



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Untersuchungen zur biotischen Bildung von Methylquecksilber aus
anorganischem Quecksilber durch intestinale Sulfat-reduzierende
Bakterien und die Bestimmung alkylierter Quecksilberverbindungen
mittels GC-ICP-MS und Isotopenverdünnungsanalyse**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Elisabeth Kaschak
geb. am 09.05.1984 in Erfurt

Mainz, April 2013

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2009 bis Mai 2012 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Physikalische und chemische Eigenschaften von Hg.....	5
1.2. Biogeochemischer Quecksilberkreislauf	7
1.3. Transformationen von Hg und mikrobielle Hg(II)-Methylierung	10
1.4. Sulfat-reduzierende Bakterien	17
1.5. Motivation und Zielsetzung.....	20
2. Material und Methode	22
2.1. Mikroorganismen.....	22
2.2. Geräte und Hilfsmittel	23
2.3. Chemikalien	25
2.4. Biochemikalien, Enzyme und Kits.....	29
2.5. Puffer und Lösungen.....	29
2.6. Medien.....	32
2.7. Invertebraten.....	38
2.8. Erdbodenproben: Charakterisierung und Analyse	40
2.9. Desulfovirdin-Nachweis.....	40
2.10. Sulfidbestimmung.....	41
2.11. Methylierung von Hg (II) durch Umweltproben.....	42
2.12. Methylierung von Hg (II) durch Mikroorganismen.....	42
2.13. Identifizierung von Mikroorganismen	45
2.13.1. Nukleinsäure-Isolation	45
2.13.2. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.13.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	46
2.13.4. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)	47
2.13.5. Erstellung phylogenetischer Stammbäume nach 16S rRNA Analyse	48
2.14. Analytik: Bestimmung von MeHg	49
2.14.1. Extraktion und Derivatisierung.....	49
2.14.2. Das Prinzip der Isotopenverdünnung.....	52
2.14.3. Instrumentelle analytische Methoden	54

2.14.3.1. Atomabsorptionsspektrometrie	54
2.14.3.2. Atomfluoreszenzspektrometrie	55
2.14.3.3. Direktverfahren zur Gesamtquecksilberbestimmung	56
2.14.3.4. Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie.....	56
2.14.3.5. Laserablations-ICP-MS.....	65
3. Ergebnisse	68
3.1. Erdbodenproben: Charakterisierung und Analyse	68
3.2. Bestimmung von Sulfid in Kulturmedien	70
3.3. Bestimmung von MeHg mittels GC-ICP-MS	71
3.4. Methylierung von Hg (II) durch Umweltproben	73
3.5. Methylierung von Hg (II) durch bakterielle Kulturen	75
3.6. Desulfovirdin-Nachweis.....	79
3.7. Identifizierung von Mikroorganismen	80
3.8. Lokalisation von Hg im histologischen Dünnschnitt.....	88
4. Diskussion.....	92
4.1. Methode zur Bestimmung von MeHg in Kulturmedien	92
4.2. Quecksilber in Böden und Anreicherung von MeHg in Gewebe.....	96
4.3. Mikrobielle Methylierung von Hg (II) im intestinalen System.....	99
4.4. Quantifizierung der mikrobiellen Methylierung von Hg (II)	104
4.5. Lokalisation von Hg mittels der LA-ICP-MS	119
5. Ausblick	124
6. Referenzen	126
7. Danksagung	141
8. Anhang	143
Abbildungsverzeichnis	155
Tabellenverzeichnis	156
Curriculum Vitae.....	157
Veröffentlichungen	159

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
ATCC	American Type Culture Collection, Wesel, Deutschland
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
cps	Counts per second
CV-AAS	Cold Vapour Atomic Absorption Spectroscopy
<i>Db.</i>	<i>Desulfobulbus</i>
deion.	deionisiert
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
<i>Dtm.</i>	<i>Desulfotomaculum</i>
<i>Dv.</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>E.</i>	<i>Eisenia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GC%	Guanin + Cytosin- Gehalt [%]
GC	Gaschromatographie
Gg	Gigagramm = 1000 t
Hungate	Kulturröhrchen für die Kultivierung anaerober Kulturen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-SFMS	Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung Mainz
Kontr.	Kontrolle
konz.	konzentriert
LA	Laser Ablation

Laser	Light Amplification by stimulated Emission of Radiation
LC ₅₀	Mittlere letale Konzentration
LOD	Limit of Detection/Nachweisgrenze
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MeHg	Monomethylquecksilber
MG	Molekulargewicht
MQ	MilliQ-Wasser
MS	Massenspektrometrie
MSRB	Medium für SRB
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OES	Optische Emissionsspektrometrie (ICP-OES)
<i>P.</i>	<i>Pachnoda</i>
p.a.	für analytische Zwecke
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogramm
ppm	Teile pro Million
ppt	Teile pro Billion
rDNA	Ribosomal Desoxyribonucleic Acid
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RSD	relative Standardabweichung
RF	Radio Frequency
SL	Spurenelement-Lösung
sp.	Nicht näher bezeichnete Spezies
SRB	Sulfat-reduzierende Bakterien
SRDTM	Medium für <i>Dtm.</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan-Borat-EDTA
U	Unit(s)
VL	Vitaminlösung
z	Ladung

Zusammenfassung

Alkylierte Quecksilberspezies sind hundertfach toxischer als anorganisches Quecksilber (Hg) und werden in der Nahrungskette mit zunehmender Trophieebene im Gewebe von Tieren und dem Menschen akkumuliert. Aufgrund der Relevanz für die Umwelt und den Effekt auf die menschliche Gesundheit kommt der biotischen Transformation von anorganischem Hg zu Monomethylquecksilber (MeHg) eine große Bedeutung zu. Es ist bekannt, dass Sulfat-reduzierende Bakterien zu den Hauptproduzenten von MeHg gehören. Darüber hinaus gibt es jedoch nur wenige Untersuchungen über die biologischen Mechanismen und die Zusammenhänge in terrestrischen und insbesondere in intestinalen Systemen. Die vorliegende Arbeit leistet daher einen wichtigen Beitrag zur Abschätzung des Potentials zur Hg-Methylierung durch intestinale Bakterien und vertieft die Kenntnisse zu der damit verbundenen Akkumulation der organischen Schwermetallverbindung im Gewebe des Kompostwurms *Eisenia foetida* (*E. foetida*).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals unter Anwendung der Gas Chromatographie mit induktiv gekoppelter Massenspektrometrie (GC-ICP-MS) und Isotopenverdünnungsanalyse ein breites Spektrum intestinaler Sulfat-reduzierender Bakterien auf die Bildung von organischem Monomethylquecksilber aus Hg(II) untersucht. Da in komplexen bakteriellen Nährlösungen mit hohem Sulfidgehalt Matrixeffekte auftreten und die Analyse von MeHg im Ultrapurenbereich erschweren können, erfolgte die Probenvorbereitung mittels der Methanol-Kaliumhydroxid-Extraktion unter Verwendung eines Maskierungsreagenzes und der Derivatisierung mit Natriumtetrapropylborat. Das Detektionslimit für MeHg in bakteriellen Nährlösungen betrug 0,03 ng/mL. Die Wiederfindung von zertifiziertem Referenzmaterial ERM® CE-464 Tuna Fish war sehr gut und lag in einem Bereich zwischen 98 – 105%.

Die Resultate der Untersuchung von 14 verschiedenen Rein- und Anreicherungskulturen Sulfat-reduzierender Bakterien zeigten, dass neun Kulturen innerhalb von 12 h nach einer Inkubation mit 0,1 mg/L Hg^{2+} im Durchschnitt 100 bis 1200 pg/mL MeHg produzierten. Darunter waren zwei *Desulfovibrio* sp. Stämme, die Spezies *Desulfovibrio piger*, *Desulfovibrio giganteus*, *Desulfovibrio termitidis*, *Desulfotomaculum ruminis*, *Desulfobulbus propionicus* sowie Anreicherungskulturen aus dem Intestinaltrakt einer Zygoptera-Larve Zy1 und *E. foetida* EF4. Die Fähigkeit zur Hg-Methylierung durch eine Spezies der Ordnung

Desulfotomaculum aus der Gruppe der Gram-positiven Firmicutes wurde hiermit erstmals beobachtet.

Weiterhin wurde gezeigt, dass im Intestinaltrakt von *E. foetida* im Gegensatz zu mikrobiellen Bodenproben eine signifikante biotische Methylierung von Hg(II) durchgeführt wird. Dass diese Transformationen in hohem Maße von der intestinalen Region ausgeht und somit zur Akkumulation von MeHg im Gewebe beiträgt, konnte durch weiterführende Experimente mittels Laserablations-ICP-MS an histologischen Gefrierschnitten des Invertebraten dargestellt werden.

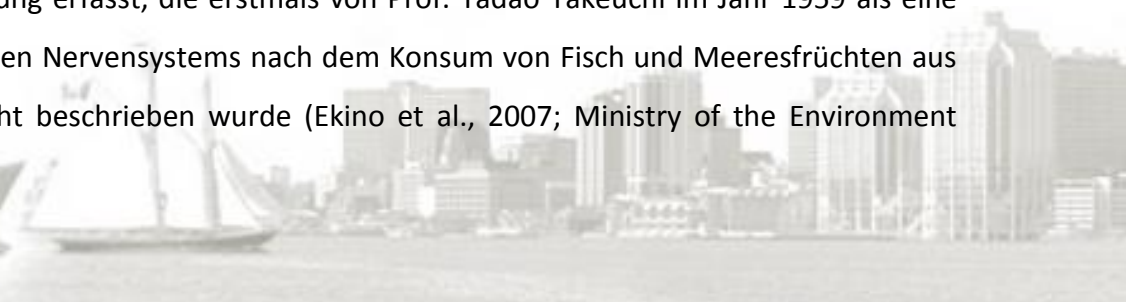
In Bezug auf diese Erkenntnisse war es außerdem von großem Interesse, ob im Intestinaltrakt des Kompostwurms Sulfat-reduzierende Organismen nachweisbar sind. Es gelang der Nachweis von einem Sulfit- und zwei Sulfat-reduzierenden Bakterien: *Desulfitobacterium* sp., *Desulfotomaculum* sp. und *Desulfovibrio* sp. Ferner wurden verschiedene Spezies aus weiteren phylogenetischen Gruppen wie den γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Gram-positiven Firmicutes erfolgreich angereichert oder isoliert. Die Identifizierung der Kulturen erfolgte nach Anwendung der denaturierenden Gelelektrophorese (DGGE) und 16S-rDNA Analyse.

Stichworte: Methylquecksilber · Isotopenverdünnung · GC-ICP-MS · intestinale Sulfat-reduzierende Bakterien · *Eisenia foetida*

1. Einleitung

Das Element Quecksilber (Hg) und seine Verbindungen werden auf natürliche Weise sowie durch anthropogene Quellen weltweit kontinuierlich freigesetzt und nehmen eine bedeutende Rolle als toxische Substanzen im globalen Kreislauf ein (Wren, 1986; Poissant et al., 2002; Craig, 2003; Holmes et al., 2010). Als Umweltgift steht dieses Schwermetall regelmäßig im Fokus öffentlicher und politischer Debatten (EPA, 1997; Europäische Kommission, 2010). Daher findet seit 1990 im Zweijahres Rhythmus die Konferenz „Mercury as a Global Pollutant“ (ICMGP) statt, die zunehmende Besucherzahlen des internationalen Fachpublikums aus mehr als 40 Ländern zu verzeichnen hat und den Austausch zu diesem relevanten Thema gewährleistet (Horvat und Wilken, 2000; Poissant et al., 2002). In der Konferenz stehen die globalen Ursachen und Prozesse der Quecksilberfreisetzung in die Umwelt unter Berücksichtigung der atmosphärischen, terrestrischen und aquatischen Transportmechanismen sowie der biologischen und chemischen Aspekte im Vordergrund (Fitzgerald et al., 1997). Dabei ist die Entwicklung neuer analytischer Methoden für die Detektion und Quantifizierung von Quecksilberverbindungen fundamental. Diese sind erforderlich für die Realisierung gesetzlicher Regelungen und die Erlassung von Verordnungen zur Kontrolle wie z.B. von weltweiten Quecksilbertransporten, der Entsorgung, Lagerung und Emissionsbegrenzung. Außerdem besteht das Ziel darin, bindende Höchstwerte von Hg in der Nahrung und im Trinkwasser zu formulieren, um die Exposition gegenüber dem Schwermetall auf ein Minimum zu reduzieren (Horvat und Wilken, 2000). In diesem Zusammenhang steht das Bestreben im Vordergrund, Umweltkatastrophen durch Quecksilbervergiftungen, wie sie sich in der Vergangenheit zwischen 1950 und 1975 in Japan und Irak ereignet haben, zukünftig zu verhindern.

Die Katastrophe von Minamata in Japan gilt als Mahnmal und ereignete sich in der Zeit von 1950 bis 1968 (Poissant et al., 2002). Der Konzern Chisso unterhielt in der Minamata Bucht eine Acetaldehyd-Produktion und war verantwortlich für eine unkontrollierte Freisetzung von Abwasser, welches eine starke Anreicherung mit Hg und Methylquecksilber (MeHg) aufwies. Während dieser Zeit wurden häufig auftretende ähnliche Krankheitsfälle unter der Bevölkerung erfasst, die erstmals von Prof. Tadao Takeuchi im Jahr 1959 als eine Störung des zentralen Nervensystems nach dem Konsum von Fisch und Meeresfrüchten aus der Minamata Bucht beschrieben wurde (Ekino et al., 2007; Ministry of the Environment



Kumamoto, 2007). Erst im Jahr 1968 wurde seitens der japanischen Regierung der Zusammenhang mit dem Chisso Konzern offiziell anerkannt - als bereits viele tausend chronische Vergiftungsfälle und Todesopfer registriert waren. Während dieser Zeit waren die Gesamtquecksilbergehalte in dieser Region außerordentlich hoch und wurden auf 20 ppm in Fischen, 500 ppm in Sedimenten und bis zu 700 ppm Hg in menschlichem Haar beziffert (Craig, 2003). Insbesondere in Fisch liegen dabei bis zu 99% des Gesamtquecksilbers als MeHg vor (Ravichandran, 2004; Kösters, 2007). Erst bei Konzentrationen von weniger als 10 ppm Hg im Haar kann per Definition ein „sicheres Level“ erreicht werden (Craig, 2003). Durch die Aufnahme von quecksilber- und methylquecksilberkontaminierter Nahrung treten typische Symptome der Minamata Krankheit auf (Countera und Buchanan, 2004). Zunächst äußert sich der Zustand in Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, später treten Koordinationsstörungen der Extremitäten und der Sprechorgane auf, Psychosen sind häufig und nicht selten endet eine Vergiftung mit Koma und Tod (EPA, 1997; Ekino 2007). Auch die Exposition gegenüber Quecksilberdämpfen wie sie z.B. in Goldminen oder bei der Herstellung von Zahnamalgam auftreten, ist gesundheitlich bedenklich (Horvat und Wilken, 2000). Quecksilberdämpfe werden zu über 80% von den Schleimhäuten resorbiert und anschließend durch Hydrogen-Peroxidase-Katalasen zu Hg^{2+} oxidiert und über die Blutkreislaufbahn verteilt (Tölg und Lorenz 1997). Die Toxizität von Hg ist auf die ausgeprägte Affinität von Hg^{2+} zu Disulfid und Thiol-Gruppen zurückzuführen, wodurch aktive Zentren von Enzymen direkt blockiert oder die Enzymfaltung verhindert werden können (Ekino et al., 2007). Organische Quecksilberverbindungen werden nach Bildung eines Cysteinkomplexes ($-\text{CH}_2\text{-S-Hg-CH}_3$), einem Strukturanalogon von Methionin, durch die Blut-Hirn- sowie die Plazenta-Schranke transportiert. Bei Neugeborenen werden hierdurch schwere Hirnschädigungen und Entwicklungsstörungen beschrieben (Countera und Buchanan, 2004). Die WHO Richtlinien sehen vor, dass eine tolerable wöchentliche Dosis von 5 μg Gesamtquecksilber (respektive 1,6 μg MeHg) pro kg Körpergewicht nicht überschritten werden sollten (UNEP DTIE, 2008). Diese Werte entsprechen dem PTWI-Wert (*provisional tolerable weekly intake*), der definiert, dass eine Substanz wöchentlich ein ganzes Leben konsumiert werden kann, ohne dass gesundheitliche Beeinträchtigungen zu erwarten sind (UNEP DTIE, 2008). Letale Dosen für HgCl_2 beim Menschen liegen bei 29 mg/kg und für Methyl- bzw. Ethylquecksilber bei nur 5 mg/kg (Greenwood, 1984). Auch im Rahmen des Europäischen Parlaments behält die Diskussion um Hg an Aktualität. So wurde im Jahr 2008 ein

Exportverbot von Hg und seinen Verbindungen aus der EU verabschiedet, welches 2011 in Kraft getreten ist und sowohl elementares Hg als auch Zinnober, Quecksilberchlorid und -oxid umfasst. Die weltweite Nachfrage lag im Jahr 2005 bei ungefähr 3.400 t pro Jahr und in den 25 EU-Mitgliedsstaaten bei rund 780 t (Europäische Kommission, 2010).

Die Ubiquität von Hg wirkt sich auf das Bewusstsein der Öffentlichkeit aus, die sensibilisiert ist gegenüber toxischen Kontaminationen der Umwelt und auf die Gewährleistung von Kontrollen für Trinkwasser und Nahrungsmitteln sowie der Regelung zur Freisetzung von Schadstoffen in die Umwelt insistiert. Daher ist offenkundig, welche enorme Bedeutung der wissenschaftlichen Grundlagenforschung zur Analyse von Hg in der Umwelt, der Umsetzung und Bildung von Quecksilberspezies, insbesondere von MeHg, im globalen Kreislauf und in Nahrungsketten unter Berücksichtigung biologischer Aspekte zukommt.

1.1. Physikalische und chemische Eigenschaften von Hg

An die bekannteste chemische Eigenschaft des Schwermetalls Hg wird durch die griechische Herkunft des Wortes „Hydrargyrum“ (flüssiges Silber) erinnert, denn es ist das einzige Metall (und neben Brom das einzige Element), welches bei Raumtemperatur flüssig ist (Poissant et al., 2002). Es ist unter den Elementen der II. Nebengruppe mit einem positiven Normalpotential ($E_0 = 0,85 \text{ V}$) die Ausnahme. Quecksilber besitzt eine geringe Leitfähigkeit ($1,063 \cdot 10^{-4} \text{ mg}/\Omega\text{mm}^2$) und ist die Basis für die Definition des elektrischen Widerstands. Dabei wird der Widerstand einer Quecksilbersäule von 106,3 cm Länge und 1 mm^2 Querschnitt bei 0 °C einem Widerstand von 1Ω gleichgesetzt (Holleman und Wiberg, 2007). In der Natur kommt Hg als Flüssigtropfen oder in Form des Minerals Zinnober (HgS) vor. Es gehört zu den seltenen Elementen, ist mit einem Anteil von $5 \cdot 10^{-5}$ Gewichtsprozent an dem Aufbau der Erdkruste beteiligt und ubiquitär vorhanden (Bunke, 2007). Dies erklärt den Befund, dass ein durchschnittlicher Boden 20 bis 150 ppb Hg in einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Formen (Spezies) enthält (Osborn et al., 1997). Große Vorkommen wurden in Spanien, China und der früheren Sowjetunion entdeckt, wo Hg als Zinnober zu finden ist (Poissant et al., 2002). Hg ist nicht in Salz- und Schwefelsäure löslich, sondern nur langsam in Salpetersäure und Königswasser (Bloom et al., 2003). Eine weitere interessante Eigenschaft von Hg, was auch den Einsatz für die Goldgewinnung erklärt, ist die Fähigkeit zur Amalgambildung, d.h. andere Metalle werden unter Bildung von flüssigen oder festen Legierungen aufgelöst. Mit den Elementen Eisen, Mangan, Nickel, Kobalt, Wolfram und

Molybdän hingegen werden keine Amalgame gebildet (Bloom et al., 2003; Hollemann und Wiberg, 2007).

Gemäß der Stellung im Periodensystem kann Hg in den Oxidationsstufen 0, 1+ und 2+ vorkommen. Allerdings liegt es in der Natur überwiegend als Hg^{2+} oder Hg^0 vor, da die Elektronenkonfiguration für Hg(I) instabil ist. Dabei bildet sich Hg_2^{2+} mit einer kovalenten Hg-Hg Bindung, welches mit Hg^0 und Hg^{2+} im Gleichgewicht steht (Hollemann und Wiberg, 2007). Das anorganische Hg^{2+} besitzt aufgrund seiner Häufigkeit in der Natur eine bedeutende Rolle und kann verschiedene Verbindungen eingehen. Welche Stabilität diese Verbindungen ausprägen, kann durch das Pearson Konzept der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB- Konzept) abgeschätzt werden. Reaktionen werden als Umsetzungen zwischen einem Elektronenpaardonor (Base) und einem Elektronenpaarakzeptor (Säure) betrachtet und sofern die Säure und die Base gleichen Charakter (ob „hart“ oder „weich“) aufweisen, bilden sich stabile Verbindungen. Der Charakter wird durch die Elektronegativität sowie die Polarisierbarkeit der Ionen bestimmt. Ein weiteres kennzeichnendes Merkmal von Hg ist die ausgeprägte Thiophilie, die nach Vergleich der Stabilitätskonstanten häufiger Verbindungen dieses Schwermetalls in Tab. 1 ersichtlich ist (Ravichandran, 2004; Hollemann und Wiberg, 2007; Hollweg et al., 2010).

Tab. 1: Ausgewählte Stabilitätskonstanten häufiger Verbindungen mit Hg^{2+} und CH_3Hg^+ .

Liganden	Stabilitätskonstante $\log K$
$\text{Hg}^{2+} + \text{Cystein } \text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	14,4
$\text{Hg}^{2+} + \text{Acetat } \text{CH}_3(\text{COOH})$	3,7
$\text{Hg}^{2+} + \text{Citrat } \text{HOC}(\text{CH}_2)_2(\text{COOH})_3$	10,9
$\text{Hg}^{2+} + \text{EDTA } \text{HOOCCH}_2)_4(\text{NCH}_2)_2$	21,5
$\text{CH}_3\text{Hg}^{2+} + \text{RS}^- = \text{CH}_3\text{HgSR}$	16,5
$\text{CH}_3\text{Hg}^{2+} + \text{OH}^- = \text{CH}_3\text{HgOH}^+$	9,37
$\text{CH}_3\text{Hg}^{2+} + \text{Cl}^- = \text{CH}_3\text{HgCl}$	5,25
$\text{Hg}^{2+} + 2\text{Cl}^- = \text{HgCl}_2$	14
$\text{Hg}^{2+} + \text{OH}^- = \text{HgOH}^+$	10,67
$\text{Hg}^{2+} + 2\text{HS}^- = \text{Hg}(\text{SH})_2$	37,71
$\text{Hg}^{2+} + 2\text{RS}^- = \text{Hg}(\text{SR})_2$	42
$\text{H}^+ + \text{HS}^- = \text{H}_2\text{S}$	7
$\text{S}_2^{2-} + \text{H}^+ = \text{HS}^-$	14,15
$\text{H}^+ + \text{OH}^- = \text{H}_2\text{O}$	13,7

Zu den schwerlöslichsten bekannten Verbindungen zählt Quecksilber(II)sulfid mit einem Löslichkeitsprodukt von $1,6 \cdot 10^{-54} \text{ mol}^2/\text{l}^2$ im Gegensatz zu vielen leichtlöslichen Hg(II) Salzen. Innerhalb schwerlöslicher Verbindungen liegt Hg zunächst immobilisiert vor. Es kann jedoch

durch verschiedene Prozesse wieder als Hg^0 freigesetzt werden (Holmes et al., 2010). Eine Besonderheit von volatillem Hg ist der hohe Dampfdruck, der bei 20 °C bereits $13,6 \text{ mg/m}^3$ Hg (= 0,17 Pa) beträgt. Die toxikologische Relevanz ist daher beträchtlich und die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) wurde bei nur $0,1 \text{ mg/m}^3$ festgesetzt (Hollemann und Wiberg, 2007). Diese und weitere wichtigen chemischen und physikalischen Eigenschaften der häufigsten Hg-Verbindungen sind in Tab. 2 zusammengefasst (Lindqvist und Rohde 1985; Demuth, 2001a). Die mitunter starken Unterschiede z.B. im Löslichkeitsverhalten bestimmen maßgeblich die Mobilität und Bioverfügbarkeit von Hg in der Umwelt und die Prozesse innerhalb des globalen Quecksilberkreislaufs (Holmes et al., 2010; Mason et al., 2012).

Tab. 2: Physikalische Eigenschaften verschiedener häufig vorliegender Quecksilberverbindungen.

Eigenschaft	Hg^0	CH_3HgCl	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	HgCl_2 Sublimat	Hg_2Cl_2 Kalomel	HgS
Wasserlöslichkeit [g/L bei 20 °C]	$63 \cdot 10^{-6}$	5	0,03 [24 °C]	74	0,0023	$1,9 \cdot 10^{-24}$
Schmelzpunkt [°C]	-39	170	-42	281	400*	584
Siedepunkt [°C]	357	-	96	302	-	-
Molare Masse [g/mol]	200,59	251,08	230,66	271,50	472,09	232,66
Dampfdruck [Pa bei 25°C]	0,25-0,28	1,76	8300	0,02	$0,3 \cdot 10^{-3}$ [50 °C]	-

*Sublimationspunkt

1.2. Biogeochemischer Quecksilberkreislauf

Quecksilber und Hg-Verbindungen gelangen sowohl durch geologische als auch anthropologische Prozesse in einen globalen Kreislauf von Wasser, Luft und Böden (Abb. 1; Poissant et al., 2002; Holmes et al., 2010; Mason et al., 2012). Durch natürliche Prozesse wie z.B. vulkanische oder geothermale Aktivitäten, Waldbrände oder dem Reflux von Hg aus aquatischen Systemen werden jährlich ca. 4200 t Hg (ohne die ozeanischen Hg^0 Emissionen einzukalkulieren) in die Atmosphäre freigesetzt (Holmes et al., 2010). Die anthropogenen Aktivitäten führen zu einer weiteren kontinuierlichen Freisetzung (Osborn et al., 1997) und die Mengen werden auf jährlich 1300 t Hg^0 sowie 800 t Hg^{2+} t geschätzt (Holmes et al., 2010). Dabei führen industrielle Prozesse wie z.B. die Verbrennung von fossilen Brennstoffen, der

Einsatz von Hg zur Goldgewinnung, in der Chlor-Alkali-Industrie oder in allgemeinen Gebrauchsgütern zu kontinuierlichem Bedarf an Hg (Poissant et al., 2002). Weiterhin wird es z.B. in Batterien, Energiesparlampen, Laborthermometern, Flachbildschirmen oder als Hg-Silberamalgam in Zahnfüllungen eingesetzt (Calvert, 2007; Sarigiannis et al., 2012). Der globale Einsatz wurde bereits reduziert, allerdings gibt es für einige physikalische oder elektrische Apparaturen (Quecksilberdampflampen, Polarographie, Kalomelektrode) aufgrund einzigartiger Eigenschaften von Hg keine Alternativen.

Das Schwermetall gelangt nach Freisetzung als volatiles Hg^0 leicht in die Atmosphäre und wird von dort weltweit verbreitet (Issaro et al., 2009). Als Hg^0 bleibt es im Durchschnitt für eine Zeit von einigen Monaten bis 1-2 Jahren in der Atmosphäre und unterliegt verschiedenen Transformationsprozessen durch photochemische Oxidantien (z.B. Ozon) und wird zu Hg^{2+} oxidiert (Holmes et al., 2010).

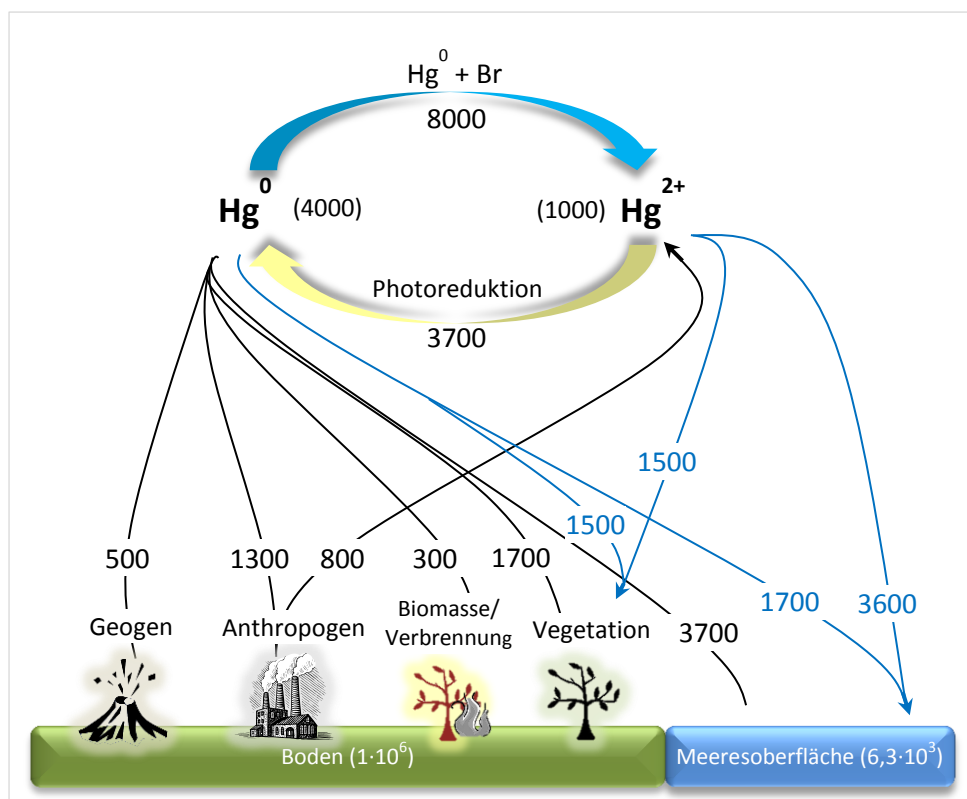


Abb. 1: Die bedeutendsten Quellen für den globalen Eintrag von Hg in die Umwelt in t, Stoffflüsse in t pro Jahr. Hg (II) umfasst gasförmige und partikuläre Formen (nach Holmes et al., 2010 mit Genehmigung durch <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Im biogeochemischen Kreislauf führen Depositionsprozesse wie z.B. Niederschläge zur Rückführung von Hg^{2+} in Sedimente, Böden und Wassersysteme (Abb. 1; Merritt und Amirbahman, 2009). Die wichtigsten und zugleich häufigsten Komponenten, die in Luft und Wasser gefunden werden, setzen sich hauptsächlich aus den folgenden Spezies zusammen: volatiles Hg^0 und $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, reaktives Hg^{2+} , HgX_2 , HgX_3^- und HgX_4^{2-} ($\text{X} = \text{OH}^-$, Cl^- und Br^- , HgO auf Aerosol-Partikel), Hg^{2+} -Komplexe mit organischen Säuren nicht-reaktive Hg Spezies wie CH_3Hg^+ , CH_3HgCl , CH_3HgOH und andere organische Hg-Komponenten, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, HgS und Hg^{2+} gebunden an Schwefel in Huminsäuren (Lindqvist und Rohde, 1985; Holmes et al., 2010). In aquatischen Sedimenten wird eine Immobilisierung von Hg durch die hohe Präsenz von Sulfiden als HgS beobachtet. Dies und die Bindung an Huminsäuren und Bodenkolloide werden als Senke für Hg angenommen. Hierbei spielen mikrobiologische Aktivitäten eine zentrale Rolle, da in Meeressedimenten Hg in neutraler Form als HgS oder in Cystein-komplexen von Prokaryoten aufgenommen und zu Hg^{2+} remobilisiert werden kann (Poissant et al., 2002; Barkay, 2003; Schaefer und Morel, 2009). Wie in Abb. 2 dargestellt ist, dient die anorganische Spezies Hg^{2+} als Ausgangsform für weitere, oftmals energieabhängige und mikrobiell katalysierte Transformationen zu organischen Hg-Verbindungen wie z.B. CH_3Hg^+ oder $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ (Barkay et al., 2003; Gilmour et al., 2011). Im Gegensatz zu MeHg ist Dimethylquecksilber leichter flüchtig und gelangt in die Atmosphäre, wobei die Moleküle durch Energiezufuhr in Form von Licht gespalten werden (Holmes et al., 2010).

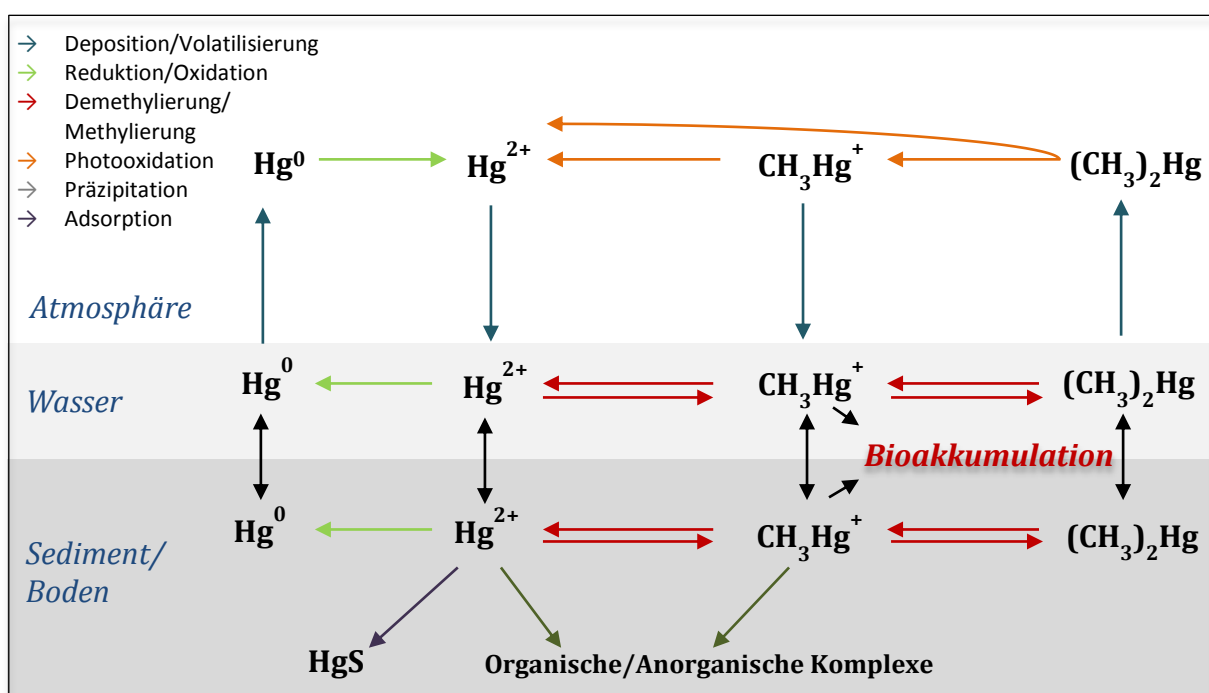


Abb. 2: Die grundlegenden Transformationen von Hg im globalen Kreislauf im Überblick.

Die organischen Hg-Verbindungen, insbesondere MeHg, besitzen eine sehr große toxikologische Bedeutung. Aufgrund ihrer hohen Lipophilie werden diese im Gewebe angereichert und im globalen Quecksilberkreislauf in den Prozess der Hg-Biomagnifikation eingeführt, d.h. Hg wird in der Nahrungskette in steigenden Trophieebenen von Algen, Muscheln bis Fischen und schließlich dem Menschen akkumuliert (Mason et al., 2012).

1.3. Transformationen von Hg und mikrobielle Hg(II)-Methylierung

Wie im vorhergehenden Kapitel geschildert wurde, gehören MeHg, Hg⁰ und Hg²⁺ zu den häufigsten Quecksilberspezies, die im globalen biogeochemischen Kreislauf eine bedeutende Rolle spielen. Diese verschiedenen Spezies können sowohl durch abiotische als auch biologisch katalysierte Prozesse, die z.B. von mikrobieller Aktivität abhängig sind, entstehen und ineinander umgewandelt werden (Osborn et al., 1997; Merritt und Amirbahman, 2009). Die bekannten Reaktionen im Prozess der Methylierung, Demethylierung, Oxidation und Reduktion von Hg⁰, Hg²⁺ und CH₃Hg sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Aufgrund der hohen Akkumulation dieses Schwermetalls innerhalb von Nahrungsketten und der daraus resultierenden ökologischen Bedeutung zählt die biotische Methylierung zu einer der wichtigsten Transformationsreaktionen von Hg. Dass MeHg unter natürlichen Bedingungen biotisch aus anorganischem Hg in Sedimenten entsteht, wurde erstmals 1969 von Jensen und Jernelöv entdeckt. Der erste Hinweis auf den biochemischen Mechanismus wurde von Wood et al. (1968) an einem zellfreien Extrakt von *Methanobacterium* (Stamm MOH) gezeigt. Dabei konnte anhand von Farbreaktionen beobachtet werden, dass reduziertes Methylcobalamin (CH₃-Co-5,6-Dimethyl-Benzimidazolyl-Carbomid) als Methyl-donor für eine Transmethylierung von negativ geladenen Methylgruppen auf Hg²⁺ in Frage kommt. Zeitgleich wurde von Vonk und Sijpenstein (1973) gefunden, dass die Zugabe von Methionin die inhibitorische Konzentration von ionischem Hg das Wachstum von zwei Pilzen *Cladosporium cucumerinum* und *Scopulariopsis brevicaulis* drastisch reduzierte. Es wurde vermutet, dass neutrale Hg-Komplexe entstehen, die die Zellwand schneller passieren können. Anhand intensiver Studien über die Bedingungen und biochemischen Mechanismen der Methylierung von Hg konnten einige Parameter gefunden werden, von denen dieser Prozess grundsätzlich abhängig ist: Das Redoxpotential sowie die Salinität haben einen deutlichen Einfluss auf die Methylierungsraten in biologischen Sedimentproben. Diese Raten

waren höher, je niedriger das Redoxpotential (bis -220 mV) und der Salzgehalt (bis 0,4%) in der Probe lagen (Compeau und Bartha, 1984).

Tab. 3: Zusammenfassung der abiotischen (rot) und biotischen (grün hinterlegten) Transformationsprozesse von Hg^{2+} und CH_3Hg^+ im biogeochemischen Kreislauf (ergänzt nach Barkay, 2003).

Mechanismus (abiotisch/biotisch)	
Methylierung von Hg^{2+}	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Transmethylierung (oxidativ)</i>^[1,2]: Reaktion durch methylierende und biogen gebildete Substanzen, z.B.: <ul style="list-style-type: none"> - Methyljodid in aquatischer Umgebung, reduktive/anaerobe Bedingungen erforderlich $Hg^0 + MeI \rightarrow MeHgI$ - Methylschwermetallverbindungen (Blei, Zinn) aus z.B. Fungiziden, begünstigt durch alkalischen pH, hohen Salzgehalt (Meereswasser)^[1] $Hg^{2+} + Me_3Pb^+ \rightarrow Me_2Pb^{2+} + MeHg^+$ • <i>Photochemische Methylierung</i>: Durch UV/Sonnenlicht und Methylendonatoren, z.B. Carbonsäuren, Alkohole, Ketone, Aminosäuren, Klärschlämme, Urin, Faeces, Industrieabwässer, z.B.: $Hg^{2+} + MeCOOH \rightarrow MeHg^+ + CO_2 + H^+$ • <i>Methylierung durch Huminstoffe, Fulvinsäuren, Carboxylsäuren</i>^[3] • <i>Abiotische Methylierung durch Methylcobalamin</i>^[1] Beteiligung von Hg^{2+}, begünstigt durch sauren pH-Wert, niedrige Salzgehalte (Süßwasser)
Demethylierung von CH_3Hg^+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Photodegradation</i> bei 200-400 nm • <i>Reduktive Demethylierung</i> durch <i>merAB</i> (<i>mer</i> Operon) zu CH_4 und Hg^0 • <i>Oxidative Demethylierung</i> durch mikrobielle Prozesse zu CO_2 und Hg Organismen: methanogene Archaea, Sulfat-reduzierende Bakterien
Reduktion von Hg^{2+}	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Photochemische Dunkelreaktion</i> in Anwesenheit von organischen und anorganischen freien Radikalen, Disproportionierung: $2 Hg^+ \rightarrow Hg^{2+} + Hg^0$ • Bakterielle <i>Quecksilber-Reduktase</i> und Beteiligung von Algen bei Wachstum, im Licht und Dunkeln
Oxidation von Hg^0	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Photooxidation</i> durch verschiedene Oxidantien und freien Radikalen, dunkle Oxidation möglich durch O_2 bei hoher Salzkonzentration • Oxidation durch <i>Hydroperoxidase</i> in Mikroorganismen (<i>Bacillus</i>, <i>Streptomyces</i>), Pflanzen, Tieren

^[1]Celo et al. (2006), ^[2]Schedlbauer (1998), ^[3]Nagase (1982), ^[4]Gilmour et al. (2011), ^[5]Fleming et al. (2006)

Die Demethylierung von z.B. CH_3HgCl wird hingegen durch aerobe Bedingungen (bei einem Redoxpotential von ca. +110 mV) begünstigt und ist unabhängig von salinen Konzentrationen im Bereich von 0,4 bis 2,5%. (Compeau und Bartha, 1984/ 1987).

Um die Gruppe der Mikroorganismen zu identifizieren, die die Methylierung von Hg in Sedimentproben katalysieren, wurden Hemmversuche durchgeführt. Die Anwendung verschiedener Kombinationen spezifischer metabolischer Inhibitoren (Molybdän) deutete erstmals auf die Beteiligung von SRB an der Methylierung von Hg hin (Abb. 3). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Bromethansulfonsäure, einem spezifischen Inhibitor für Methanogene, zu erhöhten Konzentrationen an MeHg in einer Mischkultur mit SRB. Dabei wurden die höchsten Raten erzielt, wenn die Sulfatkonzentration limitiert und fermentierende Substrate verfügbar waren (Compeau und Bartha, 1985/ 1987).

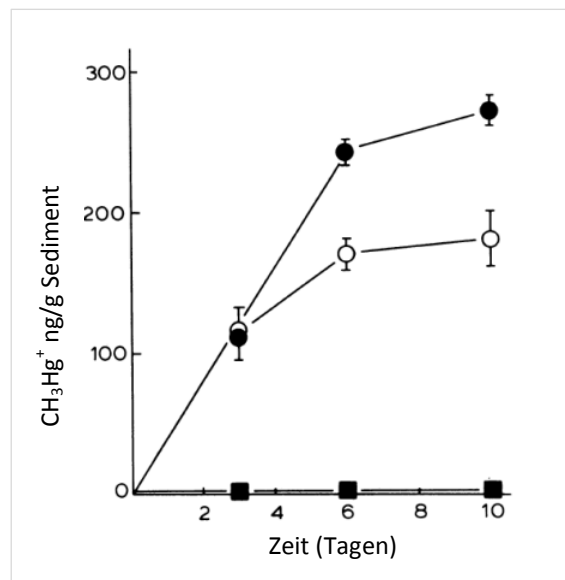


Abb. 3: Produktion von CH_3Hg^+ in anoxischen Sedimentproben (gespikt mit Hg^{2+}) durch SRB nach Zugabe spezifischer Inhibitoren: (●) BESA und (○) Na_2MoO_4 (Abb. aus Compeau und Bartha, 1985 mit Genehmigung zur Veröffentlichung durch die American Society of Microbiology am 10.01.2013).

Aus den Sedimentproben wurde ein Sulfat-reduzierendes Bakterium, *Dv. desulfuricans* LS, isoliert. Zunächst wiesen Untersuchungen über die biochemischen Mechanismen der Hg-Methylierung bei *Dv. desulfuricans* LS darauf hin, dass es sich hierbei um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, wobei Methylcobalamin als Methyl donor identifiziert wurde und die Acetyl-CoA-Synthese-Reaktion involviert ist (Choi und Bartha, 1993/ 1994a/ 1994b/ 1994c). Wie in Abb. 4 dargestellt ist, wird dabei wahrscheinlich eine Übertragung der Methylgruppe im Acetyl-CoA-Weg auf Hg anstelle von CoA-SH katalysiert (Choi und Bartha,

1994c). Diese übertragene Methylgruppe soll Berman et al. (1990) zufolge aus dem C3 von Serin oder aus Formiat (Choi und Bartha, 1994c) stammen. Das zu erwartende Endprodukt aus der Acetyl-CoA-Synthese-Reaktion wäre CO_2 und daher wurde vermutet, dass es sich bei der Hg-Methylierung lediglich um eine Nebenreaktion des Stoffwechsels handelt (Pak und Bartha, 1998a/ b). Dieser Stoffwechselweg sei auch nicht einzigartig für *Dv. desulfuricans* LS und abhängig von der Substratspezifität des entsprechenden Enzyms. Für die Beteiligung von Methylcorrinoiden spricht auch eine allgemeine biochemische Überlegung: Generell könnten

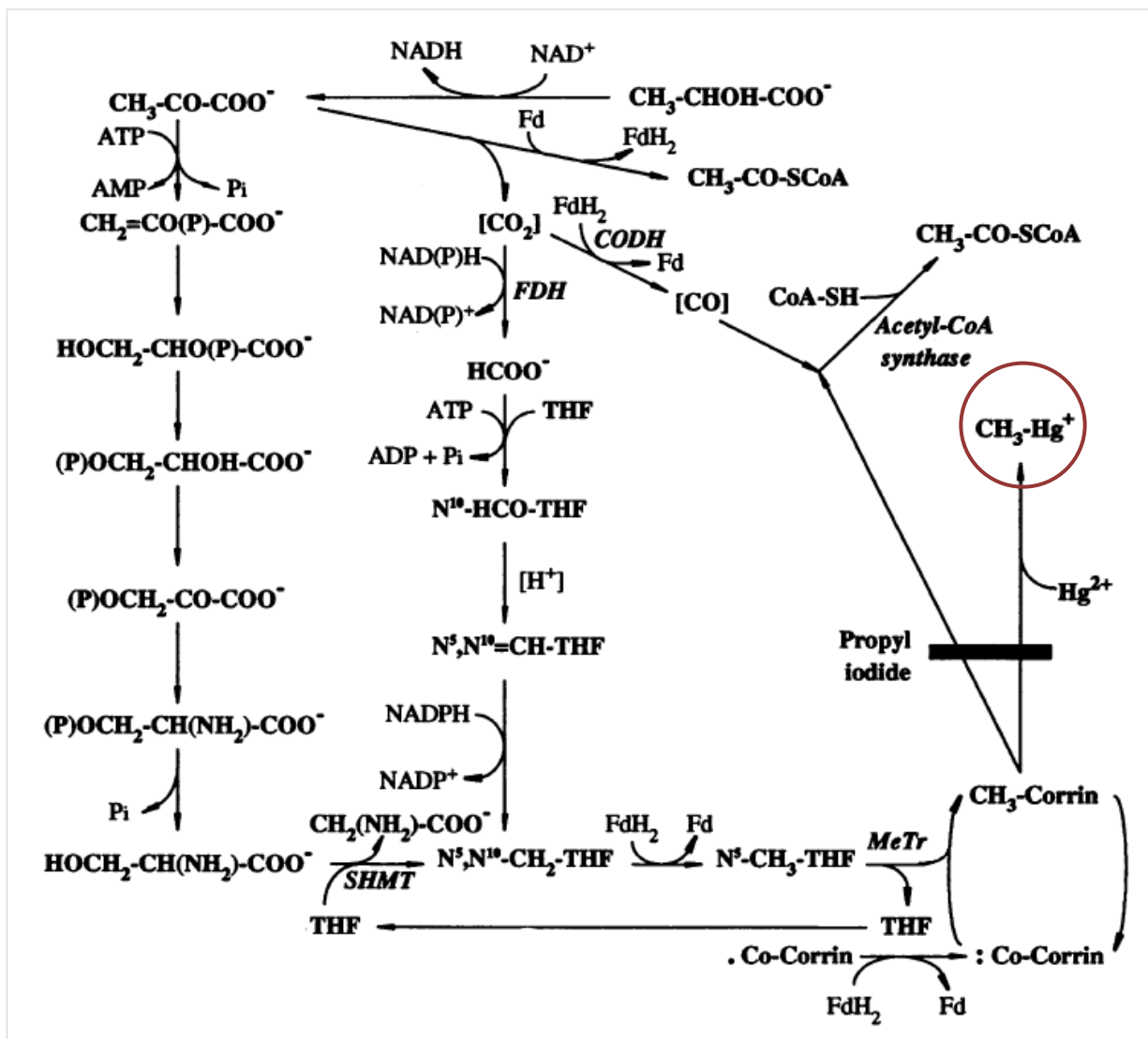


Abb. 4: Mechanismus der Quecksilbermethylierung bei *Desulfovibrio desulfuricans* LS. Inhibierungsversuche mit Propyljodid führten zu einer Blockierung der Acetyl-CoA Synthase und der Hg-Methylierung. Fd, Ferredoxin; FDH, Formiat-Dehydrogenase (Formiat-DH); CO-DH, CO-DH, MeTr: Methyltransferase (Abb. aus Choi und Bartha, 1994c mit Genehmigung zur Veröffentlichung durch die American Society of Microbiology am 10.01.2013).

drei methylierende Agenzien für den Methyl- und Dimethyltransfer auf Hg^{2+} beteiligt sein: S-Adenosylmethionin, N^5 -Methyltetrahydrofolat- und Methylcorrinoid-Derivate (Craig, 2003). Die beiden erstgenannten Verbindungen transferieren eine Methylgruppe auf nukleophile Verbindungen, daher ist der Methyltransfer auf Metalle oder Metalloide ausgeschlossen. Methylcorrinoiden hingegen reagieren sowohl mit nukleophilen als auch mit elektrophilen Verbindungen, sodass Methyl- B_{12} -Komponenten mit Hg^{2+} reagieren und sowohl Methyl- als auch Dimethylquecksilber entstehen kann (Wood, 1975; Ekstrom und Morel, 2008). In dieser Reaktion wird die Methylgruppe als CH_3^- auf Hg^{2+} übertragen, wobei die Bildung von Dimethylquecksilber aus MeHg 6000mal langsamer abläuft (Craig, 2003).

Aus der Arbeit von Ekstrom et al. (2003) geht hervor, dass wahrscheinlich noch ein zweiter Mechanismus existiert, der an der Hg-Methylierung beteiligt ist. Dabei wurden mehrere SRB auf diese Fähigkeit getestet. Fünf Reinkulturen der SRB waren vollständige Oxidierer (d.h. Acetat wird über den Acetyl-CoA Weg zu CO_2 oxidiert) und von diesen Kulturen methylierten nur drei Hg^{2+} zu MeHg . Nach der Hypothese von Choi und Bartha (1994 c) sollten die Organismen aus einer Stoffwechselgruppe jedoch die gleiche Fähigkeit aufweisen. Außerdem produzierten von sieben Kulturen unvollständiger Oxidierer, die nachweislich nicht über den Acetyl-CoA Weg verfügen, fünf Kulturen MeHg . Dieses überraschende Ergebnis ließ vermuten, dass ein zweiter, von Acetyl-CoA und Vitamin- B_{12} unabhängiger Weg zur Hg-Methylierung existiert (Ekstrom et al., 2003). Dies konnte nach weiteren Untersuchungen bestätigt werden, indem der Cobaltgehalt in den Hg-methylierenden Kulturen limitiert und sich infolgedessen die Methylierungsrate von Hg nicht in allen Kulturen drastisch reduzierte (Ekstrom und Morel, 2008). Es darf angenommen werden, dass die unvollständigen Oxidierer der SRB andere Hg-Methylierungsmechanismen aufweisen als die vollständigen Oxidierer der SRB.

Die vollständige Aufklärung des biochemischen Mechanismus der mikrobiellen Hg-Methylierung ist jedoch bis heute nicht realisiert. Die Suche nach einem gemeinsamen Faktor, der eine Schlüsselrolle bei der enzymatischen Methylierung von Hg vermittelt, wird durch die individuelle und stammspezifische Ausprägung dieser Fähigkeit und der seltenen phylogenetischen Korrelation erschwert.

Aufgrund einiger weiterer Aspekte wird von manchen Wissenschaftlern angenommen, dass die Hg-Methylierung eine „versehentliche“ Seitenreaktion im Metabolismus ist (Gilmour et al., 2011). Es handele sich zwar um einen intrazellulären Prozess, der die Aufnahme von Hg

voraussetzt, es wurde jedoch noch kein aktiver Transport gefunden und es wird vielmehr angenommen, dass das bevorzugte Substrat als HgS in neutraler Form in die Zelle diffundiert (Benoit et al., 1999a/ 1999b/ 2001a) oder als Cystein-Hg-Komplex ($\text{Hg}(\text{Cys})_2$) aufgenommen wird (Krupp et al., 2008; Schaefer und Morel, 2009). Zudem hat Quecksilber keine bekannte physiologische Funktion in Bakterien und auch die Fähigkeit zur Hg-Methylierung verleiht einem Mikroorganismus keine erhöhte Resistenz gegenüber der Toxizität von Hg (Gilmour et al., 20011). Demgegenüber steht die Auffassung, dass mehr (bisher unbekannte) biologische Mechanismen an diesem Prozess beteiligt sind, da z.B. *Geobacter sulfurreducens* deutlich mehr Hg (II) methyliert, wenn geringe Cystein-Konzentrationen in das Medium zugegeben werden. Die (aktive) Aufnahme als Cys-Hg-Komplexe erhöhe die intrazelluläre Konzentration von anorganischem Hg, wodurch die enzymatische Formation von MeHg und die Abgabe ins externe Medium verstärkt würde (Schäfer and Morel, 2009).

Es ist anzunehmen, dass die Organismen, die hauptsächlich für die Hg-Methylierung verantwortlich sind, in den Gruppen der SRB (Devereux et al., 1996, King et al., 2000), methanogenen Archaea und den Eisen-reduzierenden Bakterien (Fleming et al., 2006; Kerin et al., 2006, Schaefer and Morel, 2009) zu finden sind. Erste Studien von Vonk und Sijpenstein (1973) oder Rowland et al. (1975) ließen vermuten, dass verschiedene Bakterien wie z.B. *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., Vertreter der Streptokokken, Staphylokokken, Lactobacillen und verschiedenen Pilzen bzw. Hefen in der Lage sind, Hg zu methylieren. Diese Befunde konnten jedoch in unabhängigen Studien nicht bestätigt werden und es sind bisher keine weiteren aeroben Organismen beschrieben worden, die über diese Fähigkeit verfügen. Sofern im experimentellen Verlauf dieser Studien Methylcobalamin als Wachstumsfaktor zum Medium hinzugefügt wurde, ist aufgrund einiger Untersuchungen anzunehmen, dass dabei ein nicht unerheblicher Teil an MeHg abiotisch gebildet worden ist (Berdicevsky et al., 1979; Filipelli und Baldi, 1993; Barkay und Baldi, mündliche Mitteilung ICMGP, 2011).

Andere Mikroorganismen, die dafür bekannt sind, die Methylierung von verschiedenen Metallen und Metalloiden (Arsen, Selen, Antimon, Tellur) im Rahmen einer Seitenreaktion mit zentralen methanogenen Cofaktoren $\text{CH}_3\text{Cob(III)}$ und Cobalamin zu katalysieren, sind die methanogenen Archaea (Wuerfel et al., 2012). Die Methylierung von Hg wurde jedoch nur in zellfreien Extrakten von Archaeen nachgewiesen (Wood et al., 1968; Imura et al., 1971; Wood 1975). Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um eine abiotische Bildung von

MeHg, da die Involvierung von Enzymen oder intrazellulären Transformationen die Voraussetzung für biotische Prozesse sind. Auch in früheren Arbeiten konnte die Methylierung von Methanogenen in vergleichenden Experimenten mit anderen mikrobiellen Kulturen nicht bestätigt werden. Dafür spricht auch der Befund, dass die BMSA-Zugabe als ein spezifischer Inhibitor der Methanogenen in Mischkulturen mit methanogenen Archaea und SRB keinen Einfluss auf die Methylierungsrate von Hg hatte, die Molybdänzugabe als spezifischer Inhibitor der SRB hingegen zu einer Reduktion der MeHg-Rate führte (Compeau und Bartha 1985; Avramescu et al., 2011). Äußerst interessant ist jedoch der Befund, dass *Dv. desulfuricans* und *Methanococcus maripaludis* in einer sulfatfreien Cokultur im Gegensatz zur Kultivierung in Reinkulturen unter synergistischem Wachstum Hg²⁺ methylierten (Pak und Bartha, 1998a).

Diese Fähigkeit zur Methylierung von Hg²⁺ durch verschiedene phylogenetische Gruppen der Sulfat- und Eisenreduzierenden Bakterien wurde bisher intensiv an Kulturen aus aquatischen Systemen wie in Sedimenten, Süßwasser und marinen Regionen untersucht (Gilmour et al. 1992; Devereux et al., 1996; Pak und Bartha, 1998a/ b; King et al., 2000; Achá et al., 2011). Dabei wurden Reinkulturen folgender Gattungen oder Arten mit dieser speziellen Ausprägung identifiziert: z.B. *Desulfovibrio (Dv.) desulfuricans* LS (Berman et al., 1990), *Desulfovibrio* sp. (Compeau und Bartha 1984; Gilmour et al., 2011), *Desulfococcus* spp., *Desulfobacter* spp., *Desulfobacterium* spp. (Compeau und Bartha, 1985; King et al., 2000; Ekstrom et al. 2003; Ekstrom und Morel, 2008), *Db. (Desulfobulbus) propionicus* 1pr3 (Benoit et al., 2001 a) und *Geobacter sulfurreducens* (Schaefer und Morel, 2009). Allerdings ist es nicht möglich, diese Erkenntnisse auf die Gesamtheit der Sulfat- und Eisen-reduzierenden Bakterien zu übertragen, da sie physiologisch und phylogenetisch sehr unterschiedlich sind (Fleming et al., 2006, Kerin et al., 2006). Jede Gruppe kann ein anderes Potential zur Hg-Methylierung besitzen (King et al., 2000), ebenso wie einzelne Arten und Stämme (Gilmour et al., 2011).

1.4. Sulfat-reduzierende Bakterien

Die Sulfat-reduzierenden Bakterien sind eine heterotrophe Gruppe anaerober Mikroorganismen, die ursprünglich in Schlamm und Sedimenten in Süß- und Salzwasser entdeckt wurden, die reich an gelösten Salzen und Sulfaten sind (Postgate, 1979; Odom und Singleton, 1993; Barton, 1995). Prinzipiell sind diese Organismen in aquatischen und terrestrischen Biotopen ubiquitär verbreitet und können anaerobe ökologische Nischen besetzen, die von mikrobiellen Zersetzungsprozessen geprägt sind (Sass et al., 1998). Verschiedene Sulfat-reduzierende Mikroorganismen wurden z.B. auch in Ölfeldern, an Kohlenwasserstoff-Quellen, in Kläranlagen oder Böden des tropischen und gemäßigt kühlen humiden Klima nachgewiesen und isoliert. Dabei sind manche Arten an Habitats mit extremen Bedingungen gut angepasst, wie z.B. in sauren Vulkanseen (pH=2), basischen Seen (pH bis zu 10) oder hydrothermalen Tiefsee-Spalten (Odom und Singleton, 1993; Koschorreck et al. 2003; Geets et al., 2006; Muyzer und Stams, 2008). Neben diesen anaeroben Biotopen konnten auch bestimmte SRB aus mikrobiellen Matten isoliert werden, von denen einige sogar mit sauerstoffproduzierenden Cyanobakterien vergesellschaftet sind (Muyzer und Stams, 2008). Die Erkenntnis, dass SRB eine relativ hohe Sauerstofftoleranz aufweisen und zum Teil sogar die Fähigkeit besitzen, O₂ als Elektronenakzeptor zu nutzen geht auf Dillings und Cypionka (1990) zurück. Durch diesen Mechanismus wird das Wachstum zwar nicht unterstützt, jedoch kann als Schutzfunktion O₂ entfernt werden (Brock et al., 2000).

Im Allgemeinen sind die Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen eine äußerst diverse Gruppe (Castro et al., 2000) und auf Basis moderner phylogenetischer Studien mithilfe der vergleichenden 16S rRNA Sequenzanalyse wurden sieben phylogenetische Gruppen ermittelt (siehe Abb. 5). Davon werden fünf den Bakterien und zwei den Archaea zugeordnet. Die meisten Sulfatreduzierer gehören zu den δ -Proteobacteria und den Clostridia (Ottow, 2011). Die thermophile Gruppe umfasst die Thermodesulfobiaceae, Thermodesulfobacteria und Nitrospira. Innerhalb der Archaea sind drei Gattungen der Euryarchaeota sowie zwei der Crenarchaeota bekannt. Ein Vertreter der Archaea, die hyperthermophile Gattung *Archaeoglobus*, wurde aus dem Sediment einer hydrothermalen Tiefsee-Quelle isoliert und produziert Methan unter dem Abbau von Formiat, Glucose oder Pyruvat (Muyzer und Stams, 2008). Zu den Gram-positiven Firmicutes gehören z.B. die sporenbildenden stäbchenförmigen *Desulfotomaculum*-Arten, die typischerweise im Boden vorkommen (Castro et al., 2009).

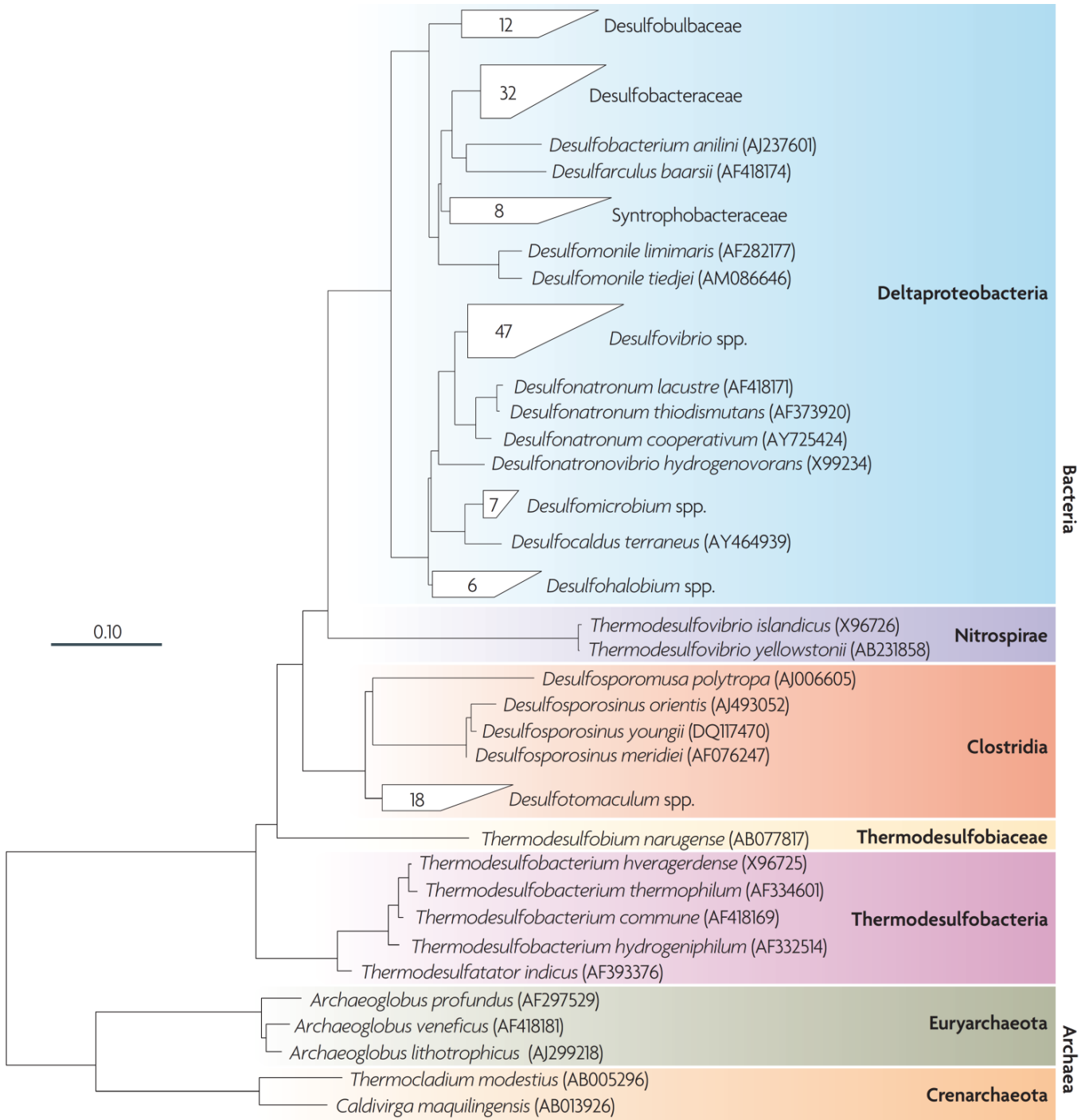
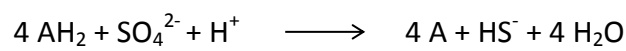


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen basierend auf der 16S rRNA Sequenzanalyse. Der Balken gibt eine 10%ige Sequenzabweichung an (Abb. aus Muyzer und Stams, 2008 mit Genehmigung zur Veröffentlichung durch die Nature Publishing Group am 10.01.13).

Unter den Gram-negativen Bakterien sind bisher nur Vertreter aus der Gruppe der δ -Proteobacteria bekannt wie z.B. die zitronenförmige Gattung *Desulfobulbus*, die hauptsächlich Propionat zu Acetat und CO_2 verwertet. Als prominentester Vertreter gilt *Desulfovibrio* mit einer charakteristischen Morphologie gebogener Stäbchen mit polaren Flagellen, fehlender Sporenbildung, Desulfovirdin als Sulfitreduktase und Vorkommen in aquatischen Biotopen oder wasserdurchtränkten Böden mit organischen Stoffen und Sulfaten (Barton, 1995; Odom und Singleton, 1993; Castro et al., 2009). Einige Arten der *Desulfovibrio* spp. wurden gelegentlich aus dem Intestinaltrakt von Tieren isoliert (Sass et al., 1998).

Das gemeinsame physiologische Merkmal der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) ist die Fähigkeit zu einer anaeroben Respiration unter der Reduktion von Sulfat oder Schwefel zu Schwefelwasserstoff H_2S , die unter der Bezeichnung „dissimilatorische Sulfatreduktion“ als physiologische Eigenschaft klar von der assimilatorischen Sulfatreduktion abgegrenzt wird (Postgate, 1979). Die dissimilatorische Sulfatreduktion kann im Allgemeinen wie folgt beschrieben werden (Odom und Singleton, 1993):



Die SRB können eine Reihe verschiedener Substrate nutzen, wie z.B. Lactat, Formiat, Propionat, Butyrat und andere Fettsäuren, Methanol, Ethanol, H_2/CO_2 , aber auch aromatische Verbindungen und Kohlenwasserstoffe (Kniemeyer et al., 2003/ 2007; Muyzer und Stams 2008). Prinzipiell werden die Sulfatreduzierer in zwei Stoffwechselgruppen eingeordnet. In der Gruppe I der „unvollständigen Oxidierer“ finden sich Vertreter der Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfobulbus*, die Acetat ausscheiden, da sie Acetyl-CoA nicht vollständig zu CO_2 oxidieren können. Vertreter der Gruppe II wie z.B. die Gattungen *Desulfotomaculum* und *Desulfobacter* hingegen oxidieren Acetyl-CoA zu CO_2 und H_2O mithilfe eines modifizierten Citratzyklus (reduktiver Tricarbonsäurezyklus) oder dem Acetyl-CoA-Weg (Barton, 1995). Der reduktive Acetyl-Co-Weg, der prinzipiell auch von acetogenen und methanogenen Mikroorganismen genutzt wird, ermöglicht autotrophen Sulfat-reduzierenden Bacteria und Archaea mit H_2/CO_2 als Substrat zu wachsen (White, 2012). Diese Eigenschaft findet sich bei verschiedenen Arten und Stämmen der Familie *Desulfobacteriaceae*, *Desulfotomaculum* und *Archaeoglobus* (Brock et al., 2000).

Neben Sulfat können einige SRB auch andere Elektronenakzeptoren zum Wachstum nutzen (Postgate, 1979). Dazu gehört etwa die Reduktion von NO_3^- zu NH_3 , von Sulfonaten wie z.B.

Isotionat ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$) oder Elementarschwefel (S^0), die beide zu H_2S reduziert werden. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass einige SRB in Abwesenheit von Sulfat und Präsenz von geeigneten organischen Komponenten die Fähigkeit zur Fermentation besitzen (Odom und Singleton, 1993). Die häufigste vergärbare Substanz ist Pyruvat, welches zu Acetat oder Propionat und nur Acetat fermentiert wird (White et al., 2012).

1.5. Motivation und Zielsetzung

Die bedeutendste Senke für atmosphärisches Hg ist der terrestrische Boden. Dabei sind 90-99% des globalen Gesamtquecksilbers an Sedimente gebunden und <1% in Biota. Demgegenüber sind 1-10% des MeHg im Sediment gefunden worden, während 90-99% in der Biota akkumuliert sind (King et al., 2000). Methylquecksilber gilt als eine äußerst gesundheitsgefährdende Hg-Spezies und es ist bekannt, dass bedenkliche Konzentrationen in (tierischen) Nahrungsmitteln akkumuliert sind (Craig, 2003). Daher ist das Verständnis der Hg-Transformationen, Anreicherungsmechanismen und biologischen Zusammenhänge sowie der Entwicklung von analytischen Nachweismethoden von fundamentaler Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen des Graduiertenkollegs 826 „Spurenanalyse und Elementspeziation: Methodenentwicklung und Anwendungen“ entstanden. Vordergründig waren dabei Untersuchungen zum Schwermetall Hg, seine Stoffkreisläufe und biotischen mikrobiellen Transformationen. Innerhalb des Projekts wurden bisher die Akkumulation von MeHg im Gewebe terrestrischer Lebewesen und die Methylierung von anorganischen Hg durch intestinale Mikroorganismen untersucht. Zunächst wurden Methoden zur Bestimmung von MeHg mittels Purge & Trap und GC-Atomfluoreszenzspektrometrie (GC-AFS) optimiert. Außerdem wurde die Produktion von MeHg durch bakterielle Kulturen, die Akkumulation von MeHg und Hg im Gewebe von Termiten *Mastotermes darwiniensis*, Kompostwürmern *Eisenia foetida* (*E. foetida*) sowie im Klärschlamm nachgewiesen und quantifiziert. Schließlich wurden bodenlebende und intestinale Mikroorganismen isoliert und identifiziert (Limper 2006; Knopf, 2010). Anhand dieser Resultate wurde angenommen, dass in dem Prozess der Anreicherung von MeHg im Gewebe des Kompostwurmes biotische Prozesse zur Transformation von Hg zu MeHg zugrunde liegen. Möglicherweise seien γ -Proteobakterien an dieser Reaktion beteiligt (Knopf, 2010).

In dieser Arbeit wurden einige Untersuchungen vertieft und ein wesentliches Ziel bestand darin, die Bildung von MeHg durch verschiedene Mikroorganismen näher zu untersuchen.

Mikrobielle Umweltproben aus dem Boden und dem Intestinaltrakt von *E. foetida* wurden vergleichend auf diese Fähigkeit getestet. Die Isolierung und Anreicherung sowie die Identifizierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt waren dabei von großem Interesse, um die Kenntnisse über die Diversität in diesem Habitat zu vertiefen und Organismen zu detektieren, die über die Fähigkeit der Methylierung von Hg(II) verfügen. Bisher gibt es intensive Studien zur Hg-Methylierung durch Sulfatreduzierer in aquatischen Biotopen, aber nur marginale Informationen über die Zusammenhänge in terrestrischen und insbesondere in intestinalen Habitaten (Knopf und König, 2009). Ein weiterer klarer Fokus dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Fähigkeit zur Hg-Methylierung durch intestinale Sulfat-reduzierende Bakterien. Um dieses Ziel zu erreichen und zuverlässige Quantifizierungen im Ultraspurenbereich vornehmen zu können, stand die Optimierung und Anwendung einer Methode zur Bestimmung von MeHg in flüssigen bakteriellen Proben mit komplexer Matrix im Mittelpunkt. Außerdem sollte in weiterführenden Experimenten gezeigt werden, inwiefern die Lokalisation von akkumulierten Hg im Gewebe von *E. foetida* unter Anwendung präziser und moderner analytischen Methoden prinzipiell möglich ist.

2. Material und Methode

2.1. Mikroorganismen

Die Mikroorganismen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Übersicht über die Mikroorganismen und ihre Herkunft.

Mikroorganismen	Stamm	Isolat aus	Herkunft ¹
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Lindhorst (1pr3)	Süßwasserschlamm	DSM 2032 ^T
<i>Desulfotomaculum alkaliphilum</i>	S1	Schweine- und Rinderdung	DSM 12257 ^T
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	DL	Schafmagen	DSM 2154 ^T
<i>Desulfovibrio giganteus</i>	STg	Termite <i>Cubitermes</i> sp.	DSM 4370
<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	KMS2	Küchenschabe <i>Cryptocercus punctulatus</i>	DSM 11275 ^T
<i>Desulfovibrio piger</i>	VPI C3-23	Menschliche Fäkalien	DSM 749 ^T
<i>Desulfovibrio</i> sp.	G11	Rindermagen	DSM 7057
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	HI1 ²	Termite <i>Heterotermes indicola</i>	DSM 5308 ^T
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	KSS1 ²	<i>Cryptocercus punctulatus</i>	DSM 11274
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	KH1 ²	<i>Heterotermes indicola</i>	IMW
<i>Desulfovibrio</i> sp.	KMS2/1 ²	<i>Cryptocercus punctulatus</i>	IMW
Anreicherungskultur	EF4	Wurm <i>Eisenia foetida</i>	diese Arbeit
Anreicherungskultur	PS1	Käfer <i>Pachnoda savignyi</i>	diese Arbeit
Anreicherungskultur	Zy1	Kleinlibelle Zygoptera, Larve, Art unbekannt	IMW

¹Die Stämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) sowie aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz (IMW) bezogen. ²Kulturen wurden von Trinkerl et al. (1990), Kuhnigk et al. (1996) sowie Fröhlich et al. (1999) isoliert; ^TTypstamm einer jeweiligen Kultur.

2.2. Geräte und Hilfsmittel

Die nachfolgende Tab. 5 gibt Auskunft über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel. Tabelle 6 fasst die wichtigsten Verbrauchsmittel zusammen.

Tab. 5: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel.

Gerät und Bezeichnung	Hersteller*
◆ Agarose-Gel-Elektrophorese	BioRad Laboratories GmbH
Sub-Cell Model 96 mit Power Supply 250 V	VWR International GmbH
◆ Anaeroben-Kammer COY	COY Laboratory Systems
(H ₂ /N ₂ : 5/95 Vol-%)	
◆ Autoklaven: Certoclav	Certoclav Sterilizer GmbH
Fedegari	Tecnomara AG
Systec Typ VX – 150	Systec GmbH
◆ DGGE System DGene™ System mit	BioRad Laboratories GmbH
Power Supply 250 V	VWR International GmbH
◆ Exsikkator, Vakuumölpumpe Trivac D 4B	Leybold
◆ Flow Injection Mercury System FIMS 4000	PerkinElmer
◆ Gaschromatograph Trace GC	Fisher Scientific GmbH
◆ Geldokumentationseinheit Bio Vision	Vilber – Lourmat Deutschland GmbH
CN3000, Software Vision Capt 14.1	
◆ Hamilton Spritze 10 µm und Gastight 1700	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
◆ Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
◆ Kryostat CM 3050S	Leica Microsystems GmbH
◆ Laser Ablationssystem NWR-193 ESI	ESI
mit ICP-Quadrupol-MS Agilent 7500	Agilent Technologies Deutschland GmbH
Standort: Institut für Geowissenschaften	
Johannes Gutenberg-Universität Mainz	
◆ Magnetrührer RCT Basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG
◆ Mikropipetten	Eppendorf AG
◆ Mikroskop SM Lux	Leica Microsystems GmbH
◆ PCR-Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG
◆ pH – Meter CG 840	Schott
◆ Photometer für Reagenzgläser	Shimadzu Europa GmbH
SpectrophotometerUV-120-01	

Gerät und Bezeichnung	Hersteller*
◆ Photometer Multiscan MKII	Titertek Instruments Inc.
◆ Photometer Specord 50	Analytik Jena AG
◆ Präzisionswaage	Sartorius Weighing Technology GmbH
◆ Reinstwasseranlage Milli-Q Plus 185, QPak®2	Merck Millipore
◆ Sektorfeld-ICP-MS Element 2, Standort: Fraunhofer Institut für Molekular- biologie und angewandte Ökologie, Schmallenberg	Thermo Fisher Scientific
◆ Thermomixer HLC HTM 130	HLC Haep Labor Consult
◆ Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf AG
◆ Trockenschrank	BINDER GmbH
◆ Ultraschallgerät Sonorex	Bandelin GmbH, Berlin
◆ Vortex Vibrofix VF1	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
◆ Wasserbad mit Thermofunktion Inkubationsbad 1003	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH
◆ Zentrifugen: Cryofuge 5000	Heraeus Christ
Zentrifuge J2 – MC	Beckman Coulter
Zentrifuge 5403	Eppendorf AG

*Firmenstandorte: Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland; Analytik Jena AG, Jena, Deutschland; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland; BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland; BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland; Certoclav Sterilizer GmbH, Traun, Österreich; COY Laboratory Systems, MI, USA; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; ESI, Portland, Oregon, USA; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland; GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland; Heraeus Christ, Osterode, Deutschland; HLC Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland; IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland; Leybold, Köln, Deutschland; Merck Millipore, Billerica, MA; PerkinElmer, Rodgau, Deutschland; Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland; Schott, Mainz, Deutschland; Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/ Deutschland; Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland; Tecnomara AG, Zürich, Schweiz; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Titertek Instruments Inc., Huntsville, AL, USA; Vilber – Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tab. 6: Übersicht über die wichtigsten Verbrauchsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller*
◆ Deckgläser 18 x 18 mm	Gerhard Menzel GmbH
◆ Menzel-Gläser/Menzel-Gläser Superfrost®Plus für Kryosektion	Gerhard Menzel GmbH
◆ Eppendorfgefäße: 1,5 /2 ml	Eppendorf AG
◆ Reaktionsgefäße: 15 mL und 50 mL	Fisher Scientific GmbH
◆ Injektionsflaschen 100 mL mit Butylstopfen und Bördelkappen	Glasgerätebau Ochs e.K.
◆ Kulturröhrchen nach Hungate 16x125 mm	Glasgerätebau Ochs e.K.
◆ Vials, braun, Rollrand (11,6x32 mm) mit Bördelkappen und Mikroinserten 250 µL	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG
◆ Schutzhandschuhe bei Arbeiten mit Methylquecksilber Silver Shield® Gloves	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

*Firmenstandorte: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland; Glasgerätebau Ochs e.K., Bovenden, Deutschland; MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Steinheim, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/ Deutschland;

2.3. Chemikalien

In der nachfolgenden Tab. 7 sind die Chemikalien und Gase aufgelistet, die für die Versuchsdurchführung verwendet wurden.

Tab. 7: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Gase.

Chemikalie	Hersteller*	Reinheit
Acrylamid/Bisacrylamid	SERVA Electrophoresis GmbH	37,5:1/40%
Agarose peqGold	PEQLAB Biotechnologie GMBH	
Ammoniumchlorid	Merck KgaA	p.a.
Ammoniumeisen(III)sulfat- Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	98,5
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Ascorbinsäure, L(+)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	reagent grade
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	p.a.

Chemikalie	Hersteller*	Reinheit
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co KG	99,8%
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KgaA	p.a.
Calcium-D-Pantothenat	Merck KgaA	≥ 98%
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Merck KgaA	p.a.
Cyanocob(III)alamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99%
Diammoniumhydrogencitrat	Merck KgaA	p.a.
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Di-Natriumsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Dinatriumsulfit	Merck KgaA	p.a.
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA	99%
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Merck KGaA	p.a.
Eisessig	Merck KGaA	suprapure
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co KG	reinst.
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA- Na ₂ · H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Folsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	98%
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99,5%
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	HPLC-grade
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG	99%
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	p.a.
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Kupferchlorid-Dihydrat	Merck KGaA	p.a.
Kupfersulfat-Heptahydrat	Merck KGaA	p.a.
L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99%
Liponsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99%
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Mangansulfat-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG	HPLC-grade

Chemikalie	Hersteller*	Reinheit
Methylquecksilber Isotop (²⁰⁰ Hg)	Applied Isotope Technologies	
N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendi- ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natrium-Dithionit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 82%
Natriumformiat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	p.a.
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natriumlactat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	60%
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck KGaA	p.a.
Natriumnitrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Natriumoxalat	Merck KgaA	p.a.
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99%
Natriumsulfid-Nonahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 98%
Natriumtetrapropylborat	ABCR GmbH & Co. KG	99%
Natriumthioglykolat	Merck KgaA	p.a.
Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	≥ 99,5%
Nickelchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	p.a.
Nikotinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 98%
p-Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 99%
Phenylethylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 99%
Pyridoxin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co KG	≥ 99%
Quecksilber(II)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	ultrapure
Referenzmaterial ERM® CE-464 Tuna Fish	IRMM	
Resazurin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	-
Riboflavin	Merck KGaA	≥ 99%
Salpetersäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	69%
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co KG	37%
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	p.a.
Standard-Agarose	Carl Roth GmbH & Co KG	
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	99%

Chemikalie	Hersteller*	Reinheit
Thiamin-Hydrochlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	≥ 99%
Tissue freezing medium (Einbettmedium) Jung	Leica Microsystems GmbH	
Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
TritonX-100	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Wasser	Merck Millipore	MQ
Zinkacetat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG	p.a.
Zinkchlorid	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH	p.a.
Komplexe Ingredienzen	Hersteller*	
Agar-Agar	Hartge Ingredients GmbH & Co. KG	
Fleischextrakt	Merck KGaA	
Hefeextrakt (Typ 900)	Hartge Ingredients GmbH & Co. KG	
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Carl Roth GmbH & Co KG	
Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH & Co KG	
Tryptose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Gase	Hersteller*	
Helium, Argon, Stickstoff	Westfalen AG	
synthetisches Gas H ₂ /CO ₂ (5:95%)	Westfalen AG	

*ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Applied Isotope Technologies, Pittsburgh, USA; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland; Hartge Ingredients GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland; Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland; IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgien; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Merck Millipore, Billerica, MA; PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/ Deutschland; Westfalen AG, Münster, Deutschland

2.4. Biochemikalien, Enzyme und Kits

Tab. 8: Die Biochemikalien, Enzyme und Kits, die für die Versuche eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Hersteller*
♦ DNA – Längenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331	Fermentas GmbH
♦ dNTP – Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH
♦ Magnesiumchlorid – Lösung (3,5 mM)	Peqlab Biotechnologie GmbH
♦ MassRuler™ (6x) Loading Dye Solution	Fermentas GmbH
♦ Oligonukleotide (Primer, 100 µM)	Eurofins MWG GmbH
♦ PCR – Puffer (10x)	Peqlab Biotechnologie GmbH
♦ Taq – Polymerase SAWADY (5U /µl)	Peqlab Biotechnologie GmbH
♦ Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
♦ DNeasy® Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH
♦ QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH

* Firmenstandorte: Eurofins MWG GmbH, Deutschland; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/ Deutschland

2.5. Puffer und Lösungen

Bestimmung von Hg und MeHg

- Für alle analytischen Durchführungen sowie für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde MilliQ Wasser verwendet ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)

- Säurespülen von Gefäßen

Laborutensilien wurden vor dem Gebrauch 24 h in ein Bad mit HCl (1 M) eingelegt und anschließend mit MilliQ Wasser gespült. Salpetersäure (65%), KOH Pellets und Essigsäure (99.7%) waren von analysenreiner Qualität.

Acetatpuffer

Natriumacetat	0,82 g/L
Eisessig	0,60 g/L
pH = 5,6	

KOH in Methanol (25% w/v)

KOH	0,25 g/100 mL
-----	---------------

Derivatisierungsreagenz (2%ig)

Natriumtetrapropylborat 1 g/50 mL

Das Derivatisierungsreagenz wurde in sauerstofffreier Atmosphäre in der COY-Kammer angesetzt, in Reaktionsgefäße (à 15 mL) abgefüllt, fest verschlossen und bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren. Einmal aufgetautes Reagenz wurde verwendet oder entsorgt.

Kupfersulfat/Natriumoxalat-Lösung

Kupfersulfat 0,24 g/10 mL

Natriumoxalat 0,40 g/10 mL

Interner Standard

Für die Bestimmung von MeHg mittels GC-ICP-MS

Thallium in HNO₃ (0,5 M) 1 µg/L

Bestimmung von SulfidLösung 1

0.4 g N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumsulfat

40 mL konz. H₂SO₄

60 mL deion. H₂O

Das Salz wurde in einem Messkolben in der Säure (im Eisbad) gelöst und anschließend wurde deion. H₂O hinzugegeben.

Lösung 2

2 g Ammoniumeisen(III)sulfat-Dodecahydrat: NH₄Fe(SO₄)₂·12 H₂O

98 mL destilliertes H₂O, 2 mL konzentrierte H₂SO₄

Lösung 3

Es wurden gleiche Volumina der Lösungen 1 und 2 gemischt. Das Reagens ist kühl und dunkel aufbewahrt nur wenige Stunden haltbar.

Zinkacetatreagens

4% (w/v) Zinkacetat in 2% (v/v) Essigsäure: 40 g Zinkacetat wurden in 20 mL konz. Essigsäure gelöst und mit 980 mL entgastem deion. H₂O aufgefüllt.

Sulfid – Stammlösung

0.15 g Na₂S · 9 H₂O wurden in 500 mL entgastem deion. H₂O gelöst, die Endkonzentration betrug 1,25 mM und wurde je nach Gebrauch mit deion. H₂O verdünnt.

Präparation der Invertebraten

Steriler Phosphat-Puffer

- | | |
|--|----------|
| 1) Kaliumdihydrogenphosphat | 9,078 g |
| 2) Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | 11,876 g |

Beide Lösungen (1 und 2) werden auf jeweils 1 L mit H₂O aufgefüllt. Um einen pH-Wert von 5,9 zu erreichen, wurden 9,8 mL von Stammlösung 1 vorgelegt und mit Stammlösung 2 auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde vor Verwendung autoklaviert (20 min, 121 °C, 2bar).

Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengen auf 1 L Gesamtvolumen.

Enzymatischer Lyse-Puffer: Für die DNA-Isolation Gram-positiver Zellen

EDTA	0,6 g
TritonX-100	1,2 %
Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan (mit HCl auf pH 8,0)	2,4 g
Lysozym	20 mg

Das Lysozym wurde erst unmittelbar vor der Verwendung hinzugefügt.

1 x TBE-Puffer: Für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese.

Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan	10,8 g
Borsäure	5,5 g
EDTA	7,4 g

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

50 x TAE-Puffer: Für die Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) 1:50 verd.

Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan	242 g
Eisessig	57,1 mL
EDTA (0,5 M)	100 mL

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Lösungen zum Gießen der DGGE-Gele 40% zu 60%

	Lösung A (40%)	Lösung B (60%)
Harnstoff	2,85 g	4,29 g
Formamid	2,72 g	4,08 g
Acrylamid	2,77 mL	2,77 mL
TAE-Puffer 50x	0,34 mL	0,34 mL
H ₂ O	9,60 mL	6,90 mL
Ammoniumpersulfat (1 M)	100 µL	100 µL
Tetramethylethyldiamin	4 µL	4 µL

2.6. Medien

Aerobe Medien

Für die Kontrolle bzw. dem Nachweis von Kontaminationen in den anaeroben Flüssigkulturen wurden diese wiederholt auf Festmedien in Petrischalen ausgestrichen und aerob inkubiert. Dabei wurde das Vollmedium Standard I verwendet. Für die Kultivierung wurde King's und PAE-Medium in Rollrandröhrchen à 7 mL verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle nachfolgenden Angaben auf g/L.

King's Medium

Pepton	20,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,7
K ₂ HPO ₄	1,5
Agar	15,0

Der pH-Wert des fertigen Mediums liegt bei 7,2 ± 0,2

PAE-Medium

Tryptose	10,0
Fleischextrakt	3,0
NaCl	5,0
Phenylethyl Alkohol	2,5
Agar	15,0

Der pH-Wert beträgt 7,1 – 7,5.

Standard I

Pepton	15,0
Hefeextrakt	3,0
NaCl	4,0
Glucose	1,0
Agar	12,0

Der pH-Wert beträgt $7,5 \pm 0,2$.

Die Nährlösungen wurden bei 121 °C und 2bar 20 min autoklaviert. Das autoklavierte Nährmedium mit Agar-Agar wurde auf ca. 60 °C abgekühlt und steril in Petrischalen gegossen. Nach Bedarf wurde für selektives Kultivieren 1 mg/L Hg^{2+} (in Form einer HgCl_2 -Lösung) nach steriler Filtration zugegeben.

Anaerobe Medien

- Entgasen von Wasser

In einer Serumflasche wurde 250 mL Wasser in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach einer Zeit von mind. 5 min sprudelndem Kochen wurde die Serumflasche entnommen, mit einem Butylstopfen und einem Metallring verschlossen. Nachdem die Flasche bei Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie in ein Anaeroben-Zelt eingeschleust (um darin die Abfüllung in Hungates vorzunehmen), wobei vor dem Öffnen des Stopfens mithilfe einer Injektionskanüle ein Druckausgleich vorgenommen werden sollte.

- Kulturerhaltung

Die meisten Medien sind den Vorgaben der DSMZ angelehnt und wurden ggf. modifiziert. Nach Bedarf wurde für selektives Kultivieren 1 mg/L Hg^{2+} (in Form einer HgCl_2 -Lösung) nach steriler Filtration zugegeben. Nachfolgend sind alle Angaben auf g/L bezogen sofern es nicht anders angegeben ist.

- Kulturröhrchen

Für die Anzucht anaerober Kulturen wurden Kulturröhrchen verwendet, die speziell für die Kultivierung anaerober Organismen entwickelt und nach ihrem Erfinder „Hungates“ benannt wurden (Hungate, 1969).

Vitamin- und SpurenelementlösungVitamin-Lösung V-141

Angaben in mg

Biotin	2,0
Folsäure	2,0
Pyridoxine-HCl	10,0
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	5,0
Riboflavin	5,0
Nikotinsäure	5,0
D-Ca-Pantothenat	5,0
Vitamin B ₁₂	0,1
p-Aminobenzoensäure	5,0
Liponsäure	5,0
MilliQ H ₂ O	1000 mL

Spurenelement-Lösung SL-10

Angaben in mg

HCl (25%; 7,7 M)	10 mL
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 g
ZnCl ₂	70,0
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	6,0
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2,0
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24,0
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36,0
MilliQ H ₂ O	990 mL
Zunächst wurde FeCl ₂ in HCl gelöst, mit H ₂ O aufgefüllt und anschließend die anderen Salze darin gelöst. Endvolumen = 1 L.	

Die Vitaminlösung V-141 und Spurenelementlösung SL-10 wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren den Medien zugegeben.

DSMZ Medium 641 MV Medium für die Kultivierung von *Dv. piger*.

NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	2,0
Na-Thiosulfat · 5 H ₂ O	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	0,5
SL-10	1 mL
VL-141	10 mL
Hefeextrakt	1,0
NaHCO ₃	2,0
Na-Lactat	2,5
Resazurin	0,5 mg
Na-Dithionit	10-20 mg/L einer frisch angesetzten Lösung (5% w/v)
Deion. H ₂ O	1000 mL

Alle Ingredienzen bis auf SL-10 und VL-141 werden in Wasser gelöst, für 1 min aufgeköcht und unter sauerstofffreier Atmosphäre abgekühlt, anschließend mit N₂ begast, in Hungates abgefüllt, verschlossen und autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden nach steriler Filtration zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,0 bis 7,2 eingestellt.

DSMZ Medium 866: Zur Kultivierung von *Dtm. alkaliphilum*.

KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1
KCl	0,2
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ CO ₃	0,5
NaHCO ₃	8,0
Na ₂ SO ₄	5,0
NaCl	5,0
Na ₂ S · 9 H ₂ O	0,5
Hefeextrakt	1,5
Na-Formiat	5,0
VL-141	10 mL
SL-10	1 mL

Das Medium wurde mit deion. entgasten H₂O auf 1000 mL aufgefüllt und anaerob unter N₂ Atmosphäre hergestellt. Die Ingredienzen (außer Bicarbonat und Sulfid) wurden in Wasser gelöst, das Medium aufgekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt, in Hungates abgefüllt, mit 100% N₂ begast und autoklaviert. Der pH-Wert wurde auf 8,7-9,0 eingestellt.

DSMZ Medium 63: Für die Kultivierung verschiedener SRB sowie die Isolierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt von Rosenkäfern oder Kompostwürmern.

Lösung A

K ₂ HPO ₄	0,5
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1
DL-Na-Lactat ¹	2,0
Hefeextrakt	2,0
Resazurin	1,0 mg
Deion. Wasser	980 mL

Lösung B

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
Deion. Wasser	10 mL

Lösung C

Na-thioglycolat	0,1
Ascorbinsäure	0,1
Deion. Wasser	10 mL

¹Je nach Versuchsansatz wurde das Lactat durch Pyruvat oder Na-Acetat (4g/L) ersetzt.

Das Medium wurde als Vollmedium zur Kulturerhaltung verwendet. Für die Untersuchung auf die MeHg Produktion wurde ein synthetisches Medium mit 10 mL VL-141 und 2 mL SL-10 anstelle von Hefeextrakt verwendet.

Die Lösung A wurde im Exsikkator 20 min entgast. Anschließend wurden Lösung B und C hinzugefügt und der pH-Wert auf 7,8 eingestellt (mit NaOH). Das Medium wurde erneut für 10 min entgast und anschließend in sauerstofffreier Atmosphäre in Hungates überführt. Vor dem Autoklavieren erfolgte zusätzlich eine Entgasung der Medien und eine Begasung mit N₂ oder einem synthetischen Gas H₂/CO₂ (5:95%).

Für die Isolierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* mit dem Ziel quecksilberresistente sowie Hg(II)-methylierende Bakterien zu finden, wurde nach Bedarf 1 ppm Hg(II) in Form von HgCl₂ zugefügt.

DSMZ Medium 410

Dieses Medium entspricht dem DSMZ Medium 63 mit einer Zugabe von 10 g/L NaCl.

DSMZ Medium 193: Zur Kultivierung von *Desulfobacter propionicus*.

<u>Lösung A</u>		<u>Lösung C</u>	
Na ₂ SO ₄	3,0	NaHCO ₃	5,0
KH ₂ HPO ₄	0,2	H ₂ O	100 mL
NH ₄ Cl	0,3		
NaCl	7,0	<u>Lösung D</u>	
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1,3	Na-Acetat · 3 H ₂ O	2,5
KCl	0,5	H ₂ O	10 mL
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,15		
Resazurin	1,0 mg	<u>Lösung E</u>	
Deion. Wasser	870 mL	VL-141	10 mL
<u>Lösung B</u>		<u>Lösung F</u>	
SL-10	1 mL	Na ₂ S · 9 H ₂ O	0,4
		H ₂ O	10 mL

Lösung A für einige Minuten kochen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen, mit 80% N₂/20% CO₂ begasen, bis pH=6 erreicht ist. Die Lösungen A, D, und F wurden separat autoklaviert, während B, C und E steril filtriert und mit dem gleichen Gasgemisch gespült wurden. Finaler pH-Wert=7,1 - 7,4. Die Zugabe von 10 - 20 mg Na-Dithionit (aus einer 5%igen steril filtrierten Lösung) ist empfehlenswert.

Assay zur mikrobiellen Methylierung von Hg²⁺

Für die Untersuchung zur Bildung von MeHg wurden ausschließlich synthetische Medien für Sulfat-reduzierende Bakterien (MSRB) verwendet, die an die oben erläuterten Medien angelehnt sind. Die Medien besitzen den gleichen pH-Wert wie die korrespondierenden Medien und wurden ebenfalls anaerob hergestellt. Die Angaben beziehen sich auf g/L.

Medium MSRB1 (ersetzt DSM 63)

<u>Lösung A</u>		<u>Lösung B</u>	
K ₂ HPO ₄	0,5	Na-thioglycolat	0,1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	Ascorbinsäure	0,1
NH ₄ Cl	1,0	Deion. Wasser	9 mL
Na ₂ SO ₄	1,0		
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1	<u>Lösung C</u>	
DL-Na-Lactat ¹	2,0	VL-141	10 mL
Deion. Wasser	980 mL	SL-10	1 mL
		Cystein	121,16 mg

Die Lösung C wurde steril filtriert nach dem Autoklavieren zugegeben. pH-Wert = 7,2.

Medium MSRB2 (ersetzt DSM 193) enthielt zusätzlich 4,0 g/L NaHCO₃ und **MSRB3** (ersetzt DSM 410) 10 g/L NaCl.

Medium SRDTM (ersetzt DSM 866)

KH ₂ PO ₄	0,1	Na ₂ SO ₄	5,0
MgCl ₂ · 7 H ₂ O	0,2	NaCl	5,0
KCl	0,1	Na ₂ S · 9 H ₂ O	0,5
NH ₄ Cl	1,0	VS-141	10 mL
Na ₂ CO ₃	0,5	SL-10	1 mL
NaHCO ₃	8,0	Na-Formiat	5,0 mL

Der pH-Wert wurde auf 8.7 eingestellt.

Die Herstellung der Medien erfolgte anaerob. Dabei wurden die Bestandteile eingewogen, in kochendem Wasser gelöst und in einer Serumflasche gasdicht verschlossen. Das Abkühlen erfolgte in einer sauerstofffreien Atmosphäre in einer COY Kammer, in dem auch die Abfüllung des Mediums in 15 mL Hungates (je 7 mL) vorgenommen wurde. Nach dem dem Autoklavieren der Medien (121 °C, 20 min), wurden Filter-sterilisierte (0,2 µm Porengröße) Lösungen (z.B. V-141, SL-10, HgCl₂ Lösung) zugegeben. Die Hungates wurden mit Butylstopfen und Bördelkappe fest verschlossen.

2.7. Invertebraten

Die Kompostwürmer *E. foetida* wurden aus einer bereits bestehenden Kultur des IMW der Johannes Gutenberg-Universität (JGU) Mainz entnommen. Die Rosenkäfer *Pachnoda savignyi* (*P. savignyi*) wurden vom Frankfurter Zoo für eine Zucht zur Verfügung gestellt.

Kultivierung

Die Kultivierung des Kompostwurmes *E. foetida* erfolgte in großen, mit Erde gefüllten Boxen, deren Böden mit Löchern versehen waren, um Staunässe zu verhindern. Die Erde wurde von dem Botanischen Garten der Universität Mainz zur Verfügung gestellt und stammte aus dem oberen Bodenhorizont (0-15 cm). Dieser Boden wurde einer Bodencharakterisierung unterzogen (siehe 2.8 Erdbodenproben: *Charakterisierung und Analyse*). Das Substrat wurde leicht feucht gehalten, mit Wasser gespültes Gras und Salat wurden regelmäßig untergemischt und die Tiere wurden bei ca. 20 °C erhalten und kultiviert.

Die Kultivierung der Rosenkäfer *P. savignyi* erfolgte in einem Insektarium aus Plexiglas mit einem engmaschigen Drahtgitter als Deckel. Als Substrat wurden ca. 10 cm hoch Erde eingefüllt und mit einer großzügigen Auflage aus Gras, Blättern, kleinen Ästen belegt. Wöchentlich wurde ein Stück Frucht (Banane, Apfel oder Orange) gefüttert, in dem kleine Stücke direkt auf die Erde aufgelegt wurden, so dass auch die Engerlinge die Nahrung aus dem Boden verzehren konnten. Das Material wurde regelmäßig leicht befeuchtet und in einen Raum mit 20 °C Umgebungstemperatur belassen.

Präparation

Um Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt zu isolieren, wurden die Präparationen der Kompostwürmer *E. foetida* und Rosenkäfer *P. savignyi* wie folgt durchgeführt: Anaerobe Anreicherungskulturen wurden unter sauerstofffreier Atmosphäre in einer COY-Kammer gewonnen. Die durch eine Mischung von 70%igen Isopropanol und 1%iger Perchlorsäure abgetöteten Tiere wurden dekapitiert und für ca. 30 s in 70%iges Ethanol getaucht und in sterilem Wasser gewaschen, um die bakterielle Mikrobiota auf der Körperoberfläche abzutöten. Die Präparation wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen durchgeführt. Um Darmepithel zu gewinnen, wurde der Wurm mit einem Skalpell längs aufgetrennt, der Darminhalt mit sterilem Wasser ausgespült und mit einer Pinzette Epithel herausgezupft. Sowohl der Darminhalt als auch das Epithel wurden sofort in sterilem

Phosphatpuffer (10 mM, pH=5,9) in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß aufgenommen. Dies diente zur weiteren Beimpfung von verschiedenen Medien.

Die Isolierung von aeroben bakteriellen Kulturen erfolgte auf Agar-haltigen Petrischalen, indem die Inokulierung mithilfe der 3-Strich-Technik durchgeführt und bei 23 °C bebrütet wurde, bis sichtbare Kolonien erkennbar waren. Einzelne Kolonien wurden gepickt und wiederholt dieser Ausstrich-Technik unterzogen, mind. aber viermal und solange bis eine mikroskopisch homogene Zellmorphologie erkennbar war. Für die flüssigen anaeroben Kulturen wurden Agar-Shake-Verdünnungsmethoden angewendet wie sie von Dröge et al. (2005), Fröhlich et al. (1999) und Kuhnigk et al. (1996) beschrieben worden sind. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C.

Lokalisation von Hg im Gewebe von *E. foetida*

Für diese Versuchsdurchführung wurden geschlechtsreife adulte Individuen verwendet, deren Clitellum bereits sichtbar war. Ein Aliquot von 800 g luftgetrockneter Erde pro Glasgefäß (r = 20 cm) wurde mit 200 mL Filter-sterilisierter HgCl₂ Lösung sorgfältig gemischt (Endkonzentration an Hg (II) betrug 6 mg/kg luftgetrocknete Erde). Die Kontrolle enthielt MilliQ Wasser anstelle von HgCl₂-Lösung. Sechs Würmer wurden in ein Gefäß zur Inkubation bei 20 °C gesetzt. Nach einer Dauer von 10 Tagen wurden die Tiere aus der Erde genommen, mit Wasser abgespült und für 48 h in ein Becherglas mit feuchter Watte überführt. Die Oligochaeten wurden auf Eis gekühlt bevor sie auf Trockeneis gefroren wurden. Anschließend wurden sie in drei Teile geteilt und mithilfe von Tissue Tec auf Trockeneis in kleine Kunststoffgefäße überführt (1,5 x 1,5 x 2 cm). Dabei wurde der Wurm vertikal im Tissue Tec eingefroren und konnte in dieser Form bei -70 °C aufbewahrt werden.

Die Anfertigung von Gewebsdünnschnitten erfolgte im Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beat Lutz. mithilfe eines Kryostats (Abb. 6) wurden die gefrorenen Präparate bei -20 °C auf eine Schnittdicke von 18 µm gebracht. Dabei wurde in der Transversalebene geschnitten, wobei ein ca. 1,5 cm langes Gewebestück der mittleren Sektion für die Anfertigung von Dünnschnitten diente, indem es vertikal auf eine Halterung mit glycerinhaltigem „Tissue Tec“ eingebettet, bei -20 °C gefroren und sofort geschnitten wurde.

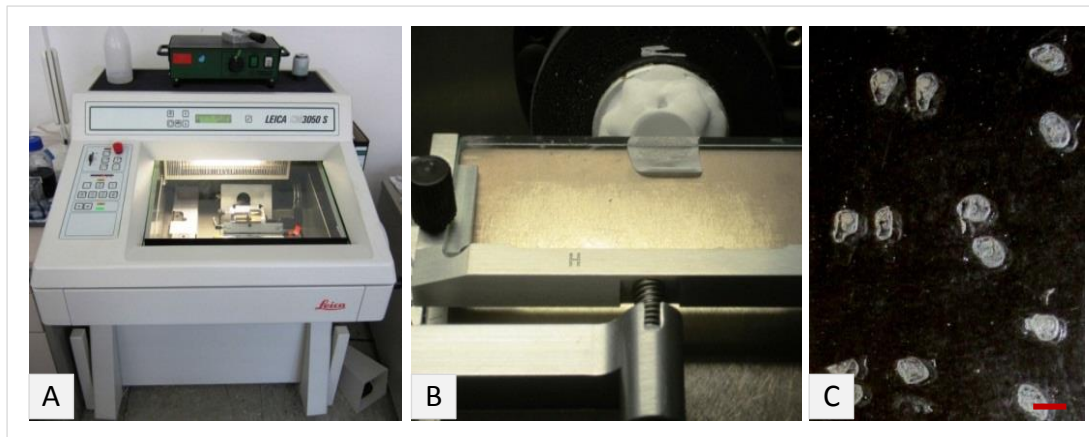


Abb. 6: Zur Anfertigung histologischer Gefrierschnitte wurde ein Kryotom (A) verwendet. Das zu untersuchende Material wurde in Gefriermedium „Tissue Tec“ eingebettet, geschnitten (B) und auf spezielle Objektträger aufgelegt (C); Skala = 0,25 cm.

2.8. Erdbodenproben: Charakterisierung und Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Erdboden sowohl für die Kultivierung als auch für die Akkumulation von Hg im Gewebe von *E. foetida* verwendet. Die Akkumulationsversuche gingen den Versuchen zur Lokalisation von Hg mittels Laserablations-Massenspektrometrie voraus. Um Kontaminationen zu erkennen, wurde von diesen Bodenproben die Bestimmung von Schwermetallen im Erdboden durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte im Landesamt für Geologie und Bergbau Rheinland Pfalz (Germany) mittels ICP-MS und Flow Injection Mercury System (Perkin Elmer) nach Aufschluss mit Königswasser (konz. Salpetersäure und konz. Salzsäure im Verhältnis 1:3) unter Berücksichtigung der DIN ISO 11466. Die Charakterisierung des Bodens wurde im Institut für Geographie der Universität Mainz unter der Leitung von Herrn Kurt Emde durchgeführt. Die in diesem Rahmen angewendeten Methoden sind Lehrbüchern der Geographie zu entnehmen (z.B. Blume et al., 2011) oder dem Skript für das „Geomorphologisch-bodenkundliche Laborpraktikum“ von Emde et al. (2000).

2.9. Desulfovibrin-Nachweis

Die Gattung *Desulfovibrio* produziert eine einzigartige, membrangebundene dissimilatorische Sulfitreduktase, Desulfovibrin (Brock et al., 2000). Der Nachweis des Enzyms ist daher ein Hinweis auf das Vorhandensein der Gattung *Desulfovibrio*. Methodisch wurde ein Test nach Postgate durchgeführt (Postgate 1959/ 1979). Die Reinkulturen der

Desulfovibrio-Stämme (Tab. 4, siehe 2.1. *Mikroorganismen*) dienten dabei als Positivkontrolle. Es wurden 7 mL bakterielle Kultur zentrifugiert, in 1 mL H₂O resuspendiert und ein Tropfen einer 20%igen NaOH hinzugefügt. Eine rote Fluoreszenz bei 365 nm deutet auf die Präsenz von Desulfovirdin hin.

2.10. Sulfidbestimmung

Die Sulfidbestimmung erfolgte nach dem Prinzip der Methylenblaumethode und wurde von Gilboa-Garber (1971) detailliert beschrieben. In diesem Nachweis wird die Gesamtmenge an Sulfid in Form von gelöstem Sulfid, Schwefelwasserstoff (H₂S), Hydrogensulfidionen (HS⁻), Sulfidionen S²⁻ sowie ungelöstem Sulfid bestimmt. In Anwesenheit von N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (I) reagiert Sulfid nach Bildung der Zwischenverbindung 3-Mercapto-N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (II) zum farblosen Leukomethylenblau (III). Durch die Zugabe von Fe³⁺ wird Methylenblau (IV) oxidiert und es erfolgt die Absorptionsmessung bei 665 nm. Ein zweites Absorptionsmaximum von Methylenblau liegt bei 620 nm vor und kann ebenfalls für die photometrische Kalibrierung herangezogen werden. Die Bearbeitung von vielen Einzelproben sowie die photometrische Messung ist besonders effektiv bei Einsatz von 96-Well Titerplatten und wurde wie folgt ausgeführt: Es wurden 40 µL Zinkacetatlösung vorgelegt und 40 µL der Probe hinzugegeben. Anschließend wurde 120 µL entgastes H₂O pipettiert und nach Zugabe von 40 µL Lösung 3 die Reaktion gestartet. Nach genau 20 min Reaktionszeit wurde die Absorption der Mikrotiterplatte bei 620 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. In jeder Mikrotiterplatte wurden zwei Kalibrierreihen und Negativ-Kontrollen in den Wells 1A bis 12A mitgeführt (Abb. 7).

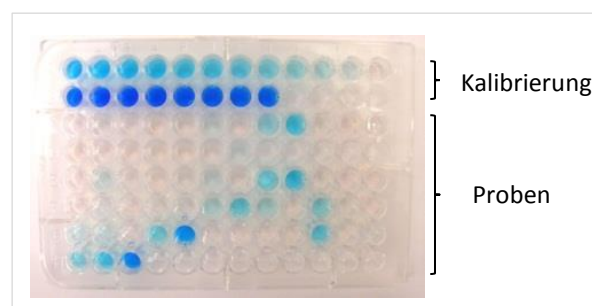


Abb. 7: Sulfidbestimmung in Mikrotiterplatten nach dem Prinzip der Methylenblaumethode.

2.11. Methylierung von Hg (II) durch Umweltproben

Es ist bekannt, dass im Gewebe von *E. foetida* MeHg angereichert wird, wenn die Kompostwürmer mehrere Tage in Erdboden inkubiert wurden, der mit anorganischen Hg versetzt ist (Burton et al., 2006; Knopf, 2010). Es ist anzunehmen, dass intestinale Mikroorganismen an dem Prozess der Methylierung von Hg^{2+} beteiligt sind, da bereits eine Mischkultur aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* isoliert wurde, die in der Lage war, MeHg aus Hg^{2+} zu produzieren (Knopf, 2010).

Um die Hypothese zu fundieren, dass an dem Prozess der Methylierung von Hg und der daraus folgenden Bioakkumulation im Wurmgewebe prinzipiell intestinale Mikroorganismen beteiligt sein können, wurde folgender Versuch durchgeführt: Das Medium SRB1 in Hungates (à 7 mL) wurde je 3 dreimal mit drei Proben inkubiert: Zum einen mit Bodenpartikeln, mit einem Stück Darmepithel sowie direkt mit dem Vomitus von *E. foetida*. Die Medienkontrollen blieben unbeimpft, um eine mögliche abiotische MeHg-Bildung zu detektieren. Die Proben wurden 7 Tage bei 23 °C anaerob inkubiert und nach dieser Zeit wurde der Überstand der je dreifach angesetzten Proben nach anaerober Zentrifugation (20 min, 4 °C, 4000 rpm) gesammelt, in ein Hungate mit 7 mL SRB1-Medium überführt, mit HgCl_2 versetzt (Hg^{2+} Konzentration betrug 0,1 mg/L) und anaerob 12 h bei 23 °C im Dunkeln inkubiert.

2.12. Methylierung von Hg (II) durch Mikroorganismen

Für die Untersuchung der Produktion von MeHg durch Reinkulturen und Anreicherungskulturen der SRB sowie Umweltproben wurde wie folgt vorgegangen: Die Inokulation der Medien in anaerobe Kulturröhrchen bzw. Hungates, erfolgte mit korrespondierenden Vorkulturen (5% v/v). Nicht inokulierte Kulturmedien wurden als Kontrollproben verwendet und unter den gleichen Bedingungen mitgeführt, um auftretende abiotische Methylierung von Hg zu detektieren. Die verwendeten Sulfat-reduzierenden Rein- und Anreicherungskulturen sind in Tab. 9 zusammengefasst. Die Referenzstämme der SRB in Reinkulturen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen oder stammten aus der Kultursammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW, Mainz).

Tab. 9: Sulfat-reduzierenden Bakterien und Anreicherungskulturen, die in einem Screening auf die Produktion von MeHg aus anorganischem Hg²⁺ getestet wurden.

Mikroorganismen	Stamm	Wachstum [°C]	Medien ¹	Herkunft
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Lindhorst (1pr3)	37	SRB2	DSM 2032 ^T
<i>Desulfotomaculum alkaliphilum</i>	S1	50	SRDTM	DSM 12257 ^T
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	DL	37	SRB1	DSM 2154 ^T
<i>Desulfovibrio giganteus</i>	STg	37	SRB3	DSM 4370
<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	KMS2	30	SRB1	DSM 11275 ^T
<i>Desulfovibrio piger</i>	VPI C3-23	37	SRB2	DSM 749 ^T
<i>Desulfovibrio</i> sp.	G11	37	SRB2	DSM 7057
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	HI1	35	SRB1	DSM 5308 ^T
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	KSS1	30	SRB1	DSM 11274
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	KH1	37	SRB1	IMW
<i>Desulfovibrio</i> sp.	KMS2/1	37	SRB1	IMW
Anreicherungskultur	EF4	37	SRB1	diese Arbeit
Anreicherungskultur	PS1	37	SRB1	diese Arbeit
Anreicherungskultur	Zy1	37	SRB1	IMW

¹Die zur Kulturerhaltung korrespondierenden Medien sind in Kap. 2.6. *Medien* aufgeführt, ^TTypstamm.

Für die MeHg-Bestimmung wurde jede Kultur dreifach in Hungates angesetzt und die Inkubation erfolgte individuell bei der jeweils optimalen Wachstumstemperatur (Tab. 9). Das Wachstum wurde verfolgt, indem die optische Dichte der Kulturen in den Hungates bei 600 nm im Abstand von einigen Stunden aufgenommen wurde. Während der exponentiellen Phase wurde die HgCl₂-Lösung zu den Kulturen gegeben, so dass eine Konzentration von 0,1 mg Hg²⁺/L vorlag. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 12 h im Dunklen inkubiert.

Für die Probenvorbereitung und die Analysen wurden jeweils 5 mL jeder Probe für die MeHg-Extraktion entnommen, während 1 mL jeder Probe bei -20 °C eingefroren wurde, um spätere Zellzählungen und Sulfid-Messungen durchzuführen. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer für Bakterien (0,02 mm Tiefe). Die Sulfid-Konzentration des Mediums wurde nach einer Methode von Bridou et al. (2011) bestimmt, wobei Mikrotiterplatten für geringe Volumen eingesetzt wurden (Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200 µL). Um Verluste oder Transformationen von MeHg im bakteriellen Medium nach der 12stündigen Inkubation der bakteriellen Proben mit anorganischem Hg im Medium auszuschließen, wurden die Proben sofort bei -70 °C eingefroren oder direkt für die alkalische Extraktion eingesetzt. Der Zeitpunkt der Extraktion von MeHg für die Probenanalyse wurde so gewählt, dass er nicht länger als 48 h nach dem Abstoppen der Inkubation lag. Als Ausgangsmaterial für die Extraktion wurden exakt 5 mL in Reaktionsgefäße (50 mL) abgefüllt und mithilfe einer Präzisionswaage gewogen.

Die Spezies *Db. propionicus* Stamm 1pr3 (DSM 2032) wurde häufig als Modellorganismus für die Untersuchung der Methylierung von Hg verwendet (Benoit et al., 2001a/ 2001b; Mehrotra et al., 2003). Daher wurde diese Kultur im Rahmen dieser Arbeit als Positiv-Kontrolle herangezogen. Außerdem wurden drei Sulfat-reduzierende intestinale Anreicherungskulturen auf die Produktion von MeHg getestet. Die Kultur Zy1 ist eine Anreicherungskultur aus dem Intestinaltrakt von einer bisher nicht näher identifizierten Zygoptera-Larve aus dem IMW Mainz. Zwei weitere anaerobe Anreicherungskulturen der SRB wurden während der Arbeit aus dem Intestinaltrakt des Kompostwurmes *E. foetida* (EF4), sowie des Rosenkäfers *P. savignyi* (PS1) erhalten, indem Anreicherungsverfahren wie die serielle oder Agar-Shake-Verdünnungsmethode nach Dröge et al. (2005) und Kuhnigk et al. (1996) durchgeführt wurden.

2.13. Identifizierung von Mikroorganismen

Die Identifizierung sowie die phylogenetische Analyse der bakteriellen Isolate wurden durch den Vergleich der 16S rRNA vorgenommen (Tringe und Hugenholtz, 2008). Dafür wurde die Gesamt-DNA einer Kultur gewonnen und konservierte Regionen der 16S rRNA mithilfe der PCR amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Analyse wurden nach Bedarf einige Proben sequenziert.

2.13.1. Nukleinsäure-Isolation

Die Extraktion der DNA aus bakteriellen Flüssigkulturen und Erdbodenproben wurde mithilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass nach dem lytischen Aufschluss der Zellen der pH-Wert des Puffers so eingestellt wird, dass die DNA negativ geladen vorliegt und an eine Silika-Membran in einem Zentrifugenröhrchen bindet. Nach einigen Waschvorgängen wird die DNA mittels eines salzhaltigen Puffers durch Zentrifugation eluiert. Der Vorgang wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und das finale Endvolumen des Elutionspuffers betrug 100 µL. Für die Zellyse wurde jeweils das Pellet einer bei 8000 rpm (6000 g), 5 min abzentrifugierten Kultur (1 mL) eingesetzt. Kulturen mit hohem Gehalt an ausgefälltem Sulfid wurden vor diesem Zentrifugationsschritt kurz anzentrifugiert, so dass die obere Phase mit weniger Partikeln in ein Eppendorfgefäß (1,5 mL) überführt werden konnte.

2.13.2. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder zur Kontrolle nach DNA-Extraktionen sowie der PCR angewendet. Je nach der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 1 bis 2,5%ige Agarosegele in 1 x TBE-Puffer hergestellt. Die Elektrophorese wurde mit 70 bis 90 V für 30 bis 60 min (je nach Gelgröße) betrieben und anschließend 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (100 µg/L) gefärbt. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren (im Abstand von ca. 10 bp) in die DNA, wodurch sich die Fluoreszenz nach Anregung im UV-Licht deutlich erhöht und Nukleinsäurebanden sichtbar werden. Mittels einer Geldokumentationseinheit wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und anschließend ausgewertet.

2.13.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Identifizierung von Prokaryoten, Verwandtschaftsanalysen sowie die Erstellung phylogenetischer Stammbäume werden meistens durch die Analyse der ribosomalen Gene durchgeführt. Dabei kommt der Sequenzierung der small subunit (SSU) ribosomalen Gensequenz (16S rDNA bei Prokaryoten bzw. 18S rDNA bei Eukaryoten) eine große Bedeutung zu (Tringe und Hugenholtz, 2008). Diese besitzt hoch konservierte Bereiche am 5' und 3'-Ende, die als Zielsequenz für Primer dienen. Die Erstellung von Amplifikaten des 16S rRNA Gens erfolgte mithilfe der Polymerase Chain Reaction, PCR (Mullis, 1986) mit konservierten Primern (Tab. 10) und der Taq-Polymerase, die während der PCR-Reaktion das komplementäre Fragment repliziert.

Tab. 10: Übersicht über die verwendeten Primer und deren wichtigsten Eigenschaften.

Primer ¹	Sequenz 5' - 3'	bp	T _m [°C] ²	Bindestelle 16S rDNA <i>Escherichia coli</i>
Eub5f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CT-3'	17	53,0	8-25
Eub519f	5'-CAG CAG CCG CGG TAA TA-3'	17	60,0	519-533
Eub1070r	5'-AGC TGA CGA CAG CCA T-3'	16	56,9	1055-1070
Eub338f	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AG-3'	17	62,4	338-354
Eub1392r	5'-CCA CGG GCG GTG TGT AC-3'	17	60,0	1392-1409
GC-Klammer ³	5'-C GCC CGC CGC GCC CCG CGC CCG GCC CGC CGC GGC CGC CCC -3'	40		

¹Primer-Bezeichnung: Forward: f und reverse: r. ²Mittlere Schmelztemperaturen laut Herstellerangaben.

³Verwendung von Primern mit GC-Klammer (am 5'-Ende eines Oligonukleotiden pro Primerpaar) für die DGGE.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit dem Reaktionsansatz (Tab. 11) nach der DNA-Extraktion gemäß einer Touch-Down-PCR (Tab. 12).

Tab. 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR.

Reaktionsansatz	Volumen [µL]
Primer (<i>reverse</i>) (10 µM)	1
Primer (<i>forward</i>) (10 µM)	1
dNTP-Mix (40 mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	2
PCR-Puffer (10 x)	5
Wasser	36
Taq-DNA-Polymerase (1 Unit/µl)	2
DNA	2

Tab. 12: Parameter für die Touch-Down PCR zur Amplifikation der 16S rDNA.

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	10
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing*	60	1
Temperaturrampe: 0,5 °C pro Zyklus			
4	Elongation	72	1
15 Zyklen beginnend bei Nr. 2			
5	Denaturierung	94	1
6	Annealing	56	1
7	Elongation	72	1
15 Zyklen beginnend bei Nr. 5			
8	Finale Elongation	72	10

* Je nach verwendetem Primerpaar kann die Annealingtemperatur optimiert werden.

Nach der Amplifikation wurden jeweils 5 µL des PCR-Produktes mittels der Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Größenmarkers analysiert. Anschließend wurden die Proben für den Einsatz in der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) oder für die Auftragssequenzierung vorbereitet.

2.13.4. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die DGGE ist eine häufig angewandte molekularbiologische Methode zur Untersuchung der Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften und zum Monitoring von Populationsdynamiken (Muyzer, 1999). Es erlaubt die Identifizierung von Mutationen oder DNA-Polymorphismen innerhalb von Nukleotidsequenzen gleicher Länge. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip einer reduzierten elektrophoretischen Mobilität partiell geschmolzener doppelsträngiger DNA Moleküle. Diese wandern in einem linearen Gradienten eines denaturierenden Polyacrylamidgels. Nach Erreichen einer bestimmten Harnstoffkonzentration im Gel trennt sich die DNA in einzelne Stränge, wodurch die Laufgeschwindigkeit stark eingeschränkt wird. Theoretisch repräsentieren die resultierenden Banden z.B. einzelne Bakterienspezies innerhalb einer Mischkultur. Die Methode ist so sensitiv, dass auch Punktmutationen, die zu veränderten Schmelzdomänen innerhalb der DNA führen, durch verlangsamte Wanderung detektiert werden können (Geets et al., 2006).

Der denaturierende Gradient im Gel wird hergestellt, indem zwei verschiedene Konzentrationen an Harnstoff und Formamid in je zwei Lösungen zu einem Gel gegossen werden. In dieser Arbeit wurde ein Gradient von 60% zu 40% eingesetzt. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 70 V durchgeführt und im Anschluss wurde das Gel im Ethidiumbromidbad (0,2%) gefärbt. Distinkte sichtbare Banden konnten in der Geldokumentationseinheit unter Berücksichtigung der Sicherheitsvorschriften mithilfe eines sterilen Skalpells ausgeschnitten und in 50 µL steril-filtrierten, autoklavierten sowie UV-bestrahltem Wasser über Nacht in sterilen 1,5 mL Eppendorfgläsern eluiert werden. Diese eluierten Nukleotidsequenzen können als Ausgangsmaterial für eine Sequenzierung verwendet werden. Eine Besonderheit für die Erzeugung von Amplifikaten mittels PCR, die für die DGGE eingesetzt wurden, ist die Verwendung eines Primers mit einer GC-Klammer.

2.13.5. Erstellung phylogenetischer Stammbäume nach 16S rRNA Analyse

Bevor die Proben sequenziert wurden, war es zweckmäßig diese aufzureinigen, da nach Anwendung der PCR im Reaktionsansatz Reste von Primern, Taq-Polymerase und Nukleotide vorhanden sind. Dafür wurde das Kit „QIAquick® PCR Purifikation“ verwendet und die Nukleotidsequenzen wurden in 30 µL Elutionspuffer aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger (Sanger et al., 1977) und wurde in Auftragsarbeit von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Das Alignment wurde mittels dem Tool „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool), einem schnellen Algorithmus zur Identifizierung ähnlicher, potentiell homologer Sequenzen, durchgeführt. Diese Anwendung wird von verschiedenen Datenbanken zur Verfügung gestellt. Eine der drei größten international kooperierende Datenbank ist die GenBank des NIH (National Institute of Health) in den USA, die vom NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwaltet wird und über die Homepage www.ncbi.nlm.nih.gov zur Verfügung steht. Zudem wurde für die Auswertung die Seite des „Ribosomal Database Project“ (RDP: <http://rdp.cme.msu.edu/>) genutzt, die auf eine Initiative der Universität in Illinois zurück zu führen ist und einen Fokus auf die Sammlung ribosomaler Sequenzen gesetzt hat. In dieser Arbeit werden für die Referenz-Nukleotidsequenzen die Akzessionsnummern angegeben, die für Sequenzeinträge einmalig vergeben werden und eindeutig mit einer Nukleotidsequenz verknüpft sind. Die manuelle Analyse von Nukleotidsequenzen sowie die Erstellung phylogenetischer Stammbäume wurde mithilfe der Software „CLC Sequence Viewer“ durchgeführt, die auf einer anwenderfreundlichen

Oberfläche die Erstellung und Editierung von Alignments, die Generierung von phylogenetischen Stammbäumen, DNA/Protein Translationen sowie die Auswertung in ansprechenden graphischen Ausgaben ermöglicht. Die Erstellung phylogenetischer ultrametrischer Stammbäume erfolgte nach multiplen Alignment auf Basis einer Distanzmatrix mithilfe des Neighbor Joining Prinzips. Im Gegensatz zu dem wohl ältesten Algorithmus der Phylogenetik, dem UPGMA-Algorithmus (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means), wird der Neighbor Joining Algorithmus am häufigsten zur Erstellung von Clustern verwendet und berücksichtigt nicht nur die Distanz der zu verbindenden Clustern, sondern auch die Distanz zu allen anderen Clustern (Studier und Keppler, 1988; Knoop und Müller, 2009).

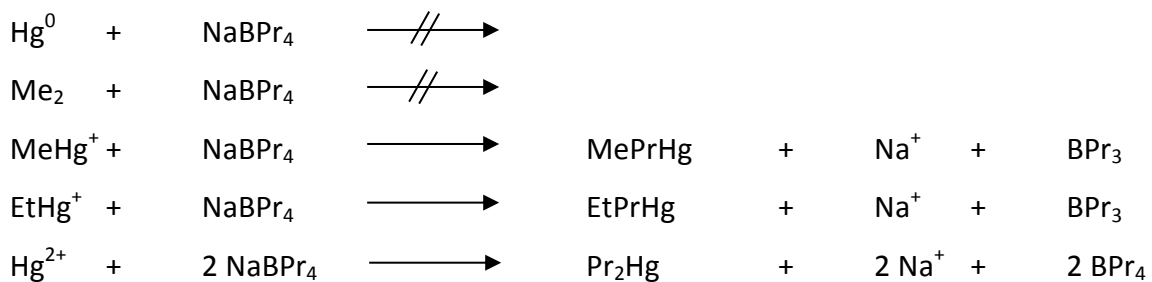
2.14. Analytik: Bestimmung von MeHg

Für die Bestimmung von MeHg in mikrobiellen Flüssigkulturen muss der Analyt während der Probenvorbereitung in eine geeignete und stabile Form überführt werden. Da der Analyt nicht nur in seiner Gesamtkonzentration, sondern auch die seiner Spezies bestimmt werden sollte, war es unumgänglich, ein Kopplungssystem mit vorgeschaltetem Trennungsgang zu applizieren. Dazu wurde die Probe derivatisiert, nachdem sie einer alkalischen Extraktion unterzogen wurde. Dabei wurde die Isotopenverdünnungsmethode angewendet, während die Bestimmung von MeHg massenspektrometrisch erfolgte.

2.14.1. Extraktion und Derivatisierung

Die erste Voraussetzung für die Bestimmung von Hg mittels Massenspektrometrie (MS), Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder Atomfluoreszenzspektrometrie (AFS) ist der vollständige und verlustfreie Aufschluss der Probe, sodass Hg in gelöster Ionenform vorliegt. Für Wasserproben mit wenig Matrix eignet sich die Anwendung der DIN EN 13506 (Issaro et al., 2009), wobei eine salzsaure Probe mit Bromid/Bromat versetzt wird und entstehendes Bromchlorid das Hg von den Partikeln löst. Andere Proben, wie z.B. Abwasserproben oder die in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Flüssigmedien enthalten oftmals Sulfide, die Hg in Komplexen stark binden und nur mittels Salpetersäure oder KOH in MeOH sowie H_2SO_4 unter Hitzeeinwirkung gelöst werden können (Puk und Weber, 1994; Leermakers et al., 2005). Für schwierige und sehr komplexe Matrices wie z.B. Erdbodenproben eignet sich der Königswasser- und Mikrowellenaufschluss (Hintelmann und Nguyen, 2005). Die in dieser

Arbeit verwendete Methode zur alkalischen Extraktion von MeHg aus flüssigen bakteriellen Nährmedien ist angelehnt an die Methode von Yang et al. (2009) und Monperrus et al. (2004). Die Isotopenverdünnungsmethode wurde ebenfalls eingesetzt, wobei das Prinzip in Kap. 2.14.2 *Das Prinzip der Isotopenverdünnungsmethode* beschrieben ist. Die Derivatisierung wurde durchgeführt, um die unterschiedlichen Quecksilberspezies in den flüssigen Proben einer gaschromatographischen Trennung zugänglich zu machen. Prinzipiell gibt es dazu verschiedene Reagenzien für die Derivatisierung von Hg, wie z.B. Natriumborhydrid (NaBH_4), Natriumtetraethylborat (NaBEt_4) oder Natriumtetrapropylborat (NaBPr_4 ; Jimenez-Moreno, 2012;). In dieser Arbeit wurde NaPr_4B verwendet und im Folgenden sind die wichtigsten Reaktionen gezeigt, die bei der Derivatisierung ablaufen. Methylquecksilber kann als Methylpropylquecksilber, EtHg als Ethylpropylquecksilber und Hg(II) als Dipropylquecksilber chromatographisch aufgetrennt werden (Demuth, 2001a).



Die Durchführung der Probenvorbereitung war wie folgt (siehe Schema in Abb. 8): Zunächst wurde zu einer exakten Einwaage von 5 g Probenmaterial (bakterielles Nährmedium in einem Reaktionsgefäß à 50 mL) eine definierte Menge des MeHg-Isotops zugegeben (z.B. 1 ng/mL für bakterielle Kulturen). Die Reaktionsgefäße wurden mit Alufolie umwickelt, um die Photodegradation von MeHg zu vermeiden. Zwei mL einer 20%igen KOH in MeOH (w/v) wurden zu der Probe gegeben und in einem Wasserbad bei 75 °C für 3 h erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden jeweils 1 mL Kupfersulfat (0.15 M)/Natrium-Oxalat-Lösung (0.3 M) als Maskierungsreagenz hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit Natrium-Acetat-Puffer (0.1 M, pH = 5.4) und HNO_3 (65%) auf 4,5 eingestellt. Dies entspricht dem optimalen Wert für die Alkylierungsreaktion von MeHg und anorganischem Quecksilber mit NaPr_4B (Bunke, 2007). Anschließend wurden alle Proben mit MilliQ Wasser auf 25 mL aufgefüllt und 500 μL NaBPr_4 (2%) sowie 1 mL Hexan zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden 20 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min, 3600 g). Durch die

Trennung der zwei Phasen konnte nun die Hexanphase mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 mL GC-Vial überführt werden. Diese wurden mit einem teflonbeschichteten Butylstopfen verschlossen und mit einem Metallring verkrampft. Die Proben wurden sofort bei -70 °C eingefroren.



Abb. 8: Schema zur Probenvorbereitung für die Messung von MeHg in bakteriellen Flüssigmedien.

Die Analyse von MeHg mittels GC-ICP-MS erfolgte im Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (Schmallenberg). Die Berechnung der MeHg Konzentration in den Proben wurde nach der Isotopenverdünnung durchgeführt, die von Monperrus et al. (2004) beschrieben wurde. Einzelheiten zu der Berechnung sind im folgenden Kapitel geschildert. Die Wiederfindung von MeHg nach Anwendung der oben erläuterten Methode wurde mit Einsatz des Referenzmaterials ERM[®] CE-464 Tuna Fish getestet (Ibáñez-Palomino et al., 2012).

2.14.2. Das Prinzip der Isotopenverdünnung

Isotope sind Nuklide mit gleicher Protonenzahl aber unterschiedlicher Neutronenzahl, die sich chemisch und physikalisch gleich verhalten und deren natürliches Verhältnis für die meisten Elemente bekannt ist. Die Bestimmung des Isotopenmusters eines Elements hat eine sehr große Bedeutung in der Kernchemie, Geologie, Archäologie oder den Lebenswissenschaften gewonnen, da sich neben einer Altersbestimmung einer Probe auch eine Provenienz-Bestimmung durchführen lässt (Heumann, 1992; Beauchemin, 2008). Dies basiert auf der geringfügigen Variation des Isotopenverhältnisses eines Elements, das je nach Fundort ein spezielles Muster aufweisen kann (Heumann, 1992). Das Isotopenmuster kann auch während einer enzymatischen Reaktion durch einen Effekt der massenabhängigen Isotopenfraktionierung variiert werden, da leichtere Isotope bevorzugt in eine Reaktion eingebunden werden können. Es wurde gezeigt, dass z.B. bei der Biomethylierung von Selen durch den Pilz *Alternaria alternata* eine Fraktionierung von Selen auftritt (Schilling et al., 2011). Die Fraktionierung von Isotopen ist abhängig von ihren physikalischen Eigenschaften und es tritt bei schwereren Elementen (wie z.B. Hg mit 200,59 g/Mol) in geringerem Maße auf (als z.B. bei Selen mit 34 g/Mol). Schwere Isotope weisen im Gegensatz zu leichten Elementen eine geringere (Diffusions-) Geschwindigkeit bei gleicher Temperatur auf. Leichte Isotope gehen aufgrund höherer Kollisionsfrequenz schneller chemische Reaktionen ein, wobei die Bindungsenergien von schweren Isotopen höher ist (Rozanski et al., 2001).

Ein weiteres Anwendungsfeld ist die Bestimmung eines Analyten mittels Spezies-spezifischer Isotopenverdünnungsanalyse. Entwickelt wurde diese Methode von Heumann und seinen Mitarbeitern (Heumann, 1992; Demuth und Heumann, 2001b). Die Voraussetzung zur Anwendung ist das Vorkommen von mehr als einem stabilen Isotop eines Elements und die Verwendung einer zertifizierten Standardlösung, in der ein Isotop hoch angereichert vorliegt (Pröfrock und Prange, 2012). Das Prinzip ist in Abb. 9 schematisch dargestellt und besteht darin, dass eine bekannte Menge der hoch angereicherten Isotopenlösung in eine eingewogene flüssige Probe unbekannter Elementkonzentration zugesetzt wird. Nach vollständiger Durchmischung und Extraktion der Probe wird mittels MS eine Isotopenhäufigkeitsanalyse durchgeführt. Dadurch kann das Verhältnis der Isotope des gesuchten Elements ermittelt und die unbekannt Konzentration des Analyten berechnet werden (Heumann, 1992; Schwedt, 1995; Pröfrock und Prange, 2012).

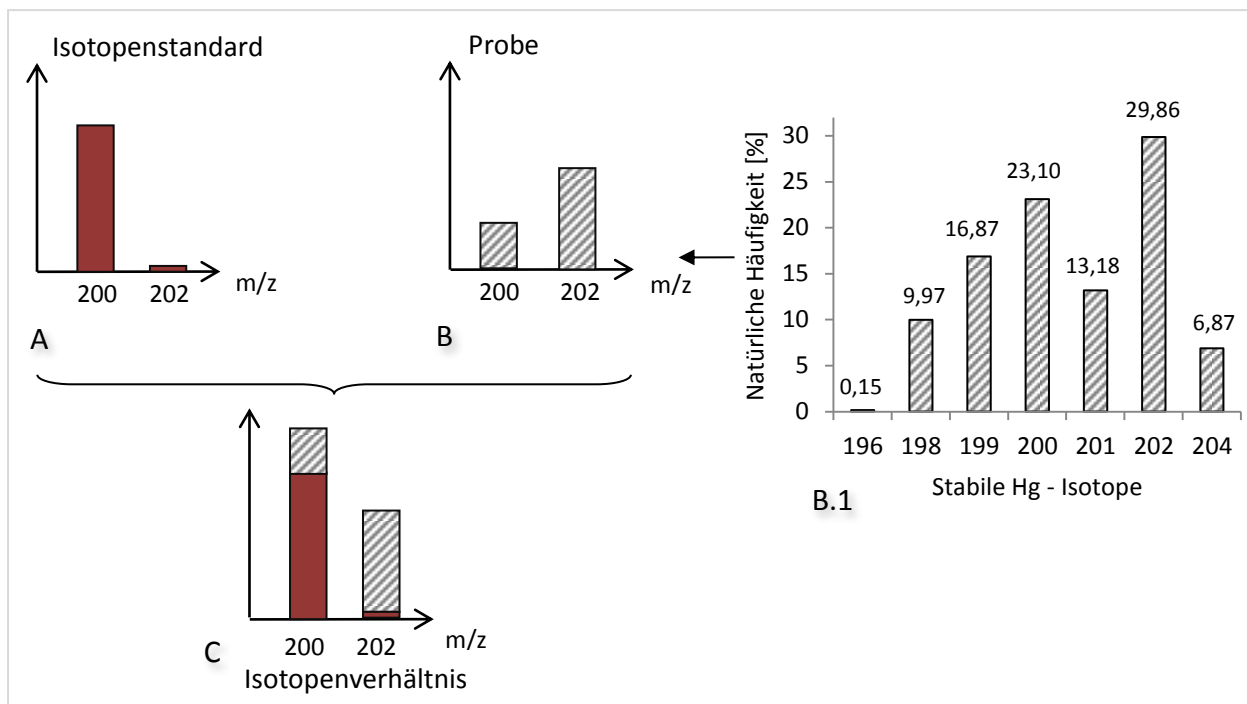


Abb. 9: Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsmethode: Ein Isotopenstandard mit bekanntem Isotopenverhältnis (A) wird zu einer Probe gegeben (B), dem das natürliche Verhältnis der Hg-Isotopenverteilung (B.1) zugrunde liegt. Aus dem gemessenen Isotopenverhältnis (C) kann die Elementkonzentration von Hg in der Probe berechnet werden.

Anhand der Messung des Isotopenmusters lässt sich durch Berechnung der bekannten Faktoren die Konzentration [in ng/g] des gesuchten Elements in der Probe wie folgt berechnen:

$$c(\text{MeHg}) = \frac{c' \cdot w' \cdot A \cdot (RY' - X')}{w \cdot A' \cdot (X - RY)} \cdot \frac{A_{\text{MeHg}}}{A}$$

Einige konstante Parameter können dabei dem mitgelieferten Zertifikat des angereicherten Isotopenstandards $^{200}\text{MeHg}$ entnommen werden (Angabe in den eckigen Klammern).

- w' Gewicht der addierten ^{200}Hg angereicherten Standardlösung [g]
- c' Konzentration der ^{200}Hg angereicherten Standardlösung [ng/g]
- A' Angereicherter Isotopenstandard: Summe der Isotopenmassen bezogen auf die prozentualen Anteile [199,990 g/mol]
- Y' Isotopenhäufigkeit von ^{202}Hg in ^{200}Hg angereicherter Standardlösung [1,033%]
- X' Isotopenhäufigkeit von ^{200}Hg in ^{200}Hg angereicherter Standardlösung [96,033%]
- w Probeneinwaage [g]
- A Natürliche Atommasse von Hg [200,5991 g/mol]
- A_{MeHg} Natürliche Atommasse von MeHg [215,6247 g/mol]
- Y Natürliche Häufigkeit von ^{202}Hg [29,86%]
- X Natürliche Häufigkeit von ^{200}Hg [23,10%]
- R Isotopenverhältnis der integrierten Peakflächen ($^{200}\text{Hg}/^{202}\text{Hg}$)

Der Vorteil dieser Spezies-spezifischen Isotopenverdünnungsmethode besteht darin, dass das gespikete Isotop als interner Standard während des gesamten Prozesses der Probenvorbereitung sowie des chromatographischen Trennungsgangs mitgeführt wird und sich chemisch und physikalisch genauso verhält wie der Analyt (Pröfrock und Prange, 2012). Zudem werden Ionisationseffekte kompensiert und Interferenzen minimiert (Heumann, 1992). Diese Isotopenverdünnung ist eine sehr häufig angewandte Methode in den Umweltwissenschaften, insbesondere für die präzise Bestimmung von Sn, Pb oder Hg (Snell et al., 2000).

2.14.3. Instrumentelle analytische Methoden

Für die Auswahl und Anwendung einer optimalen Methode zur Analyse von Hg sind die Art der Proben, die Komplexität der Matrix sowie der Konzentrationsbereich von Hg entscheidend. Im Folgenden werden die wichtigsten Methoden vorgestellt, die für die Bestimmung von Hg und MeHg in verschiedenen Probenarten durchgeführt werden.

2.14.3.1. Atomabsorptionsspektrometrie

Die Atomspektrometrie ist ein spektralanalytisches Verfahren und beruht auf der Absorption von elementspezifischer elektromagnetischer Strahlung durch freie Atome im Gaszustand. Dabei sind die Anwendungen der Flammen-AAS (F-AAS), der Graphitrohr-Technik (GF-AAS) und der Hydrid-Technik, die auch als Cold-Vapour-AAS (CV-AAS) bezeichnet wird, bekannt. Der prinzipielle Aufbau umfasst eine Hohlkathodenlampe, einen Atomisator, Monochromator und einen Detektor. In der Praxis wird die Probe im Strahlengang einer Hohlkathodenlampe, die Licht spezifischer Wellenlänge ausstrahlt, atomisiert. Dabei absorbieren freie Atome genau definierte Energiequanten und die Abschwächung der Intensität wird mit dem ungeschwächten Licht nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ins Verhältnis gesetzt. Die Signalintensität ist dabei proportional zur Konzentration des Elements (Cammann, 2010).

Generell findet die AAS Anwendung für die Analyse verschiedener Elemente, insbesondere für Metalle und Halbmetalle in meist wässrigen oder festen Phasen. Für die Quantifizierung von Hg wird die CV-AAS eingesetzt, die auch als Fließinjektion-Quecksilber-Kaltdampf-System (Flow Injection Mercury System) appliziert wird (Uria und Sanz-Medel, 1998; Ruzicka und Hansen, 2008). Quecksilber besitzt bei Raumtemperatur einen relativ hohen Dampfdruck (10-20 mg Hg/m³ Luft) und lässt sich sehr leicht zu elementarem Hg⁰ reduzieren

(z.B. durch die Reaktion mit Natriumborhydrid oder SnCl_2). Nach der Reduktion wird elementares Hg in einem Gasstrom in eine Absorptionszelle aus Quarz eingeleitet. Die Detektion erfolgt durch die Messung auf der Spektrallinie bei 253,7 nm. Die Lichtstrahlintensität wird dabei durch die Atome im Strahlungsgang proportional zur Hg-Menge geschwächt. Die Nachweisgrenze für Hg ($V = 50 \mu\text{L}$) liegt bei dieser Technik bei 0,001 $\mu\text{g/L}$. Der Vorteil der Kaltdampftechnik ist neben der hohen Nachweisempfindlichkeit für die Hg-Bestimmung der Einsatz von niedrigen Temperaturen sowie die Möglichkeit, das Gerät mit Amalgamfallen für die Anreicherung von Hg im Ultraspurenbereich auszustatten. Diese preiswerte Technik wird auch für die Routine in der Medizin zur Bestimmung des Hg-Gehalts in Blutproben verwendet (Cammann, 2010).

In der vorliegenden Arbeit findet die FIMS Anwendung zur Bestimmung der Gesamtquecksilberkonzentration in Böden nach Königswasseraufschluss (siehe 2.8. *Erdbodenproben: Charakterisierung und Analyse*).

2.14.3.2. Atomfluoreszenzspektrometrie

Die Atomfluoreszenzspektrometrie (AFS) ist eine weitere Nachweis- und Bestimmungsmethode für Hg (Uria und Sanz Medel, 1998). Im Gegensatz zur AAS wird hierbei das Prinzip der Fluoreszenz genutzt: Die Hg-Atome werden durch eine Nieder-Quecksilberlampe bei 253,7 nm in den ersten Anregungszustand überführt. Innerhalb einiger Nanosekunden fallen die Hg-Atome jedoch aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurück und emittieren Licht mit einer Wellenlänge von 253,7 nm. Dabei liegt der Detektor im 90°-Winkel versetzt und getrennt zur Lichtquelle, da die Anregung und Emission bei gleicher Wellenlänge auftreten (Jackson, 1994; Cammann, 2010).

Der Vorteil der AFS gegenüber der AAS besteht darin, dass die AFS zum einen für die Hg-Analyse sehr spezifisch ist und die Nachweisgrenzen bis ca. 0,2 ng/L deutlich niedriger sind als bei der AAS mit ca. 10 ng/L (Uria und Sanz-Medel, 1998). Diese hohe Nachweisstärke beruht darauf, dass die AFS-Detektion von der Energie des eingestrahlten Lichts abhängig, die AAS jedoch von der Messung des geschwächten, absorbierten Lichts begrenzt ist. Weiterhin ermöglicht die zusätzliche Kopplung der AFS mit einer Kapillar-GC die Speziesbestimmung von Hg. Für die Analytik von MeHg und Hg im Spuren- und Ultraspurenbereich insbesondere unter dem Aspekt der Isotopenuntersuchung findet hingegen die ICP-MS Anwendung (Pröfrock und Prange, 2012).

2.14.3.3. Direktverfahren zur Gesamtquecksilberbestimmung

Der Aufschluss verschiedener Arten von Proben (z.B. Böden, Schlämme, Metalle, Lösemittel etc.) kann neben den oxidierenden und reduzierenden Aufschlüssen auch durch das sog. Direktverfahren durchgeführt werden. Dabei werden die Proben in sog. „Schiffchen“ eingewogen und bei Temperaturen von 800 °C verbrannt. Während des Prozesses entsteht Hg^0 , welches auf einer Amalgamfalle angereicht, in einem anschließenden Schritt wieder ausgeheizt und in einem integrierten AAS gemessen wird. Bei praktischer Anwendung dieser Methode können Nachweisgrenzen von unter 0,5 µg/kg erreicht werden. Der Vorteil der Direktmethode gegenüber der CV-AAS oder AFS ist, dass kein nasschemischer Aufschluss vorangestellt werden muss. Dieser Technik kommt außerdem eine besondere Bedeutung für die Spezies-Analytik zu, da nach dem Aufschluss die Wertigkeit des Analyten erhalten bleibt (Cammann, 2010).

2.14.3.4. Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) wurde 1980 von Houk vorgestellt und bereits 1983 erstmals kommerziell genutzt (Houk, 1986). Seitdem sind ca. 8000 Systeme weltweit für ein großes Spektrum verschiedenster Anwendungen etabliert (Thomas, 2008). Die Mehrheit aller ICP-MS Systeme (80%) finden Einsatz in der Umwelt- oder Geowissenschaft, in der Biomedizin, Forensik oder der Kernchemie insbesondere für die Element-Spurenanalytik. Die zunehmende Bedeutung der ICP-MS ist begründet durch die Fähigkeit zur rapiden Multielement-Bestimmung im Ultraspurenbereich bis in den unteren ng/L Bereich (Popp et al., 2010). Infolge der Realisierung präziser Quantifizierung von biologisch relevanten Molekülen wie Proteinen, DNA, Metalloproteinen oder Toxinen wird die ICP-MS für das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Genen und Proteinen sowie zellulärer Komplexe insbesondere im Bereich der Genomik, Proteomik und Metallomik unentbehrlich sein (Bettmer et al. 2009). Auch für die Realisierung und Einführung neuer Richtlinien von Grenzwerten toxischer Stoffe aus industriellen anthropogenen Quellen in pg/L Bereichen spielt die ICP-MS eine enorm große Rolle (Pröfrock und Prange, 2012). Andere traditionelle atomspektrometrische Methoden, wie z.B. die Flammenatomabsorption (FAA), die Elektrothermische Atomisierung (ETA) und die optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) weisen einige

Einschränkungen in Bezug auf die Multi-Element-Fähigkeit, die Analysendauer, Detektionslimits sowie der Charakterisierung von Isotopen auf (Thomas, 2008).

Prinzipieller Aufbau der ICP-Massenspektrometrie

Die Komponenten einer Massenspektrometrie bestehen im Wesentlichen aus einem Einlass-System, einer Ionenquelle, die gasförmige positiv und negativ geladene Ionen erzeugt, einem Massenanalysator zur Auftrennung nach Masse-zu-Ladungsverhältnis und aus einem Detektor mit Verstärker zur Registrierung der Signalintensitäten (siehe Abb. 10). Da Ionenbewegungen nur in einem Hochvakuum kollisionsfrei erfolgen, wird mithilfe von Drehschieber- und Turbopumpen im System ein Hochvakuum von 10^{-4} mbar erzeugt (Thomas, 2008).

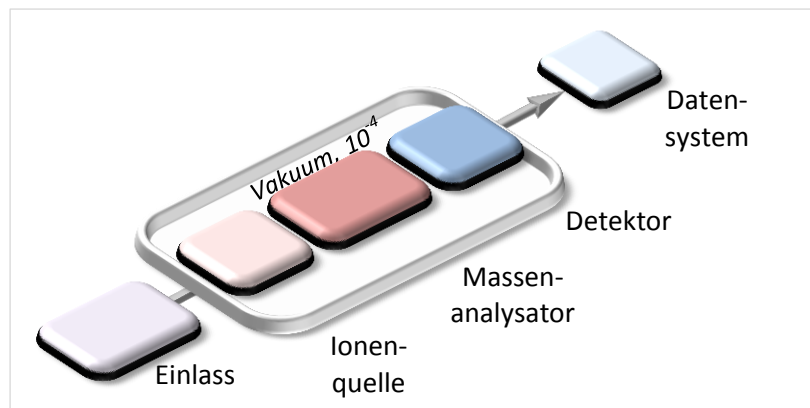


Abb. 10: Die wichtigsten Komponenten im Aufbau der Massenspektrometrie.

Funktionsweise der ICP-Massenspektrometrie

Die Probe wird üblicherweise in flüssiger Form mithilfe einer peristaltischen Pumpe (1 mL/min) in einen Nebulizer eingebracht, wo die Probe mittels eines Gasstroms (Argon, 1 L/min) in ein feines Aerosol überführt wird. Die feinen Tropfen des Aerosols, welche ca. 1-2% der Probe repräsentieren, werden von größeren Tropfen in einem Separator, der Spray Chamber, voneinander getrennt. Das feine Aerosol wird durch die Spray Chamber in den Sample Injektor, der sich im Inneren eines konzentrischen Quarzrohrs (Torch) befindet, geleitet und direkt in das Plasma transportiert (Thomas, 2008).

Das Plasma entsteht durch ein elektrisch induziertes Magnetfeld. Zwischen den äußeren und mittlerem Tube innerhalb der Torch fließt ein tangential angelegter Gasstrom (Abb. 11A). Am Ende der Torch befindet sich eine Kupferspirale, die um die Torch gewunden und mit dem RF- (Radio Frequency) Generator verbunden ist. Wenn eine Leistung am RF-Generator

angelegt wird (750–1500 W), entstehen wechselnde Schwingungen einer bestimmten Frequenz (27 oder 40 MHz), wodurch ein elektromagnetisches Feld induziert wird (Abb. 11B). Das durch die Torch fließende Argongas wird nun durch einen Hochspannungsfunken entzündet (Abb. 11C), wobei innerhalb dieses Vorgangs Elektronen aus der Außenhülle geschlagen und im Magnetfeld beschleunigt werden. Die beschleunigten Elektronen kollidieren mit anderen Argon-Atomen und -elektronen und führen zu einer Entladung (Abb. 11D), die mit der kontinuierlichen Zuführung von Energie des RF-Generators aufrechterhalten wird. Dabei entsteht ein Plasma mit Temperaturen von 6000-7000 K (Abb. 11E; Thomas, 2008; Bettmer et al., 2009).

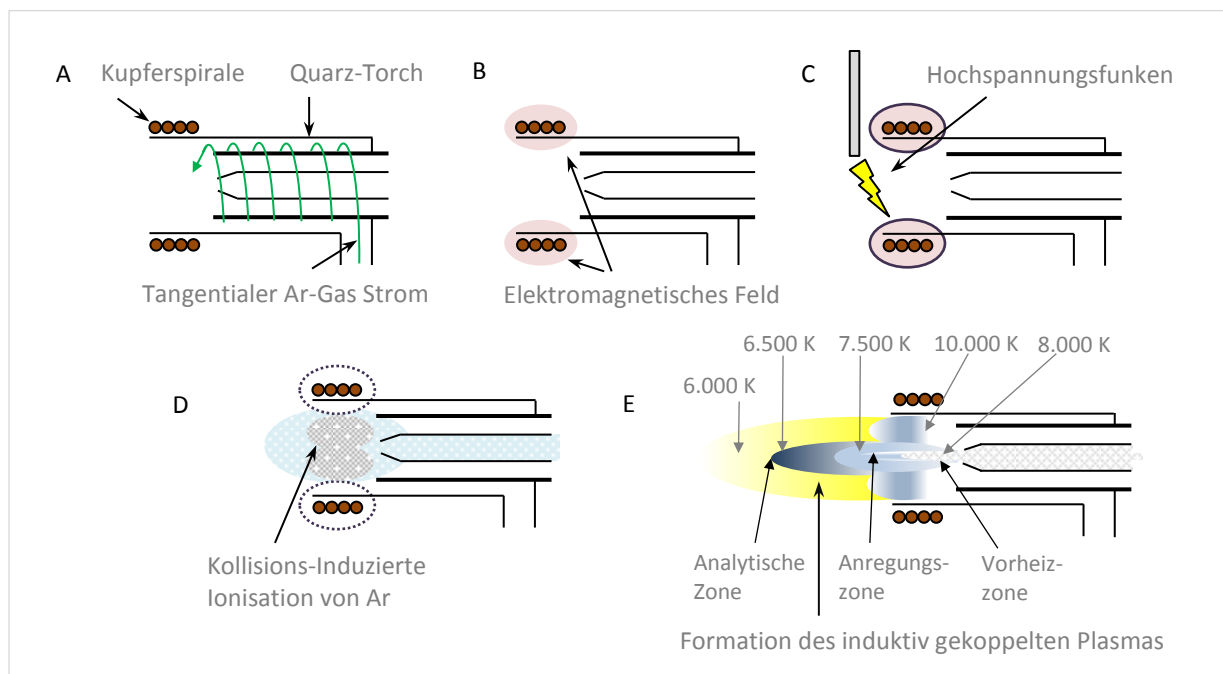


Abb. 11: Schema einer ICP-Torch und Bildung eines induktiv gekoppelten Plasmas. Erklärungen siehe Text (nach Thomas, 2008).

Die Energie, die benötigt wird, um das Argon durch den beschriebenen induktiv gekoppelten Prozess zu ionisieren, liegt bei 15,8 eV und ist ausreichend, um die meisten Elemente des Periodensystems zu ionisieren (Pröfrock und Prange, 2012). Die Probe wird mit dem Aerosol in das Plasma transportiert und durchläuft verschiedene Zonen des Plasmas, wobei dies in der Vorheizzone mit der Desolvatisierung der Tropfen beginnt. Die daraus entstandenen kleinen festen Partikel gelangen tiefer in das Plasma und werden zunächst in ein Gas, anschließend in ein Atom im Grundzustand überführt. Die Konversion eines Atoms in ein Ion verläuft hauptsächlich durch die Kollision energetischer Argon-Elektronen mit Atomen im

Grundzustand. Es werden positiv geladene Ionen generiert, die nach der Passage des Plasmas direkt in das Interface des Massenspektrometers gelangen (Thomas, 2008). Dies ist ein wichtiger Unterschied zur ICP-OES, in der das Plasma nicht horizontal, sondern vertikal ausgerichtet ist und Lichtphotonen generiert. In dem ICP-MS System hingegen befinden sich spezielle Photonenfallen, die verhindern, dass die Photonen in den Detektor gelangen, da sie potentielle Störsignale produzieren können. Dabei können quantitativ betrachtet eine sehr große Menge Ionen detektiert werden. Dies bedingt die typischen Detektionsgrenzen der ICP-MS im niederen ppt-Bereich, die 3-4 Größenordnungen kleiner sind als bei der ICP-OES. Sobald die Ionen im Plasma produziert wurden, passieren sie im nächsten Schritt das Interface der ICP-MS. Hier wird ein Vakuum von 1-2 Torr durch eine mechanische Pumpe aufrechterhalten. Die Interface-Region besteht aus zwei metallischen flachen Kegeln (meist aus Nickel), die als Sampler- und Skimmercone bezeichnet werden. Sie besitzen beide eine sehr schmale Öffnung von 0,6 bis 1,2 mm, durch die die Ionen in die Ionenoptik bzw. in den Massenseparator gelangen. Die Interface Region ist wohl die kritischste Zone innerhalb des ICP-MS, da die Ionen möglichst effektiv unter Aufrechterhalten der elektrischen Integrität von dem Plasma mit einem Atmosphärendruck von 760 Torr bis in das Massenspektrometer-Analysator-Einheit mit einem Druck von 6-10 Torr gelangen müssen.

Wenn die Ionen in das Interface gelangen, erreichen sie die Hauptvakuum-Kammer und die Ionenoptik, die aus einer Serie elektrostatischer Linsen aufgebaut ist. Das Vakuum wird an dieser Stelle durch Hochmolekularpumpen erreicht und beträgt 3-10 Torr. Der Ionenstrahl wird elektrostatisch fokussiert und gelangt in die Einheit des Massen-Separators, während Photonen, Feinstaub und neutrale Spezies vollständig abgefangen werden (Bettmer et al. 2009). Im Massenseparator wird ein Vakuum von 6-10 Torr von einer zweiten Turbomolekularpumpe aufrechterhalten. Es gibt verschiedene Massenseparatoren, die je nach Fragestellung und Anwendung eingesetzt werden. Zu den drei wichtigsten Technologien zur Massentrennung zählen der Quadrupol, das Magnetische Sektorfeld und der Time-of-Flight. Allen gemeinsam ist, dass die Analyt-Ionen nach Masse-Ladungsverhältnis getrennt werden, wobei alle interferierende Ionen oder Matrix-Ionen herausgefiltert werden. Abhängig von dem Aufbau des Massenspektrometers handelt es sich entweder um einen Scan-Prozess, wobei die Ionen sequentiell in den Detektor gelangen oder einer simultanen Detektion der verschiedenen Ionen (Thomas, 2008). In dieser Arbeit kam ein Quadrupol-ICP-MS in Kopplung mit der Laserablation sowie ein Sektorfeld-ICP-MS in

Kombination mit einer GC zur Speziestrennung für die Hg- und MeHg-Bestimmung zur Anwendung.

Der Quadrupol gehört zu den am weitesten verbreiteten und günstigsten Massen-Separatoren, die in kommerziellen ICP-MS Systemen eingesetzt werden (Abb. 12). Der Quadrupol besteht aus vier zylindrischen Metallstäben gleicher Länge (15-20 cm) und Durchmesser (ca. 1 cm), die als Elektroden dienen.

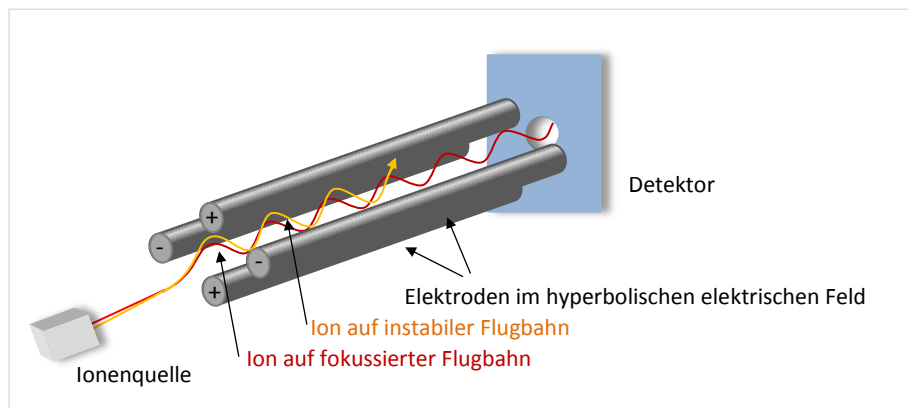


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Massenseparation mithilfe eines Quadrupol Massenfilters.

Das Material besteht meistens aus Edelstahl oder Molybdän, welches mit einer Keramiksicht als Korrosionsschutz überzogen ist. Die Massenseparation mittels eines Quadrupols wirkt durch das Anlegen eines hyperbolischen elektrischen Feldes, wobei die beiden gegenüberliegenden Elektroden jeweils gleich gepolt sind, d.h. ein Paar liegt an einem positiven, das andere an einem negativen Pol einer variablen Gleichspannungsquelle an. Gleichzeitig werden hochfrequente Wechselfeld angelegt, welche zwischen den beiden Elektrodenpaaren um 180° phasenverschoben sind. Im Elektrodenkanal werden die Ionen im elektrischen Potential (5-15 V) beschleunigt, wobei die Flugbahn der Ionen abhängig von der Ionenmasse und -ladung ist. Das elektrische Feld kann so gewählt werden, dass nur bestimmte Ionen eines m/z -Verhältnisses so auf der Flugbahn fokussiert werden, dass sie ungehindert den Detektor erreichen. Die Flugbahn anderer Ionen ist instabil und diese Ionen kollidieren mit den Elektroden, werden entladen und sind für die Analyse nicht mehr zugänglich.

Die doppel-fokussierende Sektorfeld-ICP-MS (Abb. 13) wird unter Verwendung eines sehr leistungsstarken Magnets in Kombination mit einem elektrostatischen Analysator betrieben. Dadurch wird im Gegensatz zu einfachfokussierenden MS eine sehr hohe Auflösung mit geringen Interferenzen erreicht (Beauchemin, 2008). Die geringere Auflösung wird primär durch unterschiedliche Energien der beschleunigten Ionen verursacht. Im doppel-fokussierenden Sektorfeld wird daher einem elektrostatischen Feld ein Magnetfeld vor- oder nachgeschaltet. In dem vorgeschalteten elektrostatischen Analysator werden die Ionen zunächst unabhängig von ihrem m/z -Verhältnis auf dessen Austrittsspalt fokussiert (Beauchemin, 2008). Im Magnetfeld bewegen sich die Ionen auf Kreisbahnen unterschiedlicher Radien abhängig vom m/z -Verhältnis. Durch Variation der magnetischen Feldstärke können selektiv die Ionen bestimmter m/z - Verhältnisse auf den Ionendetektor gebracht bzw. fokussiert werden (Thomas, 2008). Der Vorteil der doppel-fokussierenden ICP-SFMS besteht in einem hohen Massenaufklärungsvermögen (bis zu 100.000 im Gegensatz zu <2000 bei einfachfokussierenden Geräten).

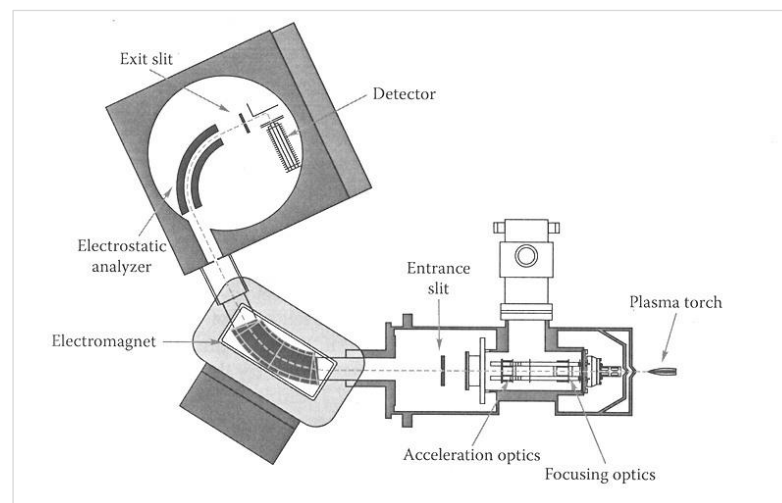


Abb. 13: Schema eines reversen Nier-Johnson doppel-fokussierenden Magnet-Massenspektrometers (Abb. aus: Gießmann und Greb, 1994 mit Genehmigung zur Veröffentlichung durch Springer am 12.01.2013).

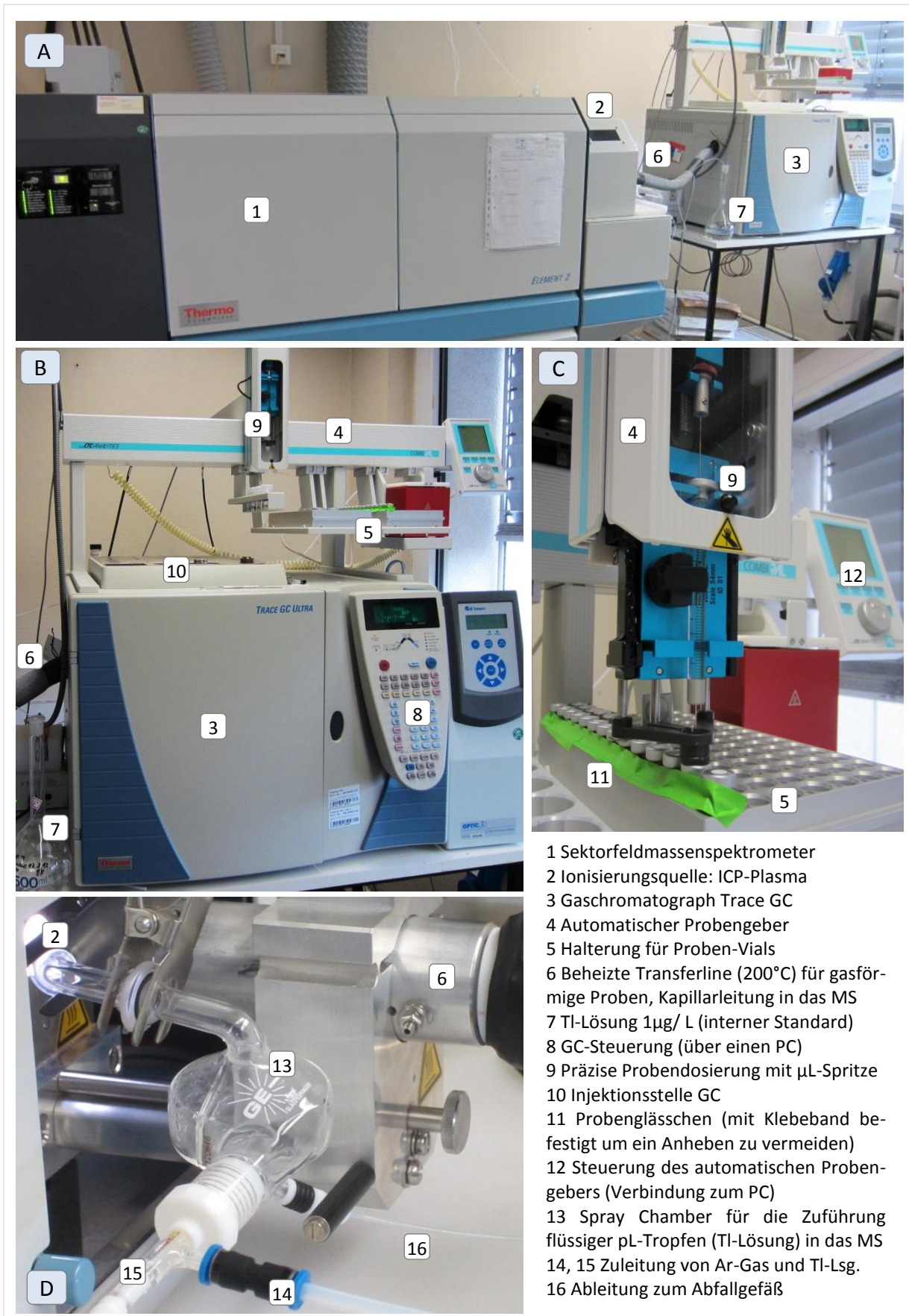
Im abschließenden Prozess werden die Ionen mittels eines Ionendetektors in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das gebräuchlichste Modell hierfür ist ein sogenannter „discrete dynode detector“ (Sekundärelektronenvervielfacher), in dessen Bauteil eine Serie von Metall-Dynoden entlang der Länge des Detektors angeordnet ist. Wenn die Ionen aus dem Massenfilter austreten, treffen sie auf die erste Parallelelektrode, wodurch eine Elektronen-Vervielfältigung stattfindet. Daraus resultierend trifft ein sehr hoher Elektronenstrahl auf die

letzte Dynode in der Reihe. Dieses elektrische Signal kann dann mithilfe spezieller Software prozessiert und auf konventionellem Weg mithilfe von ICP-MS Kalibrierstandards in die Analyt-Konzentration umgerechnet werden. Die meisten Detektions-Systeme können innerhalb des dynamischen Bereichs bis zu acht Größenordnungen verarbeiten, d.h. es können Analyte in Proben im ppt-Level bis einigen hundert ppm bestimmt werden. Bezüglich der Auswertung zur Konzentrationsbestimmung von MeHg in biologischen Proben werden die Ionenintensitäten in jedem Massenspektrum summiert und gegen die Zeit geplottet, um ein „total ion chromatogram“ (TIC) zu erhalten. Die Signalintensitäten der Quecksilberisotope werden miteinander ins Verhältnis gebracht und gemäß der Formel zur Isotopenverdünnungsmethode (siehe 2.14.2. *Das Prinzip der Isotopenverdünnung*) kann die unbekannte Konzentration des Quecksilbers in der Probe berechnet werden.

Parameter zur Anwendung der GC-ICP-MS

Die Unterscheidung der Quecksilberspezies erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch die vorangeschaltete Kopplung einer Kapillar-GC. Diese Anwendung findet sich sehr häufig in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik für die Spurenelementanalyse, da diese Kopplung in Abhängigkeit der Ionisationsmethode (ICP) und des verwendeten Massenspektrometers (Quadrupol) sehr hohe Sensitivitäten und niedrige Nachweisgrenzen im Bereich von 10 pg – 10 fg ermöglichen. Für eine Übersicht zur Bestimmung von Hg in biologischen Proben unter Anwendung gekoppelter ICP-MS-Systeme und dem Einsatz der Isotopenverdünnungsmethode sei auf einen aktuellen und umfassenden Review von Dressler et al. (2011) verwiesen. Eine Zusammenfassung zur Speziation von anorganischem Hg sowie MeHg in Umweltproben publizierten Uria und Sanz-Medel (1998).

Die Quantifizierung von Hg in wässrigen Proben mittels ICP-MS wird häufig mithilfe der ICP-SFMS durchgeführt, insbesondere mit dem Instrument Element 2 von Thermo Fisher Scientific (Beauchemin, 2008). Dieses System kam ebenfalls in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung und ist in Abb. 14 abgebildet. Die Methode für die Bestimmung von MeHg mittels ICP-MS wurde im Rahmen des Fraunhofer Institutes für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (Schmallenberg) entwickelt (Umweltbundesamt, 1996). Die eingesetzte Methode zur Bestimmung von MeHg in den biologischen Proben wurde des Weiteren mittels Wiederfindung von zertifiziertem Referenzmaterial geprüft (Ibáñez-Palomino et al., 2012). Dafür wurden jeweils etwa 200 mg des ERM[®] CE-464 Tuna Fish verwendet.



- 1 Sektorfeldmassenspektrometer
- 2 Ionisierungsquelle: ICP-Plasma
- 3 Gaschromatograph Trace GC
- 4 Automatischer Probengeber
- 5 Halterung für Proben-Vials
- 6 Beheizte Transferline (200°C) für gasförmige Proben, Kapillarleitung in das MS
- 7 TI-Lösung 1µg/ L (interner Standard)
- 8 GC-Steuerung (über einen PC)
- 9 Präzise Probendosierung mit µL-Spritze
- 10 Injektionsstelle GC
- 11 Probengläschen (mit Klebeband befestigt um ein Anheben zu vermeiden)
- 12 Steuerung des automatischen Probengebers (Verbindung zum PC)
- 13 Spray Chamber für die Zuführung flüssiger pL-Tropfen (TI-Lösung) in das MS
- 14, 15 Zuleitung von Ar-Gas und TI-Lsg.
- 16 Ableitung zum Abfallgefäß

Abb. 14: Verwendetes GC-ICP-MS-System zur Bestimmung von MeHg (A) mit Ausschnitten vom Gaschromatograph Trace GC (B), dem automatischen Probengeber (C) und der Spray Chamber (D).

Die Anwendung des GC-ICP-MS Systems erfolgte nach Einstellung der wichtigsten Parameter, die in Tab. 13 zusammengefasst werden.

Tab. 13: Parameter für die GC-ICP-MS zur Bestimmung von MeHg.

Parameter	
MeHg Isotop	²⁰⁰ Hg
Injektor	
Modus	Splitless
Temperatur	230 °C
Injiziertes Volumen	2 µL
GC	
Säule	Trace GC, Thermo Fisher Scientific RTX-5 (Restek)
Trägergas	2.5 mL/min He
GC Programm	50 °C, ramp 1: 200 °C/min to 200 °C, hold 1 min, ramp 2 300 °C/min to 300 °C, hold 3 min
Transfer Kapillare	steel tube, 1/16 inch o.d. (Thermo), 200 °C
ICP-MS	
Interner Standard	Element 2, Thermo Fisher Scientific TI 1 µg/L
Resolution	low resolution modus
Detektor Modus	counting
RF-Power	1225 W
Gasströme [L/min]	
· Plasma	16
· Auxiliary	0.8
· Sample	0.518
Nebulizer	Conical GE
Spray chamber	Twinnabar GE
Dwell time	2 ms for ²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg, ¹⁹⁹ Hg, ²⁰³ Tl, ²⁰⁵ Tl

2.14.3.5. Laserablations-ICP-MS

Eine spezielle Anwendung der ICP-MS Kopplung, die in den letzten vier Jahren deutlich weiterentwickelt wurde, ist die Laserablations-IPC-MS (LA-ICP-MS; Bings et al., 2010). Dieses System ermöglicht die Bestimmung von Isotopenverhältnissen verschiedener Matrices oder die Quantifizierung der Elementzusammensetzung von Umweltproben, die insbesondere bei festen Proben angewendet wird, die entweder nicht zerstört werden sollen oder nur schwer in Lösung zu bringen sind (Beauchemin, 2008; Pröfrock und Prange, 2012). Daher gewinnt die LA-ICP-MS auch im Bereich der analytischen Lebenswissenschaften zunehmend an Bedeutung. Im Rahmen von Umweltmonitorings wurden bereits verschiedene Elemente wie z.B. Cd, Cu, Pb, Pd, Pt und Rh in Korallen, Vogelfedern oder Muscheln untersucht, um chemische Archive zu erstellen und Abschätzungen zu Umweltveränderungen und – einflüssen zu ermöglichen (Durrant und Ward, 2005). Von derartigen Untersuchungen können auch zukünftig viele relevante umweltpolitische Entscheidungen abhängig sein. Weitere häufige Anwendungsbereiche finden sich in der Medizin, Archäologie oder bei geobiologischen Untersuchungen von Eis, Sedimenten, Böden oder Pflanzenmaterial, aber auch im Bereich der Proteomics (Durrant und Ward, 2005; Steven et al., 2005; Beauchemin, 2008). Die LA-ICP-MS ermöglicht eine präzise orts aufgelöste Messung mit hohen Nachweisgrenzen, insbesondere bei Spurenelementuntersuchungen. Diese Anwendung garantiert den Erhalt der Probe, da die Laserkrater nur wenige μm groß sind (Durrant und Ward, 2005).

Das Prinzip der Laserablation beruht darauf, dass ein fokussierter Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) mit einer Spotgröße von 1 bis 500 μm Durchmesser auf die Oberfläche einer Probe gerichtet wird. Der eingesetzte Laser besitzt eine sehr hohe Leistungsdichte und mittels des gepulsten Lasers wird die oberste Schicht der Probe so stark erhitzt, so dass das Material abgesputtert wird. Diese geringen, abgetragenen bzw. „ablatierten“ Probenmengen werden mittels eines Gasstroms direkt in ein ICP-MS-System eingebracht.

Parameter für die Anwendung der LA-ICP-MS

In dieser Arbeit wurden weiterführende Experimente unter Einsatz der LA-ICP-MS durchgeführt, um Signalintensitäten von angereichertem Hg in einem histologischen Querschnitt von *E. foetida* zu lokalisieren. Diese Untersuchungen können bei der Aufklärung

des Mechanismus zur Akkumulation von organischem Hg aus der Umwelt in das Gewebe entscheidend sein. Sofern Hg^{2+} hauptsächlich durch die intestinalen Mikroorganismen und durch einen geringeren Anteil durch die bodenlebenden Bakterien methyliert wird, wäre ein Anreicherungsgradient von MeHg im Gewebe zu erwarten. Die Gewebepreparation wurde in 2.7. *Invertebraten* beschrieben. Der Aufbau des verwendeten LA-ICP-MS Systems ist in Abb. 15 veranschaulicht.

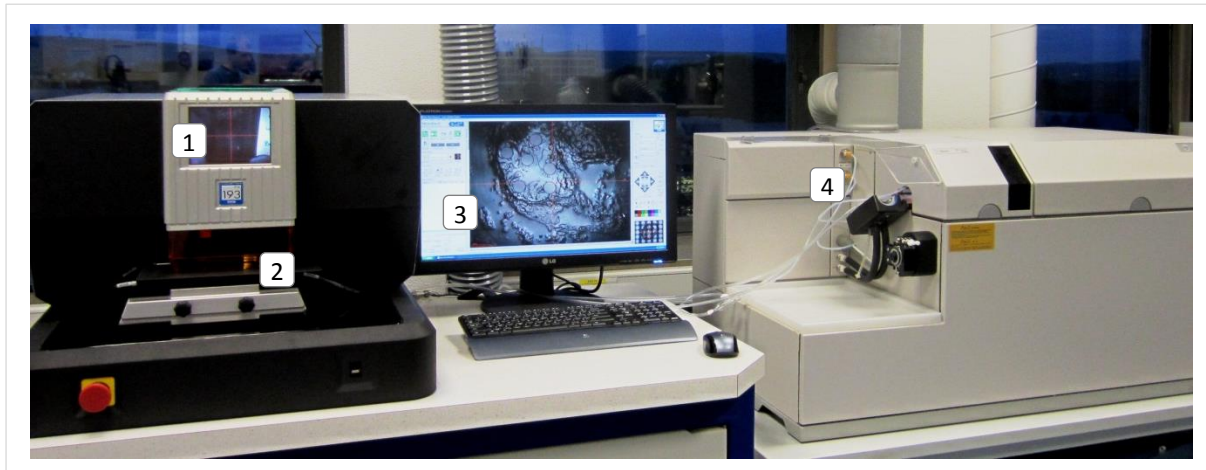


Abb. 15: Die Laser-Ablations-ICP-MS mit Beobachtungs-Mikroskop und Laser-Fokussierungssystem (1), der Ablationskammer für die Probe (2), dem PC zur Datenaufzeichnung (3) und dem Einlass in das ICP-MS (4).

Das Objekt bzw. der Gewebsschnitt wurde für die Ablation in eine mit Gas gespülte Probenkammer eingebracht (Abb. 16). Die Probe befindet sich auf einer präzise positionsverändernden Plattform, die unter dem Laser und mithilfe eines Aufsichtsmikroskops visuell ansteuerbar ist. Durch Beschuss mit gepulster Laserstrahlung wird Material von der Oberfläche der Probe abgetragen bzw. ablatiert und über dem Gasstrom direkt dem ICP-MS zugeführt (Steven et al., 2005).

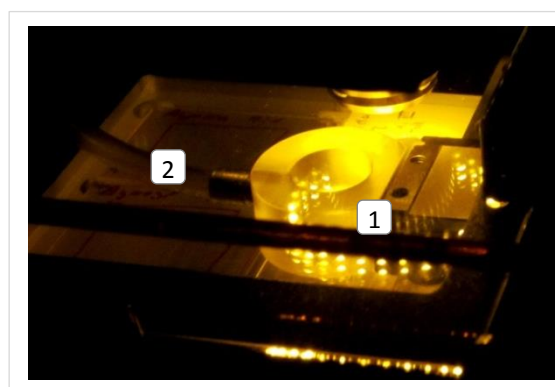


Abb. 16: In der Probenkammer (1) der LA-ICP-MS wird die abgetragene Probe nach dem Beschuss mit dem Laser mittels eines Argon-Gasstroms der ICP-MS zugeführt (2).

Von je zwei histologischen Dünnschnitten aus *E. foetida* wurden Messungen durchgeführt. Als Kontrollen dienten dabei Gewebsschnitte ohne Hg-Anreicherung. Die LA-ICP-MS Messung erfolgte im Institut für Geowissenschaften an der Universität Mainz und die Parameter für die Messungen sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Experimentelle Parameter für den Einsatz der LA-ICP-MS zur Messung von Hg in histologischen Dünnschnitten.

ICPMS Agilent 7500 cs			Laser: NWR-193 ESI	
RF Power		1450	Repetition rate	10 Hz
Plasma gas flow rate		15 L/min	Wellenlänge	193 nm
Carrier gas flow rate:	Ar	1,5 L/min	Laser Power	0,75 mJ/Pulse
	He/Ar	0,3/1,3 L/min	Pulse	75
			Pulse energy used	10%
			Spot sized used	50 μm
			Fluence	3,98 J/cm ²
			Irradiance	0,80 GW/cm ²

3. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden zunächst die Resultate zur Charakterisierung der Bodenproben vorgestellt, die für die Hg-Anreicherungsversuche und der Lokalisation von Hg im Gewebe von *E. foetida* eingesetzt wurden. Anschließend sind die Ergebnisse für die Optimierung der Methoden für die Sulfidbestimmung und GC-ICP-MS unter Ermittlung von Nachweisgrenzen und Wiederfindung von Referenzmaterial zusammengefasst. Weiterhin konnte die Fähigkeit zur Hg-Methylierung von Umweltproben sowie von Anreicherungskulturen und Reinkulturen Sulfat-reduzierender Bakterien untersucht und mittels GC-ICP-MS bestimmt werden.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit stand die Gewinnung verschiedener mikrobieller Kulturen aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* im Vordergrund. Die Anreicherungskulturen wurden auf die Anwesenheit von Desulfovirdin getestet und die Identifizierung der Kulturen erfolgte nach DNA-Extraktion, PCR und DGGE auf Basis der 16S rRNA und einer phylogenetischen Analyse. Zudem wurde in weiterführenden Experimenten erstmals die LA-ICP-MS eingesetzt, um akkumuliertes Hg im Gewebe von *E. foetida* zu lokalisieren.

3.1. Erdbodenproben: Charakterisierung und Analyse

Für die Kultivierung und die Akkumulationsversuche mit *E. foetida* kam Boden zum Einsatz, der auf den Gehalt von verschiedenen Schwermetallen untersucht und geomorphologisch sowie chemisch charakterisiert wurde. Die Untersuchung der Bodenfraktion (Partikelgröße <2 mm) erfolgte am Institut für Geologie der Universität Mainz und die Ergebnisse sind in Tab. 15 dargestellt. Die Partikelanalyse unter Verwendung von mehreren Sieben unterschiedlicher Durchlassgrößen resultierte in verschiedenen Fraktionen, die in sog. Korngrößenklassen eingeteilt werden können (Blume et al., 2011). Die Proben wurden einer Doppelbestimmung unterzogen und der Mittelwert wurde bestimmt.

Mit der Korngrößenverteilung und der daraus resultierenden Porenfrequenz hängt die Wasserbindung im Boden zusammen, da dieses durch Kapillarkräfte, Hydrations- und osmotische Kräfte gebunden wird. Die Beschreibung der Korngrößenverteilung ist unter anderem die Basis für die Erstellung eines Bodenprofils (Blume et al., 2011).

Tab. 15: Charakterisierung der Bodenproben und Ermittlung der Korngrößenverteilung.

Parameter	Mittelwert aus zwei Messungen
C [%]	6,935
N [%]	0,585
C : N Verhältnis	11,85
pH-Wert	7,2
CaCO ₃ [%]	4,94
Kationenaustauschpotential [mmol/z/100g]	45,2
Partikelgrößenbestimmung [%]:	
Sand 2 mm – 0,063 mm	44,8
Grobsand 2 – 0,63 mm	11,5
Mittelsand 0,63 – 0,2 mm	16,0
Feinsand 0,2 – 0,063 mm	17,3
Schluff 63 µm – 2 µm	44,9
Grobschluff 63 – 20 µm	30,1
Mittelschluff 20 – 6,3 µm	11,7
Feinschluff 6,3 – 2 µm	3,1
Ton < 2 µm	10,3

Die Bestimmung verschiedener Metalle und Metalloide in der Erdbodenprobe erfolgte im Landesamt Rheinland Pfalz (Mainz) und sind in Tab. 16 im Vergleich zu den tolerablen Maximalwerten in Böden garten- oder landwirtschaftlicher Nutzung nach der Bodenschutzverordnung (Bundesministerium für Umweltschutz, Naturschutz und Reaktorsicherheit Deutschland, 2012) dargestellt. Die Bestimmung erfolgte im Landesamt Rheinland Pfalz (Mainz) nach Königswasseraufschluss und unter Berücksichtigung der DIN ISO 11466 von 1977 „Bodenbeschaffenheit - Extraktion in Königswasser löslicher Spurenelemente“. Der Quecksilbergehalt bezieht sich auf das Gesamtquecksilber in der Bodenprobe und wurde mit der FIMS ermittelt, während alle anderen Elemente mittels ICP-MS bestimmt wurden. Die Proben wurden einer Doppelbestimmung unterzogen, wobei der Mittelwert berechnet wurde.

Tab. 16: Ermittelte Konzentrationen verschiedener Elemente in den Bodenproben gegenüber tolerabler Maximalwerte nach der Bodenschutzverordnung (siehe Text) in mg/kg luftgetrockneter Erde.

Elemente [mg/kg]	Konzentration Mittelwerte [mg/kg]	Höchstgrenzen [mg/kg]
As	5,27	125
Cd	0,239	50
Co	5,1	*
Cr	20	1.000
Cu	21	*
Hg	0,184	50
Ni	13,7	350
Pb	24,8	1.000
V	21,5	*
Zn	133	*

* Diese Elemente finden in der Verordnung keine Erwähnung

3.2. Bestimmung von Sulfid in Kulturmedien

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene bakterielle Kulturen auf die Produktion von MeHg aus Hg^{2+} getestet, wobei von jeder einzelnen Kultur die Zellzahl sowie der Sulfid-Gehalt ermittelt wurde. Die Durchführung für die Bestimmung des Sulfids in den Proben wurde wie in Kap. 2.10 *Sulfidbestimmung* erläutert, in Mikrotiterplatten und mittels photometrischer Messung nach einer Farbreaktion durchgeführt. In Abb. 17 sind Kalibrierungskurven für die Berechnung der Sulfid-Konzentrationen dargestellt. Für die Kalibrierung wurden zwei Konzentrationsbereiche von 0 bis 12,5 μM (Abb. 17A) und von 0 bis 171 μM (Abb. 17B) gewählt. Die Wiederfindung von Sulfid in wässrigen Standardlösungen lag in einem Bereich von 12 μM bis 171 μM bei 96 – 107%.

Die bakteriellen Medien wiesen eine komplexere Zusammensetzung als wässrige Standardlösungen auf und die Bestimmungsgrenze von Sulfid betrug daher 30 μM (in 150 μL Gesamtvolumen). Alle Proben wurden dreimal nebeneinander in der Mikrotiterplatte angesetzt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Die relative Standardabweichung betrug dabei maximal 5%.

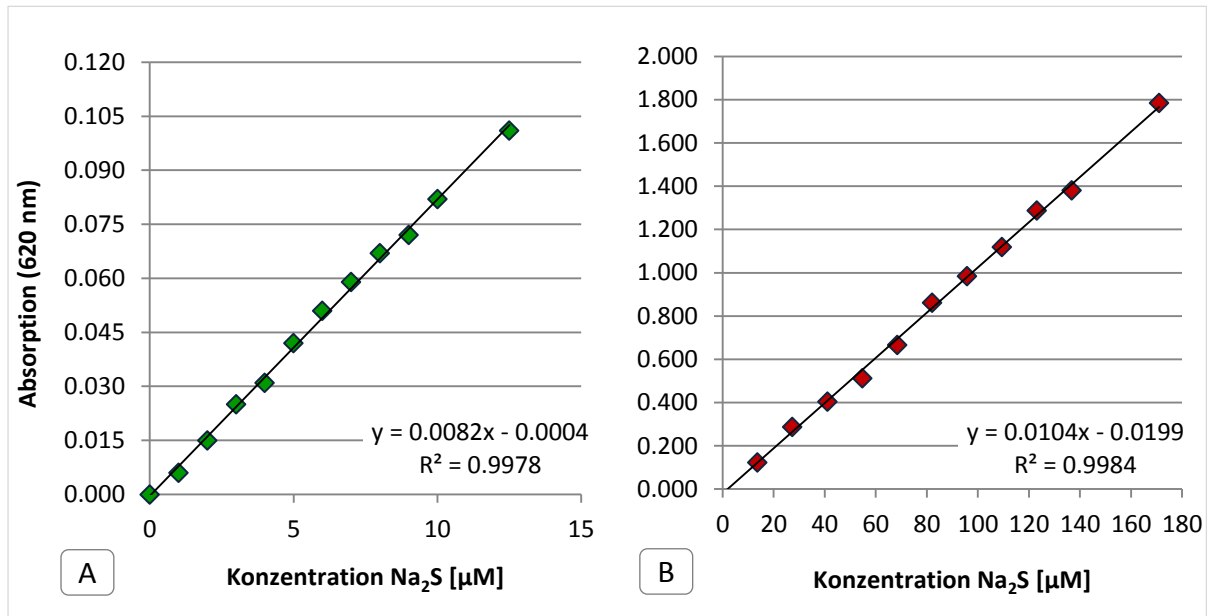


Abb. 17: Kalibriergerade von Standardlösungen (Na₂S) für die Sulfidbestimmung in bakteriellen Nährlösungen in Mikrotiterplatten in zwei Konzentrationsbereichen (0 bis 14 µM [A] und 0 bis 171 µM [B]).

3.3. Bestimmung von MeHg mittels GC-ICP-MS

Die Extraktion von produziertem MeHg aus den flüssigen bakteriellen Nährmedien wurde mithilfe des KOH/MeOH-Reagenz durchgeführt und als Maskierungsreagenz wurde Kupfersulfat/Natriumoxalat eingesetzt. Die Derivatisierung erfolgte bei pH = 4,5 mit NaPr₄B. Die Messungen erfolgten nach Anwendung der Isotopenverdünnungsmethode mithilfe der GC-ICP-MS. Als interner Standard wurde eine Thalliumlösung während der Messung kontinuierlich über einen Nebulizer und eine Spray Chamber in das ICP-MS eingebracht, wobei die Isotope ²⁰⁵Tl und ²⁰³Tl gemessen wurden. Die Signale von Thallium und das resultierende Isotopenverhältnis waren während der Messungen stabil. Für die Konzentrationsberechnung von MeHg waren die Flächen der Signalintensitäten der Isotope ²⁰⁰Hg und ²⁰²Hg maßgebend. Ein Beispiel für ein Chromatogramm nach der Messung einer Probe (flüssiges bakterielles Medium) ist in Abb. 18 dargestellt.

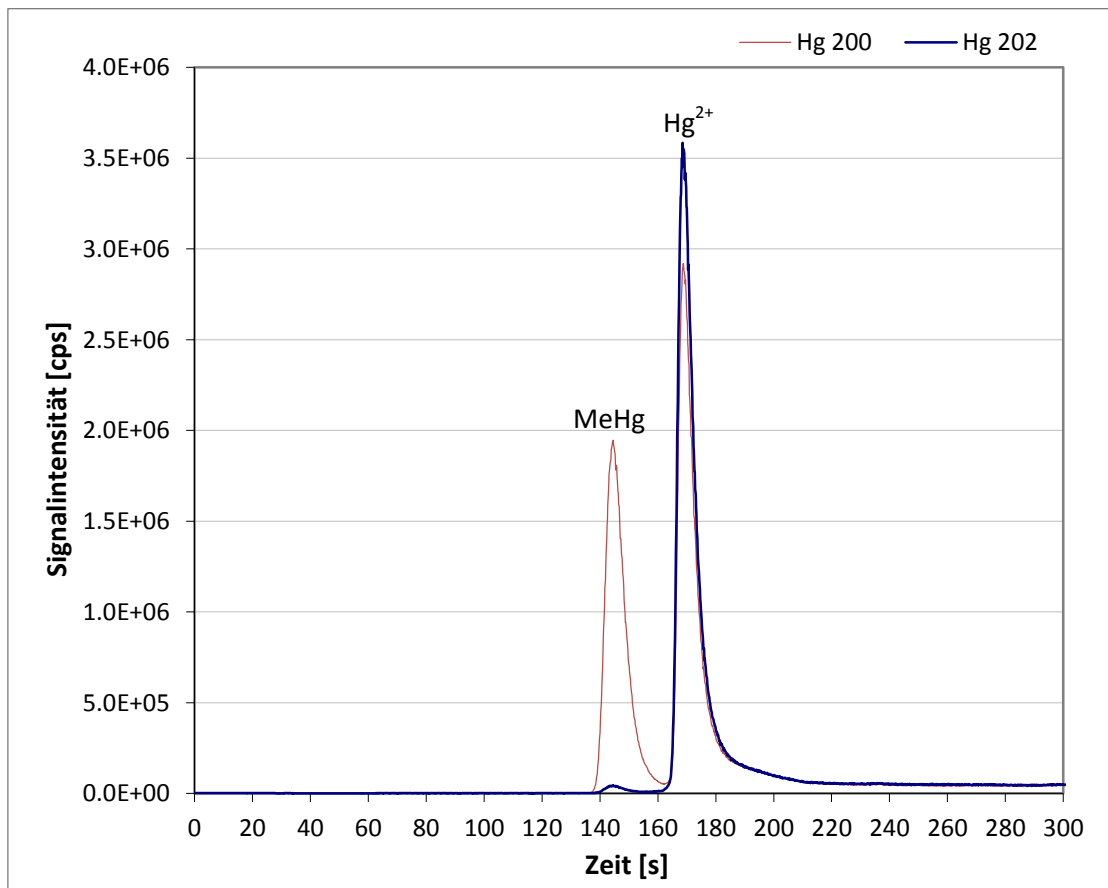


Abb. 18: Chromatogramm der Messung von MeHg und Hg²⁺ mittels SID und GC-ICP-MS. Die Retentionszeiten betragen im Allgemeinen 145 min für MePrHg und 168 min für Pr₂Hg.

Die Nachweisgrenze ist definiert als kleinste Konzentration eines Analyten, die qualitativ erfasst werden kann und im vorliegenden Fall eine Entscheidungsgrenze für das Vorhandensein von MeHg. Die Nachweisgrenze entspricht der dreifachen Standardabweichung einer mindestens 10-fachen, ausreißerfreien Bestimmung einer Leerprobe ohne Diskriminierung von Null- oder negativen Ergebnissen. In der Praxis gilt dabei meistens das dreifache Rauschen der Basislinie einer chromatographischen Auswertung und konnte hier bei 30 pg/mL bestimmt werden. Die Erfassungsgrenze ist die kleinste Konzentration des Analyten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit (95%) nachgewiesen werden kann und beträgt das Doppelte der Nachweisgrenze, also 60 pg/mL. Schließlich wird die Bestimmungsgrenze als kleinste Konzentration eines Analyten definiert, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Oberhalb dieser Bestimmungsgrenze können quantitative Resultate der Analyse angegeben werden und sie entspricht in der Praxis der dreifachen Nachweisgrenze, also 90 pg/mL (Umweltbundesamt, 2005).

Die Wiederfindung von MeHg nach Anwendung der beschriebenen Extraktions- und Messmethode wurde mit einem Referenzmaterial, dem ERM[®] CE-464 Tuna Fish, ermittelt (Tab. 17). Die Wiederfindungsraten lagen bei vier Proben mit einer Einwaage von 0,199 g bis 0,216 g zwischen 98 und 105%. Jede Probe wurde dreimal injiziert, wobei die relative Standardabweichung unter 3,6% lag. Anhand dieser Untersuchung konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Methode für die vorliegende Fragestellung sehr gut geeignet war.

Tab. 17: Wiederfindung des Referenzmaterials ERM[®] CE-464 Tuna Fish nach Anwendung der beschriebenen Extraktion, Derivatisierung und GC-ICP-MS Bestimmung. Die RSD lag bei <3,6% nach drei Injektionen.

ERM [®] CE-464 Tuna Fish Einwaage [g]	MeHg [mg/kg]	MeHg zertifiziert [mg/kg]	RSD [%]	Wiederfindung* m [%]
0,216	5,6 ± 0,18		3,1	102
0,199	5,7 ± 0,07	5,5 ± 0,17	1,3	105
0,199	5,8 ± 0,21		3,6	103
0,202	5,4 ± 0,19		3,5	98

* Wiederfindung: Mittelwert aus drei Messungen in %.

3.4. Methylierung von Hg (II) durch Umweltproben

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um weitere Hinweise darauf zu erhalten, ob hauptsächlich intestinale oder eher bodenlebende Mikroorganismen an der Methylierung von Hg²⁺ beteiligt sind. Dafür wurden mit Vomitus und Darmepithel von *E. foetida* sowie geringe Mengen von Bodenproben in flüssige Nährmedien inokuliert. Nach 7tägigem Wachstum wurden jeweils drei parallele Ansätze zusammengeführt, die für weitere 24 h nach HgCl₂-Zugabe (0,1 mg/L) inkubiert wurden. Die Zellzählung und die Sulfidbestimmungen wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Resultate zeigten, dass in der Kontrolle des unbeimpften Mediums keine Zellen nachgewiesen werden konnten und die Sulfid- sowie MeHg-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Somit kann prinzipiell ausgeschlossen werden, dass durch abiotische Methylierungsprozesse MeHg oberhalb der Nachweisgrenze in den Proben gebildet wurde. Die höchsten MeHg-Gehalte wurden in der Anreicherungskultur aus dem Vomitus mit 980 pg/mL sowie dem Epithel des Intestinaltrakts mit 710 pg/mL bestimmt, während die Konzentration von MeHg in der mit Erde inokulierten Kultur unterhalb der Nachweisgrenze von 30 pg/mL lag. Die Zellzahlen

pro mL in der Kultur mit Darminhalt betrug $8,25 \cdot 10^8$, mit Darmepithel $4,1 \cdot 10^7$ und mit Erdpartikeln $3,7 \cdot 10^7$ Zellen und die Sulfidgehalte jeweils 61, 94 und 220,6 μM .

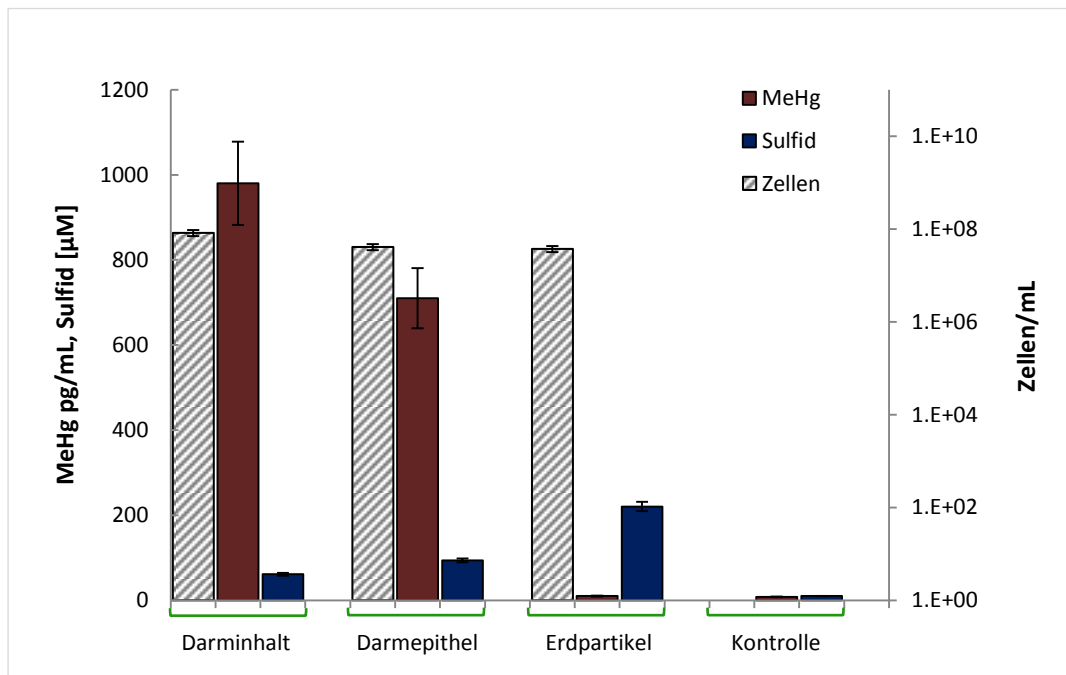


Abb. 19: Methylierung von 0,1 mg/L Hg^{2+} durch Kulturen aus *E. foetida* (Darminhalt, Darmepithel) und Bodenmaterial. Die Kontrolle entspricht nicht-inokuliertem Medium. Die Fehlerbalken repräsentieren die RSD der jeweiligen Methode in %.

Diese Ergebnisse geben einen weiteren deutlichen Hinweis auf die Beteiligung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt an dem Prozess der Methylierung von Hg. Es ist nicht auszuschließen, dass auch durch die Aktivität von bodenlebenden Mikroorganismen in der Erde MeHg gebildet und von dem Oligochaeten dermal aufgenommen werden kann. Diesen Beobachtungen nach zu urteilen, scheint diesem Weg jedoch eine geringere Bedeutung zuzukommen.

3.5. Methylierung von Hg (II) durch bakterielle Kulturen

In dieser Arbeit wurden bakterielle Anreicherungskulturen aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* (EF4), *P. savignyi* (PS1) und einer bisher nicht näher bestimmten Kleinlibellenspezies (Zy1) sowie Reinkulturen intestinaler Sulfat-reduzierender Bakterien auf die Fähigkeit zur Hg (II) Methylierung getestet. Dazu wurden den Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase eine sterile HgCl_2 Lösung zugegeben, sodass die Konzentration im Medium $0,1 \text{ mg/L Hg}^{2+}$ entsprach. Die Kulturen wurden jeweils dreifach angesetzt. Die Mittelwerte der gebildeten MeHg-Konzentrationen, die Sulfid-Gehalte und Zellzahlen der Kulturen sind in Tab. 18 zusammengefasst. Die Herkunft und Bezugsquelle der jeweiligen Stämme ist dabei der Tab. 4 (Material und Methoden) zu entnehmen. Zudem sind die MeHg-Gehalte nach Abzug der Konzentration der jeweiligen Kontrolle dargestellt, außer für die Kultur *Dtm. alkaliphilum*. In jener Kultur waren die MeHg-Werte geringer als in der Kontrolle. Die Ursachen hierfür werden diskutiert. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, wurde in jeder bakteriellen Kultur MeHg oberhalb der Nachweisgrenze von 30 pg/mL detektiert. Die Erfassungsgrenze hingegen betrug für die vorliegende Methode 60 pg/mL . Insgesamt 10 von 14 Kulturen produzierten einen Gehalt von MeHg oberhalb dieser Erfassungsgrenze. Die vier Stämme *Dv. termitidis* DSM 11274, *Dv. termitidis* DSM 5308^T und *Dv. intestinalis* DSM 11275^T produzierten nur maximal $57,4 \text{ pg/mL MeHg}$.

Die Gehalte der nicht-inokulierten Nährlösungen (Kontrollen) lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Ausschließlich die Kontrolle, welche das gleiche Medium enthielt wie für die Inkubation von *Dtm. alkaliphilum* DSM 12257^T verwendet wurde, konnte ein höherer MeHg-Gehalt erfasst werden. In diesem stark alkalischen Medium mit einem pH-Wert von 8,7 betrug der Mittelwert aus drei Parallelen 131 pg/mL . Es ist nicht auszuschließen, dass unter alkalischen Bedingungen MeHg abiotisch gebildet worden ist. Die Fähigkeit zur Methylierung von Hg kann für diesen Stamm daher nicht bestätigt werden.

Die SRB-Kultur *Db. propionicus* DSM 2032^T wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Im Durchschnitt produzierten diese Bakterien $246,4 \text{ pg/mL MeHg}$ bei einem Zelltiter von $1,6 \cdot 10^8 \pm 1,2 \cdot 10^7$ und einem Sulfidgehalt von $41,8 \text{ }\mu\text{M}$.

Tab. 18: Die Messwerte des Screenings zur Produktion von MeHg durch Sulfat-reduzierende Kulturen aus 0,1 mg/L Hg²⁺. Die MeHg-Konzentrationen (außer für die Kultur *Dtm. alkaliphilum*) sind abzüglich der Kontrollen aufgelistet. Für je drei Parallelen wurde der Mittelwert und der Bereich (min-max.) der MeHg-Konzentration sowie die Zellzahl und Sulfidkonzentration im Mittel angegeben.

Kulturen und Stämme	MeHg Mittelwert [pg/mL]	MeHg min-max [pg/mL]	Zellen m [mL ⁻¹]	Sulfid m [µM]
<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DSM 2154 ^T	763,7 ± 437,5	171,7-1215,5	4,4·10 ⁶ ±1,5·10 ⁶	304,7
<i>Desulfovibrio</i> sp. Stamm KMS2/1	273,2 ± 54,9	209,8-343,6	1,8·10 ⁶ ±1,5·10 ⁵	*
<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2032 ^T	246,4 ± 82,6	146,1-348,4	1,6·10 ⁸ ±1,2·10 ⁷	41,8
Anreicherungskultur Zy1	241,5 ± 57,0	163,0-296,7	1,8·10 ⁶ ±1,1·10 ⁶	2,7
<i>Desulfovibrio piger</i> DSM 749 ^T	225,0 ± 79,0	146,1-332,9	1,1·10 ⁷ ±6,3·10 ⁶	8,0
<i>Desulfovibrio giganteus</i> DSM 4370	186,8 ± 28,0	163,9-226,2	1,8·10 ⁷ ±3,4·10 ⁶	217,7
Anreicherungskultur EF4	153,5 ± 21,8	123,4-174,6	3,4·10 ⁶ ±7,9·10 ⁵	15,4
<i>Desulfovibrio termitidis</i> Stamm KH1	149,3 ± 65,7	60,0-216,0	1,5·10 ⁶ ±3,9·10 ⁵	*
<i>Desulfovibrio</i> sp. DSM 7057	112,4 ± 34,4	63,8-138,1	4,1·10 ⁶ ±2,4·10 ⁶	2,9
Anreicherungskultur PS1	92,7 ± 30,7	54,7-130,0	2,4·10 ⁶ ±9,3·10 ⁵	*
<i>Desulfotomaculum alkaliphilum</i> DSM 12257 ^T	87,9 ± 25,6	54,2-116,2	1,5·10 ⁶ ±2,6·10 ⁶	264,8
<i>Desulfovibrio termitidis</i> DSM 11274	32,0 ± 3,1	29,0-35,1	2,1·10 ⁵ ±2,9·10 ⁴	*
<i>Desulfovibrio termitidis</i> DSM 5308 ^T	47,1 ± 0,4	46,6-47,7	1,8·10 ⁶ ±6,2·10 ⁵	*
<i>Desulfovibrio intestinalis</i> DSM 11275 ^T	46,8 ± 8,1	37,9-57,4	3,1·10 ⁵ ±5,1·10 ⁴	*

* Der Wert lag unterhalb der Bestimmungsgrenze von 30 µM.

Bei der Bewertung der Resultate aus Tab. 18 fällt auf, dass die detektierten MeHg-Gehalte einzelner paralleler Ansätze einer Kultur abweichen und in einem relativ weiten Bereich liegen können. Daher sind die einzelnen Resultate der Stämme in den nachfolgenden Diagrammen aufgeschlüsselt (Abb. 20). In der Kultur von *Dtm. ruminis* wurden in zwei Parallelen (a und b) 903 bzw. 1215 pg/mL MeHg und in der dritten Parallele (c) nur 172 pg/mL gemessen. Dabei liegt der Sulfidgehalt in allen Proben dieses Stammes in einem Bereich von 279 bis 333 μM . Ähnlich verhält es sich mit den beobachteten MeHg Gehalten der Kultur von *Db. propionicus*, wobei sich in Ansatz a mehr als doppelt so viel MeHg (348 pg/mL) als in Ansatz c mit 146 pg/mL findet. In Bezug auf *Dtm. alkaliphilum* liegen die Werte in einem Bereich von 54 pg/mL bis 116 pg/mL.

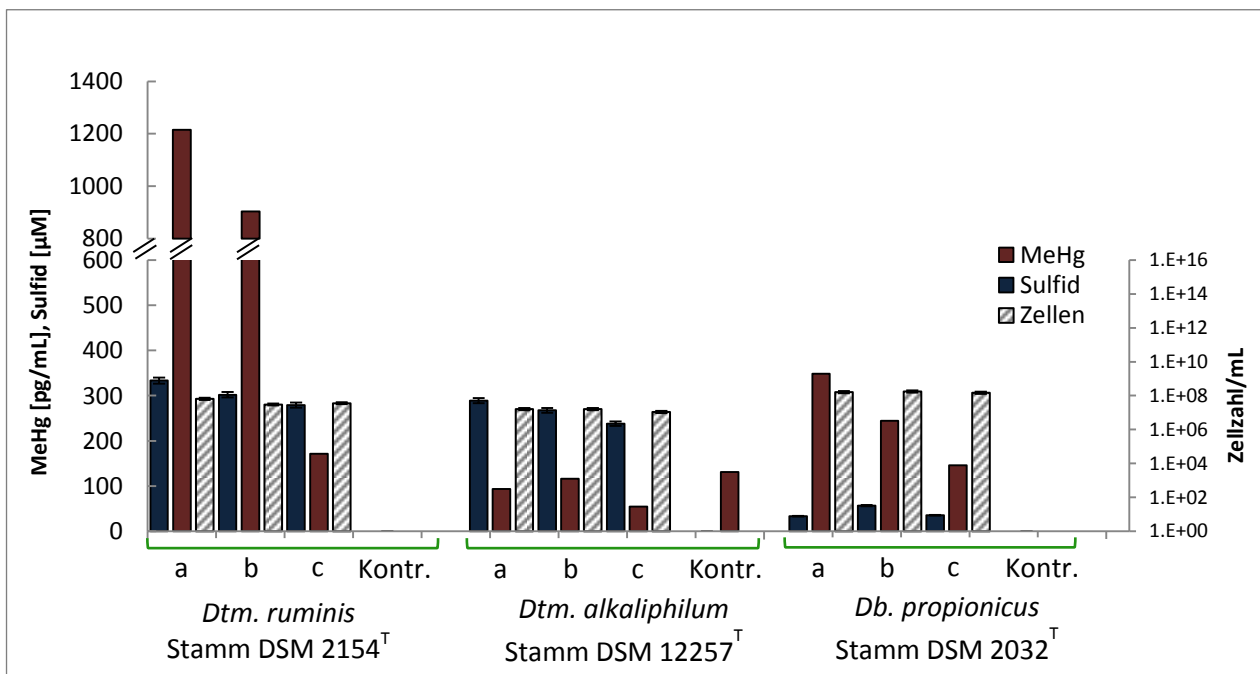


Abb. 20: Produktion von MeHg innerhalb von 12 h aus 0,1 mg/L Hg^{2+} durch *Desulfotomaculum* spp. und *Desulfobulbus* sp. in drei Parallelen (a, b, c) mit jeweils korrespondierenden Kontrollen. Fehlerbalken der Sulfidmessung und Zellzahlbestimmung beziehen sich auf die RSD einer Methode aus drei Messungen in %.

In Abb. 21 ist die Produktion von MeHg durch die parallelen Kulturen der *Desulfovibrio*-Stämme dargestellt, deren MeHg Gehalte oberhalb der Erfassungsgrenze lagen. Von diesen drei Stämmen wies *Dv. piger* die höchsten Konzentrationen von 146 bis 332 pg/mL MeHg bei einer Zellzahl von $1.1 \cdot 10^7 \pm 6.3 \cdot 10^6$ auf. Im Gegensatz dazu wurden in den Kulturen von *Dv. giganteus* die höchsten Sulfidgehalte (bis zu 226 μ M) bei einer MeHg Konzentration von durchschnittlich 186 pg/mL erreicht. *Desulfovibrio* sp., der ursprünglich aus dem Rindermagen isoliert wurde, wies in zwei von drei Parallelen 135 und 138 pg/mL MeHg auf, während der MeHg-Gehalt im dritten Ansatz mit 64 pg/mL unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. In den korrespondierenden Kontrollen konnten weder Zellen nachgewiesen noch Sulfid oder MeHg oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden.

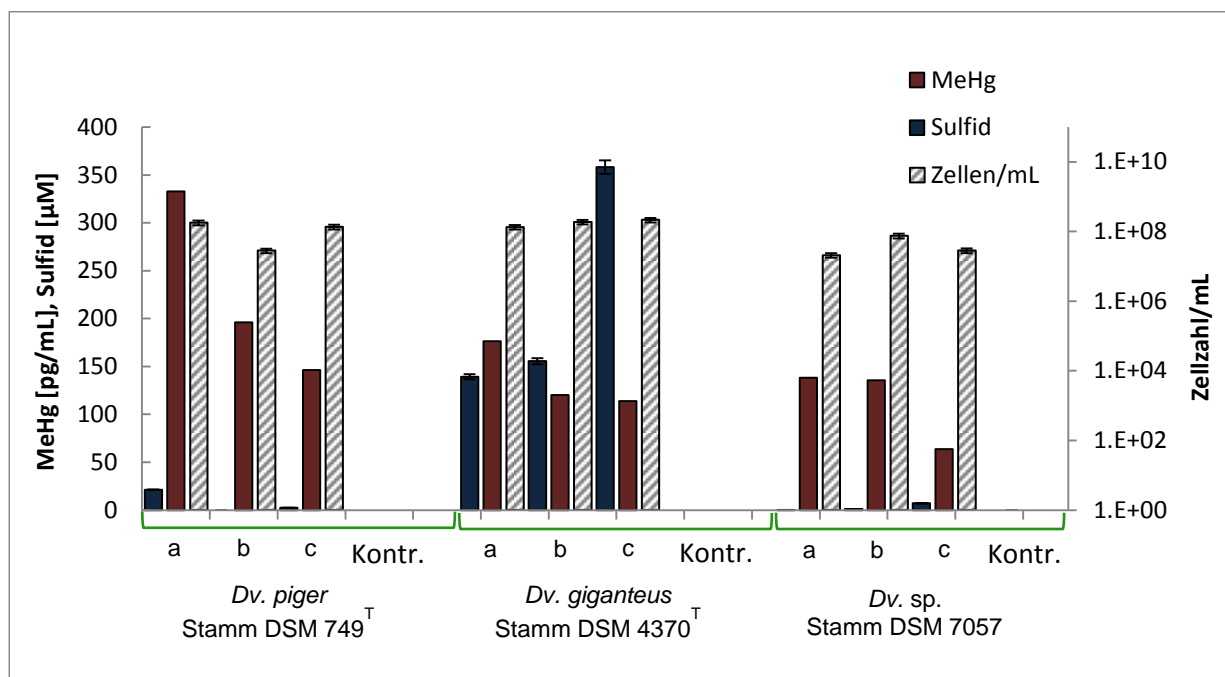


Abb. 21: Die Produktion von MeHg innerhalb von 12 h aus 0,1 mg/L Hg^{2+} durch *Desulfovibrio* spp. in drei parallelen Kulturen (a, b, c) mit jeweils korrespondierender Medien-Kontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die RSD für die Methode der Sulfidbestimmung und Zellzählung in %.

Dies bestätigte sich ebenso für die weiteren Medien-Kontrollen, die neben Eigenisolaten und Kulturen aus der institutseigenen Stammsammlung parallel mitgeführt wurden und keine messbaren Größen an MeHg, Sulfid oder Zellen aufwiesen.

Die inokulierten Kulturen intestinaler SRB hingegen produzierten einen MeHg-Gehalt von mind. 55 pg/mL, wobei die Isolate *Dv. sp.* KMS/1 aus *Mastotermes darwiniensis*, Zy1 aus

einer Zygotera-Larve sowie *Dv. termitidis* KH1 die höchsten MeHg-Gehalte im Bereich von 60 – 344 pg/mL erreichten (Abb. 22). Die zwei Kulturen aus *E. foetida* und *P. savignyi* (EF4 und PS1) enthielten MeHg – Konzentrationen in einem Bereich von 55 – 171 pg/mL.

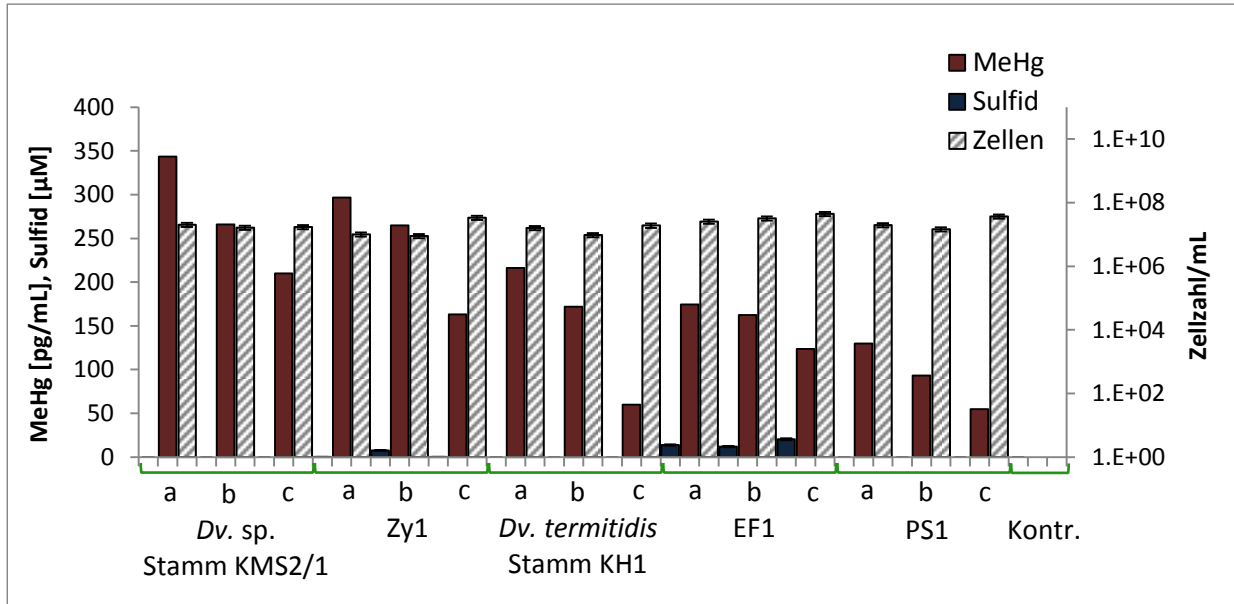


Abb. 22: Die Produktion von MeHg innerhalb von 12 h aus 0,1 mg/L Hg^{2+} durch Anreicherungskulturen und SRB in drei parallelen Kulturen (a, b, c) mit korrespondierender Medien-Kontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die RSD für die Methode der Sulfidbestimmung und Zellzählung in %.

3.6. Desulfovirdin-Nachweis

Einige Kulturen wurden auf die Präsenz von Desulfovirdin, einer speziellen Sulfitreduktase, die ausschließlich von der Gattung der *Desulfovibrio* exprimiert wird, getestet. Als negative Kontrollkulturen wurden *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli* K12 und als positive Referenz *Desulfovibrio* sp. eingesetzt. In den Anreicherungskulturen von *E. foetida*, *P. savignyi*, einer bisher nicht näher bestimmten Zygotera- Art und *Desulfovibrio* sp. (siehe Tab. 4 in *Material und Methode*) wurde eine rote Fluoreszenz beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass in den genannten Kulturen Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* vorkamen.

3.7. Identifizierung von Mikroorganismen

Aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* wurden verschiedene bakterielle Kulturen in Nährmedien mit 1 mg/L Hg^{2+} angereichert. Die Identifizierung erfolgte nach der DNA-Extraktion mithilfe der DGGE-Analyse. Distinkte Banden wurden ausgeschnitten, eluiert und ggf. sequenziert. Die Auswertung einer DGGE ist in Abb. 23 gezeigt, wobei verschiedene Isolate aus *E. foetida* nach Kultivierung im Medium DSMZ 63 unter Zugabe von 1 ppm Hg^{2+} analysiert wurden. Bei diesen Kulturen handelte es sich um vier Anreicherungskulturen (EF1 bis EF4). Die experimentellen Vorgänge der DNA-Extraktion, PCR und DGGE wurde hierbei in jeweils zwei Parallelen (a und b) durchgeführt, um die methodische Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

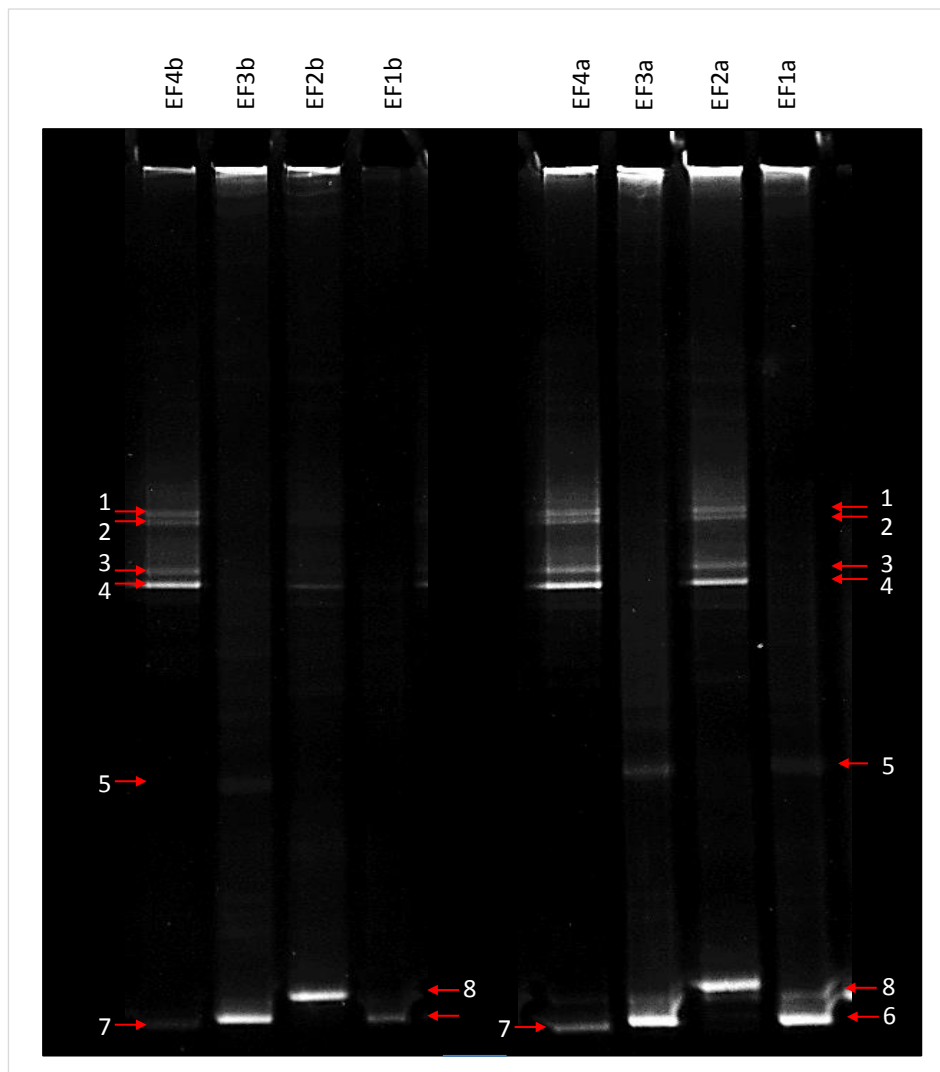


Abb. 23: DGGE-Analyse von vier Anreicherungen aus *E. foetida* in je zwei parallelen Ansätzen (a und b). Distinkte Banden auf den nummerierten Positionen wurden auf Basis der 16S rDNA identifiziert: *Clostridium* sp./ *Sporomusa* sp. (1, 2, 4), *Pseudomonas* sp. (5, 6, 8) und *Desulfovibrio* sp. (7).

Anhand des Gelbildes (Abb. 23) ist zunächst zu beobachten, dass die parallelen Ansätze der Kulturen EF3a/b und EF4a/b gleiche Muster aufwiesen. In Kultur 1b ist auf Position 8 keine Bande zu erkennen. In Kultur EF2b waren die Positionen 1, 2 und 4 bereits während der Geldokumentation nur noch äußerst schwach erkennbar. Prinzipiell scheint die DGGE unter diesen Bedingungen unter Verwendung eines denaturierenden Gradienten von 60%/40% reproduzierbare Resultate zu liefern.

Die Sequenzierung der distinkten Banden war nicht in jedem Fall erfolgreich. Die Färbung der Agarosegele erfolgte mit Ethidiumbromid. Anschließend wurden gut sichtbare Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die Nukleotidsequenzen in Wasser eluiert. Dennoch schien die Färbung mit Ethidiumbromid, einer in Nukleinsäuren interkalierenden Substanz, die Sequenzierung zu stören. Eine Silberfärbung als Alternative erbrachte keine besseren Resultate. Somit konnte die Bande auf Position 3 (Abb. 23) keiner Sequenz zugeordnet werden. Die Nukleotidsequenzen, die sequenziert werden konnten, wurden einem multiplen Alignment unterzogen. Der Abgleich in Gen-Datenbanken wies in der Regel eine Vielzahl von Treffern auf. Im Allgemeinen können die taxonomischen Identitäten sehr eng beieinander liegen. Für die Definition einer distinkten Art in Bezug auf Mikroorganismen wie Bacteria und Archaea sind die Sequenzen der 16S rDNA maßgebend, die sich in einem Bereich von bis zu 3% unterscheiden sowie die DNA-DNA Hybridisierung, die <70% betragen kann (Staley, 2006). Bei manchen Organismen ist die Übereinstimmung jedoch sehr hoch, so dass die Zuordnung einer Art kritisch geprüft und die Resultate des BLAST-Vorgangs zumindest als Hinweis auf eine Artzugehörigkeit gedeutet werden kann. In den Anreicherungskulturen EF1 bis EF4 wurden Organismen identifiziert, die nach NCBI-Datenbankrecherche *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas jinjuensis*, *Dv. africanus*, *Clostridium* sp. und *Sporomusa* sp. zugeordnet werden konnten. Die nachfolgende Tab. 19 fasst diese Resultate nach der Sequenzierung distinkter Banden aus der DGGE (Abb. 23) zusammen, wobei auf die Bandenpositionen im Gelbild verwiesen wird. Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass einige Fragmente der 16S rDNA unterschiedlicher Kulturen die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit im DGGE-Gel aufwiesen. Dieses Resultat war zunächst ein Indiz dafür, dass es sich bei gleichen Bandenposition um dieselbe Spezies handelte. Die Sequenzierung zeigt diesbezüglich sehr gute Übereinstimmung. So konnte z.B. in Kultur 4a und 4b auf den Positionen 1, 2, 4 und 8 durch jeweils unabhängige Probenvorbereitung und Sequenzierung der gleiche Organismus identifiziert werden. Theoretisch entspricht jede Bande einer

Bakterienspezies (Muyzer, 1999). Es ist jedoch möglich, dass aufgrund der Vielzahl der 16S rRNA-Kopien in einem Organismus oder durch bestehende Punktmutationen auch unterschiedliche Bandenpositionen genau einer Spezies entsprechen können. In diesem Experiment konnten mindestens zwei verschiedenen Gattungen bis zu drei Bandenpositionen zugeordnet werden. Es handelte sich dabei z.B. um *Pseudomonas* sp. auf den Positionen 5, 6 und 8. Hierbei könnte es sich auch um verschiedene Arten oder Stämme handeln. Ein weiterer Mikroorganismus war ebenfalls auf drei Positionen zu finden (1, 2 und 4) und wurde in den Kulturen EF2 und EF4 gefunden. Hierbei ist auffällig, dass eine maximale Übereinstimmung nur zu 96% zu *Clostridium* sp. bzw. *Sporomusa* sp. bestand. Wie bereits erläutert, werden Bakterien als distinkte Arten definiert, wenn eine 16S rRNA Identität von weniger als 97% vorliegt. Die morphologischen Untersuchungen deuteten auf einen stäbchenförmigen Organismus mit terminaler Sporenbildung hin, wie es für Clostridien typisch sein kann (Ottow, 2011). Es ist dennoch möglich, dass es sich bei diesem Organismus auch um eine andere sporenbildende Art handeln kann.

Ein äußerst interessanter Befund ist jedoch der Nachweis einer Sequenz, die eine hohe Übereinstimmung (98%) mit *Dv. africanus* aufweist. Dass im Intestinaltrakt von Kompostwürmern (der vorliegenden Kultur) und in deren Lebensraum Boden wahrscheinlich keine Sulfat-reduzierenden Bakterien vorkommen (Knopf, 2010), könnte hiermit in Frage gestellt werden.

Nach Zusammenstellung der Resultate (Tab. 19) aus den zwei Parallelen (EF1a/1b bis EF4a/4b), waren folgende Spezies in den Anreicherungskulturen aus *E. foetida* EF1 bis EF4 vorhanden, wobei die Bande auf Position 3 nicht identifizierbar war (siehe DGGE, Abb. 23):

EF1: Positionen 5, 6, 8: *Pseudomonas* sp. bzw. *Pseudomonas jinjuensis*.

EF2: Positionen 1, 2, 3, 4, 8: naher Verwandter von *Clostridium* sp. oder *Sporomusa* sp., *Pseudomonas* und ein unbekannter Organismus.

EF3: Positionen 5, 6, 8: wie EF1

EF4: Positionen 1, 2, 3, 4, 7, 8: *Pseudomonas* sp., *Dv. africanus* und ein naher Verwandter von *Clostridium* sp. oder *Sporomusa* sp.

Die Identifizierung von Kultur EF4 ist von besonderer Bedeutung, da diese Kultur identisch mit jener ist, die für die Untersuchung der Methylierung von Hg(II) verwendet wurde und unter den Versuchsbedingungen aus 0,1 ppm Hg²⁺ durchschnittlich 154 pg/mL MeHg produzierte (siehe Kap. 3.5. *Methylierung von Hg (II) durch bakterielle Kulturen*).

Tab. 19: Identifizierung anaerober Kulturen EF1 bis EF4 aus *E. foetida* (Wachstum im DSMZ Medium 63 mit 1ppm HgCl₂) nach DGGE auf Basis der 16S rRNA-Analyse. Angabe von max. zwei Spezies höchster Übereinstimmung (in %) laut Datenbankrecherche mit NCBI.

Kultur	DGGE Bandenposition ¹	16S rDNA-Identifizierung Nächste verwandte Mikroorganismen	Accession Number (NCBI)	bp/bp _{Ref} ²	Identität [%]
EF1a	5	<i>Pseudomonas</i> sp.	AF468449.1	482/482	100
		<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927.1	481/481	100
EF1b	6	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927.1	486/487	99
		<i>Pseudomonas</i> sp.	AF468449.1	485/487	99
EF2a	4	<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	462/480	96
		<i>Sporomusa termitida</i>	HE582745.1	462/482	96
	8	<i>Pseudomonas</i> sp.	JX298094.1	467/468	99
EF2b	8	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	JF461538.1	467/468	99
		<i>Pseudomonas</i> sp.	JX298094.1	485/485	100
EF3a	6	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927.1	469/469	100
	8	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927.1	464/464	100
EF4a	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	AF468449.1	463/464	99
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	462/480	96
	2	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	466/487	96
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	461/480	96
	4	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	466/488	96
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	449/467	96
	7	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	454/475	96
<i>Desulfovibrio africanus</i>		EU659693.1	457/463	99	
EF4b	1	<i>Desulfovibrio</i> sp.	HQ693573.1	443/464	99
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	462/480	96
	2	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	466/487	96
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	462/480	96
	4	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	465/486	96
		<i>Clostridium</i> sp.	HM755724.2	462/480	96
	7	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432.1	463/484	96
<i>Desulfovibrio africanus</i>		EU659693.1	396/404	98	
		<i>Desulfovibrio</i> sp.	HQ693573.1	376/392	96

¹Bandenpositionen beziehen sich auf Abb. 23.

²bp/bp_{Ref} gibt die Übereinstimmung der Kultur-Sequenzlänge in Basenpaaren (bp) zu den Referenz-Sequenzen aus dem Nukleotiden-BLAST (NCBI) wider. Die PCR erfolgte mit dem Primerpaar 519f/1070r.

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Kulturen aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* nach dem soeben geschilderten Prinzip identifiziert und in Tab. 20 zusammengefasst (DGGE nicht gezeigt). Die Anreicherung dieser Mikroorganismen wurde in DSMZ Medium 63 unter anaeroben Bedingungen vorgenommen.

Tab. 20: Identifizierung der anaeroben Kulturen EF5 bis EF12 aus *E. foetida* (Wachstum im DSMZ Medium 63 mit 1ppm HgCl₂) nach DGGE auf Basis der 16S rRNA-Analyse. Angabe von max. zwei Spezies höchster Übereinstimmung (in %) laut Datenbankrecherche mit NCBI.

Kultur	Distinkte Bande DGGE	16S rDNA-Identifizierung Nächste verwandte Mikroorganismen	Accession Number (NCBI)	bp/bp _{Ref} [*]	Identität [%]
EF5	EF5a	<i>Enterobacter</i> sp.	HQ231920	953/955 ²	99
		<i>Pantoea agglomerans</i>	AY941834	952/955 ²	99
	EF5b	<i>Enterobacter</i> sp.	HQ231920	960/964 ²	99
	EF5c	<i>Enterobacter</i> sp.	JF346894	939/939 ²	100
<i>Citrobacter freundii</i>		AB741675	939/939 ²	100	
EF6	EF6a	<i>Enterobacter</i> sp.	GU272393	919/921 ²	99
		<i>Enterobacter asburiae</i>	EU221358	919/921 ²	99
		<i>Pantoea agglomerans</i>	AY941834	919/921 ²	99
	EF6b	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927	848/851 ²	99
		<i>Pseudomonas</i> sp.	AF468449	848/851 ²	99
	EF7	EF7a	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927	889/890 ²
<i>Pseudomonas</i> sp.			AF468449	888/890 ²	99
EF7b		<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927	894/894 ²	100
EF8		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AM293679	628/628 ²	100
		<i>Pseudomonas</i> sp.	JX133179	627/628 ²	99
EF9	EF9a	<i>Pseudomonas jinjuensis</i>	AB681927	487/487 ³	100
		<i>Pseudomonas</i> sp.	JX133179	481/487 ³	99
	EF9b	<i>Clostridium</i> sp.	HM755724	450/470 ³	96
		<i>Sporomusa sphaeroides</i>	HE966432	451/472 ³	96
		<i>Sporomusa ovata</i>	NR_028927	452/473 ³	96
EF10	EF10a	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	JQ271545	412/412 ³	100
	EF10b	<i>Clostridium</i> sp.	AB673452	411/411 ³	100
		<i>Clostridium</i> sp.	FJ384378	475/475 ³	100
	EF10c	<i>Clostridium intestinale</i>	AY781385	475/475 ³	100
EF11		<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	GQ243738	436/439 ³	99
EF12		<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	CP001336	419/419 ³	100
		<i>Desulfitobacterium frappieri</i>	AF320982	419/419 ³	100

^{*}Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit Primerpaar ²Eub5/1070r und ³519f/1070r.

Interessante Resultate zeigten sich in der Anreicherungskultur EF10 und EF13, in denen ebenfalls SRB nachgewiesen werden konnten. Nach Vergleich der 16S rDNA liegt die Identität des Isolates EF10 mit *Desulfotomaculum* sp. sowie EF13 mit *Desulfitobacterium hafniense* bzw. *Desulfitobacterium frappieri* bei 100%. Insgesamt wurden mit *Dv. africanus* drei verschiedenen Gattungen der Sulfat- und Sulfit-reduzierenden Bakterien im Intestinaltrakt von *E. foetida* identifiziert.

Neben den Kulturen EF1 bis EF13, die unter anaeroben Bedingungen in DSMZ Medium 63 kultiviert werden konnten, wurden außerdem aerobe Isolate gewonnen, die hauptsächlich

auf King's Agar oder in PAE-Medium überführt und kultiviert wurden. Die Vereinzelmethode von Mikroorganismen durch die 3-Strich Technik auf festen Nährböden unter sterilen Bedingungen wurde zur Gewinnung von Reinkulturen verwendet. In der nachfolgenden Tab. 21 sind die aeroben Isolate EF13 bis EF23 aus *E. foetida* zusammengefasst, die zumeist in Reinkultur gebracht werden konnten. Die Identifizierung erfolgte mithilfe der PCR mit dem Primerpaar 338f/1392r und anschließender Sequenzierung nach Sanger et al. (1977).

Tab. 21: Identifizierung aerober Kulturen EF13 bis EF23 aus *E. foetida* (Wachstum in PAE Medium oder King's Agar mit 1ppm HgCl₂) nach DGGE auf Basis der 16S rRNA-Analyse. Angabe von max. zwei Spezies höchster Übereinstimmung (in %) laut Datenbankrecherche mit NCBI.

Kultur	Distinkte Bande DGGE	Reinkultur*	16S rDNA-Identifizierung		Accession Number (NCBI)	bp/bp _{Ref} *	Identität [%]
			Nächste verwandte Mikroorganismen				
EF13 ¹	✓	✓	<i>Citrobacter freundii</i>		AB741693.1	929/931	99
			<i>Citrobacter</i> sp.		FJ159441.1	929/931	99
EF14 ¹	✓	✓	<i>Pseudomonas</i> sp.		JN541208.1	962/963	99
			<i>Pseudomonas putida</i>		JX122835.1	962/963	99
EF15 ²	✓		<i>Paenibacillus</i> sp.		AY728023.1	600/601	99
EF16 ²	✓	✓	<i>Pseudomonas putida</i>		JQ835839.1	425/426	99
EF17 ¹	✓	✓	<i>Enterobacter</i> sp.		JF772075.1	829/830	99
EF18 ¹	✓	✓	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>		JQ958841.1	725/726	99
			<i>Cellulosimicrobium funkei</i>		JQ659856.1	725/726	99
			<i>Cellulosimicrobium</i> sp.		HE575927.1	725/726	99
EF19 ²	✓	✓	<i>Streptomyces</i> sp.		JX007992.1	766/768	99
EF20 ²	✓	✓	<i>Bacillus subtilis</i>		JX499253.1	984/986	99
			<i>Bacillus</i> sp.		JX402441.1	984/986	99
EF21 ¹	✓	✓	<i>Citrobacter freundii</i>		AB741693.1	818/818	100
			<i>Citrobacter</i> sp.		AB741695.1	818/818	100
EF22 ²	✓	✓	<i>Bacillus subtilis</i>		JN660084.1	818/818	100
			<i>Bacillus methylotrophicus</i>		JQ023616.1	818/818	100
EF23 ¹	✓		<i>Pseudomonas</i> sp.				
			<i>Pseudomonas</i>		JN541208.	833/834	99
			<i>plecoglossida</i>		JX280926.	833/834	99

*nach den Ergebnissen aus morphologischen und molekularbiologischen Untersuchungen (PCR, DGGE, Sequenzierung) handelt es sich um Reinkulturen. Die PCR erfolgte mit dem Primerpaar 338f/1392r.

¹Anreicherung in King's Medium oder ²PAE-Medium.

Die aeroben sowie die anaeroben Isolate aus dem Oligochaeten wurden anhand der zugrunde liegenden 16S rRNA (siehe Anhang) in einem phylogenetischen Stammbaum

dargestellt (Abb. 24). Dieser wurde nach einem multiplen Alignment auf Basis einer Distanzmatrix mit dem Neighbor-Joining Verfahren erstellt.

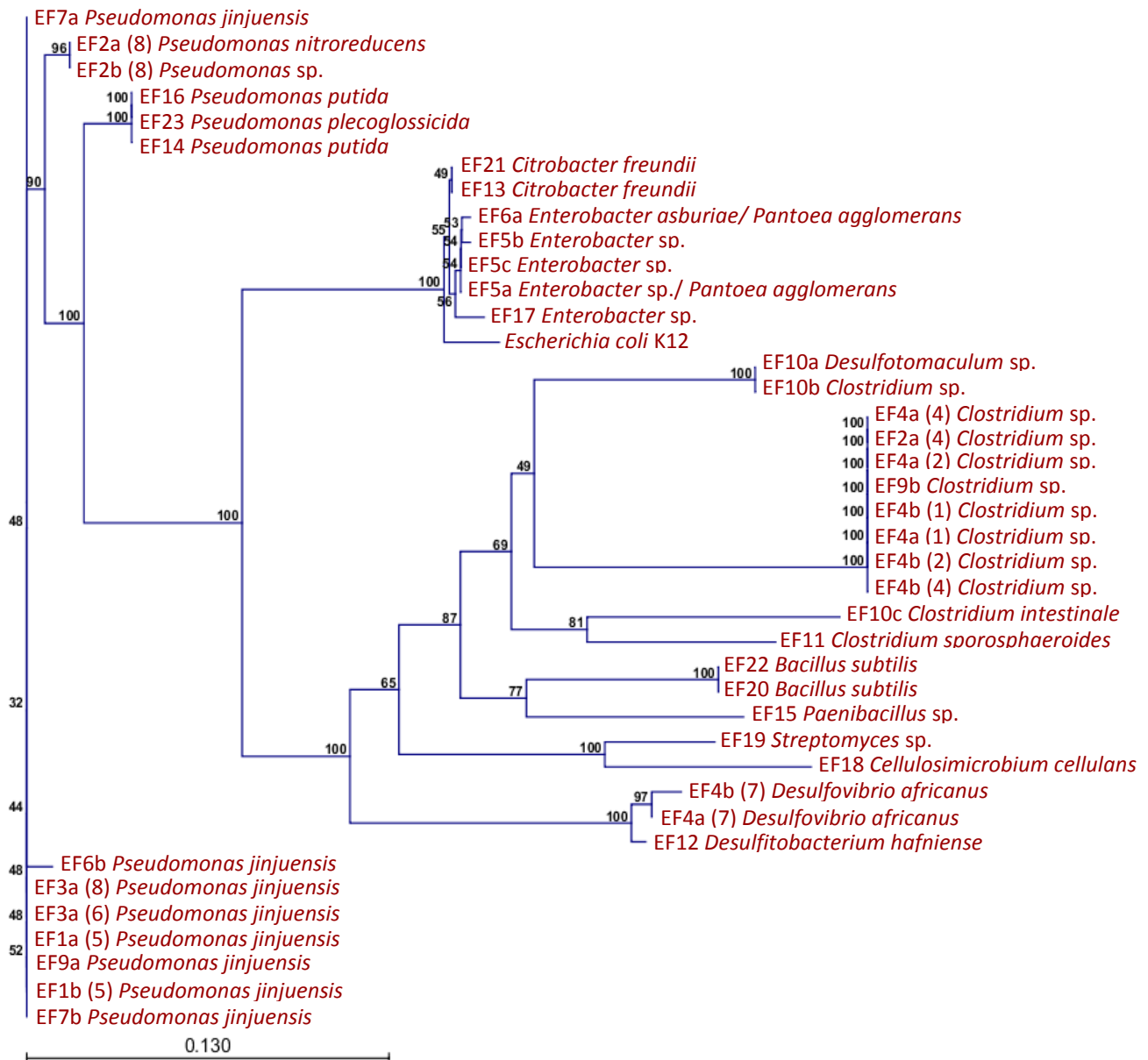


Abb. 24: Phylogenetischer Stammbaum der isolierten oder angereicherten Kulturen aus *E. foetida*. Die 16S rRNA von *Escherichia coli* K12, als typischer Modellorganismus, wurde als Outgroup eingesetzt.

Im Rahmen der phylogenetischen Analyse der bakteriellen Isolate und Anreicherungen aus *E. foetida* wurden erfolgreich Mikroorganismen verschiedener Taxa identifiziert. Darunter befanden sich Kulturen, die eine sehr hohe Übereinstimmung mit den Pseudomonadaceae aufweisen, welche neben den Enterobacteriaceae (*Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.* sowie

dem Vergleichsorganismus *Escherichia coli* K12) zu den γ -Proteobacteria zählen. *Streptomyces* sp. und *Cellulosimicrobium* sp. befinden sich in einem Cluster der Actinobacteria, eines der artenreichsten Phyla unter den kultivierbaren Bakterien. Weitere Gram-positive Bakterien wurden aus dem Phyla sporenbildender Firmicutes mit *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. und *Desulfotomaculum* sp. identifiziert. In einem weiteren Ast befindet sich die Art *Dv. africanus* aus der δ -Proteobacteria-Gruppe, die ebenfalls erfolgreich in einer Anreicherungskultur aus dem Vomit von *E. foetida* kultiviert werden konnte. In phylogenetischer Nähe wird *Desulfitobacterium hafnienses*, ein Vertreter der Firmicutes, gruppiert. Es ist anzunehmen, dass diese eher ungewöhnliche Einordnung darauf zurückzuführen ist, dass die 16S rRNAs, die der Berechnung des Stammbaums zugrunde liegen, nicht vollständig sequenziert vorlagen (siehe Anhang). Diese zahlreichen Kulturen vermitteln einen Eindruck der beachtlichen Diversität von Mikroorganismen im Intestinaltrakt von *E. foetida*.

3.8. Lokalisation von Hg im histologischen Dünnschnitt

Im Rahmen der LA-ICP-MS Untersuchungen wurde das Ziel verfolgt, angereichertes Hg im Gewebe von *E. foetida* zu detektieren. Die Würmer wurden 10 Tage in Hg(II)-haltiger Erde (6 mg/kg) bzw. die Kontrollen in Erde ohne Zugabe von Hg inkubiert. Nach der Vorbereitung der Kompostwürmer für die Messungen wurden von den gefrorenen Präparaten mithilfe eines Kryotoms bei -20°C histologische Querschnitte angefertigt. Die Schnittdicke betrug $18\ \mu\text{m}$. Der Vorteil dieser Cryosektion bestand darin, dass das Gewebe für den Vorgang des Schneidens nicht in stabilisierende Matrix eingebettet werden musste und damit das Risiko einer Kontamination aus dieser Quelle vermieden wurde. Vor diesem Hintergrund wurde auch auf eine nachträgliche Anfärbung der Schnitte verzichtet. Um das Gewebe unter dem Lichtmikroskop dennoch kontrastreich darzustellen, wurde eine grüne Lichtquelle (550 nm) verwendet. In Abb. 25 ist der Querschnitt abgebildet, innerhalb dessen charakteristische Kompartimente eines Oligochaeten erkennbar sind: Die äußere Epidermis mit Cutikula, der ausgeprägte Hautmuskelschlauch, das Coelom, die Gastrodermis sowie die typische Struktur des ventralen Subneuralgefäßes bzw. Bauchmarkes (Storch und Welsch, 2002). Der in Abb. 25 erkennbare Darmkanal war vollständig entleert, nachdem die Anneliden vor der Präparation 48 h auf feuchter Watte gehalten wurden. Das Entfernen der Erdpartikel ist die Voraussetzung für die störungsfreie Herstellung feiner Schnitte und zur Minimierung von Hg-Kontaminationen durch Bodenpartikel.

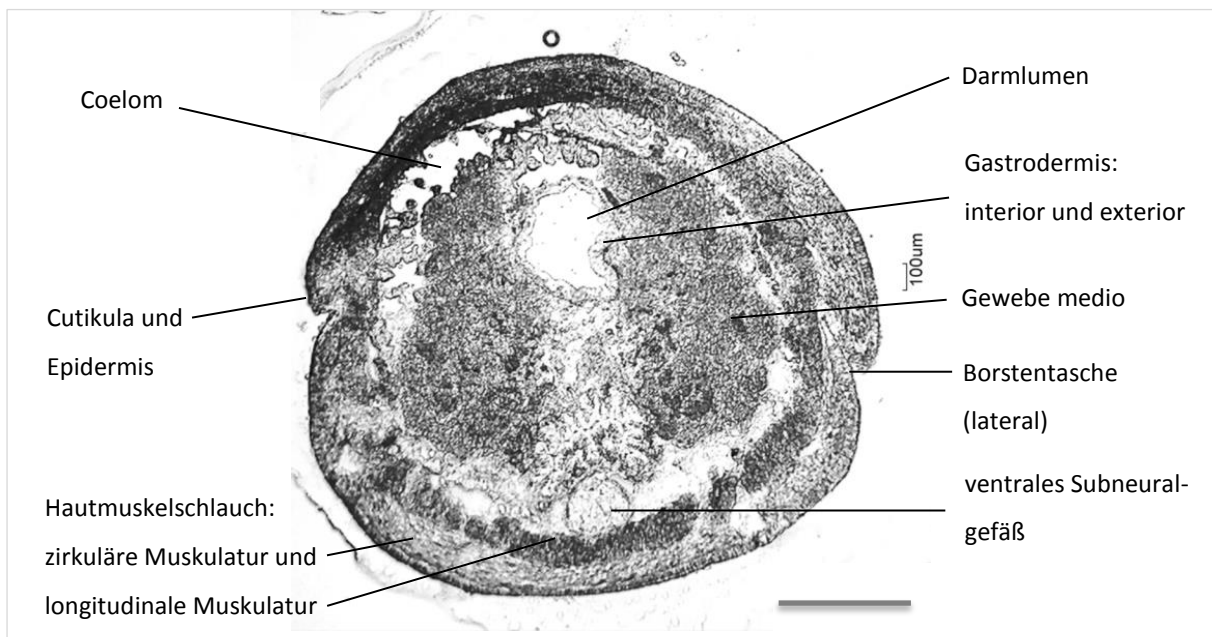


Abb. 25: Ein ungefärbter histologischer Querschnitt ($18\ \mu\text{m}$ Dicke) eines adulten *E. foetida* unter dem Lichtmikroskop, Skala = $500\ \mu\text{m}$.

Für die Detektion von Hg im Präparat mittels LA-ICP-MS wurde der histologische Dünnschnitt in der Probenkammer so positioniert, dass ein präzise ausgewählter Bereich ablatiert werden konnte. Das ablatierte Material wurde mittels eines Ar-Gasstroms direkt dem ICP-MS zugeführt und die Auswertung erfolgte über die Ermittlung der Signalintensität des Gesamtquecksilbers. Eine Hg-Speziation war mit Anwendung dieser Methode nicht möglich, da nach dem Laserbeschuss die Spezies nicht erhalten bleiben. Zudem kann die Quantifizierung von Hg-Spezies nur nach Derivatisierung und der Selektion mithilfe einer GC erfolgen. Der energiereiche fokussierte Laser hinterließ nach der Ablation auf dem Material charakteristische Spots oder Krater, die im analysierten Gewebe unter dem Lichtmikroskop deutlich erkennbar waren (siehe Abb. 26).

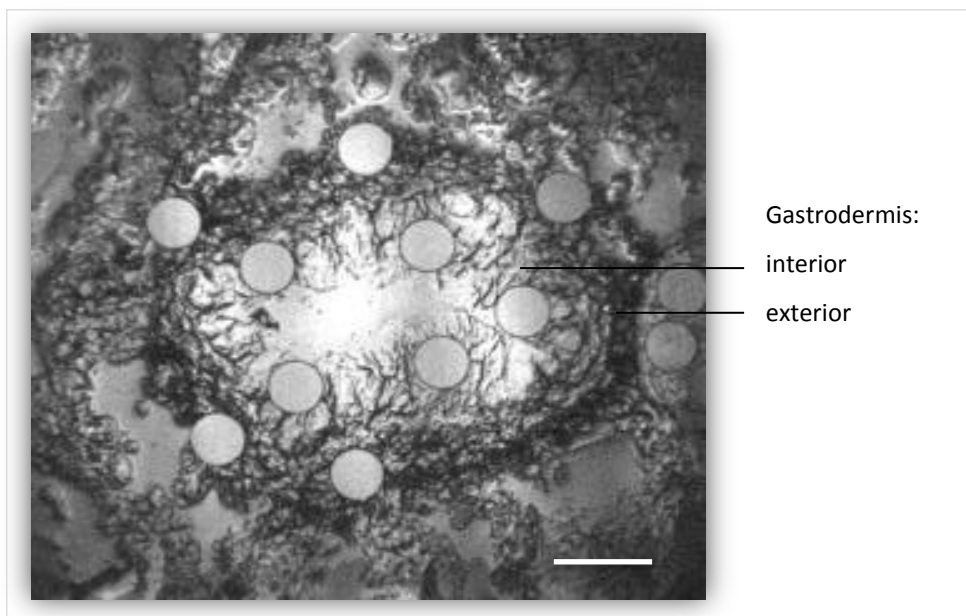


Abb. 26: Histologischer Dünnschnitt von *E. foetida* nach Anwendung der LA-ICP-MS. Das ablatierte Gewebe ist als Spot erkennbar, die 50 µm im Durchmesser betragen (Skala = 100 µm).

Die Auswertung der Gesamtquecksilber-Signalintensitäten der Gewebespoten von 50 µm Durchmesser ist in Abb. 27 gezeigt. Es wurden zwei Dünnschnitte (18 µm) von *E. foetida* im mittleren sowie im hinteren Segment untersucht. Die Signalintensitäten des Quecksilbers in Kontrollen, d.h. in Gewebe von *E. foetida*, welche in Boden ohne Zugabe von HgCl₂ gehalten wurden, waren minimal und lagen knapp über dem Basislinienrauschen im Chromatogramm. Diese Kontrollwerte wurden von den Messwerten der Präparate aus dem HgCl₂-kontaminiertem Boden subtrahiert. Im Gegensatz zu den Kontrollen wurden in den histologischen Dünnschnitten von *E. foetida* aus HgCl₂-haltigem Boden relativ hohe

Quecksilberintensitäten in einem Bereich von 463 bis 3403 cps erfasst. Die zwei unterschiedlichen Proben wiesen dabei in den Kompartimenten des Hautmuskelschlauchs, dem Gewebe, der Gastrodermis sowie dem Subneuralgefäß vergleichbare Intensitäten des Quecksilbersignals auf. Ausschließlich im Vergleich des mittleren Gewebes sind geringe Abweichungen zwischen den zwei Proben zu beobachten. In jedem Kompartiment wurden fünf Messungen durchgeführt, wobei die Spots in geringem Abstand voneinander positioniert wurden, um möglichst analoge Gewebsstrukturen zu analysieren. Die Standardabweichung des Mittelwertes aus der Messung von fünf Spots war die Grundlage für die Darstellung von Fehlerbalken in Abb. 27. Anhand dieser Fehlerbalken können signifikante Signal-Unterschiede erfasst werden. Die Gliederung der Messwerte nach Intensität und Kompartiment weist auf ein äußerst interessantes Ergebnis hin: Es ergeben sich drei signifikante Gruppen unterschiedlicher Intensitätsbereiche, wobei die höchsten Intensitäten mit 2473 bis 3403 cps in der Gastrodermis detektiert wurden (Abb. 27.1). Die geringsten Werte (463 bis 780 cps) wurden in dem äußeren zirkulären und longitudinalen

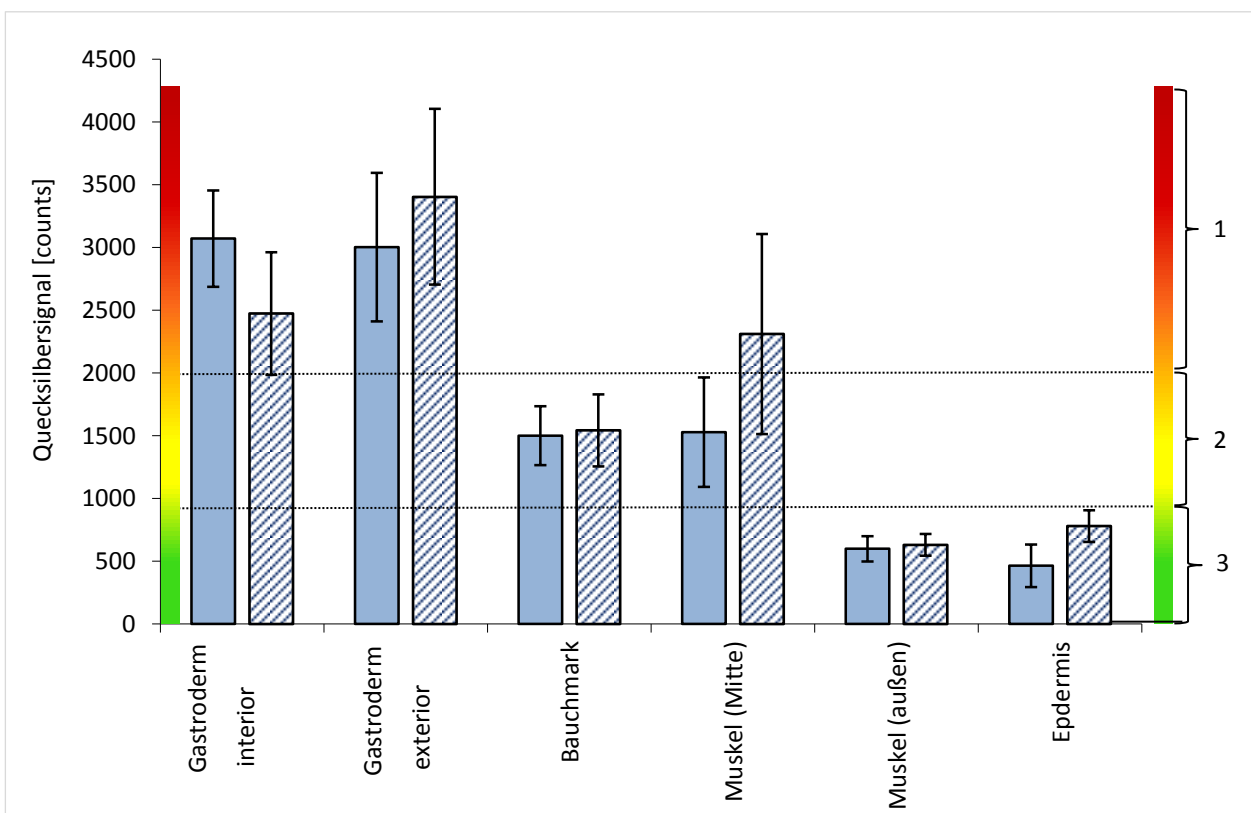


Abb. 27: LA-ICP-MS Messung: Intensitäten von Hg abzüglich der Kontrollen in verschiedenen Kompartimentierungen von je zwei Gewebeproben (blau/gemustert) von *E. foetida*. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von je fünf unabhängigen Ablationen à 50 µm Durchmesser, die nebeneinander durchgeführt wurden und über die Differenzierung signifikanter Intensitäts-Kategorien von grün nach rot (1, 2 und 3) entscheiden.

Hautmuskelschlauch registriert (Abb. 27.3). Im mittleren Gewebsbereich sowie im ventralen Subneuralgefäß wurden bis auf einen Ausreißer etwa 1500 cps gemessen (Abb. 27.2).

Folglich scheint ein Gradient von der inneren Gastrodermis bis hin zur äußeren Epidermis des Wurmgewebes vorzuliegen, der in Abb. 28 grafisch dargestellt wurde. Dabei repräsentieren die roten Zonen die höchsten und die orangenen Zonen die mittleren Hg-Intensitäten, die sich hauptsächlich am Intestinaltrakt befinden. Die Quecksilberkonzentration nimmt in Richtung der median liegenden Gewebe zunehmend ab und erreicht am Hautmuskelschlauch das niedrigste Niveau. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Aufnahme von MeHg durch das äußerste Epithel eine marginale Rolle spielt. Vielmehr scheint eine Akkumulation von MeHg von innen, d.h. von den Regionen im Darm auszugehen. Quecksilber wird hauptsächlich in organischer Form ins Gewebe aufgenommen. Daher ist anzunehmen, dass die biotische mikrobielle Methylierung von anorganischem Hg aus der Erde hauptsächlich durch die intestinalen und weniger durch die bodenbewohnenden Mikroorganismen durchgeführt wird.

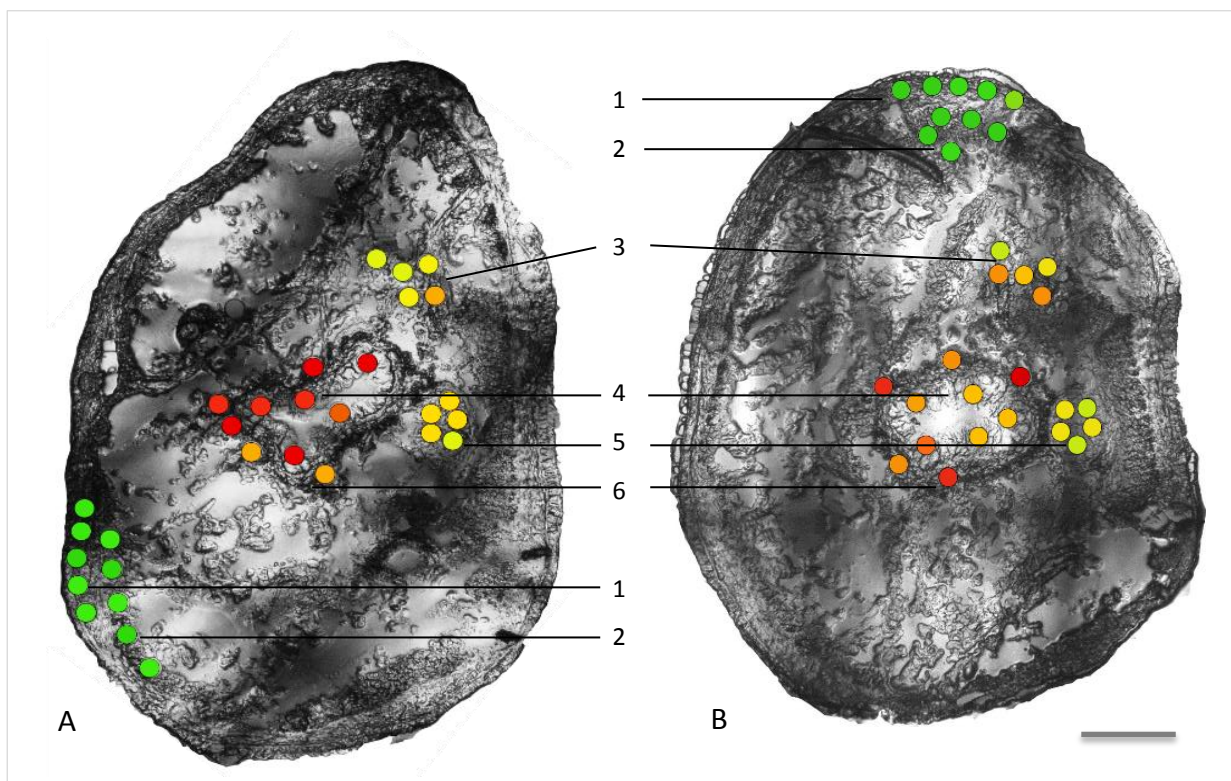


Abb. 28: Zwei histologische Querschnitte von *E. foetida* nach Laserablation (A, B): Hautmuskelschlauch mit zirkulärer (1) und longitudinaler (2) Muskulatur, Gewebe (3), interiore (4) und exteriore (6) Gastrodermis und ventrales Subneuralgefäß (5). Die farbigen Spots (50 µm Durchmesser) korrelieren mit der Signalintensität des Gesamtquecksilbers, wobei grün, orange und rot aufsteigender Signalintensität entspricht. Skala = 250 µm.

4. Diskussion

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit ist in fünf Bereiche gegliedert. Zunächst wird die analytische Methode zur Bestimmung von MeHg in bakteriellen Nährmedien vergleichend zu anderen konventionellen Methoden diskutiert. Anschließend wird die Rolle von MeHg in Böden und die Anreicherung von MeHg im bodenlebenden Invertebraten *E. foetida* thematisiert. Dabei steht die mikrobielle Methylierung von anorganischem Hg durch intestinale oder bodenlebende Mikroorganismen im terrestrischen System im Vordergrund sowie die mikrobielle Diversität in diesen Habitats. Im Speziellen wurden intestinale Sulfat-reduzierende Stämme ausgewählt und die Produktion von MeHg quantifiziert. Abschließend werden die Resultate der Lokalisation von Hg im Gewebe von *E. foetida* im Rahmen der methodischen Möglichkeiten sowie umweltrelevanter Aspekte bezüglich der Aufnahmeroute von Hg in das Gewebe geschildert.

4.1. Methode zur Bestimmung von MeHg in Kulturmedien

GC-AFS und GC-ICP-MS im Vergleich

In dieser Arbeit wurde für die Messung und Quantifizierung von Quecksilberspezies nach alkalischer Extraktion und Derivatisierung der Probe die GC-ICP-MS eingesetzt. In Bezug auf die methodische Vorgehensweise kam in früheren Studien im Rahmen dieses Projektes die AFS zur Bestimmung von MeHg in bakteriellen Medien zum Einsatz (Limper, 2006; Knopf, 2010). Sowohl die GC-AFS als auch die GC-ICP-MS sind geeignete Methoden für die sensitive und selektive Quantifizierung von MeHg in biologischen Proben (Armstrong et al., 1999). Die absoluten Nachweisgrenzen dieser zwei analytischen Anwendungen liegen unter optimalen Einstellungen bei 2 bis 6 pg Hg für die AFS sowie bei 0,05 bis 0,21 pg Hg für die Messung mit GC-ICP-MS (Nevado et al., 2011). Kommerziell erhältliche AFS-Systeme sind verhältnismäßig günstig und in Bezug auf den Aufbau, die benötigte Infrastruktur und die Applikation weniger komplex als die ICP-MS (Armstrong et al., 1999). Demgegenüber bietet die GC-ICP-MS den Vorteil der Multielement- und Isotopenbestimmung. Dies ermöglicht eine äußerst präzise Bestimmung von Hg unter Anwendung der Isotopenverdünnungsanalyse im Ultraspurenbereich (Beauchemin, 2008; Nevado et al., 2011). Weiterhin sind Multielementbestimmungen und der Einsatz eines internen Standards realisierbar. Als interner Standard wurde Thallium in jeder Messung mitgeführt, um z.B. Verschiebungen von Massenbilanzen

zu detektieren, die so ggf. korrigiert werden können (Jiménez-Moreno et al., 2012). Bezüglich der praktischen Durchführung ist zu erwähnen, dass mittels der ICP-MS eine nicht unerhebliche Zeitersparnis und erhöhte Effizienz gegenüber der Anwendung der GC-AFS zu verzeichnen war. Für die Bestimmung von MeHg mittels GC-AFS war z.B. eine separate Kalibrierung vor der Messung von Realproben erforderlich.

Vor diesen Hintergründen wurde für die Messung des MeHg-Gehalts in den bakteriellen Proben in der vorliegenden Arbeit die GC-ICP-MS eingesetzt.

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung zur Bestimmung von MeHg in den Proben erfolgte in zwei Schritten: der Extraktion und Derivatisierung. Für die Extraktion von MeHg aus verschiedenen Matrices existiert ein breites Spektrum chemischer Reagenzien, die eingesetzt werden können (Issaro et al., 2009). In dieser Arbeit wurde KOH/MeOH (25% w/v) verwendet, wobei das Prinzip an eine Arbeit von Yang et al. (2009) angelehnt ist und bereits in der Arbeit von Knopf getestet wurde (Knopf, 2010). Die Extraktion mit KOH/MeOH-Lösung wird häufig bei MeHg-Analysen aus kleineren Probenmengen biologischen Materials angewendet (Hintelmann und Nguyen, 2005). Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie im Gegensatz zur Mikrowellenextraktion mit wenig Equipment und Ressourcen auskommt (Monperrus et al., 2004; Issaro et al., 2009), während die Stabilität der Hg Spezies erhalten bleibt (Leermakers et al., 2005). Für gefriergetrocknete Gewebeproben hingegen wird die Extraktion im Allgemeinen mit TMAH durchgeführt, die bei dieser Probenart eine sehr gute Reproduzierbarkeit gewährleistet (Qvarnström und Frech, 2002; Yang et al., 2009).

Der saure Aufschluss mit KBr/H₂SO₄ wird meistens für Bodenproben durchgeführt, da bei der alkalischen Extraktion von Hg-Spezies aus Bodenproben die Entstehung von MeHg-Artefakten beobachtet wurde (Bloom et al., 1997). Sedimentproben sind reich an Fulvin- und Huminsäuren und es ist bekannt, dass diese Substanzen die abiotische Bildung von MeHg auch während der Probenvorbereitung begünstigen kann (Nagase, 1982; Nagase et al., 1984). Im Gegensatz dazu wurde nach der Extraktion von MeHg aus bakteriellen Medien unter Verwendung des KOH/Methanol-Aufschlusses keine Artefaktbildung beobachtet (Knopf, 2010). Anhand der Messung von unbeimpften Medienkontrollen oder wässrigen Standardlösungen konnte diese Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Entsprechende Kontrollen wurden in jeder Messreihe mitgeführt, da es prinzipiell nicht

auszuschließen ist, dass abiotische Transformationsreaktionen während der Inkubation in bakteriellen Medien Speziesveränderungen von MeHg einleiten (Achá et al. 2011).

Die Extraktion von MeHg-Spezies ist gekennzeichnet durch den Einsatz eines Maskierungsreagenz bzw. einer Kupfersulfat/Natriumoxalat-Lösung. Deren Zugabe wird empfohlen, da eine vollständige Unterdrückung des MeHg Signals beobachtet wurde, wenn die molare Konzentration an Sulfid in den Proben höher ist als die Cu^{2+} -Ionenkonzentration. Das Prinzip beruht darauf, dass bei einer hohen Kupferkonzentration Sulfide als CuS ausfallen und weniger MeHg-Sulfide gebildet werden (Yang et al., 2009).

Im letzten Schritt der Extraktion wird die Derivatisierung der Hg-Spezies vorgenommen, um die Auftrennung mittels der Kapillar-GC zu ermöglichen. Häufig findet für die Derivatisierung NaBEt_4 Anwendung (Martin-Doimeadios et al., 2002). Es wurde jedoch gezeigt, dass während der Derivatisierung mit NaBEt_4 MeHg zu Hg^0 transformiert werden kann, wenn Chlorid-Ionen anwesend sind (Demuth und Heumann, 2001b). In diesem Zusammenhang wird die Anwendung der Spezies-spezifischen Isotopenverdünnung empfohlen, da diese exakte Ergebnisse für die MeHg Bestimmung nach Derivatisierung mit NaBEt_4 gewährleisten kann (Monperrus et al., 2004). Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit NaPr_4B als adäquate Alternative eingesetzt, da in den bakteriellen Medien verschiedene Salze enthalten sind (Demuth und Heumann, 2001b). Dieses Reagenz ist gegenüber Sauerstoff labil (Yang et al., 2009), aber durch Ansetzen der Derivatisierungslösung in einer sauerstofffreien Atmosphäre wird die Stabilität gewährleistet. Der Einsatz von NaPr_4B erweist sich auch im Gegensatz zur Verwendung von NaBEt_4 als empfehlenswert, da überdies auch Ethylquecksilber detektiert werden kann. Dieses Signal würde im Chromatogramm auf der Zeitachse vor MeHg erscheinen. Im Verlaufe der Messungen wurde jedoch keine Produktion von Ethylquecksilber durch Bakterien beobachtet.

Nachweisgrenze und Wiederfindung

Die Nachweisgrenze von MeHg in den untersuchten Proben wurde bestimmt und betrug 30 pg/mL. Die Erfassungsgrenze betrug 60 pg/mL MeHg bei Einsatz von 0,1 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} in den Nährmedien. Dieser Wert trifft einen Bereich sehr gut, der bereits in anderen Studien für den Nachweis von MeHg in biologischen Proben nach KOH-Aufschluss, Anwendung der Isotopenverdünnungsmethode und GC-ICP-MS Messungen beschrieben wurde. Dabei findet in Dressler et al. (2011) eine Nachweisgrenze von 30 pg/mL MeHg Erwähnung.

Das Erreichen einer sehr niedrigen Nachweisgrenze ist von verschiedenen Parametern abhängig. Ein entscheidender Faktor dabei ist z.B. die Ausgangskonzentration von Hg in der Analytlösung. In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die besten Nachweisgrenzen erreicht werden, wenn der Gesamtquecksilbergehalt der Nährmedien im Spurenelementbereich liegt. Es ist vorstellbar, dass bei höheren Gehalten von Hg in diesen komplexen Sulfidhaltigen Medien eine unvollständige Extraktion, Ionisation des Analyten im Plasma der ICP-MS oder ein Tailing des Hg-Signals im Chromatogramm auftreten können.

Daher wurde in dieser Arbeit im Vergleich zu früheren Studien die HgCl₂-Zugabe in den Versuchen zur mikrobiellen Hg-Methylierung reduziert. In verschiedenen Studien wurden Quecksilberkonzentrationen von mind. 1 mg/kg eingestellt (Limper, 2006; Knopf, 2010). Dies könnte sich außerdem nachteilig auf das Wachstum einiger untersuchter Mikroorganismen auswirken (Vonk und Sijpenstein, 1973). In Bezug auf natürliche kontaminierte Systeme wurden 0,1 ppm Hg als hohes Niveau beschrieben (Duran et al., 2008). Demgegenüber wurden in chronisch kontaminierten Gebieten wie z.B. in der Region der Idrija Minen in Slowenien Gesamtquecksilbergehalte von bis zu 263 µg/g Boden registriert (Lapanje et al., 2008), wobei der MeHg-Anteil auf 0,5% bis 1,5% geschätzt wird (Burton et al., 2006). In dieser Arbeit hat sich der Einsatz von 0,1 mg/L Hg²⁺ in den Kulturmedien als zweckmäßig erwiesen. Zum einen bewirkt diese Konzentration die Selektion Hg-resistenter bakterieller Stämme und einige Organismen sind in der Lage, bei diesem Gehalt signifikante MeHg-Konzentrationen zu bilden.

Um die Anwendbarkeit der gewählten Methode zu prüfen, wurden die Wiederfindungsraten ermittelt. Dabei kam das Referenzmaterial ERM[®] CE-464 Tuna Fish zum Einsatz. In diesem zu Pulver verarbeiteten Fischmaterial waren 5,5 ± 0,17 mg/kg MeHg zertifiziert. Die Wiederfindung lag nach dreifacher Messung (bzw. Injektionen) von vier unabhängigen Proben mit einer Einwaage von 0,199 bis 0,216 g in einem engen Bereich von 98-105%. Dieses Resultat ist sehr gut und bestätigt eine zuverlässige Bestimmung von MeHg in den untersuchten Proben mittels GC-ICP-MS.

4.2. Quecksilber in Böden und Anreicherung von MeHg in Gewebe

Hg in Bodenproben

Die Beurteilung und Bewertung von Risikopräventionen für Kontaminanten in Böden wird im Allgemeinen durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit Deutschland vorgenommen. In der zuletzt aktualisierten Version der Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung von 1999 werden Höchstgrenzen verschiedener Schwermetalle und Schadstoffe in Böden beschrieben, die im Rahmen dieser Risikopräventionen maßgebend sind (Bundesministerium für Umweltschutz, Naturschutz und Reaktorsicherheit Deutschland, 2012). Dabei liegt das Limit für Hg in Böden, die garten- oder landwirtschaftlicher Nutzung unterliegen, bei 50 mg/kg Hg. In dieser Arbeit wurden Bodenproben verwendet, die einen Gesamtquecksilbergehalt von 0,184 mg/kg aufwiesen. Dieser Wert liegt innerhalb der erläuterten Norm. Dies trifft ebenso auf die anderen untersuchten Elemente Arsen, Cadmium, Chrom, Nickel und Blei zu. Für die Gesamtgehalte von Cobalt, Kupfer, Vanadium und Zink (deren Gehalte ebenfalls ermittelt wurden) gibt es diesbezüglich keine gesetzlich bindenden Höchstwerte, die in dieser Bodenschutzverordnung Erläuterung finden.

Bioverfügbarkeit von Hg im Boden

Das Element Hg ist ein ubiquitäres Schwermetall auf der Erde und der Anteil von MeHg am Gesamtquecksilbergehalt in der Umwelt wird auf 0.5% bis 1.5% geschätzt (Burton et al., 2006). Der Gesamtquecksilbergehalt der Bodenproben betrug 0.184 mg/kg und unter dieser Prämisse ist anzunehmen, dass die Konzentration von MeHg durchschnittlich 0.92-2.76 ng/g beträgt. Der tatsächliche Gehalt von MeHg in den hier verwendeten Bodenproben betrug weniger als 1 ng/g Trockengewicht (dw). Diese noch in Spuren vorliegende organische Hg-Spezies ist hauptsächlich an der Matrix bzw. an organische Komplexe des Bodens wie z.B. an Humin- und Fulvinsäuren gebunden und ist daher kaum bioverfügbar für Mikroorganismen (Barkay et al., 1997). Die Stabilitätskonstanten ($\log K$) für die Bindung von Hg^{2+} an organische Fulvin- und Huminsäuren in Böden sind äußerst hoch und liegen in einem Bereich von 10^5 bzw. $10^{21} - 10^{24}$ (Ravichandran, 2004). Weiterhin wurde im Rahmen anderer toxikologischer Studien festgestellt, dass die Bodenbeschaffenheit und –zusammensetzung eine sehr große Rolle bei der Bioverfügbarkeit von Hg spielt. In manchen Böden wird Hg stärker an die Matrix gebunden und ist weniger bioverfügbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die

Sterberate von Kompostwürmern in kontaminierten Böden mit der Bioverfügbarkeit von Hg korreliert ist. Zum Beispiel liegt der LC_{50} in gelben Ferralsol bei $LC_{50} \approx 7 \text{ mg/kg}$. Dieser gelb bis rot gefärbte Ferralsol-Boden ist reich an Fe und Al und wird meist in tropischen Gebieten gefunden. In Chernozeme hingegen ist der LC_{50} mit 15 mg/kg mehr als doppelt so hoch. Diese schwarzen Chernozem-Böden weisen einen hohen Anteil organischer Substanz auf, wodurch die Bioverfügbarkeit von Hg geringer ist als in Ferralsol (Cesar et al., 2011).

Eine weitere Überlegung zur Bioverfügbarkeit von Hg ist die Tatsache, dass in einer mikrobiellen Gemeinschaft verschiedene Metalle durch deren Adsorption auf der Oberfläche von Bakterien transportiert und verfügbar gemacht werden können. Eigene Untersuchungen zu diesem Thema an der Hefe *Saccharomyces ludwigii* (aus der Stammsammlung des IMW, Mainz) wiesen darauf hin, dass in einer quecksilberhaltigen Lösung die auf der Zellmasse adsorbierte Konzentration von Hg um einen Faktor 1000 höher war im Vergleich zur wässrigen Original-Lösung (Petersen et al., 2012). Die bakterielle Oberfläche ist ebenfalls ein bevorzugtes Reservoir für Metalle. Durch Biosorption von Hg auf der Oberfläche von z.B. *Bacillus subtilis* wurden in einer anderen Studie bis zu 65% des Gesamtquecksilbers aus einer Lösung auf der Bakterienoberfläche wiedergefunden (Fein et al., 2001). Die Bindung auf der Bakterienoberfläche erfolgt hauptsächlich an Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen (Mishra et al., 2011). Mehrotra et al. (2003) beobachteten außerdem, dass die Bioverfügbarkeit von Hg abnimmt, wenn neben Hg Eisenionen in einer Lösung vorhanden sind, da Sulfid gebunden und die Menge gelöster HgS Komplexe ($\text{Hg}(\text{HS})_2^0$, HgHS^+ , HgS^0 , HgHS_2^- , HgS_2^{2-}) reduziert wird, die von Mikroorganismen aufgenommen werden könnten. Die Bioverfügbarkeit von Hg ist demnach sehr stark abhängig von der Matrix, der Konzentration anderer Metalle wie z.B. Fe und insbesondere der Aktivität der Mikrobiota. Dies beeinflusst die Mobilität von Hg, welche entscheidend für das Verhalten sowie die Anreicherung des Schwermetalls in biologischen Systemen ist (Barkay et al., 1997; Benoit et al., 1999a; Benoit, 1999b).

Anreicherung von MeHg im Gewebe

Im Gewebe des Anneliden *E. foetida* ist eine verhältnismäßig hohe Anreicherung von organischen Quecksilberspezies wie MeHg zu beobachten, wenn der Oligochaet anorganischem Hg in der Erde in Form von HgCl_2 ausgesetzt ist (Burton et al., 2006; Zhang et al., 2009; Knopf, 2010). Demnach müsste ein Mechanismus existieren, wodurch anorganisches Hg zu organischem transformiert und in das Gewebe der Anneliden aufgenommen

wird. Diesbezüglich ist die Beobachtung sehr aufschlussreich, dass Würmer in autoklavierter und Hg-kontaminierter Erde signifikant weniger MeHg anreichern als unter unsterilen Bedingungen (Knopf, 2010). Offensichtlich findet unter biotischen Bedingungen eine Transformation von Hg zu MeHg statt, welches in das Gewebe aufgenommen und dort akkumuliert wird. Im Speziellen könnte dies mit der Aktivität intestinaler Mikroorganismen assoziiert sein. Das ist konform mit der Beobachtung, dass die Akkumulation von MeHg in steriler Erde nicht gegen Null tendiert, da die intestinalen Mikroorganismen weiterhin erhalten sind (Knopf, 2010). Es ist anzunehmen, dass diese Organismen im Allgemeinen an die Darmzotten angeheftet sind und trotz des Transfers von steriler Erde durch den Intestinaltrakt nicht vollständig aus dem Anneliden entfernt werden.

Um die Kapazitäten der Hg-Methylierung von bodenlebenden und intestinalen Mikroorganismen zu vergleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit Kulturen aus Umweltproben durchgeführt. Dazu wurden flüssige Nährmedien mit Vomitus, einem Epithelstück aus dem Gastrointestinaltrakts von *E. foetida* und geringen Mengen der Bodenproben inokuliert. Daraus wurden direkte Anreicherungskulturen gewonnen. Für den Versuch wurden die Bedingungen so gewählt, dass die Methylierung von Hg begünstigt wird. Prävalent sind dabei die Einstellung anoxischer Bedingungen und das Aufrechterhalten eines negativen Redoxpotentials (Compeau und Bartha 1984; Gilmour und Henry, 1991; Duran et al. 2008). Dieser Bereich soll bevorzugt bei -100 bis -150 mV liegen (Gadd, 1993). Martin-Doimeadios et al. (2004) wiesen nach, dass die Methylierung von Hg unter aeroben-biotischen Bedingungen nur eine marginale, unter abiotischen bzw. sterilen (sowohl aeroben als auch anaeroben) Bedingungen keine Rolle spielen. Demgegenüber waren die Hg-Methylierungsraten unter anaeroben und unsterilen Bedingungen äußerst hoch. Vor diesem Hintergrund wurden die Umweltkulturen aus der vorliegenden Arbeit nach Zugabe von 0,1 mg/L HgCl₂ zum Medium anaerob inkubiert.

Intestinale bakterielle Methylierung von Hg

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die intestinalen Mikroorganismen im Gegensatz zur Bodenmikrobiota offensichtlich in der Lage sind, MeHg aus anorganischen Hg²⁺ zu produzieren. Der Unterschied war signifikant, da der Gehalt in den Kulturen aus dem Intestinaltrakt bei 710 bis 980 pg/mL lag, während die Bodenkultur sowie die Kontrolle Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 30 pg/mL aufwiesen. Für die

Beurteilung dieser Ergebnisse sollte angemerkt werden, dass die Methylierung im Allgemeinen abhängig von der Substratverfügbarkeit und der Aktivität der methylierenden Organismen ist (Duran et al., 2008). Die beobachteten Verhältnisse lassen sich nicht direkt auf natürliche terrestrische Systeme, die klimatischen und jahreszeitlichen Veränderungen unterliegen, übertragen. Insbesondere bei der Verfügbarkeit von organischem biologisch abbaubarem Material, wird die Aktivität verschiedener Mikroorganismen angeregt infolgedessen biotische Methylierungen in den Vordergrund treten können. Unter weniger wachstumsstimulierenden Bedingungen und bei hohem Gehalt von hochmolekularen Humin- und Fulvinsäuren ist es vorstellbar, dass auch die abiotische Methylierung von Hg zum Gesamtgehalt von MeHg beiträgt.

Weiterhin ist es denkbar, dass die intestinalen Kulturen, die in der untersuchten Anreicherungskultur aus *E. foetida* Hg methylierten, nicht ausschließlich autochthon sind. Eine Vielzahl bakterieller Spezies halten sich sowohl in der Erde als auch außerhalb des Intestinaltrakts auf. Es ist möglich, dass diese Mikroorganismen in beiden Habitaten MeHg produzieren können. Die durchgeführten Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass zumindest unter Laborbedingungen die mikrobielle Methylierung im Intestinaltrakt von *E. foetida* eine bedeutende Rolle spielt und wahrscheinlich auch einen großen Beitrag zur Akkumulation von MeHg im Gewebe dieser Oligochaeten leisten.

4.3. Mikrobielle Methylierung von Hg (II) im intestinalen System

In Bezug auf die Untersuchung von Umweltproben intestinaler und bodenlebender Mikroorganismen wurde in dieser Arbeit der Beitrag der jeweiligen Mikrobiota an der Methylierung von Hg abgeschätzt. Dabei konnte beobachtet werden, dass insbesondere die intestinalen Mikroorganismen wahrscheinlich einen höheren Beitrag an der Hg-Methylierung besitzen. Da es sich in den Versuchen um Anreicherungskulturen handelt, kann zunächst keine Aussage darüber getroffen werden, welche Bakterien an diesen Prozessen maßgeblich beteiligt sind. Im Allgemeinen weisen die Habitate des Bodens und Intestinaltrakts von Invertebraten eine hohe mikrobielle Diversität bakterieller Populationen auf (Muyzer, 1999; Geets et al., 2006; Lapanje et al., 2008). Es kann jedoch angenommen werden, dass die Fähigkeit zur Hg-Methylierung im Intestinaltrakt von *E. foetida* hauptsächlich mit der Aktivität von SRB und verwandten Proteobakterien in Verbindung stehen (King et al., 2000; Ranchou-Peyreuse et al., 2009; Gilmour et al., 2011). Dabei sei erinnert, dass der ermittelte

Gehalt von MeHg stets als eine Bilanz der Methylierungs- und Demethylierungsaktivitäten aufzufassen ist. Die Demethylierungsfähigkeit ist eine äußerst weit verbreitete Eigenschaft unter den Proteobakterien. Hiervon gibt es nur wenige Ausnahmen, zu denen eine Reihe von δ -Proteobakterien gehören, die auch die meisten SRB umfassen (Barkay et al., 2010).

Methylierung von Hg nur durch δ -Proteobakterien?

Bezüglich der Methylierung von Hg ist bisher nicht bekannt, ob neben den Sulfat- und Eisenreduzierenden Mikroorganismen aus der δ -Gruppe weitere Spezies in terrestrischen Systemen existieren, die über diese Fähigkeit verfügen. In einer umfassenden Studie von Meyer et al. (2008) wurden typische Bewohner des menschlichen Darms auf ihre Fähigkeit, MeHg zu produzieren, getestet. Zum Einsatz kamen 14 Bacteria der Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes sowie Methanoarchaea (*Methanobrevibacter smithii* und *Methanosphaera stadtmanae*). Das Resultat wies darauf hin, dass zwar die meisten Kulturen in der Lage waren, andere methylierte Metallspezies (mit Selen, Tellur, Arsen, Bismut, Antimon, Tellur), aber in der Bilanz kein MeHg bilden konnten. Insbesondere methanogene Archaea besitzen zwar eine herausragende Rolle bei der Methylierung dieser Metall(oid)e, aber ein Zusammenhang mit der Hg-Methylierung wurde bisher nicht gefunden (Pak und Bartha, 1998a; Meyer et al., 2008; Diaz-Bone und van de Wiele 2010).

Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass Mikroorganismen, die nicht den SRB zugeordnet werden können, zumindest auf der Oberfläche von Periphyton aus limnischen Systemen MeHg bilden können (Achá et al. 2011). In Bezug auf terrestrische Systeme gibt es keine analogen Beobachtungen. Studien über autochthon lebende Spezies in *E. foetida* wie z.B. *Aeromonas* sp. lieferte keine Indizien dazu (Toyota und Kimura, 2000). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Bakterien aus dem Intestinaltrakt des Kompostwurmes isoliert, wobei auch Kulturen von *Enterobacter* sp. und *Pseudomonas putida* auf die Methylierung von Hg geprüft wurden, nachdem diese Untersuchungen von Knopf (2010) im Fokus standen. Nach Inkubation dieser Kulturen in entsprechenden Medien konnte jedoch keine Methylierung von Hg durch diese Reinkulturen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). *Pseudomonas putida* gehört zu den Organismen, die vorzugsweise durch aerobe Atmung Energie gewinnen. Inwieweit die biotische Methylierung in aeroben Habitats oder marinen oxischen Zonen tatsächlich eine Rolle spielt, ist bisher nur unzureichend bekannt. Baldi et al. (1989) untersuchten 106 aerobe heterotrophe

Mikroorganismen, unter denen – im Gegensatz zu Sulfat-reduzierenden Organismen – keine Hg-Methylierung beobachtet werden konnte. Profunde Untersuchungen von Martin-Doimeadios et al. (2004) wiesen ebenfalls darauf hin, dass die Methylierung von Hg bevorzugt unter anaeroben Bedingungen stattfindet.

In dieser Arbeit wurde eine anaerobe Kultur (EF4) aus dem Wurmdarm angereichert, die im Durchschnitt 153 pg/mL MeHg aus Hg^{2+} innerhalb von 12 h produzierte. Dabei konnten die Arten *Pseudomonas* sp., *Dv. africanus* und mit einer Artzugehörigkeit von 96% *Clostridium* sp. oder *Sporomusa* sp. identifiziert werden. Es gibt Untersuchungen dazu, dass einige Stämme von *Dv. africanus* in der Lage sind, Hg zu methylieren (Gilmour et al., 2011) und es ist wahrscheinlich, dass dieser Organismus in der Mischkultur EF4 zur Produktion von MeHg bedeutend beiträgt.

Es gibt eine Studie von Martin-Doimeadios et al. (2004), die Indizien dazu liefert, dass anaerobe Kulturen mit strikt fermentativen Bakterien wie z.B. *Clostridium* sp. MeHg bilden können. Sofern der Mechanismus der Hg-Methylierung von dem Acetyl-CoA-Weg abhängig ist, der ursprünglich in *Clostridium acetoxidans* (White et al., 2012) entdeckt und beschrieben wurde, ist es denkbar, dass hier ebenfalls Hg(II) über den Transfer einer Methylgruppe eines Corrinoids übertragen werden könnte. Duran et al. (2008) untersuchten marine Sedimentproben, wobei sich nach Zugabe von Hg die bakterielle Zusammensetzung signifikant änderte. In den methylierenden Kulturen wurden folgende Organismen identifiziert: *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., Sulfid-Oxidierer, *Pseudomonas* spp., δ -Proteobacteria sowie *Desulfotomaculum* spp., *Dv. africanus*, *Dtm.* spp. Die Ergebnisse lieferten weiterhin Indizien dafür, dass die Bildung von MeHg durch diese Organismen nicht ausgeschlossen war. Die Fähigkeit zur Methylierung von Hg in Reinkultur durch die Gattung *Desulfotomaculum* konnte in dieser vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben werden. Diese Gattung gehört zu den Firmicutes und weist darauf hin, dass diese Eigenschaft auch unter phylogenetischen Gruppen vertreten ist, die nicht den δ -Proteobakterien angehören.

Sulfat-reduzierende Bakterien im terrestrischen Boden?

Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit wird die Hypothese stark unterstützt, dass im Intestinaltrakt des Wurmes Hg methyliert wird. In dieser Arbeit wurde mithilfe der 16S rRNA Sequenzanalyse gezeigt, dass mindestens drei verschiedene Gattungen der Sulfat- und Sulfid-reduzierenden Bakterien im Intestinaltrakt von *E. foetida* vorkommen. Im Einzelnen wurden

Desulfovibrio sp., *Dtm.* sp. sowie *Desulfitobacterium* sp. identifiziert, wobei die Fähigkeit zur Methylierung von Hg zumindest durch Desulfovibrionaceae-Spezies als gesichert gilt (Achá et al., 2011) und in dieser vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Dieses Potential existiert wahrscheinlich auch innerhalb der Gattung *Desulfotomaculum*, wie ebenfalls im Rahmen des durchgeführten Screenings beobachtet wurde.

Bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten Boden- und Wurmkulturen wurde mittels gezielter 16S rRNA Analyse erstmals das Vorkommen von SRB in diesen Proben registriert. Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen postuliert wurde, dass SRB nicht im Intestinaltrakt von *E. foetida* oder im Erdboden vorkommen (Knopf, 2010). Die Existenz ubiquitärer SRB in terrestrischen Habitaten ist jedoch nicht unwahrscheinlich, wenn Sulfat als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht. Viele Böden sind zwar infolge von Auswaschungen im Gegensatz zu Marschland oder periodisch überfluteten Gebiete arm an Sulfaten (Ottow, 2011), es ist demgegenüber jedoch bekannt, dass durch verschiedene Prozesse Sulfat in den Boden gelangen kann. Ein Beispiel sei die anthropogene industrielle Verbrennung (insbesondere von Braunkohle), wodurch eine große Menge an Schwefel und Schwefeldioxid in die Atmosphäre freigesetzt wird (ca. $8 \cdot 10^7$ t jährlich), die mit Wasser unter der Entstehung von Schwefelsäure reagiert und durch Deposition in den Boden gelangt (Reineke und Schlömann, 2007). Daneben wird Sulfat in terrestrischen Mikro-Ökosystemen auch durch verschiedene Mikroorganismen freigesetzt, wie z.B. durch den mikrobiellen Aminosäureabbau und kann folglich von den bodenlebenden SRB als Elektronenakzeptor genutzt werden. Weitere Studien belegen auch die Anheftung von δ -Proteobakterien am Darmepithel im Intestinaltrakt verschiedener bodenlebender Tiere (Sass et al., 1998; Pikuta et al., 2000; Hamadi et al., 2003). Mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und 16S rDNA Analyse konnte z.B. gezeigt werden, dass SRB, insbesondere die Gattung *Desulfovibrio*, im Intestinaltrakt der terrestrischen Termiten *Mastotermes darwiniensis* zu finden sind (Berchtold et al., 1999). Die Isolierung von *Desulfovibrio* spp. aus dieser Termitenspezies konnte von Fröhlich et al. (1999); Kuhnigk et al. (1996) und Trinkerl et al. (1990) realisiert werden. Speziell im Intestinaltrakt von *E. foetida* wurde bereits 1981 von Hornor und Mitchell *Desulfovibrio* sp. und *Desulfotomaculum* sp. entdeckt und die hier vorliegenden Ergebnisse können dies bekräftigen.

Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt

Im Rahmen der Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen aus dem Intestinaltrakt von *E. foetida* wurden außer den SRB noch weitere Mikroorganismen identifiziert. Bezüglich der Kultivierung von Mikroorganismen konnten von aeroben Kulturen deutlich mehr Reinkulturen gewonnen werden, da hierbei die einfach durchzuführende Drei-Strich-Technik auf Agarplatten angewendet werden kann. Im Gegensatz dazu ist es deutlich umfangreicher, diese Methode unter sauerstofffreien Bedingungen anzuwenden. Die Agar-Schüttelmethode kann dazu einen guten Beitrag leisten, auch wenn hierbei nicht gewährleistet sein kann, dass auch nach vielen Verdünnungsstufen einzelne Bakterien voneinander getrennt werden können. Insbesondere die Trennung von *Citrobacter* spp. und *Desulfovibrio* spp. sowie anderen Kulturen mit Sporenbildnern war nicht ausnahmslos realisierbar. Die gewonnenen aeroben sowie anaeroben Bakterien wurden mithilfe molekularbiologischer Methoden wie DGGE, PCR und 16S rRNA Sequenzanalyse identifiziert. Die DGGE ist ein häufig angewendetes Verfahren, um einzelne Spezies aus der Umwelt zu charakterisieren und zu identifizieren. Dabei geben die Bandenmuster Hinweise auf die Spezieszugehörigkeit. Im Rahmen der Durchführung war jedoch auffällig, dass verschiedene distinkte Bandenpositionen einer Kultur nach sorgfältiger Separation, Elution, Aufreinigung und Identifizierung mittels 16S rRNA dennoch dem gleichen Organismus zugeordnet werden konnten. Theoretisch verweist eine DGGE Bande auf eine einzelne Spezies und erfüllt gleichzeitig den Anspruch einer hohen Sensitivität bezüglich der Selektivität, so dass bereits Nukleotidsequenzen mit Punktmutationen eine veränderte Wanderungsgeschwindigkeit im Gel aufweisen können (Muyzer, 1999). Es ist bekannt, dass Bakterien ein bis 15 und im Durchschnitt vier Kopien der 16S rRNA pro Genom aufweisen können. Möglicherweise könnten die unterschiedlichen Bandenpositionen der individuellen 16S rRNA zuzuordnen sein (Lee et al., 2009).

Im Ergebnis konnten einige interessante Eindrücke über die Diversität der Mikroorganismen im Intestinaltrakt gewonnen werden. Bereits in der Arbeit von Knopf (2010) wurden einige bodenlebende Bakterien mittels der 16S rRNA Analyse und DGGE erfolgreich identifiziert. Dazu gehörten Organismen *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Lysinibacillus* sp., *Lysobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Shewanella* sp., *Microbacterium resistens*, *Sinorhizobium* sp., *Paracoccus* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium* sp. Das Vorkommen einige dieser Arten konnte anhand dieser Arbeit bestätigt und die Existenz weiterer

verzeichnet werden: *Citrobacter* sp., *Clostridium* sp. oder *Sporomusa* sp., *Streptomyces* sp., *Cellulosimicrobium cellulans*, *Desulfitobacterium hafniense*, *Dv. africanus* sowie *Desulfotomaculum* sp. Diese Zusammenfassung reflektiert jedoch nur einen Bruchteil der Organismen, die tatsächlich im Intestinaltrakt von Oligochaeten, aber auch in der Erde vorkommen können.

Es wird geschätzt, dass nur 0,1% bis 20% der mikroskopisch sichtbaren Zellen in Böden bis heute kultivierbar sind (Ottow, 2011). Ihre taxonomische Zugehörigkeit entfällt nach Ottow (2011) überwiegend auf die vier Phyla Actinobacteria > Firmicutes > Proteobacteria > Bacteroides. Dabei gehören die meisten kultivierbaren Isolate zu den Proteobacteria (54%), Actinobacteria (23%), Firmicutes (14%) und Bacteroides (6%). Im Intestinaltrakt von *Lumbricus terrestris* und *E. foetida* finden sich ebenfalls eine äußerst große Vielfalt von Spezies verschiedenster Gruppen, die auch typisch für diese Oligochaeten sind: α -, β -, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Bacilli sowie Pilze, insbesondere Ascomyceten und Basidiomyceten (Byzov et al., 2007). Seltener Spezies, wie z.B. homoacetogene intestinale *Sporomusa* sp. wurden auch aus dem Darmtrakt der Termiten *Thoracotermes macrothorax* gewonnen (Boga et al., 2003).

Die Anneliden sind gleichermaßen abhängig von den Bakterien, die z.B. essentielle Aminosäuren liefern und Cellulose abbauen, so wie die Bakterien Mikrohabitate vorfinden, in denen sie verhältnismäßig konstante Bedingungen vorfinden, spezifisch angepasst sind und relativ hohe Populationsdichten aufweisen können (Byzov et al., 2007).

4.4. Quantifizierung der mikrobiellen Methylierung von Hg (II)

Die vorliegende Arbeit präsentiert das erste umfassende Screening zur Methylierung von anorganischem Hg^{2+} zu MeHg durch intestinale und terrestrische Mikroorganismen. Insgesamt wurden 14 verschiedene Stämme getestet, wobei *Db. propionicus* (Stamm 1pr3) als Positiv-Kontrolle mitgeführt wurde, da diese Fähigkeit bei diesem Stamm bereits gut untersucht ist (Benoit et al., 2001a/ 2001b).

Die Resultate des Screenings zeigten, dass in 10 von 14 Kulturen MeHg oberhalb der Erfassungsgrenze von 60 pg/mL messbar war. Die Stämme, die nur maximal 57 pg/mL MeHg produzierten, waren *Dv. termitidis* DSM 11274, *Dv. termitidis* DSM 5308^T, *Dv. intestinalis* DSM 11275^T. Offensichtlich ist die Fähigkeit zur Bildung von MeHg durch diese drei Stämme unter den beschriebenen Bedingungen nicht ausgeprägt bzw. liegt nur wenig oberhalb der

Bestimmungsgrenze. Interessant ist, dass in einer anderen Arbeit eine ähnlich niedrige Bildung von 50 pg/mL MeHg durch *Dv. intestinalis* DSM 11275^T beschrieben wurde, während die Zugabe von HgCl₂ zehnmal höher war (Limper, 2006). Bezüglich der Fähigkeit zur MeHg Produktion durch diese zwei Arten gibt es keine weiteren Untersuchungen und auch in einer aktuellen Übersicht zu allen bisher untersuchten *Desulfovibrio* Arten zur Hg-Methylierung finden diese keine Erwähnung (Gilmour et al., 2011).

Konzentrationsbereiche und Kontrollen

Alle weiteren Reinkulturen der SRB und Anreicherungskulturen wiesen in allen drei Parallelansätzen Gehalte in einem Bereich von 90 bis 1215 pg/mL auf. Einzige Ausnahmen sind dabei die zwei Parallelansätze der Kultur PS1c und *Dtm. alkaliphilum* DSM 12257^{Tc} mit 54-55 pg/mL MeHg. Im Rahmen von früheren Untersuchungen zur Hg-Methylierung durch Sedimentproben liegen die Konzentrationsbereiche von MeHg bei 50 ng/g bis 100 ng/g, wobei im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen deutlich höhere Hg²⁺-Gehalte von 10 bis 100 mg/kg eingesetzt wurden (Jensen und Jernelöv, 1969). Die MeHg-Gehalte, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, befinden sich auf ähnlichem Niveau wie in einer Studie von Achá et al. (2011), die Kulturen von Desulfovibrionaceae sowie Desulfobacteraceae untersuchten und 3 bis 1104 pg/mL MeHg nachwiesen. Jene Studie wies zudem Kontrollen auf, in denen 17 bis 164 pg/mL MeHg gefunden wurden. Dass durch abiotische Transformationsprozesse MeHg gebildet werden kann, ist nicht auszuschließen.

Diesbezüglich ist es notwendig, entsprechende inokulierte Medien als Kontrolle in jeder Messreihe mitzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenso verfahren und sowohl die Kontrollen als auch die Kulturen wurden dreifach angesetzt. Bis auf eine Ausnahme war im Rahmen des Screenings keine abiotische Methylierung in den Kontrollen zu beobachten. Ausschließlich in einem stark alkalischen Medium, welches auch für die Kultivierung von *Dtm. alkaliphilum* eingesetzt wurde, waren im Durchschnitt 131 pg/mL MeHg messbar. Die abiotische Bildung von MeHg kann unter verschiedenen Bedingungen verstärkt werden, wie z.B. durch die Anwesenheit von aliphatischen α -Aminosäuren oder Carboxylsäuren (Nagase, 1982). In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, dass in der Medienzusammensetzung zwar keine Aminosäuren vorgesehen waren, wohl aber Formiat als C-Quelle eingesetzt wurde. Unter den vorliegenden physikalischen Einflüssen wie der Inkubationstemperatur von 50 °C und einem alkalischen pH-Wert ist es denkbar, dass MeHg abiotisch gebildet

wurde. Darüber hinaus könnte vermutet werden, dass auch in den beimpften Kulturen eine abiotische MeHg Bildung vorlag. Dies könnte einen Hinweis auf die Fähigkeit zur Demethylierung durch *Dtm. alkaliphilum* geben, da die Gehalte von MeHg im Verhältnis zur Kontrolle niedriger waren.

Demethylierung von MeHg

Im Allgemeinen ist die Fähigkeit zur Demethylierung von MeHg bei einer Vielzahl von Bakterien ausgebildet (Barkay et al., 2003). Diese Quecksilberresistenz ist als Anpassung an quecksilberkontaminierte Lebensräume zu verstehen. Die Reaktion kann klar zu abiotischen Demethylierungsprozessen abgegrenzt werden. Der signifikanteste Mechanismus zum Abbau von Alkylquecksilber ist wohl die abiotische photolytische Reduktion von MeHg zu Hg^{2+} (Jiménez-Moreno, 2012). Weiterhin können während der (reduktiven) Demethylierung in einer Reaktion mit Sulfid die Endprodukte Dimethylquecksilber und HgS auftreten (Martin-Doimeadios et al., 2004). Dimethylquecksilber kann ebenso in Folge einer weiteren Methylierungsreaktion von MeHg beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Derivatisierungsreagenz NaPr_4B (anstatt z.B. NaEt_4B) eingesetzt, um die Detektion von Dimethylquecksilber grundsätzlich zu ermöglichen (Demuth, 2001a). Es wurde jedoch in keiner Probe nachgewiesen.

Der Mechanismus der biotischen mikrobiellen Demethylierung wird durch das *mer*-Operon vermittelt. Das *mer*-Operon umfasst verschiedene Gene für die Quecksilberresistenz und als Minimum stets die Gene, die für die Hg-Reduktase (*merA*) codieren sowie für membrangebundene Proteine, welche am Transport von Hg^{2+} beteiligt sind (*merT*) und einen Regulator (*merR*), der eine spezifische Signaltransduktion im Cytosol auslöst und mit der Metallkonzentration korreliert. Zudem wurden zusätzliche Enzyme wie z.B. die Organoquecksilber-Lyase (MerB) und andere, am Transport von Hg beteiligte Enzyme, identifiziert (Osborn et al., 1997; Barkay et al., 2003).

Die biotische Demethylierung verläuft in zwei Schritten: zunächst wird $\text{CH}_3\text{Hg-R}_1$ intrazellulär mittels der Organo-Quecksilber-Lyase MerB an eine Thiolgruppe gebunden ($\text{CH}_3\text{HgS-R}_2$) und durch die Übertragung eines Protons demethyliert. Methan wird freigesetzt, während der Hg-Komplex an MerA weitergegeben wird. Diese intrazelluläre FAD-enhaltende Quecksilber-Reduktase besitzt zwei bewegliche symmetrisch aufgebaute Domänen mit terminalen Aminogruppen, die Cystein enthalten. Daran gebunden katalysiert das Enzym die

Konversion von Hg^{2+} zu volatil und ungeladenem Hg^0 , welches aufgrund geringer Affinität zu anderen funktionellen Gruppen relativ leicht in das umgebene Medium und die Atmosphäre gelangt. Reduziertes Hg in Form von Hg^0 ist dem Organismus gegenüber weit weniger toxisch (Frischmuth et al., 1993; Barkay et al., 2003). Diese enzymatisch katalysierte und auch als reduktive Demethylierung bezeichnete Reaktion findet bevorzugt unter hohen Hg-Konzentrationen und aeroben Bedingungen statt (Martin-Doimeadios et al., 2004).

Die Gene für diese Quecksilberresistenz sind auf Chromosomen, Plasmiden und Transposons lokalisiert, wobei das Arrangement im Operon divers gestaltet ist und gelegentlich auch mehrere Kopien in einem Organismus auftreten können (Martin-Doimeadios et al., 2004). Diese Resistenz – bzw. das *mer*-Operon – kann auch über Artgrenzen hinweg mittels horizontalen Genaustausch transferiert werden und wurde z.B. auch im Intestinaltrakt von Oligochaeten nachgewiesen (Lapanje et al., 2008). Das *mer*-Operon kann mittels PCR und spezifischen Primern für den *merA* Locus detektiert werden. So wurde das Vorkommen des *mer*-Operons sowohl bei Archaea als auch bei Bacteria bestätigt (Barkay et al., 2010). Dabei wurden im phylogenetischen Reich der Archaea 7 Euryarcheota, 10 Crenarcheota, Thermoplasmatales und Sulfolobales gefunden. Unter den Bakterien ist das *mer*-Operon unter den α -, β - und δ -Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, aber auch in *Deinococcus* sowie den Aquificae detektiert worden. Einzelne Vertreter kamen unter den Bacteroides, Chloroflexi, Nitrospirae und Verrucomicrobiae vor. Dabei ist der Befund äußerst interessant, dass bei den Heliobacteria, Cyanobacteria, Epsilonbacteria, den Grünen Schwefelbakterien, Schwefel-/ Nichtschwefelpurpurbakterien sowie den meisten δ -Proteobacteria die Existenz des *mer*-Operons bisher nicht bestätigt werden konnte. Von insgesamt 36 Stämmen der δ -Proteobacteria wiesen nur 6 Stämme die Gene *merA* auf, wobei diese 6 Stämme gleichzeitig *Geobacter* zuzuordnen waren (Barkay et al., 2010). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die SRB zu der Hauptgruppe der Hg-Methylierer zählt. Es könnte zudem angenommen werden, dass die Demethylierung im Gegensatz zur Methylierung in einzelnen (in dieser Arbeit verwendeten) Kulturen Sulfat-reduzierender Organismen nur eine untergeordnete Rolle einnimmt.

Oxidative biotische Demethylierung von MeHg und simultane Methylierung

Demgegenüber existiert eine oxidative Demethylierung, wobei CO_2 freigesetzt wird. In manchen Mikroorganismen wurde als Endprodukt auch ein relativ geringer Gehalt an CH_4 beobachtet, wobei es sich möglicherweise im Rahmen des methylotrophen Metabolismus um ein Nebenprodukt handelt (Barkay et al., 2003). Die oxidative Demethylierung ist wie die Methylierung von Hg bei anaeroben Mikroorganismen ausgeprägt. Interessant ist hierbei, dass bei der oxidativen Demethylierung verstärkt Hg^{2+} und weniger Hg^0 produziert wird (Barkay et al., 2003; Bridou et al., 2011). Dieser Mechanismus ist jedoch nicht mit der Präsenz des *mer*-Operons verknüpft und kann daher auch nicht mithilfe molekularbiologischer Methoden (z.B. der PCR unter Verwendung spezifischer Primer für *merA* und *merB*) nachgewiesen werden. Da die beteiligten biochemischen Mechanismen dieser oxidativen Demethylierung bisher nicht bekannt sind und nicht detektiert werden können, erschwert dies zumindest die Beurteilung der quantitativen Fähigkeit zur Hg-Methylierung (Bridou et al., 2011).

In Bezug auf die Methylierungs- und Demethylierungsfähigkeiten von Mikroorganismen innerhalb anaerober Mikrobiota eines ökologischen Systems könnte zunächst angenommen werden, dass ein Hg-Kreislauf durch die Hg(II)-Methylierung respektive MeHg-Demethylierung aufrecht erhalten wird. In natürlichen und offenen Systemen, ist aber eine Hg-Methylierung durch intestinale Mikroorganismen insofern bedeutsam, als dass diese – organische und äußerst gewebebegängige – Verbindung unmittelbar von umliegenden Gewebe aufgenommen und dort angereichert wird. Methylquecksilber wird quasi aus dem Kreislauf entfernt, bevor in einer Mischpopulation durch andere Organismen die Demethylierung durchgeführt werden kann. Daher haben auch geringe Potentiale zur Hg-Methylierung im $\mu\text{g}/\text{mL}$ Bereich eine toxikologische Bedeutung für höhere Organismen.

Für die Beurteilung der Kapazitäten zur Hg-Methylierung in mikrobiellen Kulturen, sollte daher die Möglichkeit zur simultanen Methylierung und Demethylierung berücksichtigt werden. Dabei können beide Eigenschaften in verschiedenen phylogenetischen Gruppen der SRB sowie in einzelnen Stämmen unterschiedlich ausgeprägt sein (Bridou et al., 2011).

Eine signifikante Demethylierung, die gegenüber der abiotischen Kontrolle in einem Bereich von 13% bis 48% lag, ist in Stämmen nachgewiesen worden, die zu folgenden Gattungen gehören: *Desulfomicrobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfatibacillum*, *Desulfobulbus* und *Desulfotomaculum* (Bridou et al., 2011). Vor diesem Hintergrund könnten die in der vorliegenden

Arbeit ermittelten Resultate für die Kultur *Dtm. alkaliphilum* so interpretiert werden, dass eine Demethylierung stattgefunden haben könnte, da die abiotische Medien-Kontrolle deutlich höhere MeHg-Gehalte als die Kultur aufwies.

Fähigkeit zur MeHg Produktion durch verschiedene Bakterien

In Bezug auf die vorliegende Arbeit waren die Bilanzen der SRB- und Anreicherungskulturen in zehn von 14 Kulturen bei > 60 pg/mL MeHg. Für die Positiv-Kontrolle *Db. propionicus* 2032 wurde eine deutliche Hg-Methylierung beobachtet. Dieser marine Sulfatreduzierer produzierte 146-343 pg MeHg/mL, was einer Methylierungsrate von 12 bis 29 pg/mL·h⁻¹ entspricht. Ähnliche Beobachtungen wurden von Gilmour et al. (2011) und Benoit et al. (2001a) erläutert und in einer Arbeit von Ranchou-Peyreuse et al. (2009) zusammengefasst. Dabei betragen die MeHg-Produktionsraten 10,6; 86,0 und 1,1 pg/mL·h⁻¹ im Verhältnis zu korrespondierenden initialen HgCl₂ Konzentrationen von je 1, 10 und 100 µg/L. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass die Methylierung von Hg sich offensichtlich nicht proportional zu der eingesetzten Menge anorganischen Quecksilbers verhält. Dies wurde bereits 1993 von Choi und Bartha beschrieben, wobei nach der Zugabe von 0,1 µg/mL HgCl₂ 37% methyliert wurden, während es bei Einsatz von 10 µg/mL HgCl₂ nur noch 1,5% waren. Es ist anzunehmen, dass sich diese Konzentrationen toxisch auf Mikroorganismen und hemmend auf die enzymatischen Reaktionen des Hg-Methylierungsmechanismus auswirken können.

Neben der Kultur von *Db. propionicus* wurden in der vorliegenden Arbeit in der Hauptsache die Gattung *Desulfovibrio* und zwei Arten von *Desulfotomaculum* auf die Methylierung von Hg untersucht. Die drei Anreicherungskulturen, die aus einer Zygoptera-Larve, *E. foetida* sowie *P. savignyi* gewonnen wurden, enthielten ebenfalls Organismen, die anhand des positiven Desulfoviridin-Nachweis den *Desulfovibrio* zugeordnet werden konnten.

In einer vergleichbaren Untersuchung von King et al. (2000) wurden die Hg-Methylierungsraten verschiedener SRB ermittelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass *Desulfobacterium* die höchsten Raten erzielte, während die geringsten Methylierungsraten von *Desulfovibrio* und *Desulfobulbus* gleichermaßen erreicht wurden: *Desulfobacterium* >> *Desulfobacter* ≈ *Desulfococcus* >> *Desulfovibrio* ≈ *Desulfobulbus*. Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass Desulfobacteraceae gegenüber Desulfovibrionaceae höhere Methylierungsraten ausprägten, ist auch konform mit der Erkenntnis von Achá et al. (2011) nach einer Untersuchung von bakteriellen Kulturen limnischer Systeme. Diese Unterschiede in den

Methylierungsraten sind korreliert mit physiologischen Ausprägungen. King et al. (2000) kamen zu dem Ergebnis, dass die Methylierungsrate in Reinkulturen von SRB (z.B. Desulfobacteriaceae), die Acetat vollständig zu CO₂ oxidieren dreimal höher war als diejenige, die nicht in der Lage sind Acetat zu oxidieren (Desulfovibrionaceae). Dies wird darauf zurückgeführt, dass die SRB unterschiedliche Mechanismen für die Methylierung von Hg nutzen können. Eine Zusammenfassung mit bekannten Details über diese Mechanismen wird in der folgenden Tab. 22 gegeben.

Tab. 22: Die Mechanismen zur Hg-Methylierung durch vollständige und unvollständige Oxidierer der SRB.

	Mechanismus A	Mechanismus B
Mikroorganismen	<i>Desulfobacteriaceae</i> spp., <i>Desulfococcus multivorans</i> 1be1	<i>Desulfovibrionaceae</i> spp. (z.B. <i>Desulfovibrio africanus</i>), <i>Desulfobulbus propionicus</i> 1pr3
Acetat-Oxidation	Vollständig (Oxidation von Acetat zu CO ₂)	Unvollständig (Substrat wird zu Acetat oxidiert)
Ausnahme	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> LS (enthält Enzyme der vollständigen Acetat-Oxidation)	
Mechanismus	Acetyl-CoA-Synthese-Weg für die vollständige Acetatoxidation	Unabhängig vom Acetyl-CoA Weg und Vitamin B ₁₂
Herkunft der Methylgruppe	Aminosäure Serin (C3)	
Suppression der Hg-Methylierung	durch Chloroform oder Propyliodid (hemmt aber auch das Wachstum)	Keine Suppression durch Chloroform
Enzymatische Katalysation	Ja: folgt Michaelis-Menten Kinetik, Reaktion verläuft 600x schneller als die nicht-enzymatische bei pH = 7	
Abhängigkeit von	Vit B ₁₂ und Cobalt (Corrinoid-enthaltende Methyl-Transferase mit Cobalt im reaktiven Zentrum)	Reaktion ist unabhängig von Vit B ₁₂ , Reaktion wird nicht beeinflusst durch Cobaltmangel
Literatur	Gilmour und Henry, 1991; Choi und Bartha, 1994 a-c; King et al., 2000; Ekstrom et al., 2003; Barkay und Wagner-Döbler, 2005	

In der vorliegenden Arbeit wurden intestinale SRB für das Screening zur Methylierung von Hg eingesetzt, wobei es sich dabei um die unvollständigen Oxidierer *Db. propionicus*, *Dv. sp.*, *Dtm. ruminis* und *Dtm. alkaliphilum* handelte (Postgate und Campbell, 1965; King et al., 2000; Pikuta et al., 2000). Es ist also davon auszugehen, dass andere intestinale SRB, die den Kohlenstoffmetabolismus zur vollständigen Oxidation von Acetat ausbilden, noch höhere Mengen an Methylquecksilber bilden können. Innerhalb der Gattung der *Desulfovibrio* wurden hier acht Reinkulturen und drei Anreicherungskulturen untersucht, wobei

Desulfovibrio sp. KMS2/1 den höchsten (durchschnittlichen) Gehalt an MeHg aufwies: *Dv. sp.* KMS2/1 (273 pg/mL) > Zy1 (242 pg/mL) > *Dv. piger* (225 pg/mL) > *Dv. giganteus* (186 pg/mL) > EF4 (154 pg/mL) \approx *Dv. termitidis* (149 pg/mL) > *Dv. sp.* DSM 7057 (112 pg/mL) > PS1 (93 pg/mL), wobei die Stämme *Dv. termitidis* DSM 11274, *Dv. termitidis* 5308 und *Dv. intestinalis* DSM 11275^T wahrscheinlich nicht in der Lage sind, Hg zu methylieren.

Baldi et al. (1993) beschrieben die Methylierungsrate von *Desulfovibrio* Stämmen, wobei in drei unabhängigen Laboruntersuchungen die folgenden Mittelwerte erfasst wurden: 13.98 ± 5.3 ng/mL MeHg für *Dv. desulfuricans* LS in 48 h. Dabei wurden 0.35% von HgCl₂ methyliert. In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Werte ermittelt. So lag die geringste Methylierungsrate bei 0.07% für *Dtm. alkaliphilum* 12257c und die höchste bei 1.53% für *Dtm. ruminis* 2154a. Die Werte für *Desulfovibrio*-Stämme lagen bei mindestens 0.08% für *Dv. sp.* 7075c bis zu 0.42% für *Dv. piger* 749a.

Die hohe Methylierungsrate, die in der Kultur von *Dtm. ruminis* DSM 2154 beobachtet wurde, ist ein äußerst interessanter und überraschender Befund. Dieser Stamm wurde ursprünglich aus dem Magen von Schafen isoliert und gehört zu den Firmicutes. Bisher gab es noch keine Beobachtungen zur Existenz eines Gram-positiven Firmicuten, der die Fähigkeit zur Methylierung von Hg besitzt. Somit konnte für die Gattung *Desulfotomaculum* erstmals gezeigt werden, dass zumindest ein Stamm (*Dtm. ruminis* DSM 2154) diese Ausprägung unter Laborbedingungen aufweist. Ranchou-Peyreux et al. (2009) untersuchten die Stämme *Dtm. nigrificans* 574 und *Dtm. acetoxidans* 771, konnten jedoch kein Indiz für eine MeHg Produktion finden. Von verschiedenen Firmicuten ist bekannt, dass sie über eine relativ hohe Methylquecksilberresistenz und demethylierende Eigenschaften verfügen können (Baldi et al., 1993). Die Beobachtung, dass von den zwei untersuchten *Desulfotomaculum*-Arten derart verschiedene Ausprägungen gegenüber der Hg-Resistenz vorliegen können, ist konform mit den Beobachtungen, dass die Fähigkeit der Hg-Methylierung nicht nur art- sondern auch stammabhängig ist (Ranchou-Peyreux et al., 2009; Gilmour et al., 2011). Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass einige Firmicutes, die genetisch betrachtet die Möglichkeit zur Hg-Methylierung besitzen, unter bestimmten Bedingungen Demethylierungsfähigkeiten nach horizontalen Gentransfers des *mer*-Operons erlangen und in der Bilanz keine MeHg Produktion beobachtet werden kann (Lapanje et al., 2008). Die nachfolgende Tab. 23 fasst zusammen, welche Mikroorganismen bisher in Reinkultur auf die

Hg-Methylierung getestet wurden und veranschaulicht die unterschiedlichen Potentiale auch innerhalb gleicher Arten.

Tab. 23: Übersicht über die Mikroorganismen, die bisher in Reinkultur auf die Hg(II)-Methylierung getestet wurden. MeHg-Produzenten sind rot gekennzeichnet und Untersuchungen dieser Arbeit blau. Zum Vergleich produzierter MeHg-Konzentrationen sei aufgrund der unterschiedlichen und komplexen Versuchsbedingungen (Kulturmedien, Dauer, analytische Methoden, Temperatur etc.) auf die angegebenen Referenzen verwiesen.

Spezies	Stammbezeichnung (Herkunft)			Isoliert aus	MeHg	Referenz
	DSMZ	ATCC	Andere			
aerobe heterotrophe Bakterien, 106 Arten				Fiora River, S. Fiora, Italien	-	Baldi et al., 1989
<i>Bacillus megaterium</i>				Boden	(+)	Vonk und Sijpenstein 1973
<i>Aerobacter aerogenes</i>				-	(+)	Vonk und Sijpenstein 1973
<i>Allochromatium vinosum</i>				-	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Bacteroides</i> sp.				menschliche Fäkalien	(+)	Rowland et al., 1975
<i>Bifidobacteria</i> spp.				menschliche Fäkalien	(+)	Rowland et al., 1975
<i>Clostridium pasteurianum</i>	525	6013		Boden	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Clostridium</i> sp.			ADR 31	Bucht von Biskaya, Frankreich	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i>	15576	BAA-743		Meeressediment	-	Bridou et al., 2011
<i>Desulfobacter curvatus</i>	3379	43919		Meeresschlick	-	Ekstrom et al., 2003; Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011
<i>Desulfobacter</i> sp.			BG-8	-	+	King et al., 2000
<i>Desulfobacterium</i> sp.			BG-33	-	+	King et al., 2000
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	2032 ^T	33891	Lindhorst 1pr3	Süwasserschlick	+	King et al., 2000; Benoit et al., 2003; Mehrotra et al., 2003, Ekstrom et al., 2003; Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011, diese Arbeit
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	6523		MUD	Schlamm aus UASB Reaktor, Japan	+	Ekstrom et al., 2003
<i>Desulfococcus multivorans</i>	2059	33890	1be1	Abwasser, Biogasanlage, Deutschland	+	King et al., 2000; Ekstrom et al., 2003

Spezies	Stammbezeichnung (Herkunft)			Isoliert aus	MeHg	Referenz
	DSMZ	ATCC	Andere			
<i>Desulfomicrobium aestuarii</i>	19191 ^T			Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Dias et al., 2008
<i>Desulfomicrobium escambiense</i>			ADR21	Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Bridou et al., 2011
<i>Desulfomicrobium escambiense</i>			ADR28	Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Bridou et al., 2011
<i>Desulfomicrobium escambiense</i>	10707 ^T	51164	ESC1	Süßwassersediment	+	Dias et al., 2008; Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011
<i>Desulfomicrobium salsuginis</i>			ADR28	Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Desulfomicrobium salsuginis</i>	19190 ^T			Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Dias et al., 2008
<i>Desulfomicrobium</i> sp.			ADR19	Bucht von Biskaya, Frankreich	-	Dias et al., 2008; Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011
<i>Desulfosporosinus</i> sp.			ADR30	Bucht von Biskaya, Frankreich	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	771	49208	5575	Schweinedung	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011
<i>Desulfotomaculum alkaliphilum</i>	12257 ^T	700784	S1	Schweine- und Rinderdung	-	diese Arbeit
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	574	19858	Delft 74	Süßwasser, Delft, Niederlande	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	2154 ^T	23193	DL	Schafmagen	+	diese Arbeit
<i>Desulfotomaculum</i> sp.			ADR22	Bucht von Biskaya, Frankreich	-	Bridou et al., 2011
<i>Desulfovibrio africanus</i>			ADR13	Bucht von Biskaya, Frankreich	+	Bridou et al., 2011; Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio africanus</i>	2603 ^T	19996	Benghazi	Brunnenwasser, Libyen	+	Ekstrom et al., 2003; Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011; Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio caledoniensis</i>			BerOc1	Abwasser Erdöl- raffinerie, Berre Lagune, Frankreich	+	Ranchou-Peyruse et al., 2009; Bridou et al., 2011; Gilmour et al., 2011

Spezies	Stammbezeichnung (Herkunft)			Isoliert aus	MeHg	Referenz
	DSMZ	ATCC	Andere			
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>		13541		Boden	+	King et al., 2000
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	1926		El Agheila Z	schwefelhaltiger Schlamm, Libyen	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			G20	-	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			ND132	Chesapeake Sedimente	+	Jay et al., 2002
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			M8	Malibu Lagoon, CA	+	Lin und Jay, 2007
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			M9	Malibu Lagoon, CA	+	Lin und Jay, 2007
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			LS	Sediment, Cheese- quake State Park, New Jersey	+	Choi und Bartha, 1993
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>ssp. aestuarii</i>		29578		Sandbank, Deutschland	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>ssp. desulfuricans</i>	6949	27774	MB	Schafmagen	-	Bridou et al., 2011; Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>ssp. desulfuricans</i>	642	29577	Essex 6	Sand, Gasmine, UK	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio giganteus</i>	4370		STg	Termite <i>Cubitermes</i> sp.	+	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio gigas</i>	1382 ^T	19364		Wasser, Etang de Berre, Frankreich	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	11275 ^T		KMS2	Termitendarm, <i>Mastotermes</i> <i>darwiniensis</i>	+	Limper et al., 2008
<i>Desulfovibrio intestinalis</i>	11275 ^T		KMS2	Termitendarm, <i>Mastotermes</i> <i>darwiniensis</i>	-	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio piger</i>	749 ^T	29098		menschl. Fäkalien	+	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	2638	14822		Schlick, British Guyana	-	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio</i> sp.	7057		G11	Rindermagen	+	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio</i> sp.			KMS2/1	Schabe <i>Cryptocercus</i> <i>punctulatus</i>	+	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio</i> sp.			T2	-	+	Gilmour et al., 2011

Spezies	Stammebezeichnung (Herkunft)			Isoliert aus	MeHg	Referenz
	DSMZ	ATCC	Andere			
<i>Desulfovibrio sp.</i>			X2	-	+	Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	11274		KSS1	Schabe <i>Cryptocercus punctulatus</i>	-	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio termitidis</i>	5308 ^T			Termite <i>Heterotermes indicola</i>	-	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio termitidis</i>			KH1	Termite <i>Heterotermes indicola</i>	+	diese Arbeit
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	644	49858	HI1	Boden, UK, Kent	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009; Gilmour et al., 2011
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	2119		Marburg	anaerober Klärschlamm, Deutschland	-	Ekstrom et al., 2003
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>Methanococcus maripaludis</i> synergistisches Wachstum		- 43000		marines Sediment, South Carolina	+	Pak und Bartha, 1998b
<i>Desulfuromonas palmitatis</i>	12391	51701	SDBY-1	marines Sediment	+	Kerin et al., 2006
<i>Enterobacter aerogenes</i>				Sediment, Augusta, Georgia	+	Hamdy und Noyes, 1975
<i>Escherichia coli</i>				-	(+)	Vonk und Sijpenstein 1973
<i>Escherichia coli</i>				menschliche Fäkalien	(+)	Rowland et al., 1975
<i>Geobacter sp.</i>			CLFeRB	eutrophisches Seesediment, Clear Lake, CA,	+	Fleming et al., 2006
<i>Geobacter hydrogenophilus</i>	13691		H-2	Erdölkontaminiertes Wasser, South Carolina, USA	+	Kerin et al., 2006
<i>Geobacter metallireducens</i>	7210	53774	GS-15	Schlamm, USA Potomac River	+	Kerin et al., 2006
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	12127	51573	PCA	Wassergraben-sediment, USA	+	Kerin et al., 2006
<i>Geobacter sulfurreducens</i>				-	+	Schäfer und Morel, 2009
<i>Mycobacterium phlei</i>				-	(+)	Vonk und Sijpenstein 1973

Spezies	Stammbezeichnung (Herkunft)			Isoliert aus	MeHg	Referenz
	DSMZ	ATCC	Andere			
<i>Neurospora crassa</i>					+	Landner, 1971
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				Boden	(+)	Vonk und Sijpenstein 1973
<i>Pseudomonas</i> spp.			3 Stämme	-	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009
<i>Shewanella alga</i>			BrY	Oberfläche einer Rotalge <i>Jania</i> sp.	-	Kerin et al., 2006
<i>Shewanella oneidensis</i>			MR-1	Schwarzes Meer	-	Kerin et al., 2006
<i>Shewanella putrefaciens</i>			CN-32	anaerobe Wasserprobe, Mexiko	-	Kerin et al., 2006
<i>Staphylococci</i> spp.				menschliche Fäkalien	(+)	Rowland et al., 1975
<i>Streptococci</i> spp.				menschliche Fäkalien	(+)	Rowland et al., 1975
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	10017 ^T		MPOB	Abwasser, Niederlande	-	Ranchou-Peyruse et al., 2009

ATCC = American Type Culture Collection; ^TTypstamm

+ Eine positive Hg-Methylierung liegt vor, wenn die MeHg-Konzentrationen signifikant über abiotischer oder negativer Kontrollen liegt, andernfalls -.

(+) Es wurde über Hg-Methylierung berichtet, die nach heutigen Kenntnisstand unter Vorbehalt betrachtet werden sollten, da durch die Versuchsbedingungen abiotische Methylierungen nicht auszuschließen sind.

Parameter für die Hg-Methylierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchsbedingungen so eingestellt, dass eine Hg-Methylierung begünstigt werden kann. Dies wurde z.B. durch das Aufrechterhalten eines niedrigen Redoxpotentials erreicht. Zudem gibt es Möglichkeiten, die Aufnahme von Hg in den Organismus durch Einsatz verschiedener Substanzen im Medium zu erleichtern. Zweckmäßig war hierbei der Zusatz von Cystein. Es ist bekannt, dass Hg mit Cystein neutrale Komplexe bildet, wodurch die Bioverfügbarkeit für das Schwermetall erhöht wird (Schaefer und Morel 2009). Ionisches Hg kann die Zellwand nicht ohne weiteres passieren.

Die Methylierung ist ein intrazellulärer Prozess, wobei Hg wahrscheinlich in einer neutralen Form aufgenommen wird, da die bisher bekannten biochemischen Mechanismen ausschließlich cytoplasmatisch ablaufen. Dabei wurde auch beobachtet, dass in „verbrauchten“ Medien mit Organismen geringerer Aktivität keine Methylierung mehr stattfinden kann

(Benoit et al., 2001a/ 2001b). Der Transport von Hg in die Zelle ist abhängig von der bakteriellen Aktivität sowie der Energiegewinnung (Frischmuth et al., 1993). Im Speziellen ist jedoch relativ wenig bekannt über die Transportmechanismen von Hg durch Bakterien insbesondere unter anaeroben Bedingungen (Schaefer und Morel, 2009). Zudem gibt es verschiedene Ansichten über die Quecksilberaufnahme in die bakterielle Zelle. Eine häufig geäußerte Annahme ist die Theorie der passiven Diffusion neutraler Hg(II)-Sulfid-Komplexe durch externe Membranen, wie z.B. in Form von $\text{Hg}(\text{SH})_2^0_{(\text{aq})}$ (Drott et al., 2007). An dem Modellorganismus *Escherichia coli* wurde entdeckt, dass die Aufnahme von neutralen Hg-Spezies mit der Diffusion über die Zellmembran konsistent ist (Benoit et al., 2001a). Die Gram-negative bakterielle Zellwand und Membran sind zwar komplex aufgebaut, aber die äußeren Lipopolysaccharide und Peptidoglykanlayer sind permeabel gegenüber relativ kleinen low-molecular-weight-Komponenten (HgS^0), wodurch dieses Modell durchaus realistisch ist. Der Transport von Metallkomplexen über die Zellmembran ist auch bekannt von Phytoplankton, wobei Silber mit der Verbindung $\text{AgCl}_{(\text{aq})}$ die bioverfügbare Spezies darstellt (Reinfelder und Chang, 1999). Auch andere Metalle werden als neutral vorliegende Organo-Metall-Komplexe (wie z.B. Kupfer, Cd, Ni, Pb) verhältnismäßig schnell über Diffusionsprozesse durch die Zellmembranen von Algen aufgenommen (Benoit et al., 2001a). Andere Studien hingegen machten bereits auf Sulfat-Transporter aufmerksam, die in der Lage sind, Chromat in die Zelle von *Pseudomonas fluorescens* einzubringen (Barton et al., 2007). Hg ist normalerweise nicht als freies Kation verfügbar, sondern wird meistens als kleine neutrale hydrophobe Spezies wie z.B. als HgS^0 aufgenommen (Benoit et al., 2001a). Die Annahme der passiven Diffusion von HgS als Transportsystem für anorganisches Hg wird auch im Review von Ravichandran (2004) behandelt. Zu dieser Hypothese passt auch die Beobachtung, dass die Methylierungsrate unter hohen Sulfidgehalten reduziert ist. Hohe Sulfidgehalte verschieben wahrscheinlich das Gleichgewicht in Richtung zahlreicher negativ-geladener Hg-S-Komplexe, die weniger gut von der Zelle aufgenommen werden können (Benoit et al., 2001a).

Diese Theorien erklären jedoch nicht die erhöhte Methylierungsrate nach Zugabe von Cystein. Daher wird angenommen, dass Hg durch Aminosäuren wie z.B. Histidin und Cystein komplexiert wird, z.B. zu $\text{Hg}(\text{Cys})_2$ und über zelluläre Transportmechanismen als Hg-Aminosäure-Komplex aktiv in die Zelle aufgenommen wird (Krupp et al., 2008; Schaefer und Morel, 2009). Es ist anzunehmen, dass dabei molekulare Mimikry eine Rolle spielt. Aus einer

Studie über Säugetiernieren ist bekannt, dass sogenannte Cystin-Transporter in den Epithelzellen Hg-Cystein-Komplexe transportieren und diese Transporter weisen Ähnlichkeiten zu jenen in Gram-negativen Bakterien auf (Bridges et al., 2004; Schaefer und Morel, 2009).

Diese Information war die Basis für die Wahl der Zusammensetzung der Medien für die Methylierungsassays, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Dass in den meisten untersuchten SRB Kulturen eine Methylierung von Hg beobachtet werden konnte, stützt zumindest die Beobachtung, dass die Zugabe von Cystein wahrscheinlich die Methylierungsrate begünstigte.

Neben der Bioverfügbarkeit von Hg als Hg-Cys-Komplex, beeinflussen weitere Faktoren die biotische mikrobielle Methylierung von Hg. Dabei spielt der Sulfidgehalt, die Wachstumsphase der Organismen und die Art des Metabolismus eine entscheidende Rolle (Frischmuth et al., 1993). Diese Faktoren können neben dem Potential der simultanen Methylierung/ Demethylierung auch in den verschiedenen Parallelen der untersuchten Kulturen schwanken und die variierenden MeHg Gehalte in einzelnen Kulturen erklären. Des Weiteren handelt es sich um biologische natürliche Systeme und die Schwankungen in den einzelnen Kulturen liegen daher in einem tolerablen Bereich.

Die Abhängigkeit der Methylierung von der Sulfatkonzentration im Medium ist ein sehr kontroverses Thema. Es gibt verschiedene Beobachtungen zur Hemmung der Methylierungsrate durch Sulfat-Konzentrationen. So wird beschrieben, dass bereits 10 μM gelöstes Sulfid zur Ausfällung von Hg-Sulfid-Mineralien führt und die Hg-Methylierung zumindest in Sedimenten sehr stark reduziert wird (Gilmour et al., 2011). King et al. (2000) hingegen beobachteten auch eine Methylierungsaktivität in Gegenwart von 30 mM Sulfat und Sulfid. Dass hohe Konzentrationen an Sulfat die Methylierung von Hg hemmen und optimale Konzentration für hohe Methylierungsraten 0,3 mM beträgt, erläuterten Gilmour et al. (1992). Nach Ekstrom et al., 2003 soll die für die Reaktion günstige Sulfatkonzentration bei 10 bis 100 nM liegen. Worin hingegen Einigkeit herrscht, ist wohl eine vollständige Inhibierung der Quecksilbermethylierung bei einer Konzentration von über 5 mM Sulfid (Weber, 1993). Derart hohe Sulfid-Konzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst. In manchen Kulturen wurde auch nur eine sehr geringe Sulfid-Konzentration detektiert, aber es ist nicht auszuschließen, dass insbesondere *Desulfovibrio* Arten unter

bestimmten Bedingungen fermentative Strategien zur Energiegewinnung verfolgen (King et al., 2000; Gilmour et al., 2011; Bridou et al., 2011).

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass verschiedene intestinale Sulfatreduzierer in der Lage sind, unter Laborbedingungen MeHg zu produzieren. Die Kulturen mit dieser Fähigkeit wurden ursprünglich aus verschiedenen Lebewesen isoliert: *Dtm. ruminis* aus einem Schafmagen, *Dv. piger* aus menschlichen Fäkalien, *Dv. sp.* DSM 7057 aus Rindermagen, *Dv. giganteus*, *Dv. termitidis* KH1 aus den Termiten *Cubitermes sp.* bzw. *Heterotermes indicola*, *Dv. sp.* KMS2/1 aus der Küchenschabe *Cryptocercus punctulatus* und zwei Anreicherungskulturen, die aus *Eisenia foetida* und dem Intestinaltrakt einer Kleinlibellenlarve gewonnen wurden. Daraus geht hervor, dass die Eigenschaft zur Produktion von organischem Hg offensichtlich sehr weit in der Umwelt, insbesondere auch im terrestrischen System verbreitet ist. Die biotische mikrobielle Methylierung ist daher eine bedeutende Ursache für die Anreicherung von MeHg im Gewebe. Es liefert auch eine Erklärung für die schon lang bekannte Bioakkumulation von Hg im Verlaufe von terrestrischen Nahrungsketten wildlebender Tiere (Wren, 1986).

4.5. Lokalisation von Hg mittels der LA-ICP-MS

Es ist bekannt, dass im Gewebe von Kompostwürmern zu einem erheblichen Anteil organisches MeHg akkumuliert wird, sofern diese in einem mit Hg angereicherten Boden inkubiert werden (Beyer et al., 1985). Der Anteil von MeHg lag dabei in einer Arbeit von Knopf (2010) bei etwa 86 ng/kg MeHg im Gewebe nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen in Erde mit 8 mg/kg Hg^{2+} und ist konform mit den Beobachtungen von Zhang et al. (2009). Die relative Höhe der Konzentration von MeHg, die in einem Organismus gegenüber einem umgebenden Medium wie z.B. den Boden angereichert wird, kann über den Bioakkumulationsfaktor allgemein beschrieben werden (Beyer et al., 1985). Das Verhältnis der Konzentrationen von Hg in den Vergleichskompartimenten (Boden und Wurm) liegt nach einer Untersuchung von Burton et al. (2006) für *E. foetida* in einem Bereich von 0,6 bis 3,3. Unter den gleichen Bedingungen liegt dabei der Bioakkumulationsfaktor von MeHg mit 175 bis 249 deutlich höher. In diesem Zusammenhang wurden überdies Bioakkumulationsfaktoren von 20.000 bis 50.000 in Biofilmen aus Algen und verschiedenen fluvialen Bakterien auf Carbohydratmaterial ermittelt (Hintelmann et al., 1993). Diese hohen Werte geben einen deutlichen Hinweis auf die Resorption von Hg in organischer Form z.B. als MeHg, das durch

seine Lipophilität ungehindert ins Gewebe gelangt (Zhang et al., 2009). Interessant ist dabei die Tatsache, dass der größte Anteil des akkumulierten Quecksilbers im Gewebe MeHg ist. Bei Fischen wurde gezeigt, dass 96 bis 100% des Gesamtquecksilbers im Muskel als MeHg vorliegt (Wagemann et al., 1997; Kösters, 2007). Im Gegensatz dazu gibt es nur marginale Informationen bezüglich der Verteilung von Quecksilberspezies in Würmern. Nur in einer Untersuchung, von Burton et al. (2006), wird ein Anteil von 16 bis 50% MeHg am Gesamtquecksilber detektiert. Die Versuchsbedingungen sollten jedoch speziell an diese Fragestellung angepasst werden und die Würmer müssen mehrere Tage ausgehungert werden, da der Durchtritt des Vomitus (respektive der Erde) mind. 12 h beträgt. Nur so kann jedoch gewährleistet werden, dass in der Messung ein zu hoher Anteil von anorganischem Hg aus Bodenpartikeln registriert wird.

Ferner liegen Untersuchungen über die Akkumulation von MeHg in höheren Organismen (z.B. Fische oder Rehwild) vor, wobei sog. „Akkumulationszonen“ beschrieben wurden, da in verschiedenen Organen, insbesondere im Fettgewebe, Hirn oder Leber, verschiedene Hg-Konzentrationen detektiert wurden. Beispielsweise kann die Konzentration von MeHg in der Leber zwischen 30 und 90% betragen (Kösters, 2007). In Bezug auf den Kompostwurm kann jedoch anhand der Untersuchung des Gewebsschnitts mittels LA-ICP-MS das Auftreten spezifischer Akkumulationszonen nicht beurteilt werden.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die intestinalen Mikroorganismen zu einem erheblichen Teil an der Methylierung von Hg im Intestinaltrakt beteiligt sind. Anhand der Untersuchung und Lokalisation der Quecksilbersignale in histologischen Querschnitten von *E. foetida* wurde gezeigt, dass die Proben im Gegensatz zu Kontrollen aus Inkubationsansätzen mit Hg^{2+} angereicherter Erde Quecksilbersignale aufwiesen. Es wurden – je nach Position innerhalb des Querschnitts – signifikante Unterschiede der akkumulierten Konzentration von Hg deutlich. Dabei konnten drei Kategorien beschrieben werden, die sich in hohen, mittleren sowie geringen Signalen äußerten. Es ist bekannt, dass für die Quantifizierung mittels der LA-ICP-MS ein linearer dynamischer Bereich vorliegt, d.h. dass die Signalintensitäten proportional zur Konzentration von Hg sind. Bezogen auf die Ergebnisse aus der Bestimmung von Hg im Gewebe sind die Konzentrationen der höchsten Kategorie um den Faktor sieben höher als die Gehalte der untersten Gruppierung. Interessant war daher das Ergebnis, dass insbesondere die inneren Kompartimente (Gastrodermis) deutlich höhere Quecksilbergehalte aufwiesen als das Gewebe im mittleren Bereich respektive der

außen befindliche Hautmuskelschlauch. Anhand farbiger Markierungen der Hg-Intensitäten in den Bildern histologischer Gewebsschnitte wurde ein Anreicherungsgradient von Hg beginnend im Intestinaltrakt bis hin zu den äußeren Geweben beobachtet. In einer Studie von Vijver et al. (2003) wurde die Resorption von Metallen durch den Wurm *Lumbricus rubellus* untersucht. Sofern die Metalle in Wasser gelöst vorlagen, konnte keine Aufnahme in organischer Form beobachtet werden und die Hauptaufnahmeroute von Cadmium, Zink und Blei erfolgte dann dermal und nicht intestinal. Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass in der vorliegenden Arbeit nach mikrobieller Aktivität alkyliertes Hg über die intestinale Route im Gewebe akkumuliert wird. Auch im Menschen wurde bereits untersucht, dass 90-100% des MeHg über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen wird und von dort aus in die Blutbahn gelangt und andere Kompartimente erreicht (Counter und Buchanan, 2004).

Quantifizierungsstrategien

Die Quantifizierung der Quecksilberintensitäten mittels LA-ICP-MS ist nicht möglich und gegenwärtig wird an präzisen Kalibrierungsstrategien für die Elementanalytik – auch in biologischen Proben – intensiv geforscht (Orlandini von Niessen et al., 2011). Viele Untersuchungen der Element- und Spurenanalytik wie z.B. im Rahmen medizinischer Fragestellungen, beschreiben (wie in dieser Arbeit) mittels der Signalintensitätsangabe den Gehalt der untersuchten Elemente in Gewebeproben (Becker et al., 2008). Andere häufige Anwendungen bestehen darin, dass die Gewebe mit dem Laser abgerastert und die Signale schließlich mittels Imaging-Methoden grafisch dargestellt werden (Feldmann et al., 2002). In Bezug auf das Wurmgewebe war es im Rahmen dieser Arbeit jedoch zweckmäßig, die zu ablatierenden Positionen präzise und gezielt auszuwählen, da im Coelom des histologischen Dünnschnittes deutliche inhomogene Gewebsstrukturen zu beobachten waren.

Die Problematik der Kalibrierung geht mit dem Ablationsprozess einher. Der Ablationsprozess ist abhängig von einer Vielzahl von Parametern und die Quantifizierung mit Proben, die sich in der Oberflächenstruktur, Matrix, in optischen Eigenschaften oder der Massendichte unterscheiden können. Insbesondere die matrixabhängige Elementfraktionierung, die von der Laserwellenlänge, dem Kratervolumen und der chemischen Probenkomponenten beeinflusst wird, erweist sich im Allgemeinen als äußerst problematisch bei der Quantifizierung (Beauchemin, 2008). Für Gehaltsabschätzungen kann

eigens hergestelltes Referenzmaterial hinreichend sein, welches zusätzlich mittels Gesamtaufschluss und MS analysiert wird (Feldmann et al., 2002; Becker et al., 2008).

Im Allgemeinen wird eine Kalibrierung jedoch durch die Verwendung matrixangepasster zertifizierter Referenzmaterialien erreicht (Ibáñez-Palomino et al., 2012). Meistens werden diese Materialien aus gefriergetrockneten und gemahlene biologischen Proben (Pflanzenmaterial, Leber, Muskelgewebe) gewonnen. Die präzise und orts aufgelöste Kalibrierung ist jedoch durch die natürliche Inhomogenität des Materials sowie im Vergleich zu der realen Probe eher ungeeignet (Feldmann et al., 2002; Beauchemin, 2008; Bings et al., 2010). Demgegenüber sind Kalibrierungen mit frischem Gewebematerial prinzipiell möglich und wurden erstmals von Feldmann et al. (2002) gezeigt. Allerdings ist für diese Applikation in der Regel eine Kühlzelle für die Probe erforderlich. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass nur verhältnismäßig wenig Referenzmaterial verfügbar ist (Beauchemin, 2008). Aktuell wird eine Kalibrierungsstrategie entwickelt, in der getrocknete Rückstände (auf einer beliebigen Matrix) von Picoliter-Tröpfchen einer wässrigen Standard-Lösung als Referenzmaterial eingesetzt werden, um einzelne Partikel, Zellen oder andere mikroskopische Objekte zu untersuchen (Orlandini von Niessen et al., 2011).

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Signalintensität in einem dynamischen Bereich untersucht. Der entscheidende Vorteil der LA-ICP-MS gegenüber anderen analytischen Verfahren ist eine präzise orts aufgelöste Messung mit hohen Nachweisgrenzen bei Spurenelementuntersuchungen. Mithilfe der LA-ICP-MS wurde in dieser vorliegenden Arbeit erstmalig die Lokalisation von Hg in einem Gewebsschnitt dargestellt.

Innerhalb dieser Thematik können weitere vertiefte Untersuchungen fortgeführt werden. Neue Erkenntnisse bezüglich der Mechanismen und Transportrichtungen zur Anreicherung des Schwermetalls in verschiedenen Kompartimenten kann einen nennenswerten Beitrag dazu leisten, das Verständnis der Herkunft von MeHg als primäre organische und gewebsgängige Hg-Spezies zu vertiefen. Aber auch in anderen biologischen Untersuchungen birgt die Anwendung der LA-ICP-MS ein außerordentliches Potential. In Kombination mit eindrucksvollen quantitativen Imaging-Methoden können Akkumulationsregionen oder Gradienten des gesuchten Elements sofort erfasst werden. Es ist denkbar, dass auch komplexe bakterielle Kolonien und Biofilme untersucht werden, um die Wechselwirkung von Signalmolekülen (für quorum sensing), metallbindenden Proteinen, Nährstoffgradienten

oder Elementverteilungen zu erforschen. Es wurden z.B. cobaltbindende Proteine in Blut untersucht und die Humin- und Fulvinsäuren charakterisiert (Latimer et al., 2009). Insbesondere in Kombination mit anderen analytischen oder molekularbiologischen Untersuchungen wie z.B. der 2D-Gelelektrophorese und der MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation) mit MS ist die LA-ICP-MS eine enorme Bereicherung für die Bioanalytik.

5. Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende Untersuchung intestinaler Sulfat-reduzierender Bakterien zur Produktion von Hg durchgeführt. Diese Fähigkeit ist oftmals nur bei einzelnen Vertretern einer Gattung oder Art ausgeprägt, was auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Die Prävalenz der Hg-Methylierung innerhalb phylogenetischer Gruppen ist bisher nicht vollständig untersucht und dessen Aufklärung könnte daher im Fokus zukünftiger Screenings stehen. Zunächst wäre es äußerst interessant, den einzig bisher bekannten Vertreter der Firmicutes, *Dtm. ruminis* näher auf die Methylierung von Hg unter verschiedenen Parametern, wie z.B. dem Einfluss des Substratangebots zu untersuchen sowie die Spezies der Firmicutes umfassend zu testen.

Zudem könnte die Untersuchung anderer SRB im Rahmen ausgesuchter phylogenetischer Cluster wichtige Hinweise liefern, in wie weit diese Fähigkeit genetisch determiniert ist und sich evolutionäre Relationen entwickelten. Unter praktischen Aspekten der Durchführung des MeHg-Screenings wäre es von Vorteil, in Zukunft die Bilanz der simultanen Demethylierungs- und Methylierungsfähigkeit jeder einzelnen Kultur zu ermitteln. Dies könnte unter dem Einsatz mehrerer stabiler Hg-Isotope realisiert werden. Dazu müsste das Nährmedium in den Tests gleichzeitig mit verschiedenen markierten Hg-Isotopen in Form von HgCl_2 und MeHg gespickt werden, während die Durchführung der Isotopenverdünnungsmethode mithilfe eines zusätzlichen Hg-Isotopes erfolgen kann. Weiterhin wäre für die präzise Ermittlung dieser Bilanzen die Quantifizierung von Hg^0 in der Gasphase vor Beginn der Probenextraktion von alkyliertem Quecksilber notwendig. Insgesamt könnten solche Messungen weitere wichtige Informationen über den Methylierungsmechanismus geben. Eine aufschlussreiche Ergänzung wäre eine simultane molekularbiologische Detektion des *mer*-Operons in den einzelnen Kulturen.

Der Mechanismus der Methylierung von Hg ist im Allgemeinen schwer fassbar und von sehr vielen Faktoren abhängig. Um Schlüsselenzyme für diese Reaktion ausfindig zu machen, gibt es bisher keine allgemein anwendbare Methode. Zunächst schien es zweckmäßig zu sein, Techniken wie die 2D-Gelelektrophorese – eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung komplexer Proteingemische – einzusetzen. Die bakteriellen Kulturen müssen dazu unter Standardbedingungen kultiviert und vergleichend – mit und ohne HgCl_2 – inkubiert werden, um spezifische Genexpression

für die Methylierung von Hg zu induzieren bzw. die Proteine zu identifizieren. Die sulfidhaltigen Kulturen sind jedoch äußerst komplex in ihrer Zusammensetzung und nach der Zugabe von HgCl_2 war zu erwarten, dass eine unbekannte Quantität von Einzelproteinen strukturelle Veränderungen erfahren. Die Auftrennung mittels der 2D-Gelelektrophorese ist erschwert durch kaum reproduzierbare Ergebnisse oder nicht eindeutiger Korrelationen spezifischer Spots und der Fähigkeit zur Hg-Methylierung. Um die enzymatischen Hintergründe der Hg-Methylierung aufzuklären, gibt es demgegenüber eine andere Technik, die realisierbar zu sein scheint. Dabei könnte die Erzeugung und Sammlung von Mutanten eines bekannten Hg-Methylierer und SRB-Stamms eingesetzt werden. Die Voraussetzung ist, dass dieser Stamm unter bekannten Bedingungen MeHg produziert (wie z.B. *Desulfobulbus propionicus 1pr3*) und vollständig sequenziert wird. Mittels genetischer Manipulation durch den Vorgang der Konjugation können transposable Elemente in den Organismus überführt werden. Das Ziel sollte darin bestehen, Mutanten zu detektieren, die nach dieser Veränderung die Fähigkeit zur Hg-Methylierung verloren haben. Durch deren vollständigen Sequenzierung (und Anlegen von „Mutanten-Bibliotheken“) können schrittweise die Gene, Proteine und Enzyme aufgeklärt werden, die in diesem Methylierungsmechanismus involviert sind. Die Resultate aus solchen Untersuchungen sowie das nähere Verständnis des Mechanismus der Hg-Methylierung können entscheidend dazu beitragen, zukünftige Strategien zur Reduktion von MeHg in der Umwelt zu entwickeln.

6. Referenzen

- Achá D, Hintelmann H, Yee J** (2011). Importance of sulfate reducing bacteria in mercury methylation and demethylation in periphyton from Bolivian Amazon region. *Chemosphere* 82: 911-916.
- Armstrong HEL, Corns WT, Stockwell PB, O'Conner G, Ebdon L, Evans EH** (1999). Comparison of AFS and ICP-MS detection coupled with gas chromatography for the determination of methylmercury in marine samples. *Anal Chim Acta* 1999: 245-253.
- Avramescu ML, Yumvihoze E, Hintelmann H, Ridal J, Fortin D, Lean DRS** (2011). Biogeochemical factors influencing net mercury methylation in contaminated freshwater sediments from the St. Lawrence River in Cornwall, Ontario, Canada. *Sci Total Environ* 409: 968-978.
- Baldi F, Filippelli M, Olson GJ** (1989). Biotransformation of mercury by bacteria isolated from a river collecting cinnabar mine waters. *Microb Ecol* 17: 263-274.
- Baldi F, Pepi M, Filippelli M** (1993). Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation. *Appl Environ Microb* 59: 2479-2485.
- Barkay T, Gillman M, Turner RR** (1997). Effects of dissolved organics carbon and salinity on the bioavailability of mercury. *Appl Environ Microb* 63: 4267-4271.
- Barkay T, Miller SM, Summers AO** (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microb Rev* 27: 355-384.
- Barkay T, Wagner-Döbler I** (2005). Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling Hg toxicity in the environment. *Adv Appl Microbiol* 57: 1-52
- Barkay T, Kritee K, Boyd E, Geesey G** (2010). A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase. *Environ Microbiol* 12: 2904-2917.
- Barton LL** (1995). *Biotechnology Handbooks 8. Sulfate-reducing bacteria*. Atkinson T, Sherwood RF (Edt.), Plenum Press, NY.
- Barton LL, Goulhen F, Bruschi M, Woodards NA, Plunkett RM, Rietmaeijer FJM** (2007). The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biometals* 20: 291-302.
- Beauchemin D** (2008). Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 80: 445-4486.
- Becker JS, Zoriy M, Wu B, Matusch A, Becker JS** (2008). Imaging of essential and toxic elements in biological tissues by LA-ICP-MS. *JAAS* 23: 1275-1280.

- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Heyes A** (1999a). Sulfide controls on Hg speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ Sci Technol* 33: 951-957.
- Benoit JM, Mason RP, Gilmour CG** (1999b). Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol-water partitioning and implication for the availability to methylating bacteria. *Environ Toxicol Chem* 18: 2138-2141.
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP** (2001a). The influence of sulfide on solid-phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environ Sci Technol* 35: 127-132.
- Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP** (2001b). Aspects of bioavailability of mercury for methylation in pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Appl Environ Microbiol* 67: 51-58.
- Benoit JM, Gilmour CC, Heyes A, Mason RP, Miller C** (2003). Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic ecosystems. *Biogeochemistry of Environmental Important Trace Elements*, ACS Symposium Series, Chai Y, Braids OC (Edt.). Am Chem Soc 835: 262-297.
- Berchtold M, Chatzinotas A, Schönhuber W, Brune A, Amann R, Hahn D, König H** (1999). Differential enumeration and in situ localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Arch Microbiol* 172: 407-416.
- Berman M, Chase T, Bartha R** (1990). Carbon flow in mercury biomethylation by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl Environ Microbiol* 56: 298-300.
- Bettmer J, Bayón MM, Encinar JR, Sánchez MLF, Fernández de la Campa MRF, Sanz Medel A** (2009). The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J Proteom* 72: 989-1005.
- Beyer WN, Cromartie E, Moment GB** (1985). Accumulation of methylmercury in the earthworm, *Eisenia foetida*, and its effect on regeneration. *Bull Environ Contam Toxicol* 35: 157-162.
- Bings NH, Bogaerts A, Broekaert JAC** (2010). Atomic spectroscopy: a review. *Anal. Chem.* 82: 4653-4681.
- Bloom NS, Colman JA** (1997). Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius J Anal Chem* 358: 371-37.

- Bloom NS, Preus E, Katon J, Hiltner, M** (2003). Selective extractions to assess the biogeochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. *Anal Chim Acta* 479: 233-248.
- Blume HP, Stahr K, Leinweber P** (2011). *Bodenkundliches Praktikum*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Boga HI, Ludwig W, Brune A** (2003). *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1397-1404.
- Bridges CC, Bauch C, Verrey F, Zalups RK** (2004). Mercuric conjugates of cysteine are transported by the amino acid transporter system b^{0,+}: Implications of molecular mimicry. *J Am Soc Nephrol* 15: 663-673.
- Bridou R, Monperrus M, Gonzalez PR, Guyneaud R, Amouroux D** (2011). Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation of mercury capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. *Environ Toxicol Chem* 30: 337-344.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J** (2000). *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Bundesministerium für Umweltschutz, Naturschutz und Reaktorsicherheit Deutschland** (2012). Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung nach § 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1 des Bundes-Bodenschutzgesetzes für die direkte Aufnahme von Schadstoffen auf Kinderspielflächen, in Wohngebieten, Park- und Freizeitanlagen und Industrie- und Gewerbegrundstücken. <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/bbodschv/gesamt.pdf> (28.01.2013).
- Bunke M** (2007). Ausarbeitung, Validierung und Anwendung einer Methode zur simultanen Bestimmung von Monomethylquecksilber und anorganischem Quecksilber in Fischgewebe und Fischembryonen. Universität Hamburg.
- Burton DT, Turley SD, Fisher DJ, Green DJ, Shedd TR** (2006). Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water, Air Soil, Pollut* 170: 37-54.
- Byzov BA, Khomoyakov NV, Kharin SA, Kurakov AV** (2007). Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. *Europ J Soil Biol* 43: S149-S156.
- Calvert J.** (2007). *Mercury: the lore of mercury, especially its uses in science and engineering*. Denver, CO: University of Denver.

- Cammann H** (2010). Instrumentelle Analytische Chemie. Spektrum Akad Verlag Heidelberg
- Celo V, Lean DRS, Scott SL** (2006). Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Sci Total Environ*: 368: 126–137.
- Cesar R, Juan C, Marianna S, Bertolino LC, Egler S, Casthilhos Z, Polivanov H, Bidone E, Perez, D** (2011). Mercury exotoxicity assessment in three tropical soil classes using acute bioassays with earthworms. Vortrag. ICMGP, Halifax, Kanada, 2011.
- Compeau CC, Bartha R** (1984). Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH, and salinity conditions. *Am Soc Microbiol* 48: 1203-1207.
- Compeau CC, Bartha R** (1985). Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Am Soc Microbiol* 50: 498-502.
- Compeau GC, Bartha R** (1987). Effect of salinity on mercury-methylating activity of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 53: 261-265.
- Choi SC, Bartha R** (1993). Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 59: 290–295.
- Choi SC, Bartha R** (1994a). Environmental factors affecting mercury methylation in estuarine sediments. *Bull Environ Contam Toxicol* 53: 805–812.
- Choi SC, Chase T, Bartha R** (1994b). Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 60: 1342–1346.
- Choi SC, Chase T, Bartha R** (1994c). Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol* 60: 4072–4077.
- Counter SA, Buchanan LH** (2004). Mercury exposure in children: a review. *Toxicology and Appl Pharmacol* 198: 209– 230.
- Craig P** (2003). Organometallic compounds in the environment. Wiley Verlag Hoboken, USA.
- Demuth N** (2001a). Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse (MSIVA) als Validierungsmethode für Bestimmungen von Methylquecksilber mittels GC/ICP-MS. Doktorarbeit Universität Mainz.
- Demuth N, Heumann KG** (2001b). Validation of methylmercury determinations in aquatic systems by alkyl derivatization methods for GC analysis using ICP-IDMS. *Anal Chem* 73: 4020-4027.
- Devereux R, Winfrey MR, Winfrey J, Stahl D** (1996). Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and Hg methylation in estuarine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 20: 23-31.

- Diaz-Bone RA, van de Wiele T** (2010). Biotransformation of metal(loid)s by intestinal microorganisms. *Pure Appl Chem* 82, 409-427.
- Dias M, Salvado JC, Monperrus M, Caumette P, Amouroux D, Duran R, Guyneaud R** (2008). Characterization of *Desulfomicrobium salsuginis* sp. nov. and *Desulfomicrobium aestuarii* sp. nov., two new sulfate-reducing bacteria isolated from the Adour estuary (French Atlantic coast) with specific mercury methylation potentials. *Syst Appl Microb* 31: 30-37.
- Dillings W, Cypionka H** (1990). Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 71: 123-128.
- Dressler VL, Goldschmidt-Antes F, Moreira CM, Pozebon D, Duarte FA** (2011). As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: a review. *Intern J Mass Spectrom* 307: 149-162.
- Dröge S, Limper U, Emtiazi F, Schönig I, Pavlus N, Drzyzga O, Fischer U, König H** (2005). In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chafer *Pachnoda marginata*. *J Gen Appl Microbiol* 51: 57-64.
- Drott A, Lambertsson L, Björn, E, Skyllberg U** (2007). Importance of dissolved neutral mercury sulfides for methyl mercury production in contaminated sediments. *Environ Sci Technol*: 2270-2276.
- Duran, R, Ranchou-Peyreuse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille M, Bareille G, Goni MS, Salvado JC, Amouroux D, Guyneaud R, Donard OFX, Caumette P** (2008). Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). *Environ Poll* 156: 951-958.
- Durrant SF, Ward NI** (2005). Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *JAAS* 20: 821-829.
- Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T** (2007). Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl Hg poisoning. *J Neurol Sci* 262: 131-144.
- Ekstrom EB, Morel FMM, Benoit JM** (2003). Mercury methylation independent of the Acetyl-Coenzyme A pathway in sulfate-reducing bacteria. *Am Soc Microbiol* 69: 5414-5422.
- Ekstrom EB, Morel FMM** (2008). Cobalt limitation of growth and mercury methylation in sulfate-reducing bacteria. *Environ Sci Technol* 2008: 93-99.
- Emde K** (2000). Geomorphologisch-Bodenkundliches Laborpraktikum. Skript. Universität Mainz.

- EPA: Environmental Protection Agency** (1997). EPA mercury study report to congress. Publication EPA-452/R-97-009. Office of air quality and standards and office of research and development, U.S. Environ Prot Agency, Washington, D.C.
- Europäische Kommission** (2010). Mitteilung der Kommission an das Europäische Parlament und den Rat – Überprüfung der Gemeinschaftsstrategie für Quecksilber. Brüssel. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2010:0723:FIN:DE:PDF> (10.01.13).
- Fein MB, Martin AM, Wightman PG** (2001). Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach. *Geochim Cosmochim Acta* 65: 4267–4273.
- Feldmann J, Kindness A, Ek P** (2002). Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *JAAS* 17: 813-818.
- Filipelli M, Baldi F** (1993). Alkylation of ionic mercury to methylmercury and dimethylmercury by methylcobalamin: simultaneous determination by purge-and-trap GC in line with FTIR. *App Organomet Chem* 7: 487-493.
- Fitzgerald WF, Engstrom DR, Mason RP, Nater EA** (1997). The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environ Sci Technol* 32: 1-7.
- Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC** (2006). Mercury methylation from unexpected sources: molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 72: 457-464.
- Frischmuth A, Weppen P, Deckwer WD** (1993). Microbial transformation of Hg (II). *J Biotechnol* 29: 39-55.
- Fröhlich J, Sass H, Babenzien HD, Kuhnigk T, Varma A, Saxena S, Nalepa C, Pfeiffer P, König H** (1999). Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp. nov. from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Can J Microbiol* 45: 145-152.
- Gadd GM** (1993). Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol Rev* 11: 297-316
- Geets J, Borremans B, Diels L, Springael D, Vangronsveld J, van der Lelie D, Vanbroekhoven K** (2006). DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 66: 194-205.
- Gießmann U, Greb U** (1994). High resolution ICP-MS – a new concept for elemental mass spectrometry. *Fres J Anal Chem* 350: 186-193.

- Gilboa-Garber G** (1971). Direct spectrophotometric determination of inorganic sulfide in biological materials and in other complex mixtures. *Anal Biochem* 43: 129-133.
- Gilmour CC, Henry EA** (1991). Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environ Poll* 71: 131-169.
- Gilmour CC, Henry EA and Mitchell R** (1992). Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environ Sci Technol* 26: 2281-2287.
- Gilmour CC, Elias DA, Kucken AM, Brown SD, Palumbo AV, Schadt CW, Wall JD** (2011). Sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Appl Environ Microbiol* 77: 3938-3951.
- Greenwood MR** (1984). Quecksilber. In: *Metalle in der Umwelt*. E. Merian (ed.), Verlag Chemie, Weinheim 511-539.
- Hamdy MK, Noyes OR** (1975). Formation of methyl mercury by bacteria. *Appl Env Microb* 30: 424.
- Heumann KG** (1992). Isotope dilution mass spectrometry. *Int. Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 118/119: 575-592.
- Hintelmann H, Ebinghaus R, Wilken RD** (1993). Accumulation of mercury (II) and methylmercury by microbial biofilms. *Wat Res* 27: 237-242.
- Hintelmann H, Nguyen HT** (2005). Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. *Anal Bioanal Chem* 381: 360–365.
- Holleman AF, Wiberg EN** (2007). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter Verlag New York.
- Hollweg TA, Gilmour CC, Mason RP** (2010). Mercury and methylmercury cycling in sediments of the mid-Atlantic continental shelf and slope. *Limnol Oceanogr* 55: 2703-2722.
- Holmes CD, Jacob DJ, Corbitt ES, Mao J, Yang X, Talbot R and Slemr F** (2010). Global atmospheric model for mercury including oxidation by bromine atoms. *Atmos Chem Phys* 10: 12037-12057.
- Hornor SG, Mitchell MJ** (1981). Effect of the earthworm *Eisenia foetida* (oligochaeta) on fluxes of volatile carbon and sulfur compounds from sewage sludge. *Soil Biol Biochem* 13: 367-372.
- Horvat M, Wilken RD** (2000). "Mercury as a global pollutant" – the fifth international conference. *Fresenius J Anal Chem* 366: 415–416.
- Houk RS** (1986). Mass spectrometry of inductively coupled plasmas. *Anal Chem* 58: 97-105.

- Hungate RE** (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in microbiology, Norris JR and Ribbons DW (eds.) Vol 3. Academic Press Inc, New York.
- Ibáñez-Palomino C, López-Sánchez JF, Sahuquillo A** (2012). Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs? *Anal Chim Acta* 720: 9-15.
- Imura N, Sukegawa E, Pan SK, Nagao K, Kim JY, Kwan T, Ukita T** (1971). Chemical methylation of inorganic mercury with methylcobalamin, a vitamin B₁₂ analog. *Sci* 172: 1248–1249.
- Issaro N, Abi-Ghanem C, Bermond A** (2009). Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Anal Chim Acta* 631: 1-12.
- Jackson KW** (1994). Atomic Absorption, Atomic Emission and Flame Emission Spectrometry. *Anal Chem* 66: 252R-279R.
- Jay JA, Murray MJ, Gilmour CC, Mason RP, Morel FMM, Roberts AL, Hemond HF** (2002). Mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* ND 132 in the presence of polysulfides. *Appl Environ Microb* Nov:5741-5745.
- Jensen S, Jernelöv A** (1969). Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 223: 753-754.
- Jiménez-Moreno M, Perrot V, Epov VN, Monperrus M, Amouroux D** (2013). Chemical kinetic isotope fractionation of mercury during abiotic methylation of Hg(II) by methylcobalamin in aqueous chloride media. *Chem Geol* 336: 26–36.
- Kerin EJ, Gilmour CC, Roden E, Suzuki MT, Coates JD, Mason RP** (2006). Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Appl Environ Microb* Dec: 7919-7921.
- King JK, Kostka JE, Frischer ME, Saunders FM** (2000). Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at viable rates in pure culture and in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 66: 2430-2437.
- Kniemeyer O, Fischer T, Wilkes H, Glockner FO, Widdel F** (2003). Anaerobic degradation of Ethylbenzene by a new type of marine sulfate reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 69: 760-768.
- Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, Blumenberg M, Michaelis W, Classen A, Bolm C, Joye SB, Widdel F** (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nat* 449: 898-901.

- Knoop V, Müller K** (2009). Gene und Stammbäume. Spektrum Akadem Verlag Heidelberg.
- Knopf B, König H** (2009). Biomethylation of heavy metals in soil and terrestrial invertebrates. In: Soil heavy metals. Sheremati I und Varma A (eds.). Springer Heidelberg 315-328.
- Knopf B** (2010). Methylierung von anorganischen Quecksilber im Intestinaltrakt des Kompostwurms *Eisenia foetida*. Dissertation, Universität Mainz.
- Koschorreck M, Wendt-Potthoff K, Geller W** (2003). Microbial sulfate reduction at low pH in sediments of an acidic lake in Argentina. Environ Sci Technol 37: 1159-62.
- Kösters J** (2007). Bestimmung von Methylquecksilber in Fischproben aus der Umweltprobenbank des Bundes. Mitt Umweltchem Ökotox 4.
- Krupp EM, Milne BF, Mestrot A, Meharg AA, Feldmann J** (2008). Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS. Anal Bioanal Chem 390: 1753-1764.
- Kuhnigk T, Branke J, Krekeler D, Cypionka H, König H** (1996). A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. System Appl Microbiol 19: 139-149.
- Landner L** (1971). Biochemical model for the biological methylation of mercury suggested from methylation studies in vivo with *Neurospora crassa*. Nature 230: 452-454.
- Lapanje A, Drobne D, Nolde N, Valant J, Muscet B, Leser V, Rupnik M** (2008). Long-term Hg pollution induced Hg tolerance in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustaceae). Environ Poll 153: 537-547.
- Latimer J, Stokes SL, Graham AI, Bunch J, Jackson RJ, McLeod CW, Poole KP** (2009). A novel method for exploring elemental composition of microbial communities: Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry of intact bacterial colonies. J Microbiol Meth 79: 329-335.
- Lee ZM-P, Bussema C, Schmidt TM** (2009). rrrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. Nucleic Acids Res 37: D490-D493.
- Leermakers M, Baeyens W, Quevauviller P, Horvat M** (2005). Mercury in environmental samples: speciation artifacts and validation. Trends Anal Chem 24: 383-393.
- Limper U** (2006). Untersuchungen zur mikrobiellen Methylquecksilberbildung in Termiten und im Faulschlamm. Dissertation Universität Mainz.

- Limper U, Knopf B, König H** (2008). Production of methyl mercury in the gut of the Australian termite *Mastotermes darwiniensis*. *J Appl Entomol* 132: 168-176.
- Lin CC, Jay JA** (2007). Mercury methylation by planktonic and biofilm cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Environ Sci Technol* 41: 6691-6697.
- Lindqvist O, Rohde H** (1985). Atmospheric mercury. *Tellus* 37B: 136-159.
- Martin-Doimeadios RCR, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX** (2002). Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. *Anal Chem* 74: 2505-2512.
- Martin-Doimeadios RCR, Tessier E, Amouroux D, Guyoneaud R, Duran R, Caumette P, Donard OFX** (2004). Mercury methylation/ demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. *Mar Chem* 90, 107–123.
- Mason RP, Choi AL, Fitzgerald WF, Hammerschmidt CR, Lamborg CH, Soerensen AL, Sunderland EM** (2012). Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. *Environ Res* 119: 101–117.
- Mehrotra A, Horne AJ, Sedlak DL** (2003). Reduction of net mercury methylation by iron in *Desulfovibrio propionicus* (1pr3) cultures: Implications for engineered wetlands. *Environ Sci Technol* 37: 3018-3023.
- Merritt KA and Amirbahman A** (2009). Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments – a critical review. *Earth-Sci Rev.* 96: 54-66.
- Meyer J, Michalke K, Kouril T, Hensel R** (2008). Volatilisation of metals and metalloids: an inherent feature of methanoarchaea? *Syst Appl Microbiol* 31: 81-87.
- Ministry of the Environment Kumamoto** (2007). Minamata disease in history and lessons. Takeuchi T. Pathology of Minamata Disease. In: Study Group of Minamata Disease. Minamata Disease Municipal Museum: Kumamoto University 1968: 141–228.
- Mishra B, O’Loughlin E, Boyanov M, Kemner K** (2011). Binding of Hg(II) to high affinity sites on bacteria inhibits reduction to Hg(0) by mixed Fe(II/III) phases. Vortrag. ICMGP, Halifax, Canada.
- Monperrus M, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX, Rodriguez Martin-Doimeadios RC** (2004). Potentials and limits of speciated isotope dilution analysis – metrology and assessing environmental reactivity. *Trends Anal Chem* 23:261-272.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-73.
- Muyzer G** (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2: 317-322.
- Muyzer G, Stams AJM** (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6: 441-454.
- Nagase, H** (1982). Methylation of mercury by humic substrates in an aquatic environment. *Sci Total Environ* 24:133-142.
- Nagase H, Ose Y, Sato T and Ishikawa T** (1984). Mercury methylation by compounds in humic material, *Sci Total Environ* 32: 147.
- Nevado JJB, Martin-Doimeadios RCR, Krupp EM, Bernardo FJG, Farinas NR, Moreno MJ, Wallace D, Roper MJP** (2011). Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *J Chrom A* 1218: 4545-4551.
- Odom JM, Singleton R** (1993). *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer Verlag, NY.
- Orlandini von Niessen JO, Schaper JN, Petersen JH, Bings NH** (2011) Development and characterization of a thermal inkjet-based aerosol generator for micro-volume sample introduction in analytical atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 26: 1781-1789.
- Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA** (1997). Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon. *FEMS Microbiol Rev* 19:239-262.
- Ottow JCH** (2011). *Mikrobiologie von Böden*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Pak KR, Bartha R** (1998a). Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Am Soc Microb* 64: 1013-1017.
- Pak KR, Bartha R** (1998b). Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Appl Environ Microbiol* 64: 1987-1990.
- Petersen JH, Széles É, Fél K, Kaschak E, Orlandini von Niessen JO, Schaper JN, Stéfanka Z, König H, Bings NH** (2012). Development of a novel calibration strategy for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry based on the ablation of dried residues of standard solutions generated by a pL drop-on-demand generator. Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. Posterpräsentation, Tucson, USA.

- Pikuta E, Lysenko, A, Suzina N, Osipov, G, Kuznetsov B, Tourova T, Akimenko V, Laurinavichius K** (2000). *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 25-33.
- Poissant L, Dommergue A, Ferrari CP** (2002). Mercury as a global pollutant. *European Research Course on Atmospheres (ERCA): Vol. 5: 1-25.*
- Popp M, Hann S, Koellensperger G** (2010). Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled mass spectrometry – A review. *Anal Chim Acta* 668: 114-129.
- Postgate JR** (1959). A diagnostic reaction of *Desulphovibrio desulfuricans*. *Nat* 163:481-482.
- Postgate JR, Campbell LL** (1965). Classification of the spore forming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol Rev* 29: 359-363.
- Postgate JR** (1979). *The sulphate-reducing bacteria.* Cambridge Univ Press.
- Pröfrock D, Prange A** (2012). Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: a review of challenges, solutions, and trends. *App Spectrosc* 66: 843-868.
- Puk R, Weber JH** (1994). Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Appl Organomet Chem* 8: 293-302.
- Qvarnström J, Frech W** (2002). Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. *JAAS* 17: 1486-1491.
- Ranchou-Peyruse M, Monperrus M, Bridou R, Duran R, Amouroux D, Salvado JC, Guyoneaud R** (2009). Overview of mercury methylation capacities among anaerobic bacteria including representatives of the sulphate-reducers: Implications for environmental studies. *Geomicrobiol J* 26: 1–8.
- Ravichandran M** (2004). Interactions between mercury and dissolved organic matter – a review. *Chemosphere* 55: 319-331.
- Reineke W, Schlömann M** (2007). *Umweltmikrobiologie.* Elsevier GmbH, München.
- Rowland IR, Grasso P, Davies MJ** (1975). The methylation of mercuric chloride by human intestinal Bacteria. *Experienta* 31: 1064-1065.
- Rozanski K, Froehlich K, Mook WG** (2001). Environmental isotopes in the hydrological cycle. *Techn Doc Hydrol* 39, Vol. 3.

- Ruzicka J, Hansen EH** (2008). Retro-review of flow-injection analysis. *Trends Anal Chem* 27: 390-393.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sarigiannis DA, Karakitsios SP, Antonakopoulou MP, Gotti A** (2012) Exposure analysis of accidental release of mercury from compact fluorescent lamps. *Sci Total Environ* 435–436: 306-315.
- Sass H, Berchtold M, Branke J, König H, Cypionka H, Babenzien HD** (1998). Psychrotolerant sulfate-reducing bacteria from an oxic freshwater sediment, description of *Desulfovibrio cuneatus* sp. nov. and *Desulfovibrio litoralis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 21: 212-219.
- Schaefer JK, Morel FMM** (2009). High methylation rates of mercury bound to cysteine by *Geobacter sulfurreducens*. *Nat Geosci* 2: 123-126.
- Schedlbauer O** (1998). Methylierte Schwermetallverbindungen im Atlantischen Ozean und der marinen Atmosphäre – Untersuchungen zum globalen biogeochemischen Schwermetallkreislauf. Dissertation, Universität Mainz.
- Schilling K, Johnson TM, Wilcke W** (2011) Isotope fractionation of selenium during fungal biomethylation by *Alternaria alternata*, *Environ Sci Technol* 45: 2670–2676.
- Schwedt G** (1995). Analytische Chemie, Wiley-VCH.
- Snell JP, Stewart II, Sturgeon RE, Frech W** (2000). Species specific isotope dilution calibration for determination of mercury species by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma- or furnace atomization plasma ionization-mass spectrometry. *JAAS* 15: 1540-1545.
- Staley JT** (2006). The bacterial species dilemma and the genomic phylogenetic. *Phil Trans R Soc* 361: 1899-1909.
- Steven F, Durrant N, Ward I** (2005). Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). Review. *JAAS* 20: 821-829.
- Storch V, Welsch U** (2002). Kükenthals Leitfaden für das zoologische Praktikum. Spektrum Akadem Verlag, Berlin.
- Studier JA, Keppler KJ** (1988). A note on the Neighbor-Joining algorithm of Saitu and Nei. *Molecular Biology and Evolution* 24: 640-649.
- Thomas R** (2008). Practical guide to ICP-MS. A Tutorial for Beginners. Taylor & Francis Inc.

- Tölg G, Lorenz I** (1977). Quecksilber – ein Problemelement für den Menschen? In: Chemie in unserer Zeit 5: 150-156.
- Toyota K, Kimura M** (2000). Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. Biol Fertil Soils 31: 187–190
- Tringe SG, Hugenholtz P** (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr Opin Microbiol 11: 442-446.
- Trinkerl M, Breunig A, Schauder R, König H** (1990). *Desulfovibrio termitidis* sp. nov., a carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. System Appl Microbiol 13: 372-377.
- Umweltbundesamt** (1996). Analytische Vorschriften für Elemente und Spezies in Umweltproben, Matrixgruppe 1; Mai 1993, in: Umweltprobenbank des Bundes (UPB) – Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben, Herausgeber: Umweltbundesamt, Berlin. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
- Umweltbundesamt** (2005). Leitlinie zur Methodvalidierung. Wellnitz J, Gluschke M (Hrsg). Umweltbundesamt, Berlin. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2832.pdf> (28.01.2013).
- UNEP DTIE Chemicals Branch und WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases** (2008). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Switzerland.
- Uria JE, Sanz-Medel A** (1998). Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. Talanta 47: 509-524.
- Vijver MG, Vink JPM, Miermans CJH, Gestel CAM** (2003). Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. Soil Biol Biochem 35: 125-132.
- Vonk JW, Sijpensteijn AK** (1973). Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. Antonie van Leeuwenhoek 39: 505-513.
- Wagemann R, Trebacz E, Hunt R, Boila G** (1997). Percent methylmercury and organic mercury in tissues of marine mammals and fish using different experimental and calculation methods. Environ Toxicol Chem 16: 1859–1866.
- Weber JH** (1993). Review of possible paths for abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. Chemosphere: 26, 2063-77.

- Wood JM** (1975). Biological cycles for elements in the environment. *Naturw* 62: 357-364.
- Wood JM, Kennedy FS, Rosen CG** (1968). Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nat* 220: 173.
- Wren CD** (1986). A review of metal accumulation and toxicity in wild mammals. *Environ Res* 40: 210-244.
- Wuerfel O, Thomas F, Schulte MS, Hensel R, Diaz-Bone RA** (2012). Mechanism of multi-metal(oid) methylation and hydride generation by methylcobalamin and cob(I)alamin: a side reaction of methanogenesis. *Appl Organometal Chem* 26: 94-101.
- Yang DY, Truong HYT, Chen YW, Belzile N** (2009). Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples. *Anal Chim Acta* 633: 157-164.
- Zhang ZS, Zheng DM, Wang QC, Lv XG** (2009). Bioaccumulation of total mercury in three earthworm species. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:937-942.

7. Danksagung

8. Anhang

16S rRNA Sequenzen

Nachfolgend sind die Nukleotid-Sequenzen (in bp) der Kulturen aus *Eisenia foetida* sowie dem nächsten Verwandten und der Identität (in %) angegeben. Die Bandenpositionen beziehen sich auf Abb. 23.

EF1a DGGE-Bandenposition 5: *Pseudomonas* sp. (485 bp, 100%)

```
CGAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAA
GATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCT
CAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAA
TTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCTCCAACCT
AACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTT
```

EF1b DGGE-Bandenposition 6: *Pseudomonas jinjuensis* (488 bp, 99%)

```
TCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
TCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAA
GGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACC
TCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAA
ATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCTCCAACCT
TAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCTTCGTATTACCGCGGGCTGCTGA
```

EF2a DGGE-Bandenposition 4: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (483 bp, 96%)

```
AATGTCAAGTCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGATAACC
TCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCAGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAGC
GTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGAATTCC
ACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTTACTAT
CCCGCTACACGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAA
```

EF2a DGGE-Bandenposition 8: *Pseudomonas* sp. (468 bp, 99%)

```
CCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAG
GATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCT
CAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAA
TTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTT
ACCAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCATCG
```

EF2b DGGE-Bandenposition 8: *Pseudomonas* sp. (491 bp, 99%)

TTGCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
CGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTC
AAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGC
ACCTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAG
GAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATGCAGTTC CAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCC
ATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGA
AA

EF3a DGGE-Bandenposition 6: *Pseudomonas jinjuensis* (474 bp, 100%)

TTGCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCA
AGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCAC
CTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGA
AATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTC CAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCTCCAAC
TTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTAAT

EF3a DGGE-Bandenposition 8: *Pseudomonas* sp. (464 bp, 100%)

TTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCA
AGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCAC
CTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGA
AATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTC CAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCTCCAAC
TTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGAC

EF4a DGGE-Bandenposition 1: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (489 bp, 96%)

GACTCAATGTCAAGTCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
AATTCCTTTGAGTTTAACTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGCA
TACCCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCC
TCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGA
ATTCCACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTT
ACTATCCCGCTACACGCCCTTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAAA

EF4a DGGE-Bandenposition 2: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (490 bp, 96%)

TGCACTCAATGTCAAGTCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
TCAATTCCTTTGAGTTTAACTTGC GGCCGTA CCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGTC
GATACCCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCG
CCTCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGG

GAATTCACCTTTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGAC
TTATTATCCCGCCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACATATTACCGCGGCTGCTGAA

EF4a DGGE-Bandenposition 4: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (473 bp, 96%)

CACTCAATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC
AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGCA
TACCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCC
TCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGA
ATTCCACTTTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTT
ACTATCCCGCCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATT

EF4a DGGE-Bandenposition 7: *Desulfovibrio africanus* (469 bp, 99%)

CATGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTC
AGCCTTGCGACCGTACTCCCAGGCGGGATGCTTAACGCGTTAACTACGGCGCCGAAGAATACTCCCAGACCTAGCATC
CATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGCTCCACACTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCTGTCCA
GGTGGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTCCGATATCTACGGATTTCACTCTACACCGGGAATTCGCCACCCTCTCCAGG
ACTCCAGCCGCGCAGTTTCGAATGCAGTTCCCGGTTGAGCCGAGGGCTTTCACATCCGACTTACGAAGCCGCCTACGTGC
GCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGACCTTCCGTATTACCGCGGCTGCTGAAA

EF4b DGGE-Bandenposition 1: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (490 bp, 96%)

ACTCAATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC A
ATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGCA
ACCCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCT
CAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGA
ATTCCACTTTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTT
ATTATCCCGCCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAAAAT

EF4b DGGE-Bandenposition 2: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (487 bp, 96%)

CTCAATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC A A
TTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGCA
CCCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTC
AGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGAAT
TCCACTTTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTTAC
TATCCCGCCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAGA

EF4b DGGE-Bandenposition 4: *Clostridium* sp./*Sporomusa termitida* (485bp, 96%)

CAATGTCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AAT
CCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTGCA
CTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCGCTCCCCTGGCTTTCGCGCCTCAG

CGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTTCCTCCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGAATTC
CACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAGACTTACTA
TCCCGCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAAA

EF4b DGGE-Bandenposition 7: *Desulfovibrio africanus* (406 bp, 99%)

CACGAAGGATGTCAAACCCATGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAACGCGGTAACACGGCGCCGAAGAATA
CTCCCCGACACCTAGCATCCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACACTTTCGCACCTC
AGCGTCAGTACCTGTCCAGGTGGCCGCTTCCCCACTGGTGTTCCTCCGATATCTACGGATTTCACTCCTACACCGGGAAT
TCCGCCACCCTCTCCAGGACTCCAGCCGCGCAGTTTGAATGCAGTTCCCCGGTTGAGCCGAGGGCTTTCTCATCCGAC

EF5 DGGE Bande (a): *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans* (958 bp, 99%)

AGGGAGCTGTGCTCTCGGGTGACAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAC
TACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGC
CCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACC
TCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAA
CTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAAGTACGAGAGATGCTTTGGTGC
CTTCGG

EF5 DGGE Bande (b): *Enterobacter* sp. (964 bp, 99%)

TCTACCATGCAGTCGAGCGGTAACACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAA
ACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT
CGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAG
CTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGG
AGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGC
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCCCTTG
AGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGA

CAGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAG
AACTTAGCAGAG

EF5 DGGE Bande (c): *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp. (939 bp, 100%)

CGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCG
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGC
TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGG
CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG
CGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTA
GGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGA
CAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGT
CGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGG

EF6 DGGE Bande (a): *Enterobacter* sp., *Pantoea agglomerans* (926 bp, 99%)

AGCTACACATGCAGTCGAGCGGTAACACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGACGGGTGAGTAATGTCTGGG
AAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAGGGGGAC
TTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCT
AGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGG
GAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGT
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGTAGAATCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACGTGGAGGTTGTGCC
TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAG

EF6 DGGE Bande (b): *Pseudomonas* sp. (849 bp, 99%)

GATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGACAAC
GTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGC
CTAGGTCGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA
CACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGCAAGTTAATACCTT
GTAGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT

GCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTACTGGCGCAGCTAACGCG
ATAAGTCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG

EF7 DGGE Bande (a): *Pseudomonas* sp. (890 bp, 99%)

GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAA
AGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGG
CGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC
ACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGCAAGTTAATACCTTGTAGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCG
TGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGT
AAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT
GAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTG
ACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCC
GTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACCT
CAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGC
CTTGACATGTCCGGAA

EF7 DGGE Bande (b): *Pseudomonas jinjuensis* (894 bp, 100%)

AGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGA
AAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAG
GCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAG
CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTGCAAGTTAATACCTTGTAGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGT
TAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTGGCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT
GGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACT
GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGC
CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACCT
TCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCC
TTGACATGTCCGGAATCCT

EF8 DGGE Bande: *Pseudomonas fluorescens* (628 bp, 100%)

AGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGACAACGTTTCG
AAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGT
CGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATT

TTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGG
AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCC
AAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA

EF9 DGGE Bande (a): *Pseudomonas jinjuensis* (490 bp, 100%)

TTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAACCTCCAGGCGGTCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCA
AGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTGCGAC
CTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGA
AATCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGCCAGTTTTGGAGGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACCTCCAAC
TTAACAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGAAA

EF9 DGGE Bande (b): *Clostridium* sp., *Sporomusa* sp. (497 bp, 96%)

TTCAGTGAATGTCAAGTCTGTAAGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
GTCAATTCCTTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAACCTCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGT
CGATACCCTCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTGCTCCCTGGCTTTGCG
GCCTCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTG
GGAATCCACTTTCTCTCTGCACTCAAGAATAACAGTTTCATTGACCTTACGGAGTTGAGCTCCGCACTTTTACAACAG
ACTTATTATCCCGCTACACGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGAA
ATAGTG

EF10 DGGE Bande (a): *Desulfotomaculum* sp. (447 bp, 100%)

TCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAACCTCCAGGTTGAATACTTATTGCGTTAGCGGCGGCACCGAAG
AGCTTTGCTCCCCAACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTT
GAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACAC
TAGGAATCCACTTACCTCTCTGCACTCTAGCACCACAGTTTCAAAGCAGTCCCGGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACTCC
AGACTTGCAAGTCCGCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTG
GGGGCGGCCGCGGCGGGCCGGGCGGGGCGGGGCGGGG

EF10 DGGE Bande (b): *Clostridium* sp. (444 bp, 100%)

CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTAACCTCCAGGTTGAATACTTATTGCGTTAGCGGCGGCACCGAAGA
GCTTTGCTCCCCAACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTG
AGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACT
AGGAATCCACTTACCTCTCTGCACTCTAGCACCACAGTTTCAAAGCAGTCCCGGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACTCCA
GACTTGCAAGTCCGCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
GGGCGGCCGCGGCGGGCCGGGCGGGGCGGGGCGGGG

EF10 DGGE Bande (c): *Clostridium intestinale* (489 bp, 100%)

GGGACAAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCATCGTACTCCC
CAGGTGGGATACTTATTGTGTTAACTGCGGCACGGAGGGGGTACACCCCCACACCTAGTATCCATCGTTTACAGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATCGTCCAGCAATCCGCCTTCGCC
ACTGGTGTTCCTCCGTATATCTACGCATTTACCGCTACACACGGAATTCGATTGCCTCTCCGACACTCAAGAACTATAGTT
TCAAACGCAGGTTATGGGTTGAGCCATAATTTTACGCCTGACTTACAGTCCCGCCTACACGCCCTTACACCCAGTAAAT
CCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGGGGCGGCCGCGGGCCGGGCGCGGGGCGCGGGCGG
CG

EF11 DGGE Bande: *Clostridium sporosphaeroides* (486 bp, 99%)

ACAAATTAACCACATACTCCACTGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGATTTTCAACCTTGCAGCCGTACTCCCAG
GTGGATTACTTATTGTGTTAACTCCGGCACGGAAGGGGTACACCCCCACACCTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCATGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTTAAAGCCAGTAGGCCGCTTCCCCTG
GTGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCGCTACCTCTACTTCACTCAAGCCTTCCAGTTTCGA
ACGCAATTTGTGGTTAAGCCACAGCTTTCACGCCGACTTAAAAAGCCGCTACGCACCCTTACACCCAGTAAATCCG
GACAACGCTTGCTCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGGGGCGGCCGCGGGCCGGGCGCGGGGCGCGACGGGCG

EF12 DGGE Bande: *Desulfitobacterium hafniense* (521 bp, 100%)

AGGTTCAAGGATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCC
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTACGCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAACGCGTTAGCTACGGCGCCGAAGA
ATACTCCCCGACACCTAGCATCCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACACTTTCGCAC
CTCAGCGTCAGTACCTGTCCAGGTGGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCCGATATCTACGGATTTCACTCCTACACCGGG
AATCCGCCACCCTCTCCAGGACTCCAGCCTTGCAGTTTGAATGCAGTTCCCGGTTGGGCCGAGGGCTTTCACATCCGAC
TTCAAAGCAGCCTACGTGCGTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGGG
GCGGCCGCGGGCCGGGCGCGGGCCGGG

EF13 DGGE Bande: *Citrobacter freundii* (935 bp, 99%)

GGCGCAGCCTGATGCAGCCTGCCGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGT
TGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGG
GCTCAACCTGGGAACTGCATCCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
TCCGGAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTGTGACATCCAGAGAACTTAGCA
GAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAC
TGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGGATTGGAG

EF14 DGGE Bande: *Pseudomonas* sp. (963 bp, 99%)

GAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGT
AAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCT
CAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACCTTCCAGAGA
TGGATTGGTGCCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCACTCGACTGCGTGAAGT
CGGAATCG

EF15 DGGE Bande: *Paenibacillus* sp. (608 bp, 99%)

CTGGGAAGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCGATGTAAGTTGGGTGTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGACCCAAAA
CTGCATGGCTTGAGTGCAGCAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTGAATGACCGTCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGACATTC
AAGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAACT
TTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGCACTCTAGAGTACTGCCGGTGACA

EF16 DGGE Bande: *Pseudomonas putida* (426 bp, 99%)

GTAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGA
GCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGA
AGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACA

EF17 DGGE Bande: *Enterobacter* sp. (829 bp, 99%)

GCGTAAGCGCACGACGAGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAAAGTGGCA
GGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC
GAAGGCGGCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTG

GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT
GCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTC
ATAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGC
TACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC

EF18 DGGE Bande: *Cellulosimicrobium cellulans* (726 bp, 99%)

CGTAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGGTGTGAAAACCTCGAGGCTCAACCTCGAGCTTGATCGGGTACGGGCAG
ACTAGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCG
AAGGCAGGTCTCTGGGCCGCAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGCTCATTCCACGAGTTCCTGCGCAGCAAACGCATTAAGTGCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACGGGAAGCCACCAGAGATGGTGGTCTCTTTGGACTCTGTGC
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCAT
GTTGCCAGCGGTTATGCCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGTACAAAGGGCTGCGATACCCTAAGGTGGAGCGAA
TCCAAAAAGCCC

EF19 DGGE Bande: *Streptomyces* sp. (768 bp, 99%)

TAGGCGGCTTGTACGTCGGTTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCG
GTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCT
CTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCGTGTTGCCAGCAGGC
CCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCC
CCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATACCAGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA
AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAAACCTGACCCCATGAAGTCGGAG

EF20 DGGE Bande: *Bacillus subtilis* (823 bp, 99%)

CCCCCTGGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTCGGGG

GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCT
TGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGGAGGTTAAG
CCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
TCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT

EF21 DGGE Bande: *Citrobacter freundii* (820 bp, 100%)

CGAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGAACTGGCAG
GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGGTTAGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
GCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT
AAAGTATGTCGTAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGC
CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT

EF22 DGGE Bande: *Bacillus subtilis* (986 bp, 100%)

ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGT
ACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTT
CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGC
AACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCG
AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG

EF23 DGGE Bande: *Pseudomonas* sp. (837 bp, 99%)

GATACTGGGCGTAAGCGCGGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAA
AACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGAC

CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACT
CTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTC
CTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC
TAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAAT
CAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAAT

Abbildungsverzeichnis

Abb.		Seite
1	Die bedeutendsten Quellen für den globalen Eintrag von Hg in die Umwelt.	8
2	Die grundlegenden Transformationen von Hg im globalen Kreislauf im Überblick.	9
3	Produktion von CH_3Hg^+ in anoxischen Sedimentproben durch SRB nach Zugabe spezifischer Inhibitoren: BESA und Na_2MoO_4 .	12
4	Mechanismus der Quecksilbermethylierung bei <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> LS.	13
5	Phylogenetischer Stammbaum der Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen basierend auf der 16S rRNA Sequenzanalyse.	18
6	Zur Anfertigung histologischer Gefrierschnitte wurde ein Kryotom verwendet.	40
7	Sulfidbestimmung in Mikrotiterplatten nach dem Prinzip der Methylenblaumethode.	41
8	Schema zur Probenvorbereitung für die Messung von MeHg in bakteriellen Flüssigmedien.	51
9	Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungsmethode.	53
10	Die wichtigsten Komponenten im Aufbau der Massenspektrometrie.	57
11	Schema einer ICP-Torch und Bildung eines induktiv gekoppelten Plasmas.	58
12	Schematische Darstellung einer Massenseparation mithilfe eines Quadrupol-MS.	60
13	Schema eines reversen Nier-Johnson doppelfokussierenden Magnet-MS.	61
14	Verwendetes GC-ICP-MS-System zur Bestimmung von MeHg mit Ausschnitten vom Gaschromatograph Trace GC, dem automatischen Probengeber und Spray Chamber.	63
15	Die Laser-Ablations-ICP-MS mit Beobachtungs-Mikroskop und Laser-Fokussierungssystem.	66
16	Probenkammer der LA-ICP-MS.	66
17	Kalibriergerade von Standardlösungen für die Sulfidbestimmung.	71
18	Chromatogramm der Messung von MeHg und Hg^{2+} mittels SID und GC-ICP-MS.	72
19	Methylierung von 0,1 mg/L Hg^{2+} durch Kulturen aus <i>E. foetida</i> und Bodenmaterial.	74
20	Produktion von MeHg durch <i>Desulfotomaculum</i> spp. und <i>Desulfobulbus</i> sp.	77
21	Die Produktion von MeHg durch <i>Desulfovibrio</i> spp.	78
22	Die Produktion von MeHg durch Anreicherungskulturen und SRB.	79
23	DGGE-Analyse von vier Anreicherungen aus <i>E. foetida</i> in je zwei parallelen Ansätzen.	80
24	Phylogenetischer Stammbaum der isolierten oder angereicherten Kulturen aus <i>E. foetida</i> .	86
25	Ein ungefärbter histologischer Querschnitt eines adulten <i>E. foetida</i> .	88
26	Histologischer Dünnschnitt von <i>E. foetida</i> nach Anwendung der LA-ICP-MS.	89
27	LA-ICP-MS Messung: Intensitäten von Hg abzüglich der Kontrollen in verschiedenen Kompartimenten von je zwei Gewebeproben.	90
28	Zwei histologische Querschnitte von <i>E. foetida</i> nach Laserablation mit Hg-Signalintensitäten.	91

Tabellenverzeichnis

Tab.		Seite
1	Ausgewählte wichtige Stabilitätskonstanten von Hg-Verbindungen.	6
2	Physikalische Eigenschaften verschiedener Quecksilberverbindungen.	7
3	Zusammenfassung der abiotischen und biotischen Transformationsprozesse von Hg ²⁺ und CH ₃ Hg ⁺ .	11
4	Übersicht über die Mikroorganismen und ihre Herkunft.	22
5	Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Hilfsmittel.	23
6	Übersicht über die wichtigsten Verbrauchsmittel, die verwendet wurden.	25
7	Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Gase.	25
8	Die Biochemikalien, Enzyme und Kits, die für die Versuche eingesetzt wurden.	29
9	Sulfat-reduzierende Bakterien und Anreicherungskulturen.	43
10	Übersicht über die verwendeten Primer und deren wichtigsten Eigenschaften.	46
11	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR.	46
12	Parameter für die Touch-Down PCR zur Amplifikation der 16S rDNA.	47
13	Parameter für die GC-ICP-MS zur Bestimmung von MeHg.	64
14	Experimentelle Parameter für den Einsatz der LA-ICP-MS zur Lokalisation von Hg in histologischen Dünnschnitten.	67
15	Charakterisierung der Bodenproben und Ermittlung der Korngrößenverteilung.	69
16	Konzentration verschiedener Elemente in Bodenproben.	70
17	Wiederfindung des Referenzmaterials ERM [®] CE-464 Tuna Fish.	73
18	Die Messwerte des Screenings zur Produktion von MeHg durch Sulfat-reduzierende Kulturen aus 0,1 mg/L Hg ²⁺ .	76
19	Identifizierung anaerober Kulturen EF1 bis EF4 aus <i>E. foetida</i> .	83
20	Identifizierung der anaeroben Kulturen EF5 bis EF12 aus <i>E. foetida</i> .	84
21	Identifizierung aerober Kulturen EF13 bis EF23 aus <i>E. foetida</i> .	85
22	Die Mechanismen zur Hg-Methylierung.	110
23	Übersicht über die Hg-methylierenden Mikroorganismen.	112

Curriculum Vitae

von Elisabeth Kaschak

Veröffentlichungen

im Rahmen der Diplomarbeit

König H, Kaschak E, Sebastian P, Petri A, Blättel V, Wirth K, Claus H, Pfeiffer P (2012). Biogene Amine: analytische, mikrobiologische und gesundheitliche Aspekte. In: Kulturgut Rebe und Wein, König H, Decker H (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag.

Kaschak E, Göhring N, König H, Pfeiffer P (2009). Biogene Amine in deutschen Weinen: Analyse und Bewertung nach Anwendung verschiedener HPLC-Verfahren. Deutsche Lebensmittel Rundschau 105: 375-384.

Kaschak E, König H, Pfeiffer P (2009). Verbreitung biogener Amine in deutschen Weinen. Deutsches Weinbau-Jahrbuch: 125-136.

In den folgenden Publikationen und Posterpräsentationen sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit teilweise veröffentlicht:

Kaschak E, Knopf B, König H (2013). Investigation on the biomethylation of mercury (II) to methylmercury produced by intestinal sulfate reducing bacteria using GC-ICP-MS. In Vorbereitung.

Petersen JH, Széles É, Fél K, Kaschak E, Orlandini v. Niessen JO, Schaper JN, Stéfanka Z, König H, Bings NH (2012). *Development of a Novel Calibration Strategy for Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Based on the Ablation of Dried Residues of Standard Solutions Generated by a pL Drop-on-Demand Generator.* Winter Conference on Plasma Spectrochemistry. Posterpräsentation. Tucson (USA).

Kaschak E, König H (2011). *Biomethylation of mercury by intestinal sulfate-reducing bacteria.* Johannes Gutenberg Universität Mainz, Annual Meeting of the Interdisciplinary Research Training Group Program (DFG GRK 826). Vortrag. Bad Münster an der Nahe (Germany).

- Kaschak E, König H (2010). *Microbial Mercury Transformation in the gut of Eisenia foetida*. 10th International Conference on Mercury as a Global Pollutant. Posterpräsentation. Halifax, Canada.
- Kaschak E, König H (2010). *Microbial mercury transformation in the gut of the annelid Eisenia foetida*. Johannes Gutenberg Universität Mainz, Annual Meeting of the Interdisciplinary Research Training Group Program (DFG GRK 826). Vortrag. Bad Münster an der Nahe (Germany).
- Kaschak E, Knopf B, König H (2010). *Mercury methylation by microorganisms from the gut of soil invertebrates*. Posterpräsentation. VAAM, Hannover.
- Kaschak E, König H (2009). *Biochemistry of Mercury Methylation, Perspectives*. Johannes Gutenberg Universität Mainz, Annual Meeting of the Interdisciplinary Research Training Group Program (DFG GRK 826). Vortrag. Bad Münster an der Nahe (Germany).
- Knopf B, Kaschak E, König H (2009). *Alkylation of mercury by isolated microorganisms from the gut of Eisenia foetida*. Posterpräsentation. Trace Spec Tagung, Mainz.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die dem Sinn und Wortlaut anderen Quellen entnommen wurden, sind durch entsprechende Angaben kenntlich gemacht.

Elisabeth Kaschak