diesen Gleichungen erhält man für die Menge m_{Hg} des analysierten Quecksilbers:

$$m_{Hg} = \frac{N_P}{N_A} \cdot M_{Hg} = E_I \cdot G_I \frac{M_{Hg}}{N_A} \cdot \frac{{}^{200}h_I - R \cdot {}^{202}h_I}{R \cdot {}^{202}h_P - {}^{200}h_P}$$

m_{Hg} : Menge an Quecksilber [g]
 M_{Hg} : Molmasse Quecksilber [g/Atome]
 N_A : Avogadrokonstante [Atome/mol]

Den Gehalt an Quecksilber (G_P) in der Probe erhält man dann nach Substraktion des Blindwertes und Division durch die eingewogene Probenmenge (E_P):

$$G_P = \frac{m_{Hg} - B}{E_P}$$

| | |
|---------|------------------------|
| G_P : | Gehalt der Probe [g/g] |
| B : | Blindwert |
| E_P : | Einwaage der Probe [g] |

Die Tatsache, dass bei der Isotopenverdünnung nur Verhältnisse bestimmt werden, bietet den Vorteil, dass z.B. keine externe Kalibration notwendig ist. Auch spielen Verluste durch Matrixeffekte oder durch die angewendeten Extraktionsmethoden keine Rolle bei der Quantifizierung, da nicht der Gehalt, sondern das Isotopenverhältnis gemessen wird. Aus diesem Grund wurde diese Quantifizierungsmethode zur Bestimmung des Methylquecksilbergehaltes im Wurmgewebe ausgewählt. Mit dieser Methode können die genauesten Messergebnisse erreicht werden und die komplexe Matrix des Gewebes, und somit Verluste durch die Extraktion, spielen keine Rolle.

2.5.5. Atomfluoreszenzspektroskopie

Eine andere Methode zum Nachweis von Quecksilber ist die Atomfluoreszenzspektroskopie, die in dieser Arbeit auch eingesetzt wurde. Bei dieser Methode werden die Elektronen der Analytome durch Photonen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Anschließend kann die emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert werden, die beim Übergang der angeregten Atome in ihren Grundzustand bzw. auf ein energieärmeres Niveau entstehen. Diese Fluoreszenz kann für die Bestimmung genutzt werden, da die Intensität proportional zur Anzahl der Atome ist (Morita et al., 1995). Dabei ist es bei Quecksilber von großem Vorteil, dass die notwendige Atomisierung relativ leicht erreichbar ist, da Quecksilber in seiner

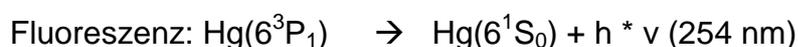
elementaren Form (Hg^0) schon bei Raumtemperatur einen einatomigen Quecksilberdampf bildet. Dieser Dampf ist gegenüber dem Luftsauerstoff ausreichend stabil und kann so mittels der AFS analysiert werden. Dabei können für die Bildung dieses Hg^0 Dampfes aus anorganischem Hg^{2+} unterschiedliche Methoden verwendet werden. Eine Möglichkeit ist die Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH_4) oder mit Zinn(II)-Verbindungen. Organische Quecksilberverbindungen können durch verschiedene Derivatisierungsreagenzien wie z.B. Natriumtetraethyl- oder Natriumtetrapropylborat oder auch durch die Grignardreaktion hergestellt werden. Die so entstandenen leichtflüchtigen Verbindungen können anschließend über eine gaschromatographische Auftrennung separiert werden und mittels einer Pyrolyse (Bloom, 1989) im Inertgasstrom in Hg^0 überführt werden. Diese Methode wird auch als Kaltdampftechnik bezeichnet, wohingegen bei anderen Elementen eine Flamme notwendig ist um deren Atomisierung hervorzurufen.

Die Detektion erfolgt, indem der gebildete Hg^0 -Dampf durch eine Durchflussmesszelle geleitet wird, die mit dem Licht einer Quecksilberdampfampe (Wellenlänge 254 nm) bestrahlt wird. Dabei wird das Fluoreszenzsignal senkrecht zu der Einstrahlrichtung gemessen, um einen Einfluss von Nichtfluoreszenzlicht zu minimieren. Für die Quecksilberanalyse mit der Kaltdampftechnik ist die nicht dispersive AFS vorzuziehen, bei der die Abtrennung von anderen Wellenlängen direkt im Photomultiplier geschieht. Im Gegensatz zu dieser Methode, muss bei der dispersiven AFS noch ein Monochromator eingesetzt werden.

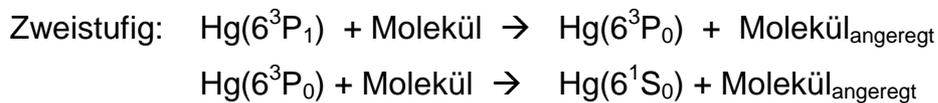
Das Prinzip der Messung, beruht darauf, dass bei der Anregung von Hg^0 mit einer Wellenlänge von 254 nm ein 6s-Elektron unter Spinumkehr in ein 6p-Orbital angehoben wird. Dies ist ein Übergang von einem Singulett-Grundzustand (6^1S_0) in einen angeregten Triplettzustand (6^3P_1).



Bei dem Übergang in den Grundzustand wird die Anregungsenergie dann in Form einer Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben.



Zu beachten ist, dass in Anwesenheit von Störstoffen der Übergang von dem angeregten Zustand in den Grundzustand auch strahlungslos stattfinden kann. Dabei erfolgt die Abgabe der Energie durch das Anstoßen mit anderen Molekülen und deren Anregung (Quenching). Dieses Quenching kann durch Gasmoleküle wie z.B. N₂, CO₂ oder auch durch organische Moleküle stattfinden (Nakahara et al., 1978). Aus diesem Grund wird als Trägergas für die GC-AFS das Edelgas Helium (He) verwendet, mit dem das Quenching unterbunden wird. Die zwei möglichen Reaktionen durch das Anstoßen von anderen Molekülen und deren Anregung ist in den folgenden Gleichungen aufgezeigt.



Die Kaltdampfatomfluoreszenzspektroskopie ist aufgrund der Abtrennung der Matrix und durch das Überführen der Analysesubstanz in die Form von Hg⁰ relativ frei von Interferenzen, vor allem in Verbindung mit gaschromatographischen Methoden. Aufgrund dieser Interferenzfreiheit, der quantitativen Atomisierung, der hohen Fluoreszenzsausbeute bei der Anregung und auch der empfindlichen Detektion ist sie besonders gut für die Analyse von Quecksilberverbindungen geeignet. Dabei liegt die Nachweisgrenze bei optimalen Bedingungen unter einem ppt (ng/kg) für Quecksilber.

Die Methode zur Detektion von verschiedenen Quecksilberspezies mittels eines Gaschromatograph-Atomfluoreszenzspektrometers wurde in dieser Arbeit für das Screening der verschiedenen Rein- und Mischbakterienkulturen verwendet. Dafür wurde ein Gerät verwendet, welches schon in der Arbeit von Schedlbauer (1998) und Limper (2006) verwendet wurde. Allerdings wurde die Apparatur modifiziert, indem das Purge & Trap-System entfernt wurde und die Proben über eine Direktinjektion mittels eines Splitlessinjektor in die GC eingespritzt wurden. Die Auftrennung wurde mit einer identischen Kapillar-Säule wie in der Arbeit von Limper (2006) durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus des verwendeten Gerätes ist in Abbildung 14 dargestellt.

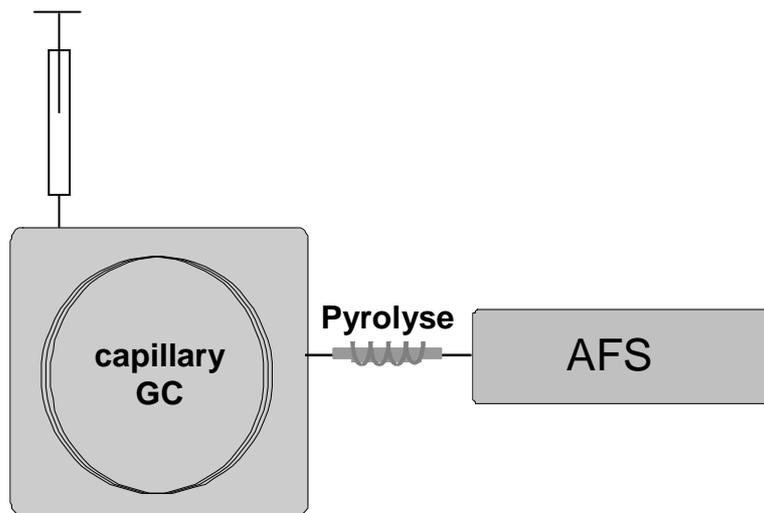


Abb. 14: Schematische Darstellung der verwendeten GC-AFS zur Untersuchung von Quecksilberverbindungen.

Von der extrahierten Probe, wie in 2.5.1 beschrieben, wurde 1 μl in den GC-Injektor eingespritzt und in diesem bei 230 $^{\circ}\text{C}$ in einen gasförmigen Zustand überführt, um eine Auftrennung über die Säule zu erreichen. Mittels eines GC-Temperatur-Programms wurden dann die einzelnen Quecksilberspezies aufgetrennt und durch einen Heliumstrom (Helium 4.6, Westfalen AG) in die Pyrolyseeinheit geleitet. Diese bestand aus einem mit desilicanisierter Glaswolle gefülltem Glasrohr, das durch eine Nychrome-Wendel auf eine Temperatur von ca. 800 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt wurde. Durch diese Pyrolyse wurden die verschiedenen Quecksilberspezies in Hg^0 überführt und durch eine Kapillarverbindung in die AFS geleitet. Die Signale des Detektors wurden über ein Interface an den Rechner weitergeleitet und mit dem Programm Turbochrom 4.1 (PerkinElmer, Überlingen) ausgewertet. Die erhaltenen Punkte von Zeit zu Signal wurden anschließend in ein Excel Dokument (Microsoft Office 2003, Microsoft) überführt und mit dem Programm Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) bearbeitet. In der Tabelle 18 sind die einzelnen Gerätetypen und die verwendete Säule wiedergegeben und das mittels Quecksilberstandards ausgearbeitete GC-Temperatur Programm.

Tab. 18: Verwendete AFS, GC-Säule und Programme.

| Gaschromatographie: | |
|-------------------------|--|
| Gaschromatograph | Autosystem XL, PerkinElmer Überlingen |
| Kapillarsäule | (5%Phenyl)-Methyl-Polysiloxan, Länge 15 m ID. 0,53 mm, Schichtdicke 5 µm, Supelco, Pennsylvania, USA |
| Gasfluss | 2 ml/min He (6.0 Westfalen AG) |
| Temperaturprogramm | 40°C 2 min → 20°C pro min → 102 °C 2 min → 20°C min → 130°C 5 min |
| AFS-System: | |
| Atomfluoreszenzdetektor | CVAFS 2, Brooks Rand Ltd. Seattle, USA |
| Interface | PE Neson 900 Series Interface, PerkinElmer Überlingen |
| Programme | TurboChrom 4.1, PerkinElmer, Überlingen Origin 7.5, OriginLab Corporation, USA |

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel ist, wie auch die für die Promotion durchgeführten Arbeitsschritte in zwei Teile gegliedert. Im ersten wird auf die Ergebnisse eingegangen, die mit den Wurmkulturen erhalten wurden. Dazu gehören die Optimierungsansätze der Wurmkulturen, die in mit Quecksilber versetztem Bodenmaterial inkubiert wurden und die gemessene Methylquecksilberkonzentration im präparierten Wurmgewebe. Dabei wurde zwischen den Wurmansätzen unterschieden, die im sterilen und im unsterilen Bodenmaterial inkubiert wurden. Im zweiten Teil wird auf die Ergebnisse der Isolierung und Identifikation einiger im Wurmdarm vorkommender Mikroorganismen eingegangen. Weiterhin werden Versuchsergebnisse über Mikroorganismen dargestellt, die womöglich befähigt sind Quecksilber zu methylieren,

3.1. Wurmversuche

3.1.1. Optimierung der Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Würmer mussten zuerst in eine Kultur überführt werden, die auch durch wechselnde äußere Bedingungen stabil bleibt. Erste Versuchsansätze zeigten allerdings eine Sterblichkeit von nahezu 100%. Diese Ansätze wurden mit dem identischen Bodenmaterial durchgeführt, indem auch die Würmer angezogen wurden, allerdings wurden sie für die Inkubation mit Quecksilber in Einmachgefäße überführt. Die Gefäße wurden mit Frischhaltefolie überzogen und enthielten Luftlöcher, durch die auch das benötigte Wasser zugegeben wurde, um ein feuchtes Milieu aufrechtzuerhalten. Aus diesem Grund musste die Methode zur Inkubation in quecksilbergespikten Bodenmaterial überarbeitet werden. Dazu wurden zuerst Untersuchungen durchgeführt, um herauszufinden, in welchen Versuchsgefäßen die Würmer lange überleben konnten. Die Methode, das Bodenmaterial in Kristallisierschalen zu geben und die Würmer in diesen zu inkubieren, ergab eine Sterblichkeitsrate von nur noch 7 - 10%. Essentiell für das Überleben der Würmer war die Zugabe von Wasser alle zwei Tage. Dafür wurde demin. Wasser verwendet, in dem mittels LC-ICP-MS Analyse kein Quecksilber

Ergebnisse

nachgewiesen werden konnte. Zu Beginn der Versuchsansätze erfolgte die Inkubation in dem mit Quecksilber versetzten Bodenmaterial für 14 Tage. Hier konnte keine bis nur eine geringe Sterblichkeit der Würmer nachgewiesen werden. In einigen Ansätzen konnten sogar Jungstadien der Würmer gefunden werden. In folgenden Ansätzen, die mit sterilem Bodenmaterial durchgeführt wurden, lag allerdings zu Beginn der Versuche die Sterblichkeitsrate nach 14 Tagen Inkubation wieder nahezu bei 100%. Dabei ist zu erwähnen, dass es nicht darauf ankam ob Quecksilber zu dem Ansatz gegeben wurde oder ob es der „Blank“ Ansatz war. In allen Fällen konnte nach der Inkubationszeit von 14 Tagen kaum noch ein Individuum wiedergefunden werden. Aus diesem Grund wurde ein Versuchsansatz alle zwei Tage auf die noch lebende Anzahl an Würmer untersucht. Dies ergab, dass nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen in dem sterilen Boden die Sterblichkeitsrate der Würmer unter 10% lag, allerdings nach 12 bis 14 Tagen wieder auf fast 100% anstieg. Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche, die mit sterilem und auch unsterilem Bodenmaterial durchgeführt wurden nur noch 10 Tage inkubiert, damit zum Ende der Inkubation noch genügend Würmer zur weiteren Untersuchung vorlagen. In Tabelle 19 kann die Sterblichkeitsrate der Würmer in Abhängigkeit ihrer Verweilzeit in der jeweiligen Bodenprobe entnommen werden.

Tab. 19: Sterblichkeitsrate der Würmer in Abhängigkeit von sterilem und unsterilem Bodenmaterial und der Inkubationszeit.

| Quecksilber Konzentration [mg/kg] | Bodenprobe steril | Bodenprobe unsteril | Inkubationszeit [d] | Sterblichkeitsrate [%] |
|--|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 0 (Blank) N=6 | - | + | 14 | 7 |
| 0 (Blank) N=6 | + | - | 14 | 90 |
| 0 (Blank) N=6 | + | - | 10 | 12 |
| 0 (Blank) N=6 | - | + | 10 | 10 |
| 4 N=6 | + | - | 14 | 84 |
| 4 N=6 | - | + | 14 | 12 |
| 4 N=6 | + | - | 10 | 10 |
| 4 N=6 | - | + | 10 | 9 |

N = Ansätze

3.1.2. Validierung der Extraktionsmethode

Die Extraktion des Wurmgewebes wurde mit der Chemikalie TMAH durchgeführt. Obwohl dies in vielen Publikationen (Poperechna und Heumann, 2005b; Harms und Bunke, 2002) als die am besten geeignete Extraktionsmethode von Quecksilber aus biologischen Proben bezeichnet wird, wurde sie auf ihre Einsetzbarkeit auch bei Wurmgewebe überprüft. Hierfür wurde das Referenzmaterial ERM-CE464, das aus mit Methylquecksilber angereichertem Thunfischgewebe besteht, verwendet. Die Extraktion erfolgte wie für die Wurmproben in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Zur

Ergebnisse

Quantifizierung wurde die Isotopenverdünnungsmethode herangezogen. In Tabelle 20 sind die jeweiligen Ergebnisse der Messungen dargestellt.

Tab. 20: Gemessene Konzentration an Methylquecksilber des Referenzmaterials ERM-CE464 mittels Isotopenverdünnungsanalyse.

| | Thunfisch- probe 1 | Thunfisch- probe 2 | Thunfisch- probe 3 | Mittelwert | Abweichung |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------|
| Gemessene Konzentration an Methylquecksilber [mg/kg] | 5,46 | 5,44 | 5,32 | 5,41 | $\pm 0,07$ |
| Konzentration Methylquecksilber im Referenzmaterial [mg/kg] | n.b. | n.b. | n.b. | 5,5 | $\pm 0,17$ |

Die Messungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit dem Referenzmaterial. Die relative Standardabweichung der ermittelten Konzentration lag bei 4%. Ein besonderer Vorteil der Isotopenverdünnungsmethode ist, dass mögliche Matrixeffekte, die einen Einfluss bei der Extraktion von Methylquecksilber aus dem biologischen Material haben, keine Rolle spielen. Auch musste für die Korrektur kein interner Standard mitgeführt werden, da dies die zugefügte Isotopenspezies übernimmt. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass mit dieser Spezies spezifischen Isotopenverdünnung ein Cochromatogramm aufgenommen wird und die gebildete Quecksilberspezies somit einwandfrei als Methylquecksilber bestimmt werden kann. Nach Validierung der TMAH-Extraktionsmethode für Quecksilberspezies aus organischem Referenzmaterial wurde diese auch für das Wurmgewebe übernommen.

3.1.3. Konzentrationsabhängigkeit

Für die Untersuchungen der Methylquecksilberkonzentration in dem Gewebe von *Eisenia foetida*, wurden die Würmer in homogenisiertes Bodenmaterial überführt, das

Ergebnisse

mit jeweils höheren Konzentrationen an anorganischem Hg^{2+} versetzt wurde: 0, 1, 2, 4, 6 und 8 mg Quecksilber pro kg Boden. Die Inkubation erfolgte in unsterilem Bodenmaterial für 10 Tage. Nach den 10 Tagen wurden die Würmer entnommen und wie in 2.3.3. beschrieben für die Gewebeextraktion vorbereitet. Für die Messung der verschiedenen Quecksilberverbindungen wurden jeweils zwischen 15 bis 30 mg des Wurmgewebehomogenisats wie in 2.5.1 beschrieben extrahiert und mittels der GC-ICP-MS gemessen. Die Quantifizierung der gebildeten Methylquecksilberkonzentration erfolgte mittels der Isotopenverdünnungsmethode. Tabelle 21 zeigt die jeweiligen gemessenen Werte in den Wurmgewebeproben, nach Inkubation der Tiere in Bodenproben mit unterschiedlich hohen Hg^{2+} Konzentrationen.

Tab. 21: Konzentrationen an Methylquecksilber im Gewebe von *Würmern* nach Inkubation in Bodenmaterial mit unterschiedlich hohen Konzentrationen an Hg^{2+} .

| Probe | Gespikte Konzentration an Hg [mg/kg Boden] | Konzentration an Methylquecksilber [ng/g] im Trockengewicht |
|----------|--|---|
| 1 N=2 | 0 | N1=12 N2=14 |
| 2 N=2 | 1 | N1=36 N2=42 |
| 3 N=2 | 2 | N1=48 N2=35 |
| 4 N=2 | 4 | N1=62 N2=60 |
| 5 N=2 | 6 | N1=82 N2=80 |
| 6 N=2 | 8 | N1=88 N2=84 |

N= Ansatz

Wie in der Tabelle 21 und der Abbildung 15 zu erkennen ist, steigt die Konzentration an Methylquecksilber im Wurmgewebe bis zu einer Konzentration von $6 \mu\text{g Hg}^{2+}$ pro

Ergebnisse

g Bodenmaterial an. Nach der Erhöhung von 6 auf 8 $\mu\text{g/g}$ Hg^{2+} ist kaum noch ein Anstieg der Methylquecksilberkonzentration zu beobachten. Die so erhaltenen Methylquecksilberkonzentrationen sind in der Abbildung 15 gegen die eingesetzte Konzentration an anorganischem Hg^{2+} aufgetragen.

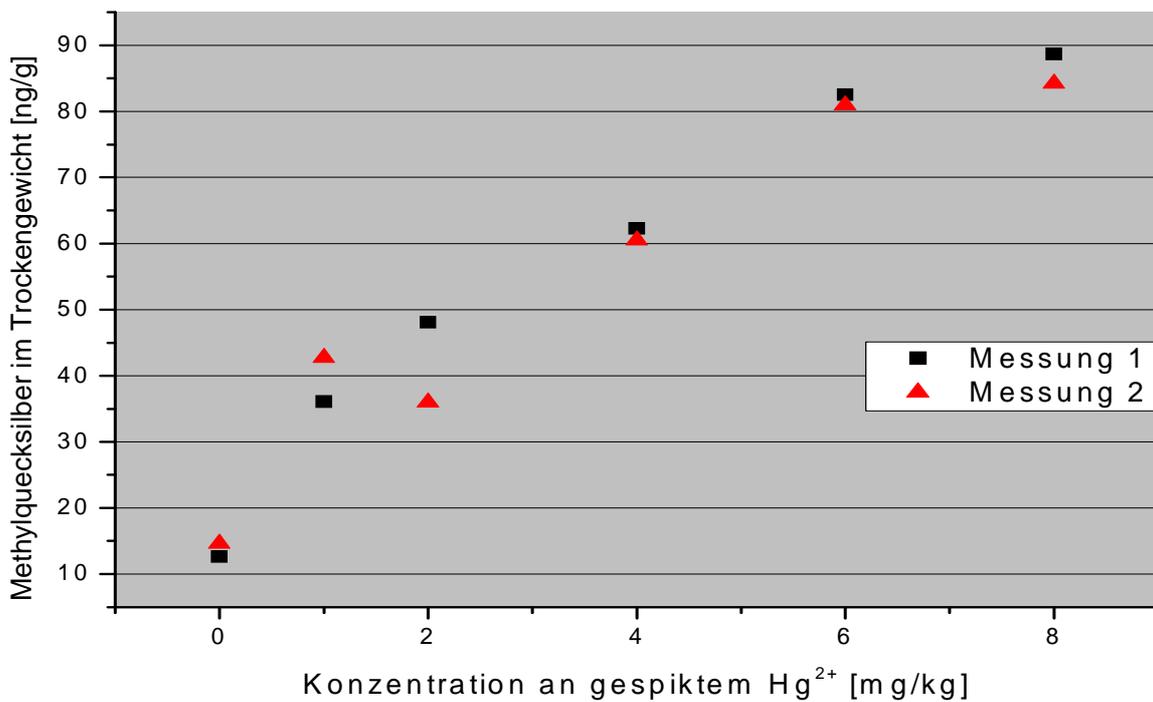


Abb. 15: Gemessene Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern, die in Bodenproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Hg^{2+} inkubiert wurden.

Wie in der Abbildung 15 zu erkennen ist, zeigt ein Anstieg der Konzentration an anorganischem Hg^{2+} auch einen Anstieg der Methylquecksilberkonzentration im Gewebe von *Eisenia foetida*. Die Kurve beschreibt einen den typischen Verlauf einer Sättigungskurve und bei einer Konzentration von 6 mg Quecksilber auf 8 mg/kg geht diese in die Substratsättigung über. Anhand dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche die Konzentration von 4 mg anorganischem Quecksilber verwendet, um im mittleren Bereich der Sättigung zu liegen. In Abbildung 16 ist ein Chromatogramm aufgetragen, das die verschiedenen Quecksilberspezies in Abhängigkeit der anorganischen Hg^{2+} Konzentration zeigt. Dabei sind nur die

Ergebnisse

Konzentrationen 0, 1 und 4 mg/kg aufgetragen. Für eine optimale Separation war es erst notwendig, das für die Trennung der Quecksilberspezies am besten geeignete Temperaturprogramm zu bestimmen. Dies erfolgte zunächst mit Standards und anschließend wurden mit dem so erhaltenen Programm die Proben aufgetrennt. Mit diesem war es möglich Hg^0 , und die nach der Propylierung entstandenen Verbindungen Methylpropylquecksilber, Ethylpropylquecksilber und Dipropylquecksilber optimal aufzutrennen. Für alle weiteren Messungen mit der GC-ICP-MS wurde dieses Programm verwendet.

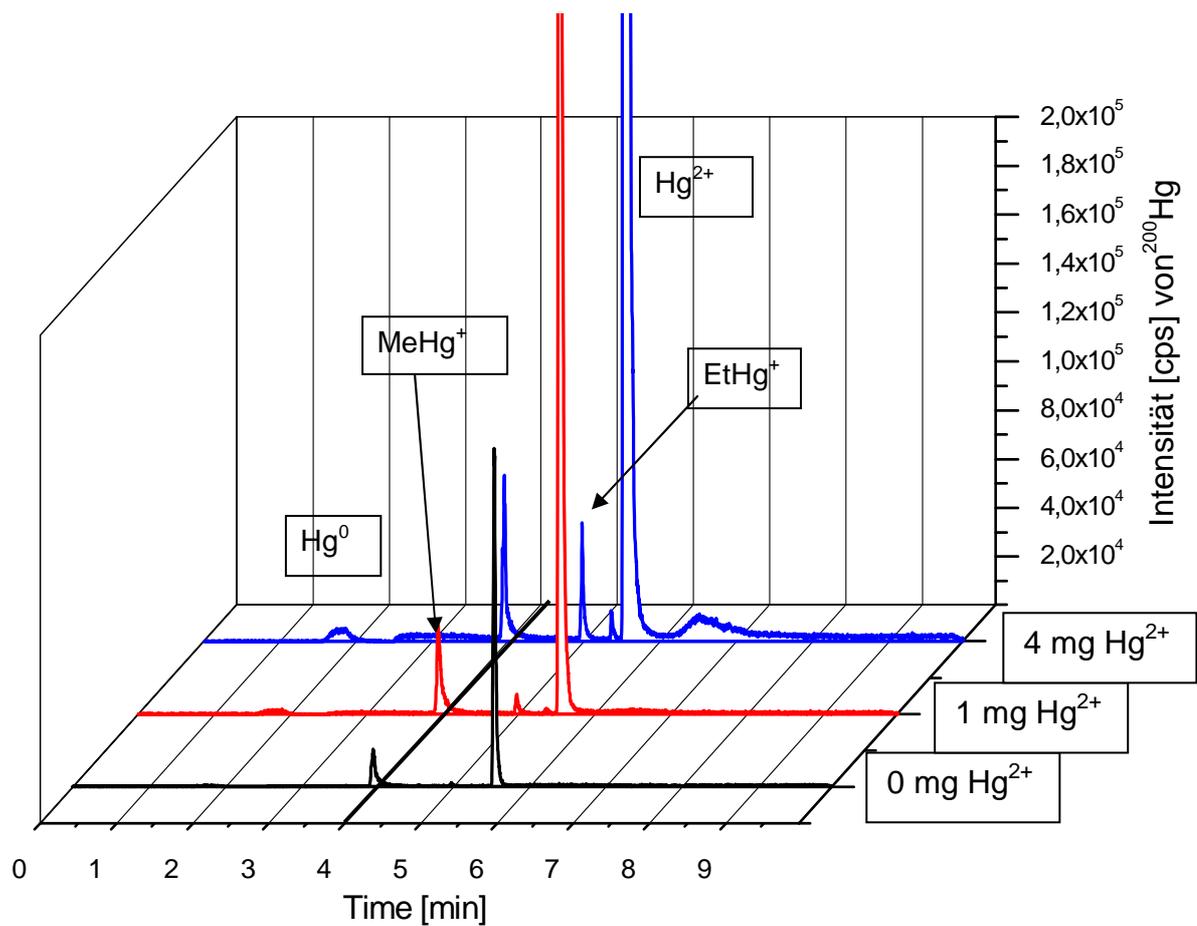


Abb. 16: Chromatogramm von Gewebeextrakten aus Würmern, welche in Bodenproben mit 0, 1 und 4 mg Hg^{2+} pro kg Bodenmaterial inkubiert wurden.

3.1.4. Unsterile Ansätze

Für die unsterilen Versuchsansätze wurde das Bodenmaterial eingewogen und mit der entsprechenden Menge an anorganischem Hg^{2+} versetzt. Die Inkubation der Würmer in dem Bodenmaterial erfolgte für 10 Tage. Danach wurden die Würmer entnommen und wie in 2.3.3. beschrieben das Gewebe präpariert. Die Extraktion erfolgte mit TMAH (siehe Material und Methode, 2.5.1) und die Quantifizierung mit der Isotopenverdünnungsanalyse. In der Tabelle 22 sind die gemessenen Methylquecksilberkonzentrationen im Gewebe von Würmern aufgetragen, die in Bodenmaterial inkubiert wurden, das nicht mit Hg^{2+} gespikt wurde.

Tab. 22: Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern nach Inkubation im ungespikten unsterilem Bodenmaterial.

| Wurmprobe (6 Parallelen) | Konzentration an Methylquecksilber im Trockengewebe [ng/g] | Mittelwert | Standard abweichung | relative Standardabweichung [%] |
|-----------------------------|--|------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1a | 19,34 | 17,40 | ±3,57 | 16 |
| 2a | 15,95 | | | |
| 3a | 12,54 | | | |
| 4a | 21,94 | | | |
| 5a | 16,35 | | | |
| 6a | 18,25 | | | |

Die durchschnittliche Konzentration lag zwischen 12 - 21 ng pro g Trockengewicht von Wurmgewebe bei einer relativen Standardabweichung von 16%. In der Tabelle 23 sind die Konzentrationen an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern eingetragen, die in Bodenmaterial inkubiert wurden, das mit Hg^{2+} gespikt war. Bei diesen Proben konnte eine drei bis dreieinhalb-fach höhere Konzentration an Methylquecksilber gemessen werden als in den Versuchsansätzen ohne zugesetztes Hg^{2+} . Im Durchschnitt betrug die Konzentration an Methylquecksilber 62 ng/g

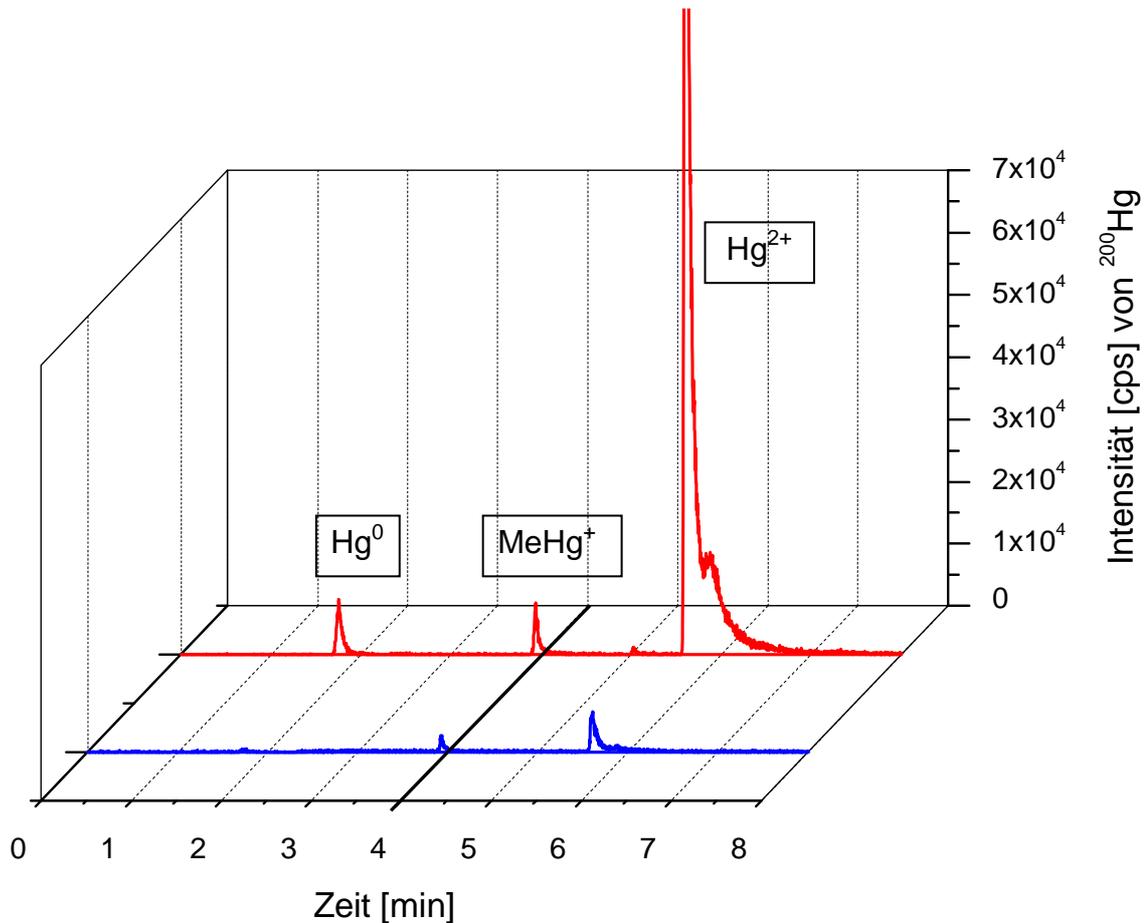
Ergebnisse

Trockengewicht. Auch lag die relative Standardabweichung bei diesen Proben nur bei 9% im Gegensatz zu den Proben ohne Zugabe von Quecksilber zu dem Bodenmaterial.

Tab. 23: Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern nach Inkubation in mit 4 mg Hg²⁺ gespiktem Bodenmaterial pro kg.

| Wurmprobe (6 Parallelen) | Konzentration an Methylquecksilber im Trockengewicht [ng/g] | Mittelwert | Standard abweichung | relative Standardabweichung [%] |
|-----------------------------|--|------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1b | 65,32 | 62,37 | ±5,77 | 9 |
| 2b | 52,49 | | | |
| 3b | 68,93 | | | |
| 4b | 63,57 | | | |
| 5b | 61,52 | | | |
| 6b | 66,63 | | | |

Nach dem Überprüfen der Werte mit dem Ausreißertest von Dean und Dixon (1951) wurden in der Bestimmung für die unsterilen Proben ohne Quecksilberzugabe (Tab. 22) die Konzentrationen der Probe 3a und 4a als Ausreißer identifiziert. Bei den Konzentrationen mit Zugabe von Quecksilber zu dem Boden (Tab. 23) sind die Proben 2b und 5b Ausreißer ($p = 95\%$). Nach Entfernen dieser Werte und einer neuen Berechnung der relativen Standardabweichung, beträgt diese für den unsterilen „Blank“ Ansatz 9% und für den unsterilen Quecksilber Ansatz 3%. In der Abbildung 17 ist ein typisches Ergebnis-Chromatogramm dargestellt. Für die Separation der einzelnen Quecksilberspezies wurde das im Material und Methoden Teil (2.5.3; Tab. 16) angegebene Temperaturprogramm verwendet.



▭ ^{200}Hg von Wurmgewebe 10 Tage inkubiert in Bodenmaterial mit Zugabe von 4 mg/kg Hg^{2+}
▭ ^{200}Hg von Wurmgewebe 10 Tage inkubiert in Bodenmaterial ohne Zugabe von Hg^{2+}

Abb. 17: Chromatogramm von Gewebeextrakten aus Würmern die sowohl in ungespiktem als auch gespiktem unsterilem Bodenmaterial inkubiert wurden.

3.1.5. Sterile Ansätze

Um die Sterilität zu gewährleisten, wurden die eingewogenen Bodenansätze für 1 h bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ autoklaviert und anschließend bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bebrütet, um mögliche noch lebende Keime oder Sporen wachsen zu lassen. Nach einem Tag wurden die Proben erneut autoklaviert und wieder bebrütet. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Zur Kontrolle wurde ein Bodenhomogenisat auf verschiedene Medienplatten aufgebracht und ebenfalls bebrütet. Auf diesen Platten konnte keinerlei Wachstum beobachtet werden. Anschließend wurde das Bodenmaterial mit einer sterilen Quecksilberlösung gespik und die entsprechende Anzahl an Würmer dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurden die Würmer entnommen und extrahiert.

Tab. 24: Konzentration an Methylquecksilber im Wurmgewebe ohne Zugabe von Quecksilber zum Bodenmaterial.

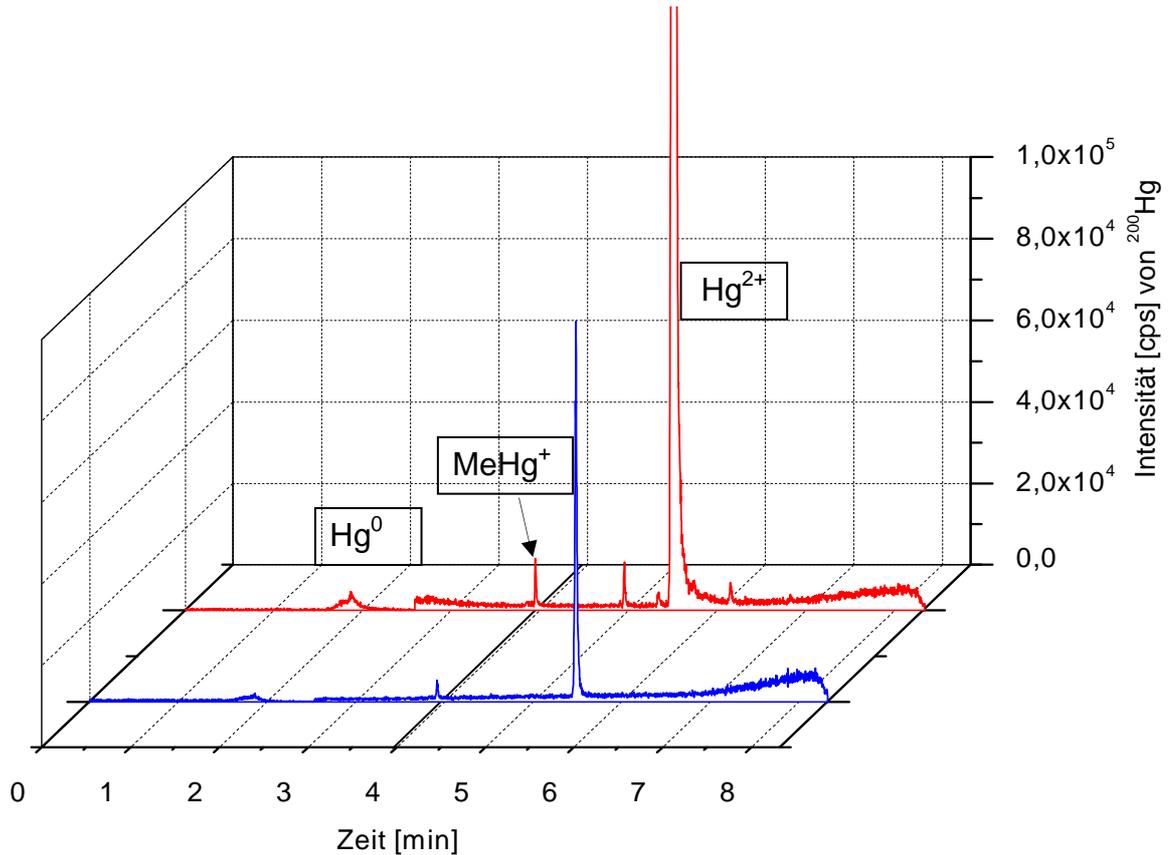
| Wurmprobe (6 Parallelen) | Konzentration an Methylquecksilber im Trockengewebe [ng/g] | Mittelwert | Standard abweichung | relative Standardabweichung [%] |
|-----------------------------|--|------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1c | 22,03 | 17,21 | ±4,05 | 23 |
| 2c | 16,92 | | | |
| 3c | 10,77 | | | |
| 4c | 18,99 | | | |
| 5c | 17,33 | | | |
| 6c | 13,08 | | | |

Die gemessene Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern die in nicht gespiktem Bodenmaterial und unter sterilen Bedingungen inkubiert wurden, betrug zwischen 10 - 22 ng pro g Trockengewicht. Die relative Standardabweichung liegt bei den Proben bei 23% (Tab. 24). In der Tabelle 25 sind die Konzentrationen an Methylquecksilber im Wurmgewebe aus den Versuchsansätzen mit zugesetztem Hg^{2+} aufgelistet. Bei diesen Proben konnte eine zweieinhalb bis dreifach höhere Konzentration an Methylquecksilber gemessen werden als in dem Wurmgewebe aus den Bodenansätzen ohne Hg^{2+} . Im Durchschnitt betrug die Konzentration an Methylquecksilber 52 ng/g Trockengewicht. Auch lag die relative Standardabweichung bei diesen Proben nur bei 9% im Gegensatz zu den Proben ohne Zugabe von Quecksilber in das Bodenmaterial.

Tab. 25: Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von Würmern nach Inkubation in mit Quecksilber versetztem Bodenmaterial.

| Wurmprobe (6 Parallelen) | Konzentration an Methylquecksilber im Trockengewicht [ng/g] | Mittelwert | Standard abweichung | relative Standardabweichung [%] |
|-----------------------------|---|------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1d | 47,95 | 51,92 | ±4,96 | 9 |
| 2d | 58,55 | | | |
| 3d | 49,42 | | | |
| 4d | 45,83 | | | |
| 5d | 55,62 | | | |
| 6d | 54,43 | | | |

Wie bei den Wurmproben, die in unsterilem Bodenmaterial inkubiert wurden, wurden auch hier die Werte mit dem Ausreißertest von Dixon und Dean (1951) kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass bei den Wurmproben ohne Zugabe von Quecksilber in den Boden die Proben 1c und 3c Ausreißer sind (Tab. 24). Bei den Konzentrationen mit Quecksilberzugabe sind die Proben 2d und 4d (Tab. 25) Ausreißer ($p = 95\%$). Nach Entfernen dieser Werte und neuer Berechnung der relativen Standardabweichung, beträgt diese für den unsterilen „Blank“ Ansatz 14% und für den unsterilen Quecksilber Ansatz 7%. In der Abbildung 18 ist ein typisches Ergebnis-Chromatogramm dargestellt. Für die Separation der einzelnen Quecksilberspezies wurde das im Material und Methoden Teil (2.5.3; Tab. 16) angegebene Temperaturprogramm verwendet.



▭ ^{200}Hg von Wurmgewebe 10 Tage inkubiert in Bodenmaterial mit Zugabe von 4 mg/kg Hg^{2+}
▭ ^{200}Hg von Wurmgewebe 10 Tage inkubiert in Bodenmaterial ohne Zugabe von Hg^{2+}

Abb. 18: Chromatogramm von Gewebeextrakten aus Würmern die sowohl in ungespiktem als auch mit Hg^{2+} gespiktem sterilem Bodenmaterial inkubiert wurden.

3.2. Vergleich der unsterilen und sterilen Ansätze

Die gemessenen Konzentrationen an Methylquecksilber im Wurmgewebe aus den verschiedenen Versuchsansätzen wurden zum besseren Vergleich in den folgenden Abbildungen in Form von Balkendiagrammen aufgetragen. Für die jeweiligen Messwerte wurden die entsprechenden Fehlerbalken in die Diagramme eingefügt. In der Abbildung 19 ist die Konzentration an Methylquecksilber aus den einzelnen Messungen aufgetragen mit allen Werten, auch den Ausreißern. Abbildung 20 zeigt dagegen die Konzentration an Methylquecksilber mit den Werten, bei denen die Ausreißer entfernt wurden.

Ergebnisse

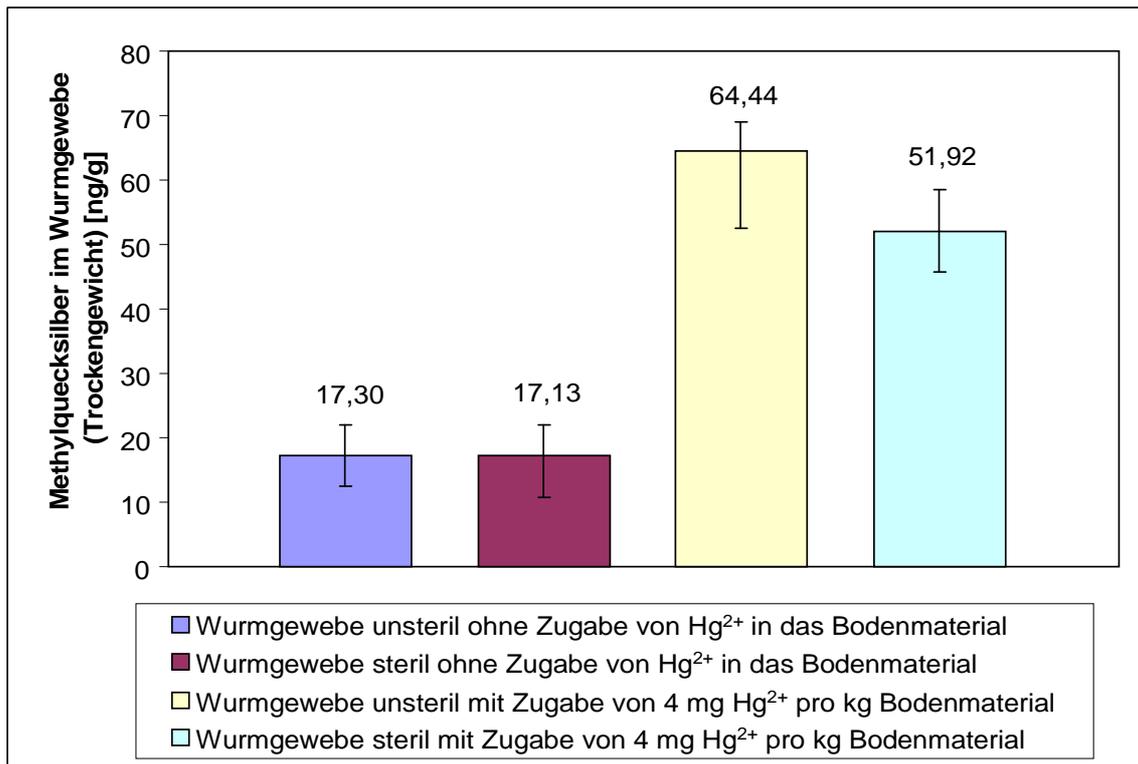


Abb. 19: Gemessene Methylquecksilberkonzentration [ng/g] im Wurmgewebe aller Versuchsansätze mit den Ausreißern und den entsprechenden Fehlerbalken.

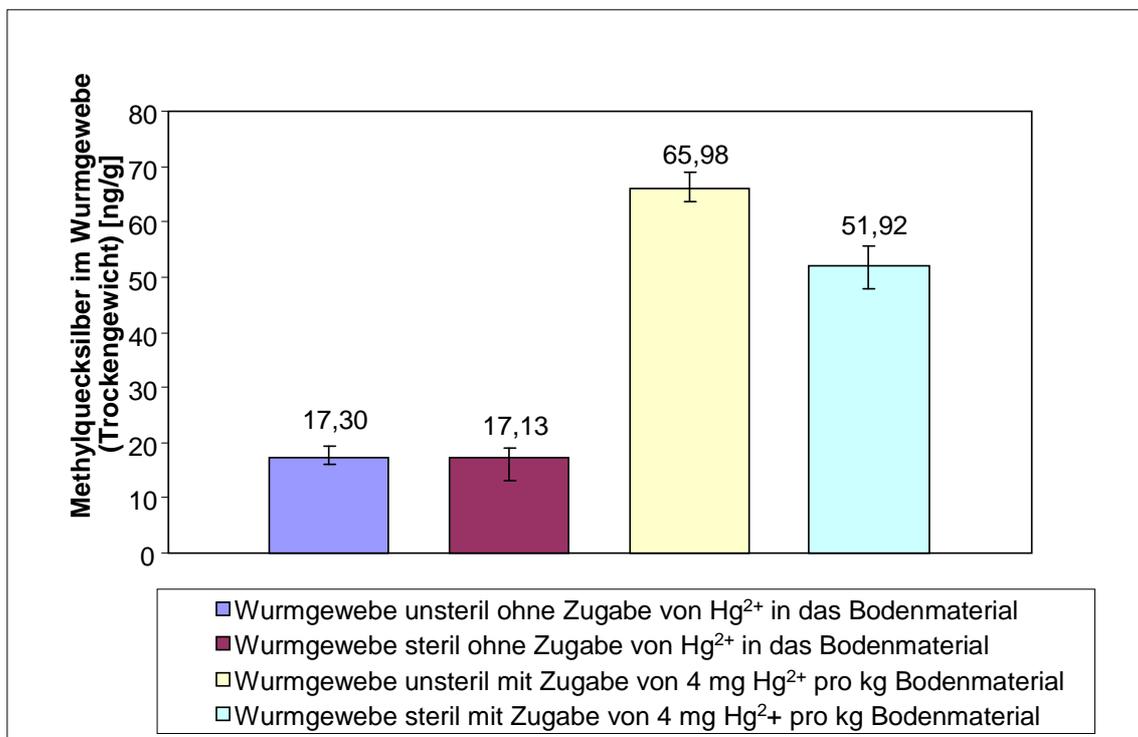


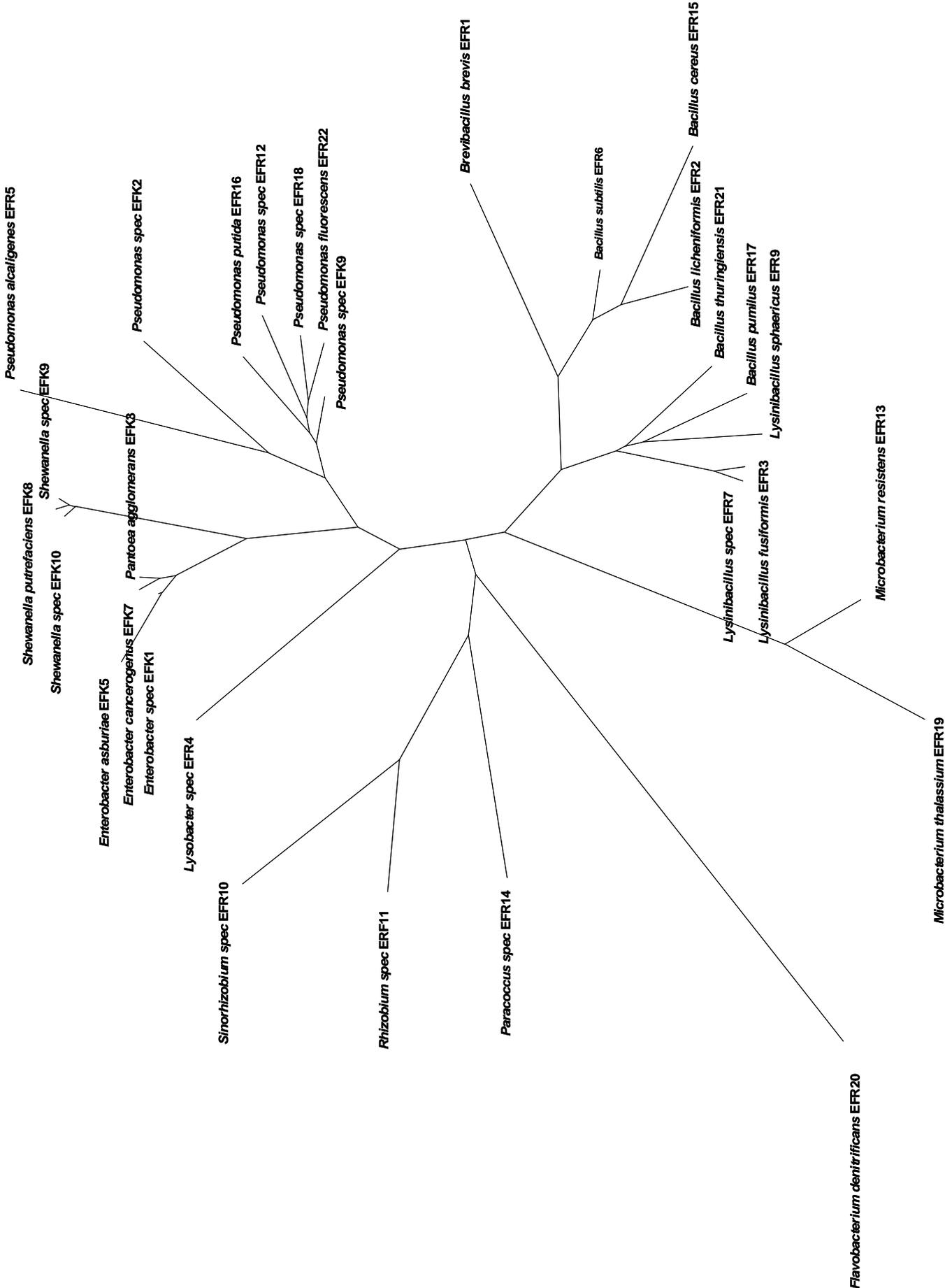
Abb. 20: Gemessene Methylquecksilberkonzentration [ng/g] im Wurmgewebe aller Versuchsansätze ohne die Ausreißer und mit den entsprechenden Fehlerbalken.

3.3. Isolierung von Darmmikroorganismen

Für die Isolierung der Bakterien wurde das Darmepithel des Wurms entnommen und in sterilem Phosphatpuffer homogenisiert. Aus dieser Suspension wurden anschließend die entsprechenden Kulturmedien beimpft und bebrütet. Jeden Tag wurde auf ein Wachstum kontrolliert und sobald dies zu beobachten war auf entsprechende Agarplatten ausgespatelt. Für die Gewinnung der Reinkulturen wurden fraktionierte Ausstriche durchgeführt. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis Einzelkolonien erkennbar waren. Diese wurden anschließend wieder in ein Flüssigmedium überimpft und aus diesen Kulturen wurde mit den beschriebenen Extraktions-Kits die DNA isoliert und für die Sequenzierung vorbereitet. Mit diesen mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden konnte eine Vielzahl an verschiedenen aeroben und fakultativ aeroben Mikroorganismen aus dem Wurmdarm isoliert werden, die dann für die Screeningexperimente auf eine mögliche Methylquecksilber Bildung überprüft wurden. Die ermittelten 16S rDNA Sequenzen der Isolate sind im Anhang aufgeführt. Diese Sequenzen wurden dann mit dem Programm GenDoc überprüft und mittels der Datenbank von NCBI und des Ribosomal Database Projekt identifiziert. Anschließend konnten die Sequenzen der so identifizierten Mikroorganismen in das Programm Clustal X übertragen und ein Stammbaum erstellt werden (Abb. 21). In der Tabelle 26 sind die sowohl isolierten Kulturen wie auch die jeweiligen Klone, die in dem Darm von *Eisenia foetida* nachgewiesen werden konnten, aufgetragen. Die isolierten Kulturen sind mit der Abkürzung EFR und die Klone mit EFK abgekürzt. Anhand dieser Daten wurde der Stammbaum erstellt.

Tab. 26: Isolierte Reinkulturen und Klone aus dem Darmtrakt von *Eisenia fetida*.

| Medium | Bezeichnung | 16S rDNA-Identifizierung | Bp [%] |
|----------------------|-------------|-------------------------------------|---------------|
| <i>Bacillus</i> | EFR1 | <i>Brevibacillus brevis</i> | 431/433 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR2 | <i>Bacillus licheniformis</i> | 448/450 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR3 | <i>Lysinibacillus fusiformis</i> | 481/483 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR4 | <i>Lysobacter sp.</i> | 453/455 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR5 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | 479/481 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR6 | <i>Bacillus subtilis</i> | 448/449 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR7 | <i>Lysinibacillus sp.</i> | 473/473 (100) |
| <i>Bacillus</i> | EFR8 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 483/485 (99) |
| <i>Bacillus</i> | EFR9 | <i>Lysinibacillus sphaericus</i> | 451/452 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK1 | <i>Enterobacter sp.</i> | 471/472 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK2 | <i>Pseudomonas sp. 2</i> | 446/456 (97) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK3 | <i>Pantoea agglomerans</i> | 918/921 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK4 | <i>Pseudomonas jinjuensis</i> | 496/501 (98) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK5 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 814/815 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK6 | <i>Pseudomonas sp. 6</i> | 491/491 (100) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK7 | <i>Enterobacter cancerogenus</i> | 486/488 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK8 | <i>Shewanella putrefaciens</i> | 495/499 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK9 | <i>Shewanella sp. 1</i> | 475/479 (99) |
| <i>Desulfovibrio</i> | EFK10 | <i>Shewanella sp. 2</i> | 500/505 (99) |
| Glycerin-Boden | EFR10 | <i>Sinorhizobium sp.</i> | 478/478 (100) |
| Glycerin-Boden | EFR11 | <i>Rhizobium sp.</i> | 499/503 (99) |
| Glycerin-Boden | EFR12 | <i>Pseudomonas sp. 4</i> | 499/508 (98) |
| Hefeextrakt | EFR13 | <i>Microbacterium resistens</i> | 479/484 (99) |
| Hefeextrakt | EFR14 | <i>Paracoccus sp.</i> | 502/505 (99) |
| Hefeextrakt | EFR15 | <i>Bacillus cereus</i> | 418/420 (99) |
| Hefeextrakt | EFR16 | <i>Pseudomonas putida</i> | 483/484 (99) |
| Hefeextrakt | EFR17 | <i>Bacillus pumilus</i> | 480/841 (99) |
| Plate-Count | EFR18 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 472/472 (100) |
| Plate-Count | EFR19 | <i>Microbacterium thalassium</i> | 434/435 (99) |
| Plate-Count | EFR20 | <i>Flavobacterium denitrificans</i> | 465/466 (99) |
| Plate-Count | EFR21 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | 481/484 (99) |
| <i>Rizobium</i> | EFR22 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 455/455 (100) |



0.1

Abb. 21: Stammbaum der Neuisolate und 16S rDNA-Klone aus dem Darm von *Eisenia foetida*

3.4. Screening auf quecksilbermethylierende Bakterien

Für die ersten Screeningexperimente wurden die isolierten Reinkulturen in den entsprechenden Medien inkubiert und anorganisches Quecksilber zugegeben. Dabei wurde jeweils 1 µg Quecksilber auf 1 g Medium zugegeben. Um eine mögliche photochemische Methylierung von Quecksilber zu unterbinden, wurden die Proben in Aluminiumfolie gewickelt und in den Brutraum gestellt. Nach 7 Tagen Inkubation wurde die Kultur mit TMAH wie in 2.5.1. beschreiben extrahiert und mittels der GC-AFS gemessen.

3.4.1. Screeningergebnisse mit Reinkulturen

Bei den isolierten aeroben Reinkulturen war es nicht möglich, einen potentiellen Methylierer zu finden. In keiner Reinkultur konnte nach der siebentägigen Inkubation, in einem Medium mit Zugabe von anorganischem Hg^{2+} Methylquecksilber nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde ein anderer Weg zum Überprüfen auf mögliche Quecksilbermethylierer durchgeführt (siehe 3.4.2.).

3.4.2. Screeningversuche von Mischkulturen

Für die weiteren Untersuchungen von Mikroorganismen, die in der Lage waren, Quecksilber zu methylieren wurden Mischkulturen direkt aus dem Darm von *Eisenia foetida* angereichert. Dafür wurde die Präparation des Darmepithels direkt im Anaerobenzelt unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das entnommene Darmepithel wurde in das entsprechende anaerobe Medium übertragen und eine Konzentration von 1 µg/g anorganisches Quecksilber zugefügt. Nach siebentägiger Inkubation wurden die Kulturen auf ein Wachstum überprüft und anschließend mit TMAH extrahiert (siehe 2.5.1.). Allerdings konnte mit dieser Methode Methylquecksilber nur nahe dem Detektionslimit der AFS nachgewiesen werden. Um zu kontrollieren, ob möglicherweise gebildetes Sulfid das Quecksilber gebunden hatte, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem das Medium mit den Organismen abzentrifugiert und einmal der Überstand und einmal der Niederschlag zusammen

Ergebnisse

mit den Bakterien extrahiert wurde. In den Abbildungen 22 und 23 sind die beiden Chromatogramme des Versuches wiedergegeben.

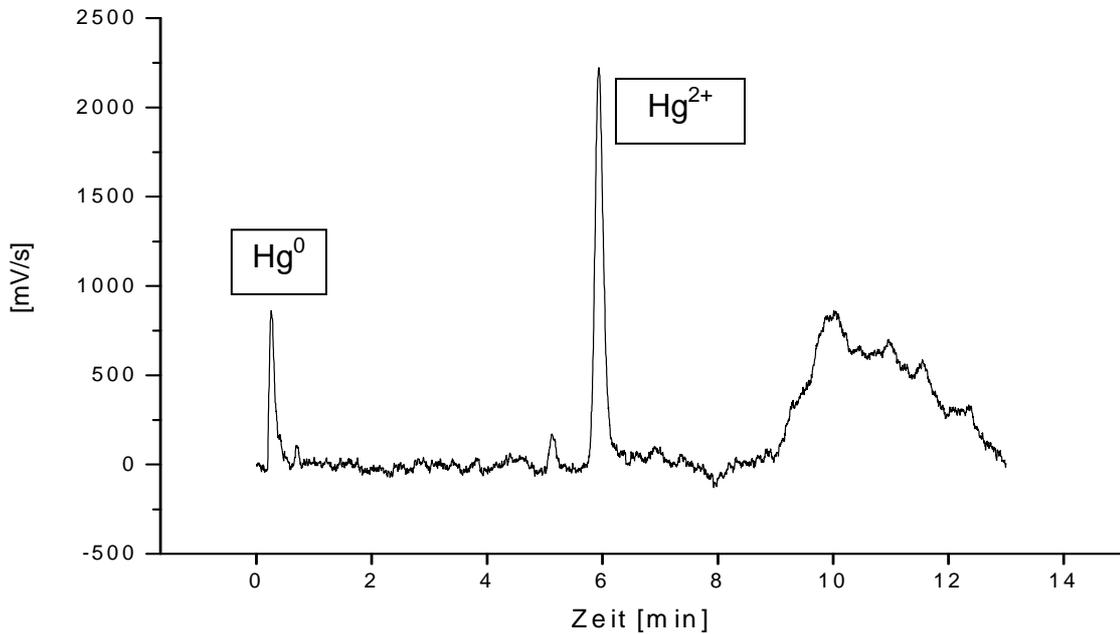


Abb. 22: Chromatogramm der Quecksilberspezies im Sulfidniederschlag einer Mischkultur nach Extraktion mit TMAH (nach sieben tägiger Inkubation).

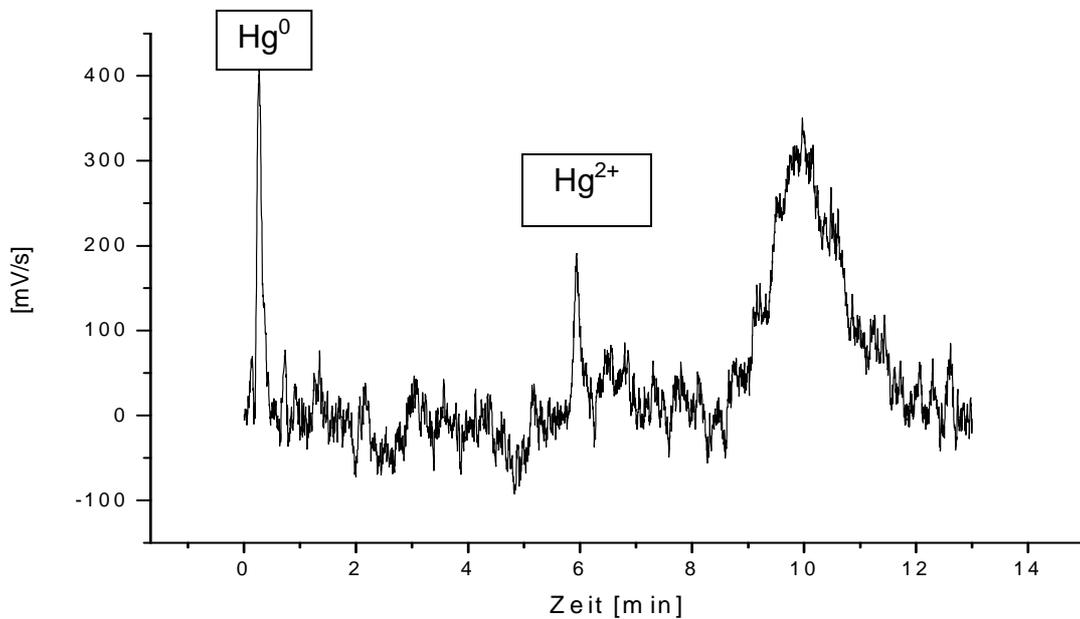


Abb. 23: Chromatogramm der Quecksilberspezies im Medium (DSMZ 63) Überstand einer Mischkultur nach Extraktion mit TMAH (nach sieben tägiger Inkubation).

Ergebnisse

Aus den Abbildungen 22 ist zu erkennen, dass der mengenmäßig größte Anteil der Quecksilberspezies als Sulfid im Niederschlag vorlag. Da mit der TMAH-Prozedur eine Auflösung des Niederschlages nicht möglich war, musste eine andere Methode zur Extraktion der Quecksilberspezies aus den kultivierten Mischkulturen angewendet werden. Diese Methode war die von Yang et al. (2009) beschriebene Extraktion mit methanolischer Kaliumhydroxidlösung und Zugabe von Kupfersulfat/Natriumoxalat zu dem Derivatisierungsreagenz. In den Abbildungen 24 und 25 sind Probeläufe mit dieser Extraktionsmethode mit und ohne Zugabe des Maskierungsreagenzes Kupfersulfat und Natriumoxalat dargestellt. Durch den Überschuss an Kupfer wird die gebundene Quecksilberspezies von dem Sulfid verdrängt. Das Natriumoxalat dient in dieser Reaktion als ein Katalysator. Dabei ist zu erkennen, dass ohne die Zugabe von dem Reagenz kein Methylquecksilber in der Probe nachzuweisen war (Abb. 24).

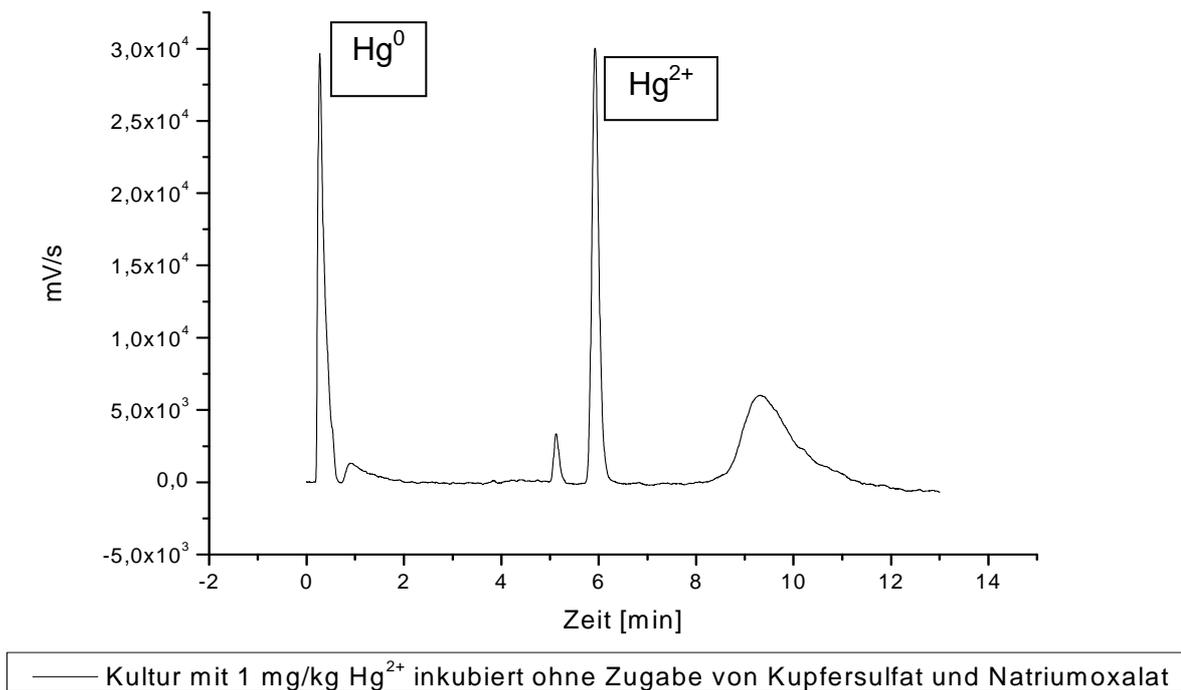


Abb. 24: Chromatogramm des Extraktes von einer Bakterienmischkultur aus dem Wurmdarm nach sieben tägiger Inkubation in quecksilberhaltigem Medium ohne die Zugabe von Kupfersulfat und Natriumoxalat zu dem Derivatisierungsreagenz.

Ergebnisse

In der Abbildung 25 ist die gleiche Probenextraktion in die GC-AFS injiziert worden, allerdings mit dem Unterschied, dass zu der Derivatisierung mit Natriumtetrapropylborat noch das Maskierungsreagenz zugegeben wurde. Es ist zu erkennen, dass durch dessen Zugabe Methylquecksilber in der Probe nachweisbar war,

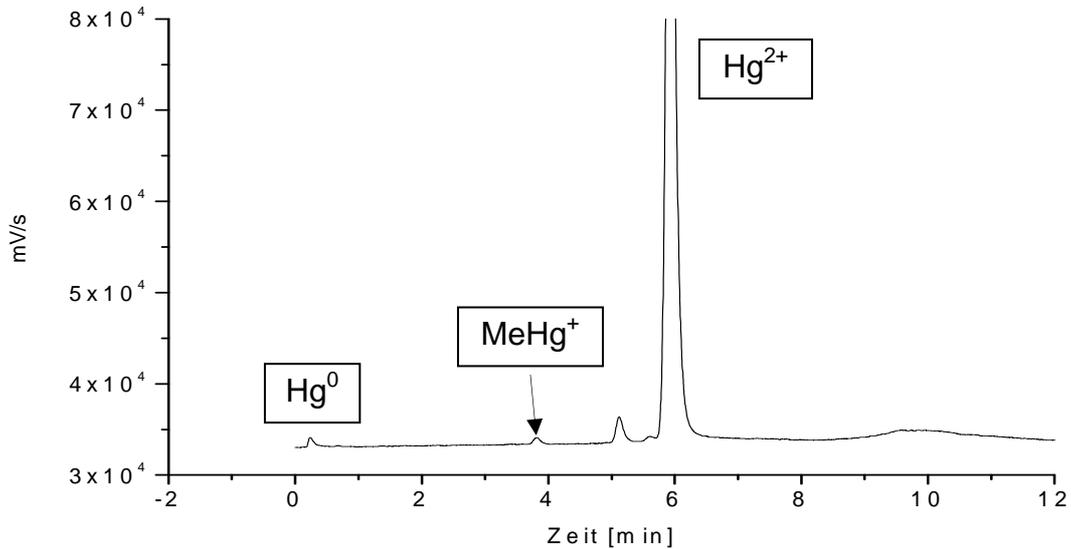


Abb. 25: Chromatogramm eines Extraktes von einer Bakterienmischkultur aus dem Wurmdarm nach sieben tätiger Inkubation in quecksilberhaltigem Medium (1 mg Hg pro kg Medium) mit Zugabe von Kupfersulfat und Natriumoxalat zu dem Derivatisierungsreagenz.

Zur Überprüfung der Ergebnisse, dass nicht durch eine abiotische Reaktion des Kupfersulfat/Natriumoxalatreagenz mit dem anorganischen Quecksilber Methylquecksilber gebildet wurde, war es notwendig weitere Versuche mit dieser Methode durchzuführen. Dafür wurde ein Hg^{2+} -Standard genauso wie die Probenmatrix mit der methanolischen Kaliumhydroxidlösung behandelt und anschließend zur Derivatisierung das Kupfersulfat/Natriumoxalatreagenz zugegeben. Nach der Injektion in die GC-AFS konnte kein Methylquecksilber in dieser Probe nachgewiesen werden. Aus diesem Grund konnte eine abiotische Methylierung des Quecksilbers ausgeschlossen werden und die Extraktionsmethode für die weiteren Ansätze verwendet werden.

Ergebnisse

Aufgrund einiger Änderungen im Detektionssystem, wie einer neuen GC-Säule und Verkürzen der Transferline hatte sich für die folgenden Messungen die Retentionszeit der einzelnen Quecksilberverbindungen verändert. Aus diesem Grund mussten die Retentionszeiten anhand von Standards neu ermittelt werden. Die Quecksilberverbindungen zeigten nach den Veränderungen eine stark verkürzte Retentionszeit: So war z.B. Methylquecksilber nicht mehr bei 3,8 min zu detektieren sondern bei 0,8 min. Ähnlich verhielt es sich auch bei Hg^{2+} , das bei der alten Einstellung nach etwa 5,9 min und bei der neuen bei 3,2 min detektiert wurde. Die nachfolgenden Messungen wurden dann alle mit diesen neuen Retentionszeiten definiert.

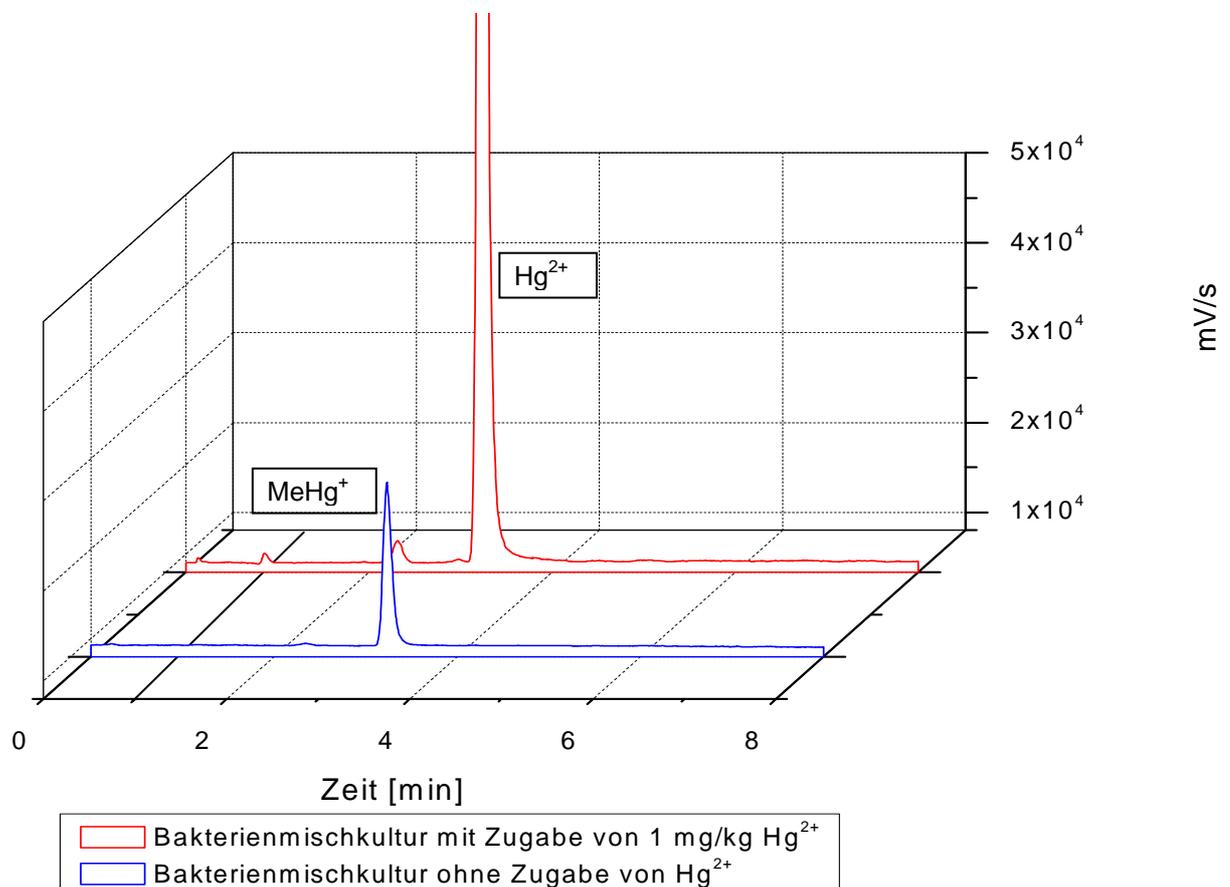


Abb. 26: Chromatogramm des Extraktes aus einer Bakterienmischkultur mit und ohne Zugabe von Hg^{2+} .

Zur Quantifizierung der Methylquecksilberkonzentration in der Mischkultur wurde eine externe Kalibrierung mit der GC-AFS unter den gleichen Bedingungen und auch am selben Tag durchgeführt, damit mögliche Schwankungen sowohl für die Kalibrierung

Ergebnisse

als auch die Probenmessung zutrifft. In der Abbildung 27 ist die nach der Messung der einzelnen Standards erstellte Kalibrationskurve mit der entsprechenden linearen Regression aufgetragen. Aus der so ermittelten Formel für die Geradengleichung konnte die Konzentration von Methylquecksilber in den jeweiligen Proben bestimmt werden. Die so berechneten Werte sind in der Tabelle 27 zusammen mit den Zellzahlen in den einzelnen Mischkulturen aufgetragen. Die Zellzahl Bestimmung wurde an demselben Tag vorgenommen, an dem auch die Extraktion der Quecksilberspezies aus den Proben erfolgte. Dafür wurden die Zellen mit der einer Zählkammer ausgezählt und der Titer der Zellen berechnet.

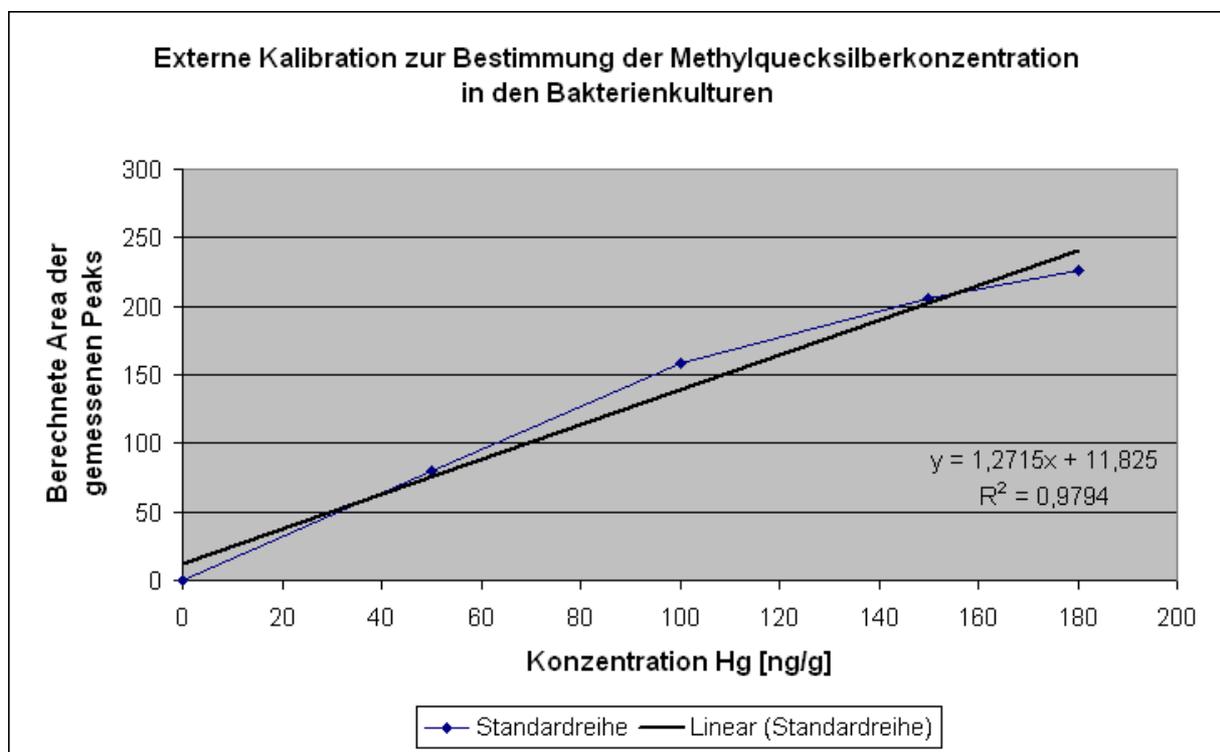


Abb. 27: Kalibrationskurve der gemessenen Quecksilberstandards für die Quantifizierung von Methylquecksilber in den Bakterienmischkulturen.

Ergebnisse

Tab. 27: Konzentration an Methylquecksilber in den Mischkulturen und der jeweilige Titer in den Kulturen.

| | Ansatz 1 | Ansatz 2 | Ansatz3 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Zellzahl/ml | $3,66 \cdot 10^8$ | $9,86 \cdot 10^9$ | $9,42 \cdot 10^9$ |
| Methylquecksilberkonzentration [ng in 5 ml] | 19 | 53 | 56 |
| Methylquecksilberkonzentration [ng/ml] | 3,87 | 10,57 | 11,13 |

3.4.3. Identifizierung der Bakterien in der Mischkultur

Zur Identifizierung der in der Mischkultur enthaltenen Mikroorganismen, wurde die DNA mittels eines Quiagen Kits wie in 2.4.3. beschrieben extrahiert. Dann wurde mit dem Touchdown-PCR-Programm, das in der Tabelle 12 beschrieben ist, amplifiziert und anschließend auf ein 30 - 70%iges DGGE Gel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in einem 1xTAE-Puffer, der mit Ethidiumbromid versetzt war für eine halbe Stunde gefärbt und nach dem Entnehmen kurz mit frischem TAE Puffer gewaschen. Das Gel wurde dann auf die Geldokumentationseinheit (BioVison CN 3000, Vilber-Lourmat, Eberhardzell) gelegt und fotografiert. In der Abbildung 28 ist nur die Spur dargestellt, in der die aus der Mischkultur enthaltene DNA aufgetragen wurde.

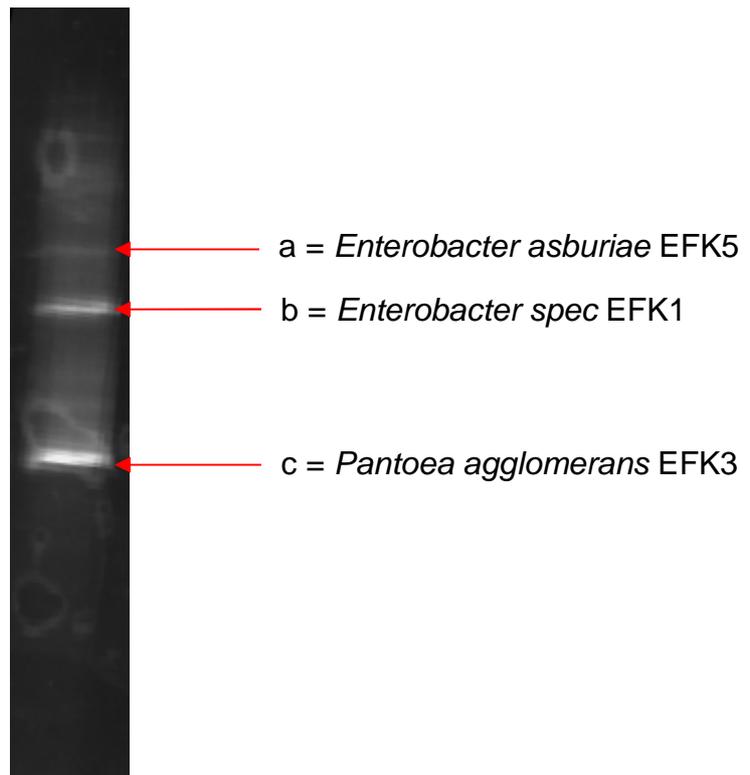


Abb. 28: DGGE der 16S rDNA Amplifikate aus einer Bakterienmischkultur die eine Methylierung von Quecksilber aufwies.

Dabei sind drei Banden gut und einige weitere Banden schwach zu erkennen. Allerdings konnten bei dem Ausschneiden auf dem UV Tisch, aufgrund des schnellen Verblässens des Ethidiumbromids nur noch die ausgeprägten Banden ausgeschnitten werden. Diese drei Banden, die ausgeschnitten und anschließend eluiert wurden sind in der Abbildung 28 mit a, b, c markiert. Für die Elution der DNA aus dem Gel wurden diese Gelstücke über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank mit 100 µl PCR Wasser inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mit dem Eluat eine weitere Touchdown PCR (Tab. 12) durchgeführt um die gewonnenen DNA zu vervielfältigen. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Quiagen Purification Kit gereinigt und zur Sequenzierung zu MWG-Eurofin geschickt. Der Abgleich der erhaltenen 16S rDNA Sequenzen mit der Datenbank von NCBI und RDP ergab die beste Übereinstimmung mit folgenden drei Bakterien:

Ergebnisse

a → NCBI: zu 99% *Enterobacter asburiae*

nahster Verwandter laut NCBI → *Enterobacter asburiae* Stamm J2S4

Bezeichnung des gefundenen Stammes: *Enterobacter asburiae* EFK5

b → NCBI: zu 99% *Enterobacter spec*

nahster Verwandter laut NCBI → *Enterobacter spec* Stamm FN302

Bezeichnung des gefundenen Stammes: *Enterobacter spec* EFK1

c → NCBI: zu 99% *Pantoea agglomerans*

nahster Verwandter laut NCBI → *Pantoea agglomerans* Stamm XW112

Bezeichnung des gefundenen Stammes: *Pantoea agglomerans* EFK3

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die mikrobielle Methylierung von Quecksilber im Darm und die Akkumulation im Gewebe des Invertebraten *Eisenia foetida* nachzuweisen. Dafür war es zunächst notwendig, eine geeignete Extraktionsmethode zu finden, die ein Maximum des gebildeten Methylquecksilbers aus der biologischen Matrix löst. Auch die verwendete analytische Methode zur Detektion des gebildeten Methylquecksilbers musste so abgestimmt werden, dass mögliche Matrixeffekte zu vernachlässigen waren. Aus diesem Grund wurde auf die Isotopenverdünnungsmethode zurückgegriffen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Identifikation der bei der Methylierung von Quecksilber beteiligten Mikroorganismen aus dem Darmtrakt von *Eisenia foetida*. Dazu musste ein möglichst breites Spektrum an Kulturmedien verwendet werden, um eine Vielzahl von unterschiedlichen Mikroorganismen zu erhalten. Diese wurden mit molekularbiologischen Methoden identifiziert und anschließend auf eine mögliche Methylierung von Quecksilber untersucht. Dazu wurde dem Kulturmedium eine definierte Menge an anorganischem Hg^{2+} zugefügt und auf Bildung von Methylquecksilber untersucht.

4.1. Kultivierungsoptimierung von *Eisenia foetida*

Zu Beginn der Arbeit war es notwendig, eine Kultur des Modellorganismus *Eisenia foetida* anzulegen. Dabei konnte durch Vorversuche gezeigt werden, dass sich dieser Organismus für die Studie besonders gut eignet. *Eisenia foetida* ist ein häufig verwendeter Modellorganismus in der Biologie. Dies liegt besonders an der einfachen Handhabung, der hohen Reproduktion des Wurms (Domiguez et al., 2003) und den Fütterungseigenschaften (Edwards und Fletcher, 1988). Von besonderer Bedeutung ist auch das Anlegen einer „Stammkultur“, damit die Ergebnisse der Versuche auch vergleichbar sind. In der Arbeit von Lowe und Butt (2007) konnte gezeigt werden, dass eine Kultur von *Eisenia foetida* nur geeignet ist, wenn diese sich an die zu untersuchenden Umweltbedingungen angepasst hat. Damit ist gemeint, dass sich der Modelorganismus schon einige Zeit in dem entsprechenden Bodenmaterial befinden soll, wenn die Ergebnisse vergleichbar sein sollen. Häufig

Diskussion

werden in Versuchen Freilandkulturen oder gekaufte Würmer direkt in den Modelboden zugegeben. Allerdings ist in diesen Fällen die Sterblichkeitsrate besonders hoch und die Reproduktionsrate niedrig. Aus diesem Grund war es notwendig, eine Wurmkultur anzulegen, die in dem identischen Bodenmaterial angezogen wurde, in dem anschließend auch die Versuche durchgeführt wurden. Allerdings war zu Beginn der Versuche die Sterblichkeitsrate der Würmer in den Versuchen besonders hoch und lag bei beinahe 100%. Um dies zu unterbinden musste der Ansatz verändert werden und unterschiedliche Modelle wurden untersucht. Als besonders geeignet erwies sich die Variante, bei der in eine Kristallisierschale das Bodenmaterial und die Würmer direkt zu diesem Ansatz zugegeben wurden. Der Boden wurde zuvor durch ein 2 mm Sieb ausgesiebt, um ein homogenes Material zu erhalten. Nach Einbringen des Bodenmaterials in die Schalen wurde zu den jeweiligen Ansätzen 200 ml MilliQ-Wasser pro 700 g Boden mit und ohne Quecksilber zugegeben. Dies war die beste Methode, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Quecksilberlösung im Bodenansatz zu erreichen. Anschließend wurden die Würmer dem Ansatz dazugegeben und für die entsprechende Zeit inkubiert. Zu Beginn zeigten allerdings auch diese Versuchsvarianten eine noch relativ hohe Sterblichkeit der Würmer (ca. 40%), wobei es egal, war ob es sich um einen Ansatz mit oder ohne Quecksilber handelte. Aus diesem Grund war es erneut notwendig, den Inkubationsansatz weiter zu verfeinern. Eine Maßnahme, die eine entscheidende Verringerung der Sterblichkeitsrate hervorrief, war, dass der Boden alle zwei Tage mit einer ausreichenden Menge an Wasser benetzt wurde. Dies gewährleistete eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Würmer, die eine feuchte Außenhaut benötigen, um eine Sauerstoffaufnahme mittels Diffusion durchführen zu können. Mit diesen Modifikationen konnte die Sterblichkeitsrate von anfangs fast 100% bei den ersten Versuchen, auf ca. 7 - 10% gesenkt werden (siehe Ergebnisse Tab. 19). Beyer et al. (1985) untersuchten in ihrer Studie wie sich anorganisches und auch organisches Quecksilber auf die Regeneration von *Eisenia foetida* auswirkte. Dabei konnten sie eine Sterblichkeitsrate von bis zu 21% bei *Eisenia foetida* nachweisen, wenn diese in Bodenmaterial inkubiert wurden, welches mit 5 mg/kg Methylquecksilber versetzt war. Bei Konzentration von 25 und 125 mg/kg Methylquecksilber betrug die Sterblichkeitsrate nach 12 Wochen Inkubation 100%. Auch auf die Regeneration von Wurmsegmenten hatte die Methylquecksilberkonzentration einen Einfluss. Dabei

Diskussion

konnte gezeigt werden, dass bei Würmern, die an dem 50. und 51. Segment abgeschnitten wurden, eine 100% Regeneration stattfand, wenn diese in den Kontrollproben und dem Bodenmaterial mit 1 mg/kg Methylquecksilber inkubiert wurden. In dem Boden mit 5 mg Methylquecksilber pro kg Boden zeigten nur noch 29% der Würmer eine Regeneration der Segmente. Abassi und Soni (1983) untersuchten die Sterblichkeitsrate von *Octochaetus pattoni* nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an anorganischem Quecksilber zu dem Versuchsboden. Bei diesem Modelorganismus konnte ein LC_{50} von 2,39 mg/kg anorganischem Quecksilber nach 10 Tagen Inkubation bestimmt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus konnte keine erhöhte Sterblichkeitsrate bei 4 mg/kg anorganischem Quecksilber nachgewiesen werden. Selbst bei höheren Konzentrationen, wie z.B. 8 mg/kg war die Sterblichkeit der Würmer gegenüber dem Kontrollversuch nicht signifikant höher. Ausschlaggebender für die Sterblichkeit der Würmer war eher der Umstand, ob die Versuchsbedingungen unter sterilen oder unsterilen Bedingungen durchgeführt wurden. Bei den sterilen Bodenansätzen betrug die Sterblichkeitsrate der Würmer nach 14 Tagen 100%. Diese Tatsache deutet eher darauf hin, dass es für *Eisenia foetida* notwendig ist, sich in einem Boden mit lebenden Mikroorganismen zu befinden, um die eigene Darmflora aufrecht zu erhalten, damit eine intakte Futteraufnahme und Verwertung stattfinden kann. Edwards und Fletcher (1988) zeigten die Notwendigkeit von verschiedenen Bakterien, Pilzen, Protozoen und auch Algen für Regenwürmer, um eine funktionstüchtige Nahrungsverwertung aufrecht zu erhalten. Dabei muss aber allerdings auch zwischen den verschiedenen Gattungen unterschieden werden. Während z. B. *Lumbricus terrestris* hauptsächlich intaktes organisches Material verwertet, kann *Eisenia foetida* vor allem organisches Material verwerten, welches schon in einem Zustand der Zersetzung ist. Viele Studien beschäftigten sich mit der Zugabe einer speziellen Mikroflora zu dem Bodenmaterial um deren Einfluss auf das Wachstum und die Reproduktion von *Eisenia foetida* zu untersuchen (Flack und Hartenstein, 1984; Hand et al., 1988; Neuhauser et al., 1980). Allerdings wurde bei keinen der Experimente auch eine sterile Variante mitgeführt (Edwards und Fletcher, 1988). In dieser Arbeit wurde dagegen ein steriler Bodenansatz verwendet, um den Einfluss der Bodenflora auf die Methylierung von Quecksilber zu untersuchen. Dies wurde gemacht, um eine Aussage treffen zu können, ob die im Boden vorkommenden Mikroorganismen an der Methylierung beteiligt sind oder

hauptsächlich die Darmflora des Wurms. Dabei konnte, wie schon vorher erwähnt, gezeigt werden, dass durch das Verwenden von sterilem Bodenmaterial die Sterblichkeitsrate von *Eisenia foetida* innerhalb von 14 Tagen auf fast 100% stieg.

4.2. Methylquecksilber in *Eisenia foetida*

Nach Bewältigung der Optimierung der Kultur wurden die jeweiligen Proben des Bodenmaterials mit unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Hg^{2+} versetzt und die Würmer in dieses gesetzt. Dieser experimentelle Ansatz sollte zu einem optimalen Verhältnis von Sterblichkeitsrate zu, wenn gebildet, Methylquecksilber im Gewebe führen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann Untersuchungen durchgeführt, um die Methylquecksilberkonzentration in Gewebeproben zu quantifizieren. Dafür wurden sowohl Würmern aus ungespikten und mit 4 mg Hg^{2+} pro kg Bodenmaterial gespikten Ansätzen verwendet. Dabei wurden unsterile und sterile Versuchsansätze gegenüber gestellt, um den Einfluss der Bodenmikroorganismen auf die Methylierung von Quecksilber zu beobachten. Für die Messungen wurde die GC-ICP-MS und zur Quantifizierung die Isotopenverdünnungsmethode verwendet. Die erforderliche Extraktionsmethode wurde für das Wurmgewebe angepasst und mit einem entsprechenden Referenzmaterial validiert. Diese Validierung war notwendig, da auch heute noch die Bestimmung von Methylquecksilber, obwohl es eine Menge neuer und zuverlässiger Analysemethoden gibt, immer noch ein Problem in der analytischen Chemie darstellt. Dies liegt hauptsächlich an der relativ geringen Konzentration, in der Methylquecksilber gegenüber anorganischem Hg^{2+} in biologischen Proben vorliegt. Aus diesem Grund ist es notwendig, bei der Entscheidung mit welcher analytischen Methode der Nachweis erfolgen soll, die zu wählen, die für das untersuchte Element geeignet ist. Doch nicht nur die Detektionsmethode ist ein limitierender Faktor, sondern auch die geeignete Probenaufbereitung. Besonders biologische Matrices können zu einer Ungenauigkeit der Quantifizierung führen. Ein weiterer Punkt bei der Quecksilberanalytik ist die Reinheit der Chemikalien und der verwendeten Labor- und Analysegerätschaften. Schon geringe Kontaminationen in den verwendeten Chemikalien oder z.B. Reaktionsgefäßen können die Messung verfälschen, besonders wenn man im Spurenbereich arbeitet. Dabei ist der sog. Memoryeffekt,

der bei Quecksilber besonders stark ist, mit die größte Gefahr einer Verunreinigung. Aus diesem Grund müssen alle Gerätschaften, die für die Untersuchungen verwendet werden besonders gut gereinigt werden um eine Verfälschung zu vermeiden.

4.2.1. Abhängigkeit Methylquecksilber zu anorganischem Hg^{2+} im Bodenmaterial

Bei diesem Versuchsansatz konnte eine Abhängigkeit der Methylquecksilberkonzentration im Gewebe von der Menge an anorganischem Quecksilber im Bodenmaterial festgestellt werden. In der Abbildung 15 (siehe Ergebnisse Seite 78) wurde die Konzentration an anorganischem Quecksilber gegen die Konzentration an Methylquecksilber im Gewebe von *Eisenia foetida* aufgetragen. Dabei ist gut zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration des anorganischen Quecksilbers im Boden auch die Methylquecksilberkonzentration im Gewebe steigt und die Kurve in höheren Konzentrationen in eine Sättigung übergeht. Dieser Verlauf ist typisch für Reaktion, die durch Enzyme katalysiert werden. Eine enzymatische Methylierung von Quecksilber beschrieb Choi et al. (1994) im Zellextrakt von *Desulfovibrio desulfuricans*. Dabei wird eine Methylgruppe zuerst von Methyltetrahydrofolat durch das Enzym Methyltransferase I auf ein Cobalaminprotein übertragen. Anschließend wird die Methylgruppe durch ein zweites Enzym, die Methyltransferase II auf ein zweiwertiges Quecksilberion übertragen. Die zuerst von Choi und Bartha (1993) vorgeschlagene Methylierung die nur durch Methylcobalamin erfolgt konnte in der Folgestudie 1994 insofern erweitert werden, dass eben auch die genannten enzymatischen Reaktionen im Acetyl-CoA Weg für die Methylierung verantwortlich sind. Besonders interessant bei dem von Choi und Bartha (1993) untersuchten *Desulfovibrio desulfuricans* LS ist, dass er zu den unvollständigen Oxidierern gehört und somit diesen biochemischen Weg zum Abbau von Acetat zu CO_2 nicht benötigt. Choi et al. (1994) nahmen an, dass *Desulfovibrio desulfuricans* LS diesen Weg eher zum Metabolismus für untypische Kohlenstoffquellen verwendet. Aufgrund dieser Arbeit von Choi und seinen Mitarbeitern wird der Acetyl-CoA Weg heute als der biochemische Hauptweg zur Methylierung von Quecksilber angesehen. Ekstrom et al. (2003) konnten allerdings zeigen, dass die Methylierung bei Sulfat reduzierenden Bakterien auch unabhängig von dem Acetyl-CoA Weg stattfinden kann. Dabei

Diskussion

untersuchten sie verschiedene SRBs, bei denen eine Gruppe den Acetyl-CoA-Weg besaß, während die andere Gruppe nicht in der Lage war über diesen biochemischen Weg Kohlehydratsubstrate zu verwerten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigten, dass alle vollständigen Oxidierer, die den Acetyl-CoA Weg besitzen, auch eine Methylierung von Quecksilber durchführen können. Allerdings wiesen auch die nichtvollständigen Oxidierer eine Methylierung auf, jedoch besaßen diese, im Gegensatz zu *Desulfovibrio desulfuricans* LS, keinen Acetyl-CoA- Weg. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Acetyl-CoA Weg nicht der einzige biochemische Weg zur Methylierung von Quecksilber ist, sondern dass wahrscheinlich noch andere Reaktionswege beteiligt sind.

4.2.2. Gesamtquecksilber im Wurmgewebe

Anhand der Ergebnisse aus den Versuchsansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an anorganischem Hg^{2+} wurden alle weiteren Ansätze mit einer Konzentration von 4 mg Hg^{2+} pro kg Bodenmaterial gespikt. Dies wurde gemacht, da sich bei dieser Konzentration die Sättigungskurve in der steigenden Phase befindet und das Verhältnis von Sterblichkeit der Würmer zu der Methylquecksilberausbeute am besten war.

Die Bestimmung der Gesamtquecksilberkonzentration in dem präparierten Wurmgewebe zeigte eine deutliche Schwankung. In der Tabelle 28 sind die jeweiligen berechneten Konzentrationen zusammen mit Literaturdaten aufgetragen.

Tab. 28: Gesamtquecksilberkonzentrationen im Lebend- und Trockengewicht verschiedener Organismen.

| Probe | Gesamtquecksilber [µg/g] | | Literatur |
|---|-----------------------------|----------------|--------------------------|
| | Lebendgewicht | Trockengewicht | |
| <i>Eisenia foetida</i> | | | |
| Unbelastet | n.b. | 0,12- 0,72 | Diese Arbeit |
| Belastet | n.b. | 5,6- 19,2 | |
| <i>Eisenia foetida</i> | | | |
| Unbelastet | 13 | n.b. | Beyer et al., 1985 |
| Belastet | 27-85 | n.b. | |
| <i>Mastotermes darwiniensis</i> | | | |
| Unbelastet | 0,019 | 0,061 | Limper et al., 2008 |
| Belastet | n.b. | 2,12 - 12,86 | |
| <i>Porcellio scaber</i> | 0,03 | n.b. | Jereb et al., 2003 |
| Intestinaltrakt von Insekten aus aquatischen Habitaten | | | |
| Unbelastetes Habitat | 0,05-0,16 | n.b. | Trembley et al., 1998 |
| Belastetes Habitat | 0,14-1,5 | n.b. | |

n.b. = nicht bestimmt

Die bei den Modelorganismus *Eisenia foetida* gefundenen Konzentrationen unterliegen einer starken Schwankung. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Beyer et al. (1985), in deren Untersuchungen die Konzentration des Gesamtquecksilbers im Lebendgewebe von *Eisenia foetida* zwischen 13 µg/g Gesamtquecksilber bei unbelastetem Bodenmaterial bis zu 85 µg/g bei einem Bodenmaterial mit 5 mg/kg Zugabe von Quecksilber schwankt. Hartenstein et al. (1981) beschrieb eine Verweildauer der Nahrung im Wurmdarm von ca. 2,5 bis 3,5 Stunden bei adulten Würmern. Allerdings konnte bei einigen anderen Wurmarten wie z.B. bei *Eisenia andrei*, einem nahen Verwandten von *Eisenia foetida* eine Verweildauer von 11 bis 13 Stunden bei jugendlichen Formen nachgewiesen werden (Fleuren et al., 2003). Aufgrund der Tatsache, dass es nicht immer exakt zu bestimmen ist, ob es sich bei dem Versuchswurm um einen schon ausgewachsenen

oder einen noch im jugendlichen Stadium befindlichen Wurm handelt, kann es vorkommen, dass in den Versuchsansätzen sowohl adulte als auch jugendliche Würmer verwendet wurden. Dadurch resultiert auch eine unterschiedliche starke Aufnahme und Verweildauer der Nahrung im Darm und somit eine unterschiedlich hohe Resorption von Quecksilber in das Wurmgewebe. Ein weiterer Punkt, der zu der erwähnten Schwankung führen kann, ist die Tatsache, dass das Versetzen des Bodenmaterials mit Quecksilber nicht homogen genug erfolgte. Zwar wurde der verwendete Boden zuerst gesiebt, um eine gleichmäßige Korngrösse zu erhalten und anschließend mit dem Quecksilberversetzten Wasser vermischt. Allerdings ist es möglich, dass das anorganische Quecksilber sich unterschiedlich gut an die jeweiligen Bodenpartikel bindet. Quecksilber hat eine besonders hohe Affinität zu organischer Substanz, kann jedoch auch mit mineralischen Bodenkomponenten – pedogene Oxide und Tonmineralien- eine Bindung eingehen (Scheffer und Schachtschabel, 2002). Aufgrund dieser Bindungseigenschaft von Quecksilber kann es passieren, dass in einem Bereich des Bodenmaterials des Versuchsansatzes besonders viel Quecksilber gebunden vorliegt und in einem anderen weniger. Auch ist eine definierte „Futterroute“ des Wurms nicht bestimmbar. Der Wurm durchpflügt den Boden nach den benötigten organischen Substraten zur Verwertung und kann dabei sowohl durch einen Bereich gelangen der eine besonders hohe Konzentration an Quecksilber aufweist oder eben in einen in dem nur eine relativ niedrige Konzentration an Quecksilber vorliegt. Wenn man jedoch die einzelnen Messergebnisse auf Ausreißer untersucht, beläuft sich der Bereich der Gesamtquecksilberkonzentration in gespikten Bodenmaterial zwischen 9,9 und 19,2 µg/g Quecksilber. In der Arbeit von Beyer et al. (1988) konnte eine Konzentration an Quecksilber zwischen 13 µg/g in dem Kontrollansatz nachgewiesen werden und in den mit Quecksilberversetzten Proben eine Konzentration bis zu 85 µg/g bei einer Zugabe von 5 mg Quecksilber pro kg Material.

4.2.3. Methylquecksilber im Wurmgewebe

Bei den Messungen auf Methylquecksilber im Gewebe von *Eisenia foetida*, konnten in den Tieren, die unter unsterilen Bedingungen ohne Quecksilberzugabe angezogen wurden Konzentrationen von ca. 17 ng/g Trockengewicht nachwiesen werden. In

Gewebe-Proben aus Würmern die in Bodenmaterial mit zugesetztem Quecksilber inkubiert wurden, konnten Konzentrationen von ca. 60 ng/g gefunden werden. Dies zeigt einen Anstieg um mehr als das dreifache. Dabei ist zu erwähnen, dass in dem verwendeten Bodenmaterial, weder in dem sterilen noch in dem unsterilen, kein Methylquecksilber nachweisbar war oder die Konzentration unter der Nachweisgrenze der GC-ICP-MS lag und somit nicht detektiert werden konnte. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in den sterilen Bodenproben gemessen werden. Das „Blank“ Wurmgewebe wies eine Konzentration von ca. 17 ng Methylquecksilber pro g Trockengewicht des Wurmgewebes auf. Allerdings war die Konzentration in den mit Quecksilber inkubierten Proben etwas geringer als in den unsterilen Proben. Hier konnte nur eine Konzentration von ca. 51 ng Methylquecksilber nachgewiesen werden. Dies entspricht etwa einer zweieinhalb fachen Erhöhung der Methylquecksilberkonzentration im Wurmgewebe. Auch in den hier verwendeten Bodenproben war kein Methylquecksilber nachweisbar oder wie schon erwähnt, lag es unter dem Detektionslimit. Der Anteil des Methylquecksilbers zum Gesamtquecksilber in den Proben ohne zusätzliche Zugabe von Quecksilber betrug im Falle des unsterilen Ansatzes ca. 7% während der des sterilen Ansatzes bei nur 4 % lag. Dieser Unterschied lag hauptsächlich daran, dass die Gesamtkonzentration an Quecksilber bei den Würmern die im sterilen Boden inkubiert wurden um ca. 45% höher lag als in den Würmern die in unsterilem Bodenmaterial inkubiert wurden. Da das Bodenmaterial aus der gleichen Charge stammte und auch keine höhere Konzentration an Quecksilber in diesem gemessen werden konnte, lässt dies darauf schließen, dass die Würmer in dem sterilen Boden einen höheren Umsatz an Bodenmaterial hatten und so eine höhere Konzentration an anorganischem Quecksilber aufnahmen.

Vergleicht man die Daten der Methylquecksilber- zu den Gesamtquecksilberkonzentrationen mit z.B. der Arbeit von Limper et al. (2008) unterscheidet sich das Verhältnis nur bei den sterilen Bodenproben. Bei den Ansätzen von Limper et al. (2008) lag die Konzentration des Methylquecksilbers im Gewebe von Termiten, die zur Fütterung Sägemehl bekamen, welches kein zusätzliches Quecksilber enthielt, bei ca. 4,1 ng pro g Trockengewicht (Tab. 29). Das Verhältnis von Methyl- zu Gesamtquecksilber betrug etwa 7% in diesen Ansätzen. In dieser Arbeit wurde allerdings kein Unterschied zwischen sterilem oder unsterilem Sägemehl gemacht, da die Wahrscheinlichkeit, dass mögliche Mikroorganismen, die in dem Sägemehl

Diskussion

enthalten sein könnten einen Einfluss auf die Methylierung von Quecksilber haben könnten, relativ gering ist. Dagegen steht die mögliche Methylierung von Quecksilber durch Bodenorganismen in dem verwendeten Bodenmaterial in dieser Arbeit. Zwar konnte Burton et al. (2006) in seiner Studie keine Zunahme von Methylquecksilber im Boden durch Bodenorganismen nachweisen, die somit einen Einfluss auf die akkumulierte Konzentration an Methylquecksilber im Wurmgewebe hätten haben können. Um dies allerdings eindeutig ausschließen zu können, war es für diese Arbeit notwendig auch sterile Ansätze zu untersuchen, um den Einfluss von Bodenorganismen völlig auszuschließen.

Tab. 29: Methylquecksilberkonzentrationen und Verhältnis von Methylquecksilber zu Gesamtquecksilber in einigen verschiedenen Organismen.

| Probe | MeHg Konzentration [ng/g] | | Verhältnis von MeHg zu Gesamt Hg [%] | Literatur |
|---------------------------------|---------------------------|----------------|--------------------------------------|---------------------|
| | Lebendgewicht | Trockengewicht | | |
| <i>Eisenia foetida</i> | | | | |
| Unsteril | n.b. | 17,4 | 7 | Eigene Arbeit |
| steril | n.b. | 17,2 | 4 | |
| <i>Mastotermis darwiniesnis</i> | 1,3 | 4,1 | 7 | Limper et al., 2008 |
| <i>Porcellio scaber</i> | | | | |
| Drüsengewebe | 7,3 | n.b. | 77 | Jereb et al., 2003 |
| Intestinaltrakt | 4,2 | n.b. | 14 | |
| Insektenlarven | | | | |
| Herbivoren | 2 - 30 | n.b. | 10 - 50 | Mason et al., 2000 |
| Predatoren | > 10 - 60 | n.b. | 60 - 100 | |

n.b. = nicht bestimmt

Im dem Gewebe der Würmer, die in Bodenmaterial inkubiert wurden, das eine Zugabe von Quecksilber enthielt, konnte eine Konzentration von ca. 51 ng in den sterilen und ca. 66 ng in den unsterilen Ansätzen nachgewiesen werden. Bei diesen Ansätzen lag das Verhältnis von akkumuliertem Methylquecksilber zu dem im Wurmgewebe gefunden Gesamtquecksilber in einem Bereich von 0,3 bis 1,7%. In einem Fall war sogar ein Verhältnis von fast 7% an Methylquecksilber wiederzufinden. Aufgrund der Tatsache, dass dies jedoch nur einmal auftrat, kann dieser Wert als ein Ausreißer angesehen werden.

In der Arbeit von Limper et al. (2008) konnte bei einer Zugabe von anorganischem Quecksilber zu dem Sägemehl, das den Termiten verfüttert wurde, ein Anstieg der Konzentration von Methylquecksilber bis auf 53 ng/g Trockengewicht an nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Verhältnis 0,15 bis 0,38%. Im Vergleich zu den Arbeiten von Rudd et al. (1980) und Rowland et al. (1975), die eine Methylierung von Quecksilber im Darminhalt von verschiedenen Fischen und von Ratten untersuchten, ist das Verhältnis zwischen Methyl- und Gesamtquecksilber um den Faktor vier bis sechs erhöht. Im Darminhalt von Ratten konnten Rowland et al. einen Anteil an Methylquecksilber von etwa 0,05 bis 0,25% pro g Trockengewicht nachweisen. Diese Methylierung erfolgte in den 16 bis 24 h, die das Quecksilber benötigte um den Darm zu passieren. Im Vergleich liegt die Verweildauer des Darminhaltes in *Eisenia foetida* bei ca. 2,5 bis 3,5 h, was fast um einen Faktor von sechs kürzer ist. Dies lässt darauf schließen, dass der Wurm innerhalb einer kürzeren Zeit mehr Quecksilber durch den Darm schleusen kann und auch eine Methylierung in dieser Zeit durchgeführt wird. Anschließend kann das so gebildete Methylquecksilber von der Darmwand resorbiert werden und sich im Gewebe absetzen.

4.3. Methylierung durch Bakterien

Die Methylierung von Quecksilber durch Bakterien wurde schon in verschiedenen Arbeiten näher diskutiert. Dabei ist das Spektrum der Bakterien, die in der Lage sind Quecksilber zu methylieren, weit gefächert. Rowland et al. (1975) isolierten Bakterien aus dem menschlichen Darm und untersuchten diese Isolate auf ihre Befähigung zur Quecksilbermethylierung. Die in dieser Studie gefundenen Daten sind in der Tabelle

30 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass ein großer Teil der Isolate auch Methylquecksilber produziert. Rudd et al. (1980) untersuchte später die Methylierung von Quecksilber im Darm von Fischen und zeigte auch bei diesen Organismen eine Methylierung. Hamdy und Noyes (1975) isolierten Quecksilber resistente Stämme aus Sedimenten des Savannah Flusses in Georgia. Dabei konnten sie, ähnlich wie auch Rowland et al. Stämme der Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Bacilli* isolieren und testeten diese auf ihre Resistenz gegenüber anorganischem Quecksilber. Dabei zeigten die Stämme von *Enterobacter* und *Bacilli* die größte Resistenz gegenüber Quecksilber. Ein isolierter Stamm von *Enterobacter aerogenes* wies nach dreitägiger Inkubation eine Methylierung von Quecksilber auf, die unter aeroben Bedingungen stärker war als unter anaeroben.

Compeau und Bartha (1985) sowie Pak und Bartha (1998) beschrieben später, dass die sulfatreduzierenden Bakterien (SRBs) eine besonders wichtige Rolle bei der Methylierung von Quecksilber in anaeroben Sedimenten spielen. In ihren Arbeiten konnten SRBs isoliert werden, die die Fähigkeit besaßen, Quecksilber zu methylieren. Für ein SRB konnte auch erstmals von Choi und Bartha (1994) ein möglicher Reaktionsweg für diese Methylierung gefunden werden, wie schon vorher in 4.2.1. ausführlicher beschrieben. Ekstrom et al. (2003) konnten dann später noch weitere SRBs auf ihr Methylierungspotential hin untersuchen und zeigen, dass nicht nur der von Choi und Bartha beschriebene Acetyl-CoA Weg für die Methylierung von Quecksilber verantwortlich zu sein scheint.

Anhand dieser verschiedenen Arbeiten konnte eine eindeutige Abhängigkeit des Aufkommens von Methylquecksilber in der Umwelt durch das Vorhandensein von Mikroorganismen beschrieben werden. Es sind also nicht nur die abiotischen Reaktionen wie z.B. eine photochemisch induzierte Methylierung für die Bildung von Methylquecksilber verantwortlich, sondern auch biotische Wege durch Mikroorganismen. Diese sind laut Berman und Bartha (1986) gegenüber den abiotischen sogar die mengenmäßig vorherrschenden Prozesse.

In der Tabelle 30 sind die von Rowland et al. (1975) und Vonk und Sijpesteijn (1973) getesteten Mikroorganismen aufgelistet, die eine Methylierung von Quecksilber aufwiesen. Auf diese Ergebnisse wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen und mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen verglichen.

Diskussion

Tab. 30: Bildung von Methylquecksilber durch einige Bakterienisolate (Rowland et al., 1975; Vonk und Sijpesteijn, 1973).

| Mikroorganismen | Anzahl getesteter Stämme | Anzahl der positive getesteten Stämme | Konzentration an anorganischem Quecksilber im Medium [$\mu\text{g/ml}$] | Gebildete Menge an MeHg [ng/ml] | Literatur |
|---|--------------------------|---------------------------------------|---|--|----------------------------|
| <i>Streptococcen</i> | 6 | 4 | 5 | 2,1-5,8 | Rowland et al., 1975 |
| <i>Staphylococcen</i> | 10 | 6 | 5 | 0,5-5,0 | |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 3 | 5 | 0,9-3,0 | |
| <i>Hefe</i> | 9 | 4 | 5 | 0,7-1,7 | |
| <i>Lactobacillen</i> | 9 | 1 | 5 | 0,5 | |
| <i>Bacteroide</i> } <i>Bifidobacterien</i> | 10 | 3 | 5 | 0,4-0,6 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | | | 5 | 0,34 | Vonc und Sijpesteijn, 1973 |
| <i>Mycobacterium phlei</i> | | | 20 | 0,345 | |
| <i>Bacillus megaterium</i> | | | 20 | 0,830 | |
| <i>Escherichia coli B</i> | | | 20 | 0,865 | |
| <i>Aerobacter aerogenes</i> | | | 20 | < 0,290 | |

4.3.1. Methylierung von Quecksilber durch Neuisolate

In dieser Arbeit war es nicht möglich, eine Reinkultur zu isolieren, die die Fähigkeit zur Methylierung von Quecksilber besitzt. In vielen Veröffentlichungen, z.B. von Choi und Bartha (1994), Ekstrom et al. (2003) und weiteren wurden hauptsächlich die sulfatreduzierenden Bakterien als Methylierer beschrieben. Dabei spielte es keine Rolle ob sie zur physiologischen Gruppe der vollständigen oder unvollständigen Oxidierer gehören. Auch die von Choi und Bartha angenommene Theorie, dass der Acetyl-CoA Weg verantwortlich ist für die Methylierung, konnte von Ekstrom widerlegt werden, da in ihrer Arbeit auch SRBs gefunden wurden, die eine Methylierung von Quecksilber durchführen, allerdings nicht über den Acetyl-CoA Weg verfügen. Rowland et al. (1975) isolierten aus dem menschlichen Darm verschiedene Mikroorganismen die in der Lage waren Quecksilber zu methylieren und nicht zu den Sulfatreduzieren gezählt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Methylierer im Wurmdarm zu finden und zu identifizieren. Allerdings konnte kein SRB, die als die hauptsächlichlichen Methylierer von Quecksilber gelten, im Wurmdarm nachgewiesen werden. Schon in vorigen Arbeiten, z.B. von Parle (1963), Miles (1963) oder Morgan (1985) wurde die Darmflora verschiedener Wurmarten auf ihre mikrobielle Zusammensetzung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Darmflora des Wurms nicht nur von der eigenen Flora, sondern auch stark von der mikrobiellen Flora des verwendeten Bodenmaterials abhängt. Hauptsächlich wurden im Wurmdarm verschiedene Actinomyceten, Gammaproteobacteria sowie verschiedene Pseudomonaden und auch Vertreter der Bacilli gefunden. Allerdings wurde bisher noch in keiner Arbeit in diesem Zusammenhang ein sulfatreduzierendes Bakterium beschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass diese Bakteriengattung nicht im Darm von Würmern vorkommt oder eben keine Möglichkeit besitzt sich in diesem anzusiedeln. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass in dem verwendeten Bodenmaterial keine Sulfatreduzierer vorkommen und somit eine Ansiedlung im Darm nicht stattfinden kann.

Aus diesen Gründen musste nach weiteren potentiellen Methylierern Ausschau gehalten und die neuisolierten Stämme auf diese Fähigkeit gescreent werden. Die im Darm von *Eisenia foetida* gefundenen Gammaproteobakterien, Bacilli und auch

Actinobacteria wurden entsprechend untersucht. Abbildung 21 (siehe Ergebnisse Seite 89) zeigt den anhand von 16S rDNA-Sequenzen konstruierte Stammbaum aller aus dem Wurmdarm identifizierten Organismen. Dabei ist zu sagen, dass nicht alle identifizierten Organismen als eine Reinkultur isoliert werden konnten. Der Grossteil der Isolate gehört zu den Pseudomonaden wie z.B. *Pseudomonas alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. putida* und den Bacilli wie z.B. *Bacillus licheniformis* oder *B. thuringiensis*. Leider wies keines der genannten Isolate eine Methylierung von Quecksilber auf. Eine ähnliche Beobachtung beschrieben auch Holm und Cox (1975), welche die Stämme *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spec.*, *Bacillus subtilis* und *B. megaterium* auf ihre Transformation von anorganischem Quecksilber in die elementare Form untersuchten. Dabei zeigte sich, dass alle Stämme in der Lage waren, elementares Quecksilber zu bilden, also das anorganische Quecksilber reduzieren konnten. Allerdings war keiner der Stämme in der Lage, das angebotenen anorganischem Quecksilber zu methylieren. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen, die Vonk und Sijpesteijn (1973) mit ähnlichen Stämmen machten. In ihrer Arbeit konnte durch *P. fluorescens*, *E.coli* und auch *B. megaterium* unter aeroben Bedingungen eine Methylierung von Quecksilber nachgewiesen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 340 – 865 ng Methylquecksilber pro Liter Medium nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse und die Tatsache, dass diese Organismen bei Holm und Cox (1975) und auch in den Untersuchungen dieser Arbeit keine Methylierung zeigten, kann an den verschiedenen verwendeten Kulturmedien liegen. Das in der Arbeit von Vonk und Sijpesteijn (1973) benutzte Kulturmedium unterscheidet sich von den anderen verwendeten Nährlösungen hauptsächlich in dem Punkt, dass zu den jeweiligen Ansätzen noch LD-Cystein zugegeben wurde. Ein Einfluss von LD-Cystein auf die Methylierungsrate würde allerdings gegen die Tatsache sprechen, dass Rowland et al. (1975) in verschiedenen aus dem Darm isolierten Bakterien eine Methylierung nachweisen konnten, obwohl ihrem verwendeten Medium kein LD-Cystein zugegeben wurde. Eine andere Möglichkeit für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann auch sein, dass in den jeweiligen Versuchen Subspecies der Organismen verwendet wurden. Es ist denkbar, dass sich diese Organismen nur geringfügig in ihrer enzymatischen Ausstattung unterscheiden, aber durch diesen Unterschied eine Methylierung von Quecksilber durchführen können oder eben nicht. Wie in Tab. 28 gezeigt unterscheiden sich verschiedene Stämme einer Art bezüglich

ihrer Methylierungsfähigkeit. Diese These unterstützen auch die Ergebnisse von Ekstrom et al. (2003), die bei den verwendeten Sulfatreduzierern zeigen konnten, dass nicht alleine der von Choi und Bartha (1994) beschriebene Acetyl-CoA Weg für die Methylierung zuständig ist, sondern dass auch Organismen, die diesen Weg nicht besitzen Methylquecksilber produzieren können.

4.3.2. Methylierung von Quecksilber neuisolierter Mischkulturen

Für die weiteren Untersuchungen mit Mikroorganismen aus dem Darm von *Eisenia foetida* wurden Mischkulturen isoliert. Dabei wurde direkt ein Stück des Darmepithels unter sterilen und anaeroben Bedingungen in ein entsprechendes Kulturmedium überimpft. Dabei fiel auf, dass in allen angeimpften Medien nach ca. 2 bis 3 Tagen ein schwarzer Niederschlag zu erkennen war, der auf eine mögliche Sulfidproduktion hinwies. Jedoch konnten selbst mit modifizierten Medien kein Sulfatreduzierer isoliert werden und auch eine Extraktion der Gesamt DNA mit anschließender DGGE und Sequenzierung der isolierten Banden wies nicht auf eine Sulfatreduzierer hin. Allerdings konnten verschiedene *Enterobacteriaceae* in den Mischkulturen gefunden werden. In der Abbildung 29 sind sowohl die als Reinkulturen isolierten Bakterien der Gammaproteobakterien als auch die aus den Mischkulturen identifizierten Bakterien dieser Gattung aufgetragen.

Diskussion

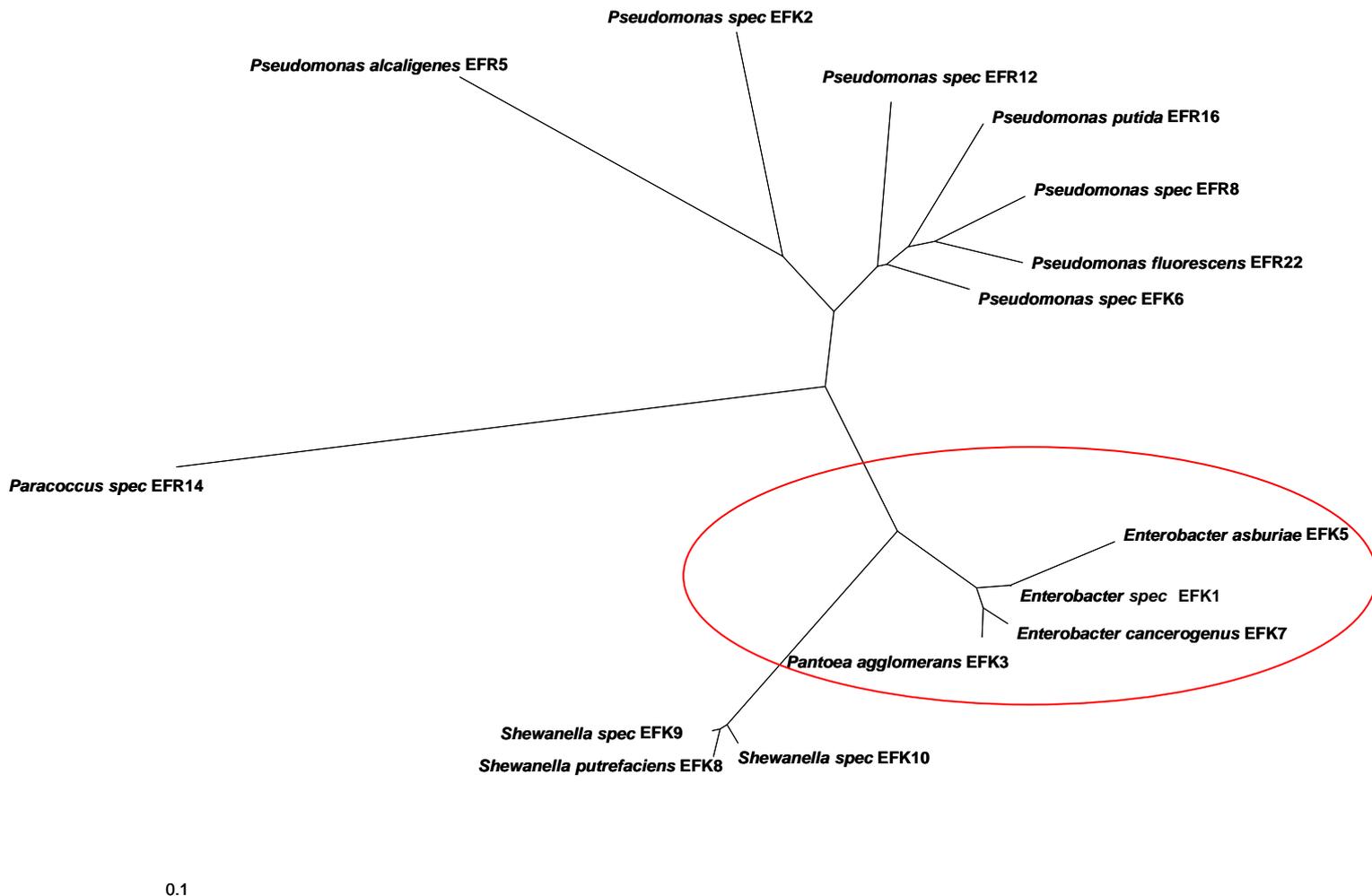


Abb. 29: Stammbaum der identifizierten Mikroorganismen aus der Klasse der Gammaproteobacteria anhand ihrer 16S rDNA Sequenz.

Die Mischkultur, in der ein *Enterobacter spec.*, *Pantoea agglomerans* und auch *Enterobacter asburiae* nachgewiesen werden konnte, zeigte in mehreren parallelen Ansätzen eine Bildung von Methylquecksilber. Dabei war die am Schluss gefundene Konzentration an Methylquecksilber abhängig von dem in den Ansätzen gefundenen Zelltitel. In den Kulturen konnte eine Konzentration von fast 4 bis 11 ng Methylquecksilber pro ml Kultur wiedergefunden werden, wobei bei derjenigen mit nur 4 ng auch der Titer um mehr als eine zehner Potenz niedriger lag (siehe Tab. 27, Ergebnisse Seite 96). Im Vergleich zu den Ergebnissen von Rowland et al. (1975) und Vonk und Sijestein (1973), die z.B. bei *Escherichia coli* eine Konzentration von 0,8 – 3 ng Methylquecksilber pro ml Medium wiederfanden, zeigt die gefundene

Diskussion

Mischkultur eine um den Faktor 3 höhere Methylierung. Dies kann vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass in der Mischkultur nicht nur ein Organismus an der Methylierung beteiligt ist, sondern mehrere und somit eine höhere Konzentration an Methylquecksilber erreicht werden kann. Ein weiterer Mechanismus, der das höhere Potential der Methylierung in der verwendeten Mischkultur erklärt, ist die Verfügbarkeit von Quecksilber für die Organismen. Entscheidend für die Aufnahme von Quecksilber durch Mikroorganismen ist die Form in der es vorliegt. Ein Transport von Metallen kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Dabei kann es sich um eine einfache Diffusion, eine gerichtete Diffusion (Kanäle oder Transporter) oder um aktive Prozesse wie Ionenpumpen (Braeckman et al., 1998). In einer Ionischen Form wie z.B. Hg^{2+} kann das Quecksilber nicht einfach durch eine Diffusion den Lipidbilayer passieren und in die Zelle eindringen, wohingegen in einer neutralen Form eine Diffusion möglich ist. Benoit et al. (1999) zeigten in ihrer Studie, dass die Aufnahme von Quecksilber in sulfidreichen Sedimenten dadurch beeinflusst wird, dass durch eine Zunahme an unlöslichem HgS ein Shift entsteht des löslichen HgS vorliegt. Dadurch liegt für die Mikroorganismen eine neutrale Form von Quecksilber vor, welches durch Diffusion in die Zellen eindringen kann. Diese Tatsache würde auch erklären, warum in den Versuchen mit den Reinkulturen kein Methylquecksilber nachzuweisen war, da in diesen keine neutrale und somit eine durch Diffusion aufnehmbare Form vorlag.

5. **Ausblick**

In dieser Arbeit konnte eine mikrobielle Methylierung von Quecksilber im Intestinaltrakt von *Eisenia foetida* nachgewiesen werden. Die isolierte Mischkultur bestehend aus *Pantoea agglomerans* EFK3, *Enterobacter asburiae* EFK5 und einem *Enterobacter spec.* EFK1 wies eine, im Vergleich zu anderen Studien, relativ hohe Konzentration an Methylquecksilber auf. Für weitere Untersuchungen, ist es notwendig, die in dem Gemisch enthaltenen Bakterien-Arten zu vereinzeln und Reinkulturen zu erhalten. Mit diesen könnten dann Studien betrieben werden, um aufzuklären, ob die Einzelkulturen oder nur die Mischkultur in der Lage sind Quecksilber zu methylieren.

Der nachfolgende Schritt wäre, den biochemischen Weg der Quecksilbermethylierung nachzuweisen. Bei diesem biochemischen Weg sind noch viele Fragen ungeklärt. Wie in dieser Arbeit erwähnt, wird der Acetyl-CoA Weg von SRBs als ein Musterweg für die biotische Methylierung von Quecksilber angesehen. Allerdings wurden auch schon Mikroorganismen beschrieben, u.a. einige SRBs, die nicht über diesen Weg verfügen und trotzdem eine Methylierung von Quecksilber betreiben. Es muss also noch weitere, bisher unbeschriebene biochemische Wege geben, welche für die biotische Methylierung von Quecksilber verantwortlich sind. Hierbei könnte die Verfolgung des Quecksilbers mittels eines ^{203}Hg Tracers von Vorteil sein. Mit Hilfe einer 2D Gelelektrophorese und Auroradiographie könnten mögliche Zwischenprodukte des biochemischen Weges sichtbar gemacht werden. Die radioaktive Methode ermöglicht einen sehr sensitiven und auch im Spurenbereich liegenden Nachweis. Dies ist besonders bei Untersuchungen eines biochemischen Weges von Vorteil, da mögliche Zwischenprodukte nur in geringen Konzentrationen vorliegen können.

6. Zusammenfassung

Das terrestrische System der Methylquecksilberbildung und auch der Weg des Methylquecksilbers durch die Nahrungskette von terrestrischen Organismen sind bisher nur wenig erforscht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine mikrobielle Methylierung von Quecksilber im Darm von *Eisenia foetida* und die Akkumulation des gebildeten Methylquecksilbers im Gewebe des Wurms nachgewiesen werden. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da er Erkenntnisse zur Methylquecksilberbildung außerhalb des aquatischen Systems liefert.

Für den Nachweis einer Methylquecksilberbildung durch Mikroorganismen im Darm von *Eisenia foetida* wurde dem verwendeten Bodenmaterial eine definierte Menge an Quecksilber(II)chlorid zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen wurden die Würmer aus dem Boden entnommen und die verschiedenen organischen Quecksilberspezies aus dem Gewebe extrahiert. Dies erfolgte mittels der TMAH Methode, die besonders für biologische Matrices geeignet ist, da mit dieser Chemikalie das Probenmaterial vollständig aufgelöst werden kann. Die Messungen der organischen Quecksilberverbindungen erfolgte anschließend mittels einer GC-ICP-MS. Für die Quantifizierung des gebildeten Methylquecksilbers wurde die Isotopen Verdünnungs-Methode angewendet. Dieses Vorgehen ist vor allem wegen der Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von großem Vorteil. Mögliche Effekte der biologischen Matrix und der Extraktionsmethode können durch diese Art der Quantifizierung vernachlässigt werden, da durch die Zugabe eines Spezies-spezifischen Isotops nur das Verhältnis des angereicherten zu dem natürlichen Isotop gemessen werden muss. Dieses Verhältnis ändert sich nicht, selbst wenn durch eine Bindung von Methylquecksilber an Matrixbestandteile ein Teil nicht gelöst vorliegt.

Mit dieser Strategie konnten 65 ng Methylquecksilber pro g Wurmgewebe quantifiziert werden. Diese Konzentration enthielten Würmer, die in unsterilem Bodenmaterial inkubiert wurden. In Bodenmaterial, das sterilisiert wurde um eine mögliche mikrobielle Methylierung durch Bodenorganismen zu verhindern, konnte eine Konzentration von 52 ng Methylquecksilber pro g Wurmgewebe gemessen werden.

Zusammenfassung

Für die mikrobiologischen Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit, wurden sowohl Reinkulturen als auch Mischkulturen der mikrobiellen Flora des Wurmdarms erstellt. Diese Kulturen wurden anschließend auf ihre potentielle Quecksilbermethylierung hin untersucht. Dafür wurden die Kulturen direkt mit Quecksilber(II)chlorid im Medium versetzt und nach einer siebentägigen Inkubation extrahiert. Die Extraktion erfolgte mit einer methanolischen Kaliumhydroxidlösung und für eine bessere Derivatisierung der organischen Quecksilberspezies wurde ein aus Kupfersulfat und Natriumoxalat bestehendes Maskierungsreagenz verwendet. Durch dieses wird an gebildetes Sulfid gebundenes Quecksilber verdrängt und so in Lösung gebracht. Nach der Extraktion wurden die verschiedenen Quecksilberspezies mittels einer GC-AFS gemessen. Dabei konnte in einer Mischkultur bestehend aus *Pantoea agglomerans* EFK3, *Enterobacter asburiae* EFK5 und einem *Enterobacter spec.* EFK1 eine Konzentration von ca. 10 ng Methylquecksilber pro $9 \cdot 10^8$ Zellen nachgewiesen werden.

8. Literaturverzeichnis

- Abassi SA, Soni R (1983) Stress-induced enhancement of reproduction in earthworms exposed to chromium (VI) and mercury (II)- implications in environmental management. *Int. J. Environ. Stud.* 22: 43 - 47
- Alli A, Jaffe R, Jones R (1994) Analysis of organomercury compounds in sediments by capillary GC with atomic fluorescence detection. *J. High Resolut. Chromatogr.* 17: 745 – 748
- Anderson JT, Baatrup E (1988) Ultrastructural localization of mercury accumulations in the gills, hepatopancreas, midgut and antennal glands of the brown shrimp, *Crangon crangon*. *Aquat. Toxicol.* 13, 309 - 324
- Babiarz CL, Hurley JP, Benoit JM, Shafer MM, Andren AW, Webb DA (1998) Seasonal influences on partitioning and transport of total and methylmercury in rivers from contrasting watersheds. *Biogeochem.* 41: 237 - 257
- Back CR, Visman V, Watras CJ (1995) Microhomogenization of individual zooplankton species improves mercury and methylmercury determinations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 2470 - 2475
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, Al-Rawi NY, Tikriti S, Dhahir HI, Carkson TW, Smith JC, Doherty RA (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230 - 241
- Barkay T, Miller SM, Summers AO (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 335 – 384
- Bentley R, Chasteen TG (2002) Microbial methylation of metalloid: arsenic, antimony and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 250 – 271
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Reidel GS, Reidel GF (1998) Sources and cycling of mercury in the Patuxant estuary. *Biogeochem.* 40: 249 - 265

Literaturverzeichnis

- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Heyes A (1999) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore water. *Environ. Sci. Technol.* 33: 951 - 957
- Berman M, Bartha R (1986) Levels of chemical versus biological methylation of mercury in sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 401 - 404
- Bertilsson L, Neujahr HY (1971) Methylation of mercury compounds by methylcobalamin. *Biochem.* 10: 2805 - 2808
- Beyer WN, Cromartie E, Moment GB (1985) Accumulation of methylmercury in the earthworm, *Eisenia foetida*, and its effect on regeneration. *Bull. Environ. Toxicol.* 35: 157 – 162
- Bloom NS (1989) Determination of picogram levels of methylmercury by aqueous phase ethylation, followed by cryogenic gas chromatography with cold vapour atomic fluorescence detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1131 - 1140
- Bloom NS, Gill GA, Driscoll C, Rudd J, Mason RP (1999) An investigation regarding the speciation and cycling of mercury in Lavaca bay sediment. *Environ. Sci. Technol.* 33: 7 - 13
- Braeckman B, Cornelis R, Rzeznik U, Raes H (1998) Uptake of $HgCl_2$ and $MeHgCl$ in an insect cell line (*Aedes albopictus* C6/36). *Environ. Res.* 79: 33 - 40
- Burton DT, Turley SD, Fischer DJ, Green DJ, Sheed TR (2006) Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water, Air and Soil Pollu.* 170: 37 - 54
- Choi SC, Bartha R (1993) Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 290 - 295

Literaturverzeichnis

- Choi SC, Chase T, Bartha R (1994) Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4072 - 4077
- Chytky J.: Research Projects 2001, University of Alberta:
<http://www.ualberta.ca/~medlabsc/courses/intd/2001-abstracts/chytky.html>
- Clarkson TW (1994) The toxicology of mercury and its compounds, in : C. J. Watras, J. W. Huckabee (Hrsg.), *Mercury pollution : integration and synthesis*, Lewis Publisher, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo 631 - 641
- Compeau GC, Bartha R (1985) Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1342 – 1346
- Craig P (1986) *Organometallic compounds in the environment*. Longman, Harlow
- Craig P (2003) *Organometallic compounds in the environment*. John Wiley & Sons, New York
- de Bièvre P (1997) Isotope dilution mass spectrometry : what can it contribute to accuracy in trace analysis ? *Fresenius J. Anal. Chem.* 357: 74 - 79
- Demuth N, Heumann KG (2001) Validation of methylmercury determination in aquatic systems by alkyl derivatisation methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Anal. Chem.* 73:4020 - 4027
- Dean RB, Dixon WJ (1951) Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal. Chem.* 23: 636 - 638
- Dietz C, Madrid Y, Cámara C, Quevauviller P (2000) The capillary cold trap as a suitable instrument for mercury speciation by volatilization, cryogenic trapping, and gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 4178 – 4184

- Domínguez J, Velando A, Aira M, Monroy F (2003) Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. Andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of selfinsemination. *Pedobiologia* 47: 530 – 534
- Dunemann I, Hajimiragha H, Begerow J (1999) Simultaneous determination of Hg(II) and alkylated Hg, Pb and Sn species in human body fluids using SPME-GC/MS-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 363: 466 – 46
- Ebinghaus R, Hintelmann H, Wilken RD (1994) Mercury-cycling in surface waters and in the atmosphere - species analysis for the investigation of transformation and transport properties of mercury. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350: 21 - 29
- Edwards CE, Fletcher KE (1988) Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosys. Environ.* 24: 235 - 247
- Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T (2007) Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J. Neurol. Sci.* 262: 131 – 144
- Ekstrom BE, Morel FMM, Benoit JM (2003) Mercury methylation independent of the Acetyl-Coenzyme A pathway in sulphate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5414 - 5422
- Elhassani SB, Amin-Zaki L, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA, Greenwood MR, Kilpper RW (1978) Exchange transfusion treatment of methylmercury-poisoned children. *J. Environ. Sci. Health* 13: 63 - 80
- Fahti M, Lorenz H (1980) ZEBs-Berichte 1/1980. Reimer, Berlin
- Falter R (1996) Quecksilber im Ökosystem – Bestimmung von organischen Quecksilberspezies mit einer neuentwickelten HPLC-Methode, BITÖK, Bayreuth

- Fent K, Mueller MD (1991) Occurrence of organotins in municipal wastewater and sewage sludge and behavior in a treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 25: 489 - 493
- Fernández RG, Bayón MM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2000) Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 35: 639 - 646
- Fischer R, Rapsomanikis S, Andreae MO (1993) Determination of methylmercury in fish samples using GC/AA and sodium tetraethylborate derivatization. *Anal. Chem.* 65: 763 - 766
- Fitzgerald WF, Clarkson TW (1991) Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environ. Health Pers.* 96: 159 - 166
- Flack F, Hartenstein R (1984) Growth of the earthworm *Eisenia foetida* on microorganisms and cellulose. *Soil Biol. Biochem.* 16: 491 - 495.
- Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC (2005) Mercury methylation from unexpected sources: Molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 457 - 464
- Flora SJS, Mittal M, Metha A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Ind. J. Med. Res.* 128: 501 - 523
- Fleuren RHLJ, Jager T, Roelofs W, De Groot AC, Baarsekman R, Peijnenburg WJG (2003) Feeding behaviour of *Eisenia andrei* in two different field soils. *Pedobiologia* 47: 670 - 675
- Fushtey SG, Frank R (1981) Distribution of mercury residues from the use of mercurial fungicides on golf course greens. *Can. J. Soil. Sci.* 61: 525 - 527

Gadd GM (1993) Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 297 - 316

Gagnon C, Pelletier E, Mucci A, Fitzgerald WF (1996) Diagenetic behaviour of methylmercury in organic-rich coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 41: 428 - 434

Gardner WS, Kendall DR, Odum RR, Windom HL, Stephens JA (1978) The distribution of methylmercury in a contaminated salt marsh ecosystem. *Environ. Pollut.* 15: 243 - 254

Greenwood MR, von Burg R (1984) Quecksilber. In: Merian E. (Hrsg.) *Metalle in der Umwelt*, Verlag Chemie Weinheim, 511 - 539

Hall B, Bloom NS, Munthe J (1995) An experimental study of two potential methylation agents of mercury in the atmosphere : CH₃I and DMS. *Water Air Soil Pollut.* 80: 337 – 341

Hamasaki T, Nagase H, Yoshioka Y, Sato T (1995) Formation, distribution and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury and arsenic in the environment. *Cri. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25: 25 - 91

Hamdy MK, Noyes OR (1975) Formation of methyl mercury by bacteria. *App. Microbiol.* 3: 424 - 432

Hand P, Hayes WA, Frankland JC, Satchell JE (1988) The vermicomposting of cow slurry. *Pedobiologia* 31: 199 – 209.

Harms U, Bunke M (2002) Ausarbeitung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgeweben und Zooplankton. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Forschungsbericht FKZ 20022230, 1 – 83

- Hartenstein F, Hartenstein E, Hartenstein R (1981) Gut load and transit time in the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* 22: 5 – 20.
- Hendrickson NB (1991) Gut load and food-retention time in the earthworm *Lumbricus festivus* and *L. castaneus*: A field study. *Biol. Fertil. Soils* 11: 170 – 173
- Heumann KG (1990) Elementspurenbestimmung mit der massenspektrometrischen Isotopenverdünnungsanalyse. in : Günzler H, Borsdorf R, Fresenius W, Huber W, Kelker H, Lüderwald I, Tölg G, Wissner H (Hrsg.), *Analytiker Taschenbuch*, Bd. 9, Springer Verlag, Heidelberg 192 - 223
- Heumann KG, Rottmann L, Vogl J (1994) Elemental speciation with liquid chromatography–inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 9: 1351 - 1355
- Hintelmann H, Wilken RD (1993) The analysis of organic mercury compounds using liquid chromatography with on-line atomic fluorescence spectrometric detection. *Appl. Organomet. Chem.* 7: 173 - 180
- Hintelmann H, Evans RD (1997) Application of stable isotopes in environmental tracer studies – measurement of monomethylmercury (CH₃Hg⁺) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius J. Anal. Chem.* 358: 378 - 385
- Holleman AF, Wiberg E (1995) *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 101. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin – New York
- Holm HW, Cox MF (1975) Transformation of elemental mercury by bacteria. *App. Microbiol.* 29: 491 – 494
- Honeycutt, Jr. JB, Riddle JM (1961) Preparation and reactions of sodium tetraethylboron and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 369 - 373

- Hudson JM, Gherini SA, Fitzgerald WF, Porcella DB (1995) Anthropogenic influences on the global mercury cycle: A model-based analysis. *Water Air Soil Poll.* 80: 265 - 272
- Jereb V, Horvat M, Drobne D, Pihlar B (2003) Transformation of mercury in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea). *Sci. Total Environ.* 304:269 - 284
- Keith RL, Setiarahardjo I, Fernando Q, Aposhian HV, Gandolfi AJ (1997) Utilization of renal slices to evaluate the efficacy of chelating agents for removing mercury from the kidney. *Toxicology* 116: 67 - 75
- Leermakers M, Meulemann C, Baeyens W (1995) Mercury speciation in the Scheldt Estuary. *Water Air Soil Pollut.* 80: 641 - 652
- Limper U (2006) Untersuchungen zur mikrobiellen Methylquecksilberbildung in Termiten und im Faulschlamm. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Limper U, Knopf B, König H (2008) Production of methyl mercury in the gut of the Australian termite *Mastotermes dawiniensis*. *J. App. Entom.*:132: 168 - 176
- Liu G, Cai Y, Philippi T, Kalla P, Scheidt D, Richards J, Scinto L, Appleby C (2008) Distribution of total and methylmercury in different ecosystem compartments in the Everglades: Implications for mercury bioaccumulation. *Environ. Poll.* 153: 257 - 265
- Logar M, Horvat M, Akagi H, Pihlar B (2002) Simultaneous determination of inorganic mercury and methyl mercury compounds in natural waters. *Anal. Bioanal. Chem.* 374: 1015 - 1021
- Longbottom JE, Dressman RC, Lichtenberg JJ (1973) Gas chromatographic determination of methyl mercury in fish, sediment, and waste. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56: 1297 - 1303

- Lowe CN, Butt KR (2007) Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *Euro. J. Soil Biol.* 43: 281 – 288
- MacCrimmon HR, Wren CD, Gots BL (1983) Mercury uptake by lake trout, *Salvelinus namaycush*, relative to age, growth, and diet in Tadenac Lake with comparative data from other Precambrian Shield lakes. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 40: 114 – 120
- Mason RP, Sullivan KA (1997) Mercury in Lake Michigan. *Environ. Sci. Technol.* 31: 942 - 947
- Mason RP, Lawrence AL (1999) The concentration, distribution and bioavailability of mercury and methylmercury in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2438 – 2447
- Mason RP, Dobbs C, Leaner JJ (1988) The bioaccumulation of mercury and methylmercury in two contrasting food chains. Presentation made at the 8th International SETAC Conference, Bordeaux, Frankreich, April 1988
- Mason RP, Rolfhus KR, Fitzgerald WF (1995a) Methylated and elemental mercury in the surface and deep ocean waters of the North Atlantic. *Water Air Soil Poll.* 80: 665 - 677
- Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM (1995c) Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water Air Soil Poll.* 80: 915 – 921
- Mason RP, Lawso NM, Lawrence AL, Leaner JJ, Lee JG, Sheu G-R (1999) Mercury in the Chesapeake Bay. *Mar. Chem.* 65: 77 – 96
- Mason RP, Laporte JM, Andres S (2000) Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 283 - 297

Miles HB (1963) Soil protozoa and earthworm nutrition. Soil Sci. 95: 407 - 409.

Morita M, Tanaka H, Shimomura S (1995) Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments. Spectrochim. Acta 50B: 69 – 84

Morgan MH (1985) An Investigation of the Nutritional Requirements of the Earthworm, *Eisenia foetida*. Dissertation, University of Stirling, U.K.

Morgan MH (1998) The role of microorganisms in the nutrition of *Eisenia foetida*. In: Edwards CA, Neuhauser EF (Eds.) Earthworms in waste and environmental management. SPB Academic Publisher, The Hague, 71 – 82

Mülhardt C (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 4. Auflage, Elsevier Verlag, München

Muhaya BBM, Leermakers M, Baeyens W (1997) Total mercury and methylmercury in sediments and in the polychaete *Nereis diversicolor* at Groot Buitenschoor (Scheldt Estuary, Belgium). Water Air Soil Pollut. 94: 109 – 123

Nakahara T, Tanaka T, Musha S (1978) Flameless atomic fluorescence spectrometry of mercury by dispersive and nondispersive systems in combination with cold vapour technique. Bull. Chem. Soc. Jap. 51: 2020 - 2024

Neuhauser EF, Kaplan DL, Malecki MR, Hartenstein R (1980) Materials supporting weight gain by the earthworm, *E. foetida* in waste conversion systems. Agric. Wastes 2: 43 - 60.

Niki H, Maker PD, Savage CM, Breitenbach LM (1983) A long-path fourier transform study of the kinetics and mechanisms for the OH-radical initiated oxidation of dimethylmercury. J. Phys. Chem. 87: 4978 - 4981

Pak KR, Bartha R (1998) Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64: 1013 - 1017

Parle JN (1963) Microorganisms in the intestines of earthworms. J. Gen. Microbiol. 31: 1 - 11.

Poperechna N, Heumann KG (2005a) Species-specific GC/ICP-IDMS for trimethyllead determinations in biological and environmental samples. Anal.Chem. 77: 511 – 516

Poperechna N, Heumann KG (2005b) Simultaneous multi-species determination of trimethyllead, monomethylmercury and three butyltin compounds by species-specific isotope dilution GC-ICP-MS in biological samples. Anal.Bioanal.Chem. 383: 153 – 159

Rai R, Maher W, Kirkowa F (2002) Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissue by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. J.Anal.At.Spectrom. 12: 1560 - 1563

Raposo JC, Ozamiz G, Etxebarria N, Tueros I, Muñoz C, Muela A, Arana I, Barcina I (2008) Mercury biomethylation assessment in the estuary of Bilbao (North of Spain). Environ.Poll. 156: 482 - 488

Robidoux PY, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G, Sunahara GI (1999) Acute Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Earthworm (*Eisenia andrei*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 44: 311 - 321

Rowland IR, Grasso P, Davies MJ (1975) The methylation of mercuric chloride by human intestinal bacteria. Experientia 31: 1064 - 1065

Rudd JWM, Furutani A, Turner MA (1980) Mercury methylation by fish intestinal contents. Appl. Environ. Microbiol. 40: 777 – 782

Schedlbauer OF (1998) Methylierte Schwermetallverbindungen im Atlantischen Ozean und der marinen Atmosphäre, Untersuchungen zum globalen biogeochemischen Schwermetallkreislauf. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Literaturverzeichnis

- Scheffer F, Schachtschabel P (2002) Lehrbuch der Bodenkunde. 15.Auflage, Springer Verlag, Heidelberg
- Sellers P, Kelly CA, Rudd JWM, MacHutchon AR (1996) Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature* 380: 694 – 697
- Slemr F, Langer E (1992) Increase in global atmospheric concentrations of mercury inferred from measurements over the Atlantic Ocean. *Nature* 355: 434 - 437
- Spangler WJ, Spiragelli JL, Rose JM, Miller HM (1973) Methylmercury : bacterial degradation in lake sediments, *Science* 180:192 - 193
- Stein ED, Cohen Y, Winer AM (1996) Environmental distribution and transformation of mercury compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26:1 - 43
- Templeton, DM, Ariese, F, Cornelis, R, Danielson, L-G, Muntau, H, Van Leeuwen, HP, Lobinski, R (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* 72: 1453 - 1470
- Thompson-Eagle ET, Frankenberger Jr. WT, Karlson U (1989) Volatilization of selenium by *Alternaria alternata*. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 55:1406 – 1413
- Thomas R (2008) Practical guide to ICP-MS. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York
- Trembley A, Cloutier L, Lucotte M (1998) Total and methylmercury fluxes via emerging insects in recently flooded hydroelectric reservoirs and a natural lake. *Sci. Total Environ.* 219: 209 - 221
- Tsubaki T (1971) Clinical and Epidemiological Aspects of Organic Mercury Intoxication: Meeting on Mercury in the Environment. *Can. Roy. Soc. Ottawa.* 131 - 136

- Verta M, Matalianen T (1995) Methylmercury distribution and partitioning in stratified Finnish forest lakes. *Water Air Soil Pollut.* 80: 585 - 588
- Vonk JW, Sijpesteijn AK (1973) Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 505 - 513
- Watras CJ, Bloom NS (1992) Mercury and methylmercury in individual zooplankton: implications for bioaccumulation. *Limnol. Oceanogr.* 37: 1313 - 1318
- Westöö G (1966) Determination of methylmercury compounds in foodstuffs I. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta Chem. Scand.* 20: 2131 - 2127
- Westöö G (1967) Determination of methylmercury compounds in foodstuff II. Methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta. Chem. Scand.* 20: 2127 – 2131
- Westöö G (1968) Determination of methylmercury salts in various kinds of biological materials. *Acta. Chem. Scand.* 22: 2277 - 2280
- Widdel, F. & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*, 4: 3352 – 3378. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. (Eds.) New York: Springer.
- Williams RJP (1988) The transfer of methyl groups : a general introduction. in P. J. Craig, F. Glocklings (Hrsg.), *The biological alkylation of heavy metals*, Royal Society of chemistry, London 5 - 19
- Wood JM, Wang HK (1983) Microbial resistance of heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 17:582 - 590
- Wren CD, MacCrimmon HR, Löscher BR (1983) Examination of bioaccumulation and biomagnification of metals in a precambrian shield lake. *Water Air Soil Poll.* 19:277 – 291

Literaturverzeichnis

www.analyticjournal.de/glossar/glossar_main_m1.htm#analytk

Yang DY, Truong HYT, Chen YW, Belzile N (2009) Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 633: 157 - 164

9. Anhang

Sequenzen mit den jeweiligen Artbezeichnungen und den laut NCBI nahsten Verwandten

Bacillus cereus EFR15 (425) → *Bacillus cereus* Stamm IHB B 1380

TTGAATGCAGAAGAGGAAAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGA
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA
CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTC
TCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTAACAG

Bacillus licheniformis EFR2 (452) → *Bacillus licheniformis* Stamm BFE 5370

TAAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAAG
TGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC

Bacillus pumilus EFR17 (483) → *Bacillus pumilus* Stamm SB 3002

GTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGA
GATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA
GCTA

Lysinibacillus sphaericus EFR9 (454) → *Lysinibacillus sphaericus* Stamm T12-16

ACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
AGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATGGTTTTCCCTTCGGGGACAACGGTGAC
AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTAA

Bacillus subtilis EFR6 (449) → *Bacillus subtilis* Stamm T-2

GGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGA
GAGTGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAG
AGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTC

Bacillus thuringiensis EFR21 (485) → *Bacillus thuringiensis* Stamm CCGE2286

GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG
TGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAA ACTCTAG
AGATAGAGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGATAGTGCATGGCTGTCTGTA
GCTA

Brevibacillus brevis EFR1 (442) → *Brevibacillus brevis* Stamm IMAU80218

CATCAAAA ACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCT
GGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTTCAATA
CCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGCTCGC
AAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGAC
CGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGG
CTTCGTCAGCTCACCG

Enterobacter asburiae EFK5 (815) → *Enterobacter asburiae* Stamm J2S4

GCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG
ATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG
ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGAT
TAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCG
GTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGTG
TTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATT CGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTG TAGAGGGG
GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGCGGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCACGTGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTT
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAA

Enterobacter cancerogenus EFK7 (488) → *Enterobacter cancerogenus* Stamm R27c
TAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG
GCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTG
TGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT
CCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTG
CTGCATGCG

Enterobacter spec EFK1 (484) → *Enterobacter spec* Stamm FN302
TGATACATCGGATTACTGGGCGTAAGCGCACGCAGTAAGGTCTGTCAAGTCGG
ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAG
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTGCAGAGATGCTTTGGT
GCC

Flavobacterium denitrificans EFR20 (469) → *Flavobacterium denitrificans* Stamm
ED5T
TGCGGTCTTGTAAGTCAGTGGTGAAAGCCCATCGCTCAACGATGGAACGGCCA
TTGATACTGCAGGACTTGAATTACCAGGAAGCAACTAGAATATGTAGTGTAGCG
GTGAAATGCTTAGAGATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTTGCTACTG
GTGGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTGGGGGCGACCTCAGTG
GCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGCAGACTGACCGTTTTGGAA
ACAGAACTTTCGCAAGACAGTCTACAAGGTGCAGCATGGCT

Lysinibacillus fusiformis EFR3 (448) → *Lysinibacillus fusiformis* Stamm IMAU80226
TTATGAGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGAATTCCAAGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGG
TCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACC
ACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGG
CTGCCGTCA

Lysinibacillus spec ER7 (483) → *Lysinibacillus spec* Stamm CS101

TTTGAGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
TGGAAGACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCOAAGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGG
TCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACC
ACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGA
ATTT

Lysobacter spec EFR4 (459) → *Lysobacter spec* Stamm KNUC361

GGCTAAACCTGGGAAGTGCATTGGAAACTGGCTGACTAGAGTGCGGTAGAGGG
GTGTGGAATTCGCGGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACATCT
GTGGCGAAGGCGACACCCTGGACCAGCACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGCGAAC
TGGATGTTGGGGGCAACTTGGCCCTCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCCG
CGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGCCTTGACATGCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCG
TGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCAAAA

Microbacterium resistens EFR13 (490) → *Microbacterium resistens* Stamm IMER-
B4-14

TTTGTCCCGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTAAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTA
CGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGT
AGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAGTGTGGGGTCCCTTTCCACGGATTCCG
TGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACGAGAACGGGCC
AGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTGAACAGGTGGTGCATGGCTGGCGTCA
GCTAACCAGC

Microbacterium thalassium EFR19 (437) → *Microbacterium thalassium* Stamm
DSM 12511

AATGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTGTA
GCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCT
GGGCCGTAAGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGA
TACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAGTGTGGGGTCCCTTTCCA
CGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCAT
GCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACGAG
AACGCTGCAGAAATGTAGAACTCTTTGGACACTCGTGAACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCT

Pantoea agglomerans EFK3 (920) → *Pantoea agglomerans* Stamm XW112
ACACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA
TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTG
CCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCC
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCG
GGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGAT
GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAG
TCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTGACTTGGGAGGTTGTGCCCTTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG
CGAGAACCTTACCTACTCTT

Paracoccus spec EFR14 (506) → *Paracoccus spec* Stamm R-32540
CGGATTACTGGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGACCGGAAAGTTGGAGGTGAAAT
CCCAGGGCTCAACCTTGGAACTGCCTTCAAACCTATCGGTCTGGAGTTCGAGAG
AGGTGAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAA
TGCCAGTCGTCGGGTAGCATGCTATTCGGTGACACACCTAACGGATTAAGCATT
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTAC
CAACCCTTGACATTACAGGACATCCCCAGAGATGGGGCTTTCACTTCGGTGACC
TGTGGACAGATGCTGCATGGCTGCCG

Pseudomonas alcaligenes EFR5 (482) → *Pseudomonas alcaligenes* Stamm
DCB015
TCAGCAAGTTGAAGGTGAAATCCCCGGGCTCACCTGGGAACTGCCTCCAAA
ACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACT
GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC
TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGAT
GGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
AA

Pseudomonas spec EFR8 (483) → *Pseudomonas spec* Stamm RF-128

AGTGAGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
ATTCAAAAGCTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTG
GACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGC
TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACT
TTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGTTC
GGT

Pseudomonas fluorescens EFR22 (455) → *Pseudomonas fluorescens* Stamm LMG
14577

GGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAAAAGCTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGT
GGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAG
CCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
CCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT

Pseudomonas putida EFR16 (491) → *Pseudomonas putida* Stamm CDd-9

TATTAGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TCCAAAAGCTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGG
ACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATT
TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAAGCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGACACAGATGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTAA

Pseudomonas spec (500) EFK2 → *Pseudomonas spec* Stamm CWX5

GAAAAAGGCTCGAGCAGGACTGATCGTAATCTCGCGTGGTATGGTTCAGCAAG
GTGAAGGTGAAATCCCCTGCGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCTAAACTACTGA
GCTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGC
TCACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGATAAAAAGCTCAA
TGAATTGACGGGCGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATT
GGTGCCTTCGGGAGCTCGGA

Pseudomonas spec EFR12 (500) → *Pseudomonas spec* Stamm PEB06
CAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGG
TTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAA
CTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTG
GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAGAACCTTACCAGCCTTGACATCCAATGACTTTCCAGAGATG
ATGTGTCTTCGGAACATGAG

Pseudomonas jinjuensis EFK4 (500) → *Pseudomonas jinjuensis* Stamm Pss 26
CGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGG
TTTGTTAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAA
CTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTACTG
GCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC
TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCACAGATGCT
GGAGTGCCTTCGAGAATCG

Pseudomonas spec EFK6 (500) → *Pseudomonas spec* Stamm sk0927 1-3
TGAACAACTCGGATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGG
ATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAG
AGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
GGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGG
TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGC
ATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCT
TCGGGAACTCTGACACAG

Pseudomonas spec EFR8 (489) → *Pseudomonas spec* Stamm CWX5
GTAGGTTTCAGCAAGTTGAAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCT
CCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAAATTCCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGA
CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCT
TAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCC
AGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTTCCG
TCAGCTAA

Rhizobium spec ERF11 (507) → *Rhizobium spec* Stamm Sulf-459

GCATACTGGGCGTAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCC
CAGAGCTCAACTCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTTCGATCTAGAGTATGGAAGAG
GTGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTT
AGCCGTTCGGTTAGTTTACTAATCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCGCG
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCT
CTTGACATCCCGATCGCGGACAGTGGAGACATTGTCCTTCAGTTAGGCTGGATC
GGTGACAGGAGCTGCATGGCTGCC

Shewanella putrefaciens EFK8 (505) → *Shewanella putrefaciens* Stamm S002

GGATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGC
CCTGGGCTCAACCTAGGAATAGCATTTCGAACTGGCGAACTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATGCACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
TACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAACGCATTAAGTAG
ACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTACTCTTGACATCCACAGAAGACAGCAGAGATGGACTTGTGCCTTCGGGAACC
GTGAGACAGGTGCTGCATGGTTGAG

Shewanella spec EFK9 (481) → *Shewanella spec* Stamm LHB20

GAGCTAACGTTATCGGATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTTAAG
CGAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATAGCATTTCGAACTGGCGAA
CTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATCTGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG
CTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGC
TAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAT
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAAGACAGCAGAGATGCACTT
GTGCCTTCGGGAACCTGTGAGA

Shewanella spec EFK10 (506) → *Shewanella spec* Stamm S4

GAAGCTATAGTTTCGGATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTTAAGC
GAGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATAGCATTTCGAACTGGCGAACT
AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATAACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTC
ATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCTACTCGGAGTTTGGTGTCTTGAACACTGGGCTCTCAAGCTAA
CGCATTAAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAAGACTGCAGAGATGGACTTGT
GCCTTCGGGAACCTGTGAGA

Sinorhizobium spec EFR10 (485) → *Sinorhizobium spec* Stamm NP1

AGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGGGT
GTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
GATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACG
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTTCGGTGGCGCAGC
TAACGCATTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAG
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATTACGGAGACGTT
TTCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTAA
TTCGC

Hiermit bestätige ich, daß ich diese Arbeit selbstständig verfaßt und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die Angegebenen verwendet habe.

Mainz, Januar 2010