

# **Immunologische Untersuchungen am Schlüsselenzymsystem der Ammoniakoxidanten**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Claudia Pinck**

aus Hamburg

Hamburg 2001

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. Bock

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. R. Conrad

Tag der Disputation: 30.11.01

Hamburg, den 29. November 2001



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'U. Wienand', written in a cursive style.

Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Bakterienstämme .....	19
3.1.1 Chemolithotrophe Ammoniak- und Nitritoxidanten.....	19
3.1.2 Chemoorganotrophe Bakterien.....	20
3.2 Nährmedien und Kulturführung .....	21
3.2.1 Ammoniakoxidanten.....	21
3.2.2 Anreicherung von Ammoniakoxidanten .....	23
3.2.3 Nitritoxidanten.....	24
3.2.4 Methanoxidanten .....	25
3.2.5 Methylotrophe Bakterien.....	26
3.2.6 Weitere chemoorganotrophe Bakterien.....	27
3.3 Reinheitskontrollen.....	27
3.4 Ernte der Bakterienzellen.....	28
3.5 Zellaufschluss.....	28
3.5.1 French Pressure Cell Press .....	29
3.5.2 Ultraschall.....	29
3.5.3 Glasperlen.....	29
3.6 Analytische Nachweismethoden .....	29
3.6.1 Bestimmung des Proteingehaltes .....	29
3.6.2 Bestimmung von Ammonium .....	31
3.6.3 Bestimmung von Hydroxylamin.....	31
3.6.4 Bestimmung von Nitrit.....	32
3.6.5 Bestimmung von Metallionen .....	32
3.7 Isolierung des AmoA- und AmoB-Proteins.....	33
3.8 Identifizierung des AmoA- und AmoB-Proteins mit Hilfe der Sequenzierung...	34
3.9 Synthese eines AmoA-Oligopeptids.....	35
3.10 Herstellung von Antikörpern gegen die AmoA und AmoB .....	35
3.11 Gelelektrophorese.....	35
3.11.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	35
3.11.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
3.12 Färbung der Proteinbanden im Gel.....	39

3.12.1 Comassie-Blaufärbung .....	39
3.12.2 Zinkfärbung .....	39
3.12.3 Peroxidasefärbung zum Nachweis von Hämproteinen .....	39
3.13 Trocknung und Dokumentation der Gele.....	40
3.14 Westernblot .....	40
3.14.1 Elektroblob mit diskontinuierlichem Puffersystem .....	41
3.14.2 Elektroblob mit kontinuierlichem Puffersystem.....	42
3.14.3 Immunologischer Nachweis .....	42
3.14.4 Quantitativer Nachweis der AmoA und AmoB im Westernblot .....	44
3.15 Permeabilisierung ganzer Zellen in Reinkulturen und Anreicherungskulturen .	45
3.16 Immunfluoreszenzfärbung ganzer Zellen .....	45
3.16.1 IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoA .....	45
3.16.2 IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoB .....	46
3.16.3 Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoA und AmoB ..	47
3.17 <i>In situ</i> -Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden .....	47
3.18 Mikroskopische Untersuchungen .....	48
3.18.1 Zellzahlbestimmung von Bakterien .....	48
3.18.2 Epifluoreszenzmikroskopie .....	48
3.18.3 Konfokale-Laser-Raster-Mikroskopie .....	49
3.18.4 Transmissionselektronenmikroskopie.....	49
3.18.4.1 Einbettung nach Spurr .....	49
3.18.4.2 Einbettung in Lowicryl® bei tiefen Temperaturen .....	50
3.18.4.3 Herstellung von Ultradünnschnitten und Nachkontrastierung .....	51
3.18.4.4 Negativkontrastierung der Ammoniakmonooxygenase .....	52
3.19 Immuncytochemischer Nachweis der AmoA und AmoB mit Hilfe der Immun-	
goldmarkierung.....	52
3.20 Isolierung der Ammoniakmonooxygenase .....	53
3.20.1 Ionenaustauschchromatographie.....	53
3.20.2 Gradientenzentrifugation.....	55
3.21 Bestimmung der Ammoniakoxidationsaktivität.....	55
3.22 Absorptionsspektrum der Ammoniakmonooxygenase .....	57
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1 Isolierung der Untereinheiten der Ammoniakmonooxygenase.....	59
4.1.1 Anreicherung des AmoA-Proteins.....	59
4.1.2 Isolierung des AmoB-Proteins.....	61
4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die Untereinheiten der Ammoniak-	
monooxygenase .....	62
4.3 Zusammenfassende Darstellung der Verwendung der Antikörper .....	63
4.4 Spezifität der Antikörper im Immunblot .....	64

4.4.1 Untersuchungen der Gattung <i>Nitrosomonas</i> und <i>Nitrosococcus mobilis</i> ..	64
4.4.2 Untersuchungen der Gattungen <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrosovibrio</i> , <i>Nitrosolobus</i> und <i>Nitrosococcus</i> .....	66
4.4.3 Kontrollen zur Spezifität der Antikörper .....	67
4.5 Quantitativer Nachweis der Ammoniakmonooxygenase im Westernblot.....	68
4.5.1 Bestimmung des prozentualen Anteils der AmoA und AmoB am Gesamt- protein von <i>N. eutropha</i> .....	68
4.5.2 Abhängigkeit des AmoA- und AmoB-Gehaltes von der Ammonium- konzentration .....	70
4.5.3 Abhängigkeit des AmoA- und AmoB-Gehaltes von alternativen Substraten .....	71
4.5.4 AmoA- und AmoB-Gehalt in hungernden Zellen von <i>Nitrosomonas</i> .....	72
4.5.5 Abhängigkeit des AmoA- und AmoB-Gehaltes von der Temperatur und dem pH-Wert .....	74
4.6 Immunfluoreszenzfärbung von Ammoniakoxidanten in Reinkulturen.....	74
4.6.1 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen .....	74
4.6.2 IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoA.....	75
4.6.3 IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoB .....	76
4.6.4 Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoA und AmoB ....	78
4.7 Identifizierung verschiedener Isolate von Ammoniakoxidanten .....	80
4.8 <i>In situ</i> Untersuchungen in Anreicherungskulturen von Ammoniakoxidanten....	82
4.9 Immuncytochemischer Nachweis der AmoA und AmoB mit Hilfe der Immun- goldmarkierung .....	88
4.9.1 IG-Markierung der AmoA.....	88
4.9.2 IG-Markierung der AmoB.....	88
4.10 Überblick über die immunologischen Untersuchungen mit den Antikörpern ...	93
4.11 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>N. eutropha</i> ...	95
4.12 Isolierung der Ammoniakmonooxygenase .....	97
4.12.1 Ionenaustauschchromatographie.....	97
4.12.2 Gradientenzentrifugation.....	100
4.13 Nachweis der Ammoniakoxidationsaktivität .....	103
4.13.1 Aktivität ganzer Zellen.....	103
4.13.2 Aktivität zellfreier Extrakte.....	104
4.13.3 Aktivität angereicherter Ammoniakmonooxygenase.....	106
4.14 Charakterisierung der Ammoniakmonooxygenase .....	108
4.14.1 Absorptionsspektrum .....	108
4.14.2 Relative Molekülmasse .....	109
4.14.3 Kupfer- und Eisengehalt.....	110
4.14.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	110

5 Diskussion .....	<b>113</b>
5.1 Antikörper gegen das AmoA- und AmoB-Protein.....	113
5.2 AmoA und AmoB-Protein .....	115
5.3 Identifizierung von Ammoniakoxidanten .....	120
5.4 Eigenschaften der AMO .....	122
5.5 Aktivität der AMO.....	124
5.6 Enzymmodell der AMO.....	126
5.7 Offene Fragen.....	129
5.8 Ausblick .....	130
6 Literaturverzeichnis .....	<b>133</b>
Veröffentlichung.....	<b>148</b>
Anhang	

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a	spezifische Ammoniakoxidationsaktivität
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ad.	auffüllen auf
AK	Antikörper
AMO	Ammoniakmonooxygenase
AmoA	A-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoA</i>	Gen der AmoA
AmoB	B-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoB</i>	Gen der AmoB
AmoC	C-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoC</i>	Gen der AmoC
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
aqua deion.	deionisiertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	engl.: American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninicsäure
BP-Filter	Bandpass-Filter
β-Proteobakterien	β-Unterklasse der Proteobakterien
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
cm	Zentimeter
cyt	Cytochrom
$\Delta G_0'$	Änderung der freien Energie bei pH 7,0
$\Delta t$	Zeitintervall
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethylagarose
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMB	Dimethoxybenzidin
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
e <sup>-</sup>	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	englisch
EPR	elektromagnetisches Resonanzspektrum
et al.	et alii
Fa.	Firma
FISH	engl.: fluorescence <i>in situ</i> hybridisation
γ-Proteobakterien	γ-Unterklasse der Proteobakterien
g	Gramm oder vielfaches der Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
h	Stunde
HAO	Hydroxylaminoxidoreduktase
<i>hao</i>	Gen der HAO
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	engl.: high performance liquid chromatographie
Hrsg.	Herausgeber
ICMs	intracytoplasmatische Membranen
IF	Immunfluoreszenz
IG	Immungold
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare

kbar	Kilobar
kDa	Kilodalton
KHL	Keyhole Limpet Hämocyanin
kJ	Kilojoule
$K_m$	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
l	Liter
LP-Filter	Langpass-Filter
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{mol}$	Mikromol
M	Molar
m	Masse
mA	Milliamper
Mb	Megabasenpaare
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMO	Methanmonooxygenase
mmol	Milimol
mol	Mol
MPN	engl.: most probable number
$M_r$	relative Molekülmasse
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
mV	Millivolt
N	normal
n	Stoffmenge
NAD	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
n.b.	nicht bestimmt
NCIMB	engl.: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd.
nm	Nanometer
n.n.	nicht nachweisbar
NOR	Nitritoxidoreduktase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration
PHB	Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure
pI	isoelektrischer Punkt
pMMO	partikuläre Methanmonooxygenase
PmoA	A-Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase
PmoB	B-Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase
PmoC	C-Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase
PP	Polypropylen
ppm	parts per million
®	eingetragenes Warenzeichen
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
S	SVEDBERG-Einheit
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sMMO	lösliche Methanmonooxygenase
s. o.	siehe oben
spec.	species
s. u.	siehe unten
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	technische Universität
Tween	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen die A- und die B-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha* hergestellt. Die AmoA-Antikörper wurden mit Hilfe eines AmoA-Oligopeptids gewonnen. Die Herstellung der AmoB-Antikörper erfolgte über die Isolierung des AmoB-Proteins.

Die Antikörper dienten immunologischen Untersuchungen ganzer Zellen von Ammoniakoxidanten und der Isolierung und Charakterisierung der AMO.

Beide Antiseren waren spezifisch für die AMO-Untereinheiten der Ammoniakoxidanten. Im Immunblot detektierten die AmoA-Antikörper das AmoA-Protein von vier Arten der Gattung *Nitrosomonas*. Die AmoB-Antikörper markierten dagegen das AmoB-Protein aller getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Beide Antikörper reagierten nicht mit der AMO der Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien sowie mit den Proteinen der Methanoxidanten, Nitritoxidanten und weiteren getesteten Bakterien.

Mit Hilfe der Antikörper wurde der prozentuale Anteil der AMO-Untereinheiten am Gesamtprotein von *Nitrosomonas eutropha* bestimmt. Die A- und B-Untereinheiten kamen in den Zellen in etwa im Verhältnis 1:1 vor. Der AMO-Gehalt war abhängig von der Substratkonzentration. Zellen, die mit wenig Ammonium gewachsen waren, enthielten deutlich mehr AMO als Zellen, die mit viel Substrat angezogen wurden. Außerdem war die Anzahl der intracytoplasmatischen Membranen in den Ammoniummangelzellen erhöht.

In hungernden Zellen, die lange Zeit ohne Ammonium gestanden hatten, wurde bis zu einem Jahr nach dem Ammoniumverbrauch noch AMO nachgewiesen. Der AMO-Gehalt korrelierte nicht mit der Ammoniakoxidationsaktivität.

Weiterhin konnten ammoniakoxidierende Zellen in Reinkulturen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Gattung *Nitrosomonas* reagierte mit beiden Antiseren. Dagegen wurden die übrigen Gattungen der Ammoniakoxidanten nur mit den AmoB-Antikörpern detektiert. Die Fluoreszenzsignale traten bei allen Gattungen in Verbindung mit den Cytoplasmamembranen auf. Dadurch konnten die morphologischen Zelltypen der einzelnen Gattungen unterschieden werden. Die IF-Färbung ermöglichte eine eindeutige Zuordnung von Neuisolaten zu einer bestehenden Gattung der Ammoniakoxidanten.

Neben der Anwendung der Antiseren in Reinkulturen wurden Ammoniakoxidanten mit der IF-Färbung auch in Anreicherungskulturen nachgewiesen. In Anreicherungen von Belebtschlamm und Sandsteinproben dominierte die Gattung *Nitrosomonas*. In Anreicherungen von Teichsediment und Boden wurden überwiegend Vertreter der Gattungen *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* detektiert.

Mit den AmoB-Antikörpern war ein immuncytochemischer Nachweis der AmoB in Ultradünnschnitten von Ammoniakoxidanten möglich. Die AmoB von *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* und *Nitrosovibrio* wurde stets in der Zellperipherie in Nähe der äußeren Cytoplasmamembran markiert. Die Immungoldmarkierung der AmoB trat nur selten in Verbindung mit den intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* auf. Dagegen wurden die AmoB in Zellen von *Nitrosolobus* auch an den ICMs detektiert.

Die Antiseren ermöglichten die Isolierung der AMO. Die AMO-Untereinheiten wurden während der Reinigung der AMO mittels Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gradientenzentrifugation mit Hilfe der Antiseren identifiziert. Das Enzym wies sowohl unter oxidischen Bedingungen mit  $O_2$  als auch unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von  $N_2O_4$  Ammoniakoxidationsaktivität auf. Wurde die AMO in Abwesenheit von Sauerstoff isoliert, so wurde das Enzym durch  $O_2$ , nicht jedoch durch  $N_2O_4$  vollständig gehemmt.

Die aufgereinigte AMO wurde charakterisiert. In der nativen Gelelektrophorese wurden vorwiegend Dimere und Trimere des AMO-Heterodimers ( $A_nB_n$ ) detektiert. Die isolierte AMO enthielt Kupfer jedoch kein Eisen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der AMO waren Partikel einheitlicher Größe sichtbar.

Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften des Enzyms konnte ein Modell der Enzymreaktion der AMO entwickelt werden.

## 2 EINLEITUNG

Nitrifikation, die mikrobielle Oxidation von Ammoniak über Nitrit zu Nitrat, ist eine wichtige Teilreaktion des Stickstoffkreislaufes in Böden, Süß- und Salzwasser. Das Gleichgewicht des Stickstoffkreislaufes wird durch anthropogene Stickstoffeinträge seit der Erfindung des Haber-Bosch-Verfahrens zur Ammoniakherstellung stark beeinflusst. Dabei stellen die Verwendung von Stickstoffdüngern in der Landwirtschaft, die Freisetzung gasförmigen Ammoniaks in der Intensivtierhaltung, der Eintrag organischer und anorganischer Stickstoffverbindungen in Abwässer und die Freisetzung von Stickoxiden, insbesondere bei der Verwendung fossiler Brennstoffe, die wichtigsten Quellen für die Einträge dar. Der Einsatz von Ammonium als Düngemittel führt durch die Aktivität von Nitrifikanten zum einen zu einer erhöhten Austragung von Nitrat ins Grundwasser und zum anderen zur Ansäuerung ungepufferter Böden (Van Miegroet & Cole, 1985). Durch die Bildung von Salpetersäure werden wichtige Nährstoffe ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) mobilisiert und aus den Böden entfernt. Ebenso werden für Pflanzen toxische Aluminiumionen freigesetzt (Likens et al., 1969). Darüber hinaus trägt die Bildung von Salpetersäure zur Verwitterung von Natur- und Kunststeinen historischer Bauten bei (Mansch & Bock, 1998). Die Aktivität der Nitrifikanten wird jedoch auch technisch genutzt. Von großer Bedeutung sind biotechnische Verfahren, mit denen in Klärwerken zur Aufbereitung von Abwässern in der Nitrifikations/Denitrifikationsstufe lösliche Stickstoffverbindungen in gasförmige überführt werden (Painter, 1986). Zur Optimierung der Abwasseraufbereitung sowie zur Vermeidung von Schäden an der Umwelt durch die Wirkung von Nitrifikanten ist es notwendig, Nitrifikanten und die an der Nitrifikation beteiligten Enzyme besser zu verstehen.

An der Nitrifikation sind sowohl chemolithoautotrophe als auch heterotrophe Nitrifikanten beteiligt. Jedoch sind nur erstere in der Lage, aus der Oxidation von Ammoniak über Nitrit zu Nitrat Energie zum Wachstum zu konservieren. Chemolithoautotrophe Nitrifikanten nutzen anorganische Stickstoffverbindungen als Energiequelle und hauptsächlich Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle für ihr Zellwachstum. Zwei phylogenetisch nicht verwandte Gruppen, die Ammoniak- und Nitritoxidanten, sind an der Reaktion beteiligt (Teske et al., 1994). Ammoniakoxidanten oxidieren Ammoniak zu Nitrit, welches von den Nitritoxidanten weiter zu Nitrat oxidiert wird. Sie wurden ursprünglich in der Familie *Nitrobacteraceae* zusammengefasst (Watson et al., 1989).

Zu den Ammoniakoxidanten gehören die Vertreter der Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus* (Watson et al., 1981, 1989). Diese wurden aufgrund genetischer und physiologischer Untersuchungen in 16 Arten

untergliedert (Watson et al., 1965, 1971; Watson, 1971; Harms et al., 1976; Koops et al., 1976, 1990, 1991; Pommerening-Röser et al., 1996). Weitere Arten sind nur unvollständig charakterisiert (Koops & Harms, 1985; Stehr et al., 1995). Die Differenzierung der Gattungen basiert im Wesentlichen auf morphologischen Merkmalen insbesondere der Anordnung der intracytoplasmatischen Membranen (Watson & Mandel, 1971; Watson et al., 1981, 1989; Koops & Möller, 1992). Aufgrund von Sequenzierungen der 16S rRNA wurden die Arten der Ammoniakoxidanten, mit Ausnahme der marinen Arten *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus*, der  $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien ( $\beta$ -Proteobakterien) zugeordnet (Woese et al., 1984, 1985). Die beiden marinen Arten wurden als Mitglieder der  $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien ( $\gamma$ -Proteobakterien) identifiziert. Wegen der hohen Übereinstimmung der 16S-rRNA-Gensequenzen von *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* haben Head et al. (1993) vorgeschlagen, diese drei Gattungen trotz unterschiedlicher Morphologie zu der Gattung *Nitrospira* zusammenzufassen. Dagegen lassen sich die Arten der Gattung *Nitrosomonas* aufgrund von DNA-Homologien, 16S-rDNA- und *amoA*-Sequenzen sowie physiologischer Eigenschaften auf verschiedene Entwicklungslinien zurückführen (Pommerening-Röser et al., 1996; Purkhold et al., 2000; Koops & Pommerening-Röser, 2001). Anhand der 16S-rDNA-Sequenzen wurden die 11 beschriebenen Arten von *Nitrosomonas* in mindestens fünf Gruppen unterteilt. Die Art *Nitrosococcus mobilis* ist phylogenetisch eng mit den Arten der Gattung *Nitrosomonas* verwandt (Head et al., 1993).

Der Zellwandaufbau der Ammoniakoxidanten ist Gram-negativ und kann bei marinen Arten durch ein bis zwei äußere kristalline Schichten ergänzt sein (Watson & Remsen, 1969, 1970). Zellen der Gattung *Nitrosomonas* und der Art *Nitrosococcus mobilis* besitzen ein peripheres intracytoplasmatisches Membransystem (ICMs). In Zellen von *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus* sind die ICMs in Form eines Membranstapels zentral im Cytoplasma angeordnet. Zellen der Gattung *Nitrosolobus* werden durch ins Cytoplasma ragende ICMs partiell kompartimentiert. Die Gattungen *Nitrospira* und *Nitrosovibrio* besitzen keine ICMs. Einige Arten der Ammoniakoxidanten enthalten Carboxysomen, bei vielen Zellen wurde eine Begeißelung festgestellt (Koops & Möller, 1992). Optimales Wachstum mit einer minimalen Generationszeit von 7 h erfolgt bei einem pH-Optimum von 7,6 bis 7,8 und Temperaturen von 25 bis 30 °C. Die Gruppen von *Nitrosomonas* unterscheiden sich durch ihre Substrataffinität, das Salzbedürfnis bzw. die Salztoleranz und die Fähigkeit, Harnstoff oder Glutamin als zusätzliche Ammoniakquelle nutzen zu können (Pommerening-Röser et al., 1996; Pinck, 1998; Koops & Pommerening-Röser, 2001). *Nitrosomonas* überlebt Hungerperioden von mehreren Monaten (Jones & Morita, 1985; Wilhelm et al., 1998).

Ammoniakoxidanten sind ubiquitär in Böden, Süß- und Salzwasser sowie Abwasser verbreitet. Darüber hinaus wurden sie in extremen Lebensräumen wie Naturstein (Mansch & Bock, 1998), sauren Waldböden (de Boer et al., 1991), heißen Quellen (Golovacheva, 1976), Eis der Antarktis (Arrigo et al., 1995) oder marinen Schwämmen (Diaz & Ward, 1997) nachgewiesen. Obwohl fast ausschließlich die Gattung *Nitrosomonas* für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen verwendet wird und aus vielen Habitaten isoliert wurde, scheinen andere Gattungen in speziellen Biotopen zu dominieren. So wurden z. B. aus Naturstein vorwiegend Vertreter der Gattung *Nitrosovibrio* (Meincke et al., 1989; Spieck et al., 1992) und aus sauren Böden solche der Gattung *Nitrosospira* isoliert (de Boer et al., 1989; Allison & Prosser, 1991). Durch unterschiedliche, ökophysiologische Eigenschaften sind die Arten von *Nitrosomonas* an verschiedene Habitate angepasst. Sie wurden aus Böden, Süß- und Salzwasser sowie Abwasser isoliert (Koops et al., 1991; Stehr et al., 1995; Koops & Pommerening-Röser, 2001).

Herkömmlich erfolgte der Nachweis und die Quantifizierung von Ammoniakoxidanten in Naturproben mit Hilfe der MPN-Methode (engl.: most probable number) (Mateluwich et al., 1975; Belser, 1979). Diese Methode beruht auf der Kultivierung in selektiven Medien. Aufgrund der langen Generationszeit der Ammoniakoxidanten ist diese Methode jedoch zeitaufwendig. Mit dieser Methode werden außerdem die Zellzahlen unterschätzt, da nur kultivierbare Organismen detektiert werden (Konuma et al., 2001). Erst die nachfolgende Isolierung der Ammoniakoxidanten gibt Aufschluss darüber, welche Arten angereichert wurden. Daher wurden neue Techniken zum Nachweis von Ammoniakoxidanten in Naturproben entwickelt, die von der Kultivierung unabhängig sind. Es wurden monoklonale (Sanden et al., 1994; Noda et al., 2000) und polyklonale Antikörper (Belser & Schmidt, 1978; Ward & Carlucci, 1985; Völsch et al., 1990; Smorczewski & Schmidt, 1991; Saraswat et al., 1994) gegen Zellwandaußenschichten hergestellt. Fluoreszenzmarkierte oder enzymgebundene Antikörper ermöglichten einen schnellen sensitiven und spezifischen Nachweis in den unterschiedlichen Habitaten. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik konnte die Gattung *Nitrosomonas* in See-, Meer- und Abwasser (Ward & Carlucci, 1985; Smorczewski & Schmidt, 1991; Noda et al., 2000), die Gattungen *Nitrosospira* und *Nitrosolobus* in Seewasser (Smorczewski & Schmidt, 1991) und die Gattung *Nitrosococcus* in Meerwasser (Ward & Perry, 1980; Ward & Carlucci, 1985) detektiert und quantifiziert werden. Darüber hinaus war eine Quantifizierung von Zellen der Gattung *Nitrosomonas* im Abwasser mit Hilfe der ELISA-Technik (enzyme-linked immunosorbent assay) möglich (Sanden et al., 1994; Saraswat et al., 1994). Die mit den immunologischen Techniken ermittelten Zellzahlen waren deutlich höher als die Zellzahlen, die durch die MPN-Technik gemessen wurden (Ward, 1982; Cooper, 1983; Völsch et al., 1990; Sowitzki, 1992). Neben der Quantifizierung konnte mit Hilfe fluoreszierender Antikörper die *in situ* Verteilung von Ammoniakoxidanten in Biofilmen von Abwasserproben aufgezeigt werden (Noda et al., 2000). Zum Teil war der immunologische Nachweis in den Biofilmen jedoch durch

extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) behindert (Szweringi et al., 1985). Ein weiteres Problem ist, dass die Zellwandaußenschichten der Ammoniakoxidanten erhebliche serologische Unterschiede zwischen den Stämmen aufwiesen. Deshalb wurden mit den Antikörpern selbst innerhalb eines Ökosystems nicht alle Vertreter einer Art erfasst (Belser & Schmidt, 1978; Ward & Carlucci, 1985). Ein weiterer Nachteil ist, dass die Stämme zur Antikörperherstellung zuvor isoliert werden müssen. Nichtkultivierbare Organismen werden durch diese Antikörper daher nicht detektiert. Alternativ zu Antikörpern gegen die Zellwandaußenschichten werden auch Antikörper gegen Schlüsselenzyme eingesetzt. Ein Beispiel sind monoklonale Antikörper gegen das Nitrit oxidierende System von Nitritoxidanten (Aamand et al., 1996; Bartosch et al., 1999). Diese Antikörper sind nicht auf serologische Gruppen beschränkt, sondern markieren die gesamte Gruppe der Nitritoxidanten. So konnten bisher nicht beschriebene Isolate und Zellen in Anreicherungskulturen von Belebtschlammproben bzw. Bodenproben auf Gattungsebene identifiziert werden (Bartosch, 1999; Hartwig, 1999; Bartosch et al., 1999, 2001). Zudem wurden monoklonale Antikörper gegen die Nitritreduktase von denitrifizierenden Bakterien hergestellt (Körner et al., 1987; Coyne et al., 1989). Die Antikörper wurden zum Nachweis von denitrifizierenden Bakterien in verschiedenen Naturproben eingesetzt (Ward et al., 1993; Bothe et al., 2000).

Seit Beginn der 90er Jahre sind außerdem genetische Methoden zum Nachweis von Ammoniakoxidanten entwickelt worden. Anhand der 16S rRNA Gene bzw. der funktionellen Gene der AMO (*amoA*) können Ammoniakoxidanten identifiziert werden. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass sie unabhängig von der Kultivierung der Organismen eingesetzt werden können. Zum Nachweis von Ammoniakoxidanten in Anreicherungs- und Naturproben wurden Primer gegen die 16S rDNA (z. B. Hiorns et al., 1995; Voytek & Ward, 1995; McCaig et al., 1999; Mendum et al., 1999; Bano & Hollibaugh, 2000) und *amoA* (Sinigalliano et al., 1995; Rotthauwe et al., 1997; Horz et al., 2000; Nold et al., 2000) verwendet. Dazu wird die DNA der Zellen aus den Proben extrahiert und mit Hilfe der PCR sowie zum Teil durch anschließende Klonierung amplifiziert. Die DNA der Ammoniakoxidanten wird dann mittels verschiedener Methoden identifiziert. Als Identifizierungsmethoden werden z. B. die Sequenzierung, die Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden oder die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) verwendet. Zudem werden Ammoniakoxidanten direkt in den Proben mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (engl.: fluorescence *in situ* hybridisation = FISH) gegen die 16S rRNA detektiert (Wagner et al., 1995; Mobarry et al., 1996; Juretschko et al., 1998; Voytek et al., 1999). Die Vielzahl und die Spezifität der bisher veröffentlichten Primer, die die 16S rDNA bzw. 16S rRNA der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien detektieren, wurde von Utäker & Nes (1998) sowie Purkhold et al. (2000) zusammengefasst. Auch gegen Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien wurden Primer entwickelt (Voytek, 1996) und in Naturproben angewandt (Ward et al., 2000). Die Untersuchungen gaben Aufschluss über die Mannigfaltigkeit der Ammoniakoxidanten. Sie wurden in vielen, unterschiedlichen Habitaten

nachgewiesen. Aufgrund der hohen Verwandtschaft der Gattung *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* war jedoch mit Hilfe der Methoden keine Differenzierung dieser Gattungen möglich. Mit den Primern wurden Vertreter der Gattungen *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* in Boden, Belebtschlamm, Seesediment und -wasser detektiert (Hiorns et al., 1995; Hastings et al., 1997, 1998; Bruns et al., 1999; Whitby et al., 1999). Die Gattung *Nitrosomonas* trat in den gleichen Habitaten, aber vorwiegend in Proben mit hohem Ammoniumgehalt auf (Hastings et al., 1997, 1998; McCaig et al., 1999; Ward et al., 2000). Zudem zeigten die Methoden, dass *Nitrosomonas* in Abwasserproben dominiert (Mobarry et al., 1996; Purkhold et al., 2000). Neuere Untersuchungen gaben Aufschluss darüber, dass die bisher bekannten Primer häufig nicht sensitiv und spezifisch genug sind. Zum Teil detektieren sie nur bestimmte Arten einer Gattung und unterschätzen daher z. B. die Zellzahl von *Nitrosomonas* (Utåker & Nes, 1998; Purkhold et al., 2000). Versuche an Reinkulturen von Ammoniakoxidanten zeigten, dass kein Primer in der Lage ist, alle Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien gemeinsam spezifisch zu erfassen (Purkhold et al., 2000).

Ammoniakoxidanten galten lange Zeit als obligat aerobe, chemolithoautotrophe Organismen, die ihre Energie ausschließlich durch die Oxidation von Ammoniak konservieren und mit Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), welches über den Calvin-Zyklus fixiert wird, als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Hooper, 1969; Prosser, 1989). Der Stoffwechsel der Ammoniakoxidanten ist jedoch vielfältiger als bislang angenommen. Einige Arten können sowohl autotroph mit  $\text{CO}_2$  als einziger Kohlenstoffquelle als auch mixotroph wachsen und einfache organische Verbindungen assimilieren (Clark & Schmidt, 1966; Martiny & Koops, 1982). Heterotrophes Wachstum mit organischen Substanzen als Energiequelle und Sauerstoff als Elektronenakzeptor ist aber bisher nicht beobachtet worden (Matin, 1978; Krümmel & Harms, 1982). Unter sauerstofflimitierten und anoxischen Bedingungen ist *Nitrosomonas* in der Lage, durch Denitrifikation zu wachsen. Acetat, Pyruvat oder molekularer Wasserstoff können als Elektronendonatoren und Nitrit als Elektronenakzeptor genutzt werden, wobei Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) und Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) entstehen (Abeliovich & Vonshak, 1992; Stüven et al., 1992; Bock et al., 1992). Zudem ist eine anaerobe Ammoniakoxidation mit Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$ ) als Sauerstoffdonator anstelle von Sauerstoff möglich (Schmidt, 1997; Schmidt & Bock, 1997, 1998).

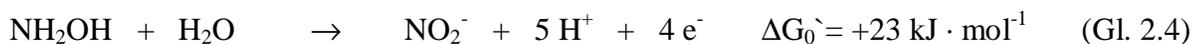
Ammoniakoxidanten konservieren Energie durch Oxidation von Ammoniak zu Nitrit. An dieser Reaktion sind zwei Schlüsselenzyme, die Ammoniakmonooxygenase (AMO) und die Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO), beteiligt. Die AMO katalysiert die Oxidation von Ammoniak zum Zwischenprodukt Hydroxylamin (Gl. 2.3). Diese Oxidation läuft in zwei Teilreaktionen ab (Gl. 2.1, Gl. 2.2). Die endergonische Reaktion der Ammoniakoxidation wird durch eine an sie gekoppelte exergonische Reduktion von Sauerstoff ermöglicht, wobei zwei Reduktionsäquivalente verbraucht werden (Wood, 1988 a).



\*Zur Berechnung des Energiegehaltes der eingesetzten Reduktionsäquivalente wurde reduziertes Ubichinon (+110 mV) zugrunde gelegt (Schmidt & Bock, 1998).

Bei der anaeroben Ammoniakoxidation wird vermutlich Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) bzw. Distickstofftetraoxid (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) als Sauerstoffdonator zur Oxidation von Ammoniak genutzt (Schmidt, 1997; Schmidt & Bock, 1997, 1998). Dabei wird Stickstoffmonoxid (NO) als zusätzliches Produkt neben Hydroxylamin und Wasser freigesetzt. Unter anoxischen Bedingungen mit 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> besitzen Zellen von *Nitromonas eutropha* nur etwa 10 % der aeroben Ammoniakoxidationsaktivität (Schmidt & Bock, 1997). Die anaerobe Ammoniakoxidation wird vermutlich ebenfalls durch die AMO katalysiert, da Hydroxylamin als Zwischenprodukt auftritt (Schmidt & Bock, 1998). Jedoch wird die anaerobe Ammoniakoxidation im Gegensatz zur aeroben Oxidation nicht durch Acetylen gehemmt (Schmidt et al., 2001 a). Neben NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> scheint auch NO eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel der Ammoniakoxidanten zu spielen. Durch die Zugabe von NO und NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> konnte bei allen fünf Gattungen der Ammoniakoxidanten eine fördernde Wirkung der aeroben Ammoniakoxidation festgestellt werden (Zart, 1997; Schnier, 2001). Zart (1997) postulierte für *Nitrosomonas eutropha* einen Stickoxidzyklus, in dem Sauerstoff nicht direkt als Oxidationsmittel der AMO dient, sondern zunächst auf NO übertragen und dabei NO<sub>2</sub> bzw. N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gebildet wird. NO<sub>2</sub> bzw. N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> stellen somit auch bei der aeroben Ammoniakoxidation das eigentliche Oxidationsmittel der AMO dar. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestärkt, dass die aerobe Ammoniakoxidation mit einer NO und NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Bildung gekoppelt ist (Stüven & Bock, 2001).

Das von der AMO gebildete Hydroxylamin wird vom zweiten Schlüsselenzym der Ammoniakoxidanten, der periplasmatischen Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO), zu Nitrit oxidiert (Andersson & Hooper, 1983) (Gl. 2.4).



Die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit verläuft in mehreren Teilschritten. Dabei werden vermutlich intermediär die enzymgebundenen Verbindungen Nitroxyl (NOH) und NO gebildet (Hooper & Terry, 1979; Hooper & Balny, 1982). NOH kann in geringem Maße in Form von N<sub>2</sub>O und NO freigesetzt werden (Anderson, 1965; Anderson & Levine, 1986).

Da die Ammoniakmonooxygenase (AMO) ein wichtiges Schlüsselenzym der Nitrifikation ist, wurden viele Versuche unternommen, die AMO zu isolieren. Aufgrund der Instabilität des Enzyms in zellfreien Extrakten ist es bisher noch nicht gelungen, die AMO in ihrer aktiven

Form zu reinigen (Suzuki & Kwok, 1970; Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993). Daher ist wenig über die Struktur der AMO und den enzymatischen Mechanismus der Ammoniakoxidation bekannt. Fast alle Eigenschaften des Enzyms wurden aus Hemmversuchen mit ganzen Zellen von *Nitrosomonas europaea* hergeleitet. Versuche mit  $^{18}\text{O}_2$  wiesen darauf hin, dass es sich bei der AMO um eine Monooxygenase handelt (Dua et al., 1979; Hollocher et al., 1981; Anderson & Hooper, 1983). Die  $K_m$ -Werte sowie die pH-Optima des Enzyms deuten darauf hin, dass Ammoniak anstelle von Ammonium als Substrat von der AMO genutzt wird (Suzuki et al., 1974; Drozd, 1976). Die niedrigen  $K_m$ -Werte für Ammoniak mit 1,9 bis 61  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$  (Suzuki et al., 1974; Stehr et al., 1995; Koops & Pommerening-Röser, 2001) und für Sauerstoff mit 0,5 bis 7,5  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$  (Laanbroek & Gerards, 1993) ermöglichen auch bei geringen Substratkonzentrationen noch eine hohe Ammoniakoxidationsaktivität. Andererseits besitzt die AMO eine geringe Substratspezifität. Neben Ammoniak werden eine Vielzahl von Verbindungen wie Kohlenmonoxid (Tsang & Suzuki, 1982), Methan (Hyman & Wood, 1983; Jones & Morita, 1983) sowie aliphatische (Hyman et al., 1988), aromatische (Hyman et al., 1985) und halogenierte (Arciero et al., 1989; Vannelli et al., 1990) Kohlenwasserstoffe umgesetzt. Aus der Oxidation dieser Substrate kann jedoch keine Energie gewonnen werden. Dagegen wirken die alternativen Substrate als reversible kompetitive und nicht kompetitive Hemmstoffe der AMO (Keener & Arp, 1993). Die Hemmung der AMO durch unpolare Substanzen deutet auf ein unpolares aktives und ein unpolares allosterisches Zentrum der AMO hin. Neben der reversiblen Hemmung kann die AMO auch irreversibel gehemmt werden. Als irreversible kompetitive Inhibitoren sind Acetylen (Hynes & Knowles, 1978, 1982; Hyman & Wood, 1985) sowie Trichlorethylen (Hyman et al., 1995) beschrieben worden. Als irreversible nicht-kompetitive Inhibitoren sind p-Anisidin und 1,2-Dimethylcyclopropan bekannt (Keener et al., 1998). Einige dieser Inhibitoren hemmen auch andere Monooxygenasen, wie die Methanmonooxygenase der Methanoxidanten (Prior & Dalton, 1985 a) und das Cytochrom P-450-System der Leber (Ortiz de Montellano & Kunze, 1980). Acetylen wirkt nur hemmend, wenn die AMO katalytisch aktiv ist. Hohe Konzentrationen von Ammonium schützen die Zellen (Hyman & Arp, 1992). Daher wird angenommen, dass Acetylen am aktiven Zentrum bindet und dort oxidiert wird (Hyman & Wood, 1985). In *Nitrosomonas europaea* markiert [ $^{14}\text{C}$ ]Acetylen ein 27-kDa-Protein, welches vermutlich das aktive Zentrum der AMO enthält (Hyman & Wood, 1985; Hyman & Arp, 1992). In der fraktionierten Zentrifugation reichert sich dieses Protein in der partikulären Fraktion an, so dass vermutet wird, dass die AMO membrangebunden ist (Hyman & Wood, 1985). Andere Verbindungen wie Nitrapyrin (2-Chlor-6-trichlormethylpyridin) (Belser & Schmidt, 1981; Vannelli & Hooper, 1993) und Metallchelatoren z. B. Thioharnstoff und Allylthioharnstoff (Lees, 1946; Hooper & Terry, 1973) wirken als weitere Hemmstoffe der AMO. Da diese Metallchelatoren vorzugsweise Kupfer binden und die Ammoniakoxidation zellfreier Extrakte von *Nitrosomonas* durch Kupfer gesteigert wird, wurde daraus geschlossen, dass die AMO Kupfer enthält (Loveless & Painter, 1968; Bédard & Knowles, 1989; Ensign et al., 1993).

Basierend auf den Hemmstoffversuchen wurde von Keener & Arp (1993) und Keener et al. (1998) ein „Active-site model“ der AMO mit vier Bindungsstellen vorgeschlagen. Neben einer Bindungsstelle für Ammoniak, die auch kompetitive Inhibitoren bindet, werden Bindungsstellen für nicht-kompetitive Inhibitoren sowie für Sauerstoff und für Elektronendonatoren postuliert. Hemmstoffversuche zeigten, dass neben dem aktiven Zentrum auch am allosterischen Zentrum Oxidationsreaktionen ausgeführt werden. Basierend auf diesen Versuchen wurde ein radikalischer Enzymmechanismus der AMO postuliert, der die Reaktion eines Amidiumradikals mit einem Hydroxylradikal zu Hydroxylamin beinhaltet (nicht dargestellt). Aufgrund der Hemmung der AMO durch Licht im UV-Bereich (Hooper & Terry, 1974; Shears & Wood, 1985) schlugen Shears & Wood (1985) einen Reaktionsmechanismus der AMO analog zum dreistufigen katalytischen Kreislauf der kupferhaltigen Tyrosinase vor (Lerch et al., 1986). In diesem Enzymmodell wird postuliert, dass zwei Kupferatome im aktiven Zentrum des Enzyms an der Sauerstoffübertragung auf Ammoniak beteiligt sind. Ein Schema zum hypothetischen Reaktionsmechanismus der AMO analog zum dreistufigen Kreislauf der Tyrosinase ist in der Diskussion dargestellt (siehe Abschnitt 5).

Mit Hilfe der [<sup>14</sup>C]Acetylen-Markierung des 27-kDa-Proteins konnte das kodierende Gen für dieses Protein in *Nitrosomonas europaea* identifiziert werden (McTavish et al., 1993 a). Das Protein wurde AmoA genannt. Das Gen *amoA* kodiert für ein 32 kDa großes hydrophobes Protein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 7,9, welches vier bis fünf transmembrane Abschnitte enthält (McTavish et al., 1993 a; Hooper et al., 1997). Das Gen *amoA* kodiert für keine N-terminale Signalsequenz. Trotzdem erscheint das Protein AmoA im SDS-Gel mit 27 kDa kleiner als das Molekulargewicht, das aus dem Gen *amoA* abgeleitet wird (s.o.). Diese Eigenschaft ist mehrfach für Membranproteine beschrieben worden (Youvan et al., 1984; Kok et al., 1989). Im selben Operon wurde ein zweites Gen *amoB* identifiziert und sequenziert (McTavish et al., 1993 a; Bergmann & Hooper, 1994 a). Das Gen *amoB* kodiert für ein 43 kDa großes Protein mit einem pI von 6,8. Dieses Protein ist leicht hydrophob, es enthält zwei bis drei transmembrane Abschnitte und ein langes hydrophiles N-terminales und ein langes hydrophiles C-terminales Ende (McTavish et al., 1993 a; Bergmann & Hooper, 1994 a). Im Gegensatz zum *amoA*-Gen kodiert das *amoB*-Gen für eine N-terminale 37 Aminosäuren lange hydrophobe Signalsequenz (McTavish et al., 1993 a). Im SDS-Gel ergibt das AmoB-Protein eine 41-kDa-Bande. Da das AmoB-Protein zusammen mit dem AmoA-Protein isoliert wurde, nimmt man an, dass es eine weitere Untereinheit der AMO ist (McTavish et al., 1993 a). Die Gene *amoA* und *amoB* werden mit einem weiteren Gen *amoC* auf eine 3,5 kb große mRNA transkribiert (Sayavedra-Soto et al., 1998). Das Gen *amoC* kodiert für ein 31 kDa großes Protein AmoC mit einem pI von 6,6. Es wird vermutet, dass es sich bei diesem hydrophoben Protein mit sechs transmembranen Abschnitten um ein Chaperon handelt, welches die Synthese der AMO aus AmoA und AmoB kontrolliert (Klotz et al., 1997). *Nitrosomonas europaea* besitzt zwei Kopien des *amo*-Operons (McTavish et al.,

1993 a). Die Anzahl der Kopien des *amo*-Operons im Genom der Ammoniakoxidanten ist vermutlich gattungsspezifisch. Im Genom von *Nitrosovibrio* wurden ebenfalls zwei Kopien und im Genom von *Nitrosospira* und *Nitrosolobus* drei Kopien des *amo*-Operons identifiziert. Zudem liegt jeweils eine weitere Kopie von *amoC* außerhalb des *amo*-Operons im Genom vor (Norton et al., 1996; Klotz & Norton, 1998; Sayavedra-Soto et al., 1998). Im Gegensatz zum Genom der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien konnte im Genom der Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien nur eine Kopie des *amo*-Operons detektiert werden (Alzerreca et al., 1999). Die *amoA*-Kopien von *Nitrosomonas europaea* sind fast identisch und knockout-Mutanten zeigten, dass ein Gen zum Wachstum ausreicht (Hommes et al., 1998). Die Proteine AmoA, AmoB und AmoC der Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien unterscheiden sich deutlich von den AMO-Proteinen der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Zwischen beiden liegen 37 bis 43%ige Ähnlichkeiten der Aminosäure (AS)-Sequenzen vor. Dagegen wurden 73 bis 85%ige Ähnlichkeiten zwischen den AS-Sequenzen der AMO-Proteine von Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien festgestellt (Alzerreca et al., 1999).

Die AMO der Ammoniakoxidanten weist große Ähnlichkeiten mit der membrangebundenen, partikulären Methanmonooxygenase (pMMO) der Methanoxidanten auf. Beide Enzyme besitzen ein ähnliches Substratspektrum und Hemmstoffprofil (Stirling & Dalton, 1977; Prior & Dalton, 1985 a; Bédard & Knowles, 1989). Eine aktive Form der kupferhaltigen pMMO wurde von *Methylococcus capsulatus* Bath isoliert und charakterisiert. Sie besteht aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 46, 26 und 23 kDa (PmoB, PmoA, PmoC) (Zahn & Dispirito, 1996; Nguyen et al., 1998). Die Aminosäuresequenzen der pMMO-Untereinheiten und die der AMO-Untereinheiten sind ähnlich (Holmes et al., 1995; Alzerreca et al., 1999). Man geht davon aus, dass die AMO und pMMO trotz unterschiedlicher physiologischer Rollen phylogenetisch verwandt sind und durch eine divergente Entwicklung entstanden sind (Klotz & Norton, 1998). Die AMO-Proteine von *Nitrosococcus oceani*, der zu den  $\gamma$ -Proteobakterien gehört, sind den pMMO-Untereinheiten von *Methylococcus capsulatus* sogar ähnlicher als den AMO-Proteinen der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Die biochemische Verwandtschaft der AMO von *Nitrosococcus oceani* zu der pMMO zeigt sich auch im Hemmstoffprofil. Die Enzyme sind gegenüber der Hemmung von Phenylacetylen sehr viel weniger empfindlich als die AMO der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien (Lontoh et al., 2000). Die AMO und die pMMO stellen vermutlich eine neue Klasse von Monooxygenasen dar (McTavish et al., 1993 a; Holmes et al., 1995). Sie zeigen keine Ähnlichkeiten mit anderen Monooxygenasen wie z. B. den integralen, membrangebundenen Monooxygenasen Alkan-Hydroxylase und Xylen-Monooxygenase (Kok et al., 1989; Suzuki et al., 1991) oder mit den kupferhaltigen Monooxygenasen Tyrosinase (Lerch et al., 1986) und Dopamin B-Hydroxylase (Taljanidisz et al., 1989). Ebenso wurde keine Ähnlichkeit zu der eisenhaltigen cytoplasmatischen Methanmonooxygenase (sMMO) festgestellt, die von

einigen Methanoxidanten bei Kupfermangel gebildet werden kann (Fox et al., 1989; McTavish et al., 1993 a; Lipscomb, 1994; Semrau et al., 1995).

Neben den chemolithotrophen Ammoniakoxidanten ist auch die taxonomisch diverse Gruppe der heterotrophen Nitrifikanten in der Lage, Ammonium und/oder Hydroxylamin zu Nitrit und zum Teil weiter zu Nitrat zu oxidieren (Kuenen & Robertson, 1994). Dabei handelt es sich in der Regel um einen Co-Metabolismus, der mit keinem Energiegewinn für die Zellen verbunden ist (Hooper et al., 1997; Stouthamer et al., 1997). Heterotrophe Nitrifikation findet man bei Algen, Pilzen und einigen Bakterien (Spiller et al., 1976; Robertson & Kuenen, 1988; Stams et al., 1990; Nishio et al., 1994). Das membranassoziierte Ammoniak oxidierende Enzym von *Paracoccus denitrificans* wurde isoliert und charakterisiert (Moir et al., 1996). Das aus zwei Untereinheiten, 38 und 46 kDa, bestehende Enzym ist eine Chinol Oxidase. Obwohl die AMO von *Paracoccus denitrificans* einige enzymatische Eigenschaften der AMO von *Nitrosomonas europaea* aufweist wie z. B. Oxidation von Alkenen, Aktivierung durch  $\text{Cu}^{2+}$  und Hemmung durch Metallchelatoren, sind die für die Enzyme kodierenden Gene sehr unterschiedlich (Crossman et al., 1997). Dagegen konnten Daum et al. (1998) 28 bis 46%ige Ähnlichkeiten zwischen der Aminosäuresequenzen der AMO-Proteine der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien und der AMO-Proteine des heterotrophen Nitrifikanten *Pseudomonas putida* feststellen.

Trotz der zahlreichen indirekten Hinweise fehlen zur Zeit direkte Beweise, dass die Proteine AmoA, AmoB und AmoC Bestandteile der AMO der chemolithoautrophen Ammoniakoxidanten sind. In vitro konnte bislang keine Ammoniakoxidationsaktivität der isolierten Proteine nachgewiesen werden. Die Wiederherstellung der Aktivität war jedoch in ganzen Zellen nach irreversibler Hemmung der AMO mit Acetylen von der Synthese der AmoA und weiteren nicht charakterisierten Proteinen (55 bzw. 65 kDa) abhängig (Hyman & Arp, 1992, 1995; Stein et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ammonium die Synthese der mRNA des *amo*-Operons reguliert (Sayavedra-Soto et al., 1996). Eine Regulation der Synthese und Aktivität der AMO-Proteine durch Ammoniak wurde ebenso auf translationaler und posttranslationaler Ebene nachgewiesen (Hyman & Arp, 1995; Stein et al., 1997; Stein & Arp, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gasförmiges  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  die Synthese der AmoA induziert (Schmidt et al., 2001 b).

Aufgrund der Instabilität der Ammoniakoxidationsaktivität in zellfreien Systemen ist es bisher noch nicht gelungen, die AMO in aktiver Form zu isolieren. Alle Untersuchungen zur Ammoniakoxidationsaktivität wurden an ganzen Zellen oder zellfreien Extrakten durchgeführt. Versuche zeigten, dass zellfreie Extrakte von *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosococcus oceani* nur in Gegenwart von stabilisierenden Agenzien wie z. B. Rinderserumalbumin (BSA), Spermin und  $\text{MgCl}_2$  in der Lage waren, Ammoniak zu oxidieren

(Suzuki & Kwok, 1969, 1970, 1981; Watson et al., 1970; Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995). Die Aktivitäten der zellfreien Extrakte von *Nitrosomonas* variierten stark und waren vom Alter und der *in vivo* Aktivität ganzer Zellen abhängig (Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993). Durch den Zusatz von Kupfer konnte die Aktivität zellfreier Extrakte gesteigert werden (Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995). Die Aktivität war bei 4 °C über zwei Tage stabil (Suzuki & Kwok, 1970; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995). Es wird postuliert, dass die Instabilität der Aktivität durch einen Verlust von Kupfer aus dem katalytischen Zentrum der AMO oder durch einen Verlust der Kopplung zwischen HAO und AMO verursacht wird (Ensign et al., 1993). Nach einer Auftrennung der zellfreien Extrakte von *Nitrosomonas* in drei Fraktionen, nämlich eine Membranfraktion und zwei lösliche Fraktionen, war eine Aktivität nur nach der Wiedervereinigung der Fraktionen zu messen (Suzuki & Kwok, 1981). Es war jedoch in geringem Maße möglich, die löslichen Fraktionen durch gereinigtes Cytochrom c<sub>554</sub> zu ersetzen (Tsang & Suzuki, 1982). Schmidt & Bock (1998) zeigten, dass zellfreie Extrakte von *Nitrosomonas eutropha* anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität aufwiesen und die Aktivität der Rohextrakte durch steigende Sauerstoffkonzentrationen gehemmt wurde.

Im Gegensatz zum ersten Schlüsselenzym der Ammoniakoxidation ist das zweite, die Hydroxylaminoreduktase, isoliert und charakterisiert worden. Die HAO ist ein komplexes, di- oder trimeres Hämprotein, das sich aus identischen 63 kDa großen Untereinheiten zusammensetzt (Arciero & Hooper, 1993; Sayavedra-Soto et al., 1994; Hoppert et al., 1995; Igarashi et al., 1997; Iverson et al., 1998). Jede Untereinheit enthält acht Hämgruppen: Sieben c-Typ-Cytochrome und ein P460-Cytochrom (Arciero & Hooper, 1993). Das aktive Zentrum der HAO wird vermutlich vom P460-Cytochrom gebildet (Hooper et al., 1983; Arciero et al., 1993). Unter bestimmten Wachstumsbedingungen kann das periplasmatische Enzym auch mit der Membran assoziiert sein (Olson & Hooper, 1983; McTavish et al., 1995). Im SDS-Gel besitzt die HAO ein Molekulargewicht von etwa 125 bzw. 140 kDa (Masson et al., 1990; Nejidat et al., 1997). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten HAO-Partikel eine tetramere Struktur mit einer Größe von 8,8 nm (Hoppert et al., 1995). Die HAO enthält etwa 40 % der c-Typ Häme von *Nitrosomonas* (DiSpirito et al., 1985 a). Im periplasmatischen Raum von *Nitrosomonas europaea* wurde in geringen Konzentrationen auch freies Monohäm Cytochrom P460 gefunden. Dieses Cytochrom wies ebenfalls Hydroxylaminoxidationsaktivität auf (Bergmann & Hooper, 1994 b). Ein dem Cytochrom P460 von *Nitrosomonas* sehr ähnliches Protein konnte in dem Methanoxidanten *Methylococcus capsulatus* detektiert werden. Es katalysiert auch dort die Reaktion von Hydroxylamin zu Nitrit (Zahn et al., 1994).

Die Ammoniakoxidation und die Hydroxylaminoxidation sind eng gekoppelt. Hydroxylamin kann nur in Gegenwart von Ammonium als Substrat zum Zellwachstum genutzt werden (Böttcher & Koops, 1994; de Bruijn et al., 1995). Neuere Versuche zeigten jedoch, dass ein

Wachstum von *Nitrosomonas* mit Hydroxylamin in Anwesenheit von Sauerstoff und gleichzeitiger Hemmung der AMO möglich ist (Oesterreicher, 2001).

Bei der Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit durch die HAO werden vier Elektronen freigesetzt. Die Elektronen werden wahrscheinlich über das 26-kDa-Tetrahämprotein Cytochrom  $c_{554}$  auf die Elektronentransportsysteme überführt (Abb. 2.1) (Andersson et al., 1986; Arciero et al., 1991; Bergmann et al., 1994). Cytochrom  $c_{554}$  ist ein positiv geladenes (pI 10,7), periplasmatisches Enzym, welches unter bestimmten Bedingungen an die negativ geladene Membran gebunden ist (Yamanaka & Shinra, 1974; McTavish et al., 1995). Dieser Zwei-Elektronen-Überträger ist in der Lage, Ionenkomplexe mit negativ geladenen Elektronendonatoren und -akzeptoren wie z. B. der HAO (pI 3,4) (Hooper et al., 1978; Iverson et al., 1998) und dem 10 kDa großen Monohämprotein Cytochrom  $c_{552}$  (pI 3,7) (Yamanaka & Shinra, 1974; Fujiwara et al., 1995) zu bilden. Cytochrom  $c_{554}$  stellt einen Verzweigungspunkt der Elektronentransportkette dar. Zwei der vier frei werdenden Elektronen der Hydroxylaminoxidation werden von Cytochrom  $c_{554}$  vermutlich über das membranassoziierte Tetrahäm-Cytochrom  $c_{M552}$  (Cyt  $c_B$ ) und einen membrangebundenen Ubichinon-Cytochrom  $bc_1$ -Komplex zur AMO geleitet (Tsang & Suzuki, 1982; Miller & Wood, 1983 a; Wood, 1986; Whittaker et al., 2000). Neben Tri- und Tetramethylhydrochinon konnten Hydroxylamin und NADH als mögliche Elektronendonatoren der AMO nachgewiesen werden (Suzuki et al., 1981; Shears & Wood, 1986).

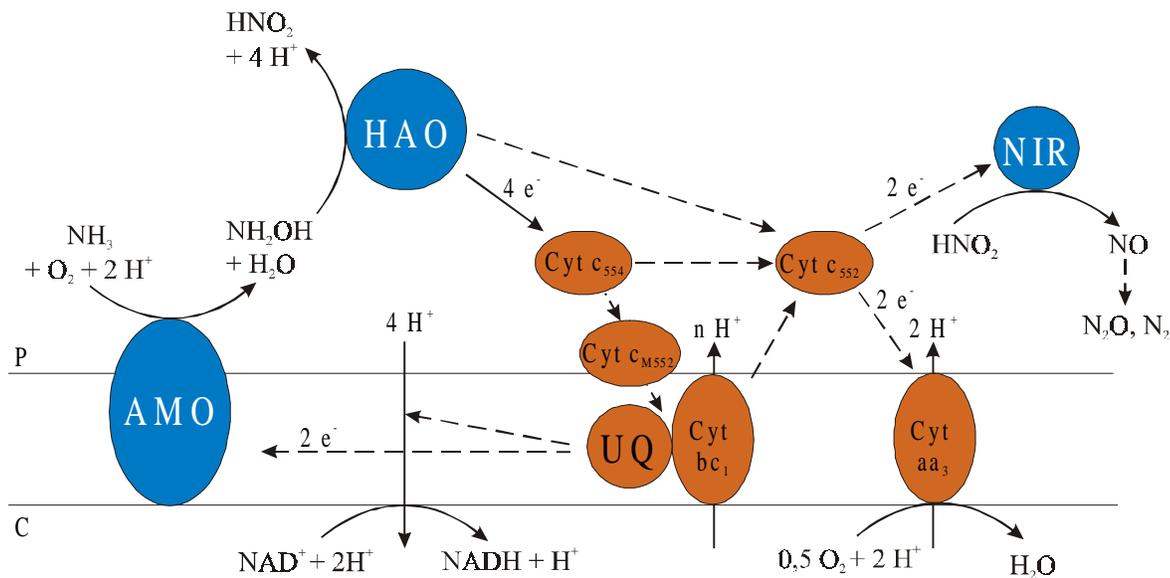


Abb. 2.1: Modell des Elektronentransportweges von *Nitrosomonas europaea* modifiziert nach Whittaker et al. (2000) und Poughon et al. (2001). AMO = Ammoniakmonooxygenase, C = cytoplasmatische Seite der Membran, Cyt = Cytochrom, HAO = Hydroxylaminoxidoreduktase, NIR = Nitritreduktase, P = periplasmatische Seite der Membran, UQ = Ubichinonpool.

Ein Teil der verbleibenden Elektronen wird über Cytochrom  $c_{552}$  auf die membrangebundene terminale Cytochromoxidase  $aa_3$  (DiSpirito et al., 1986) oder die periplasmatische kupferhaltige Nitritreduktase (DiSpirito et al. 1985 b; Miller & Nicholas, 1985) übertragen. Es ist möglich, dass die Elektronen dabei nicht direkt vom Cytochrom  $c_{554}$  auf Cytochrom  $c_{552}$  übertragen werden, sondern über den zwischengeschalteten Ubichinon-Cytochrom  $bc_1$ -Komplex fließen (Wood, 1986). Ubichinon ( $Q_8$ ) und membrangebundene Cytochrome vom b- und c-Typ wurden in *Nitrosomonas europaea* nachgewiesen (Hooper et al., 1972; Miller & Wood, 1983 a; DiSpirito et al., 1985 a; Whittaker et al., 2000). Weitere Elektronenüberträger wurden identifiziert, deren Funktion jedoch bisher ungeklärt ist (Hooper et al., 1997; Whittaker et al., 2000).

Die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit führt zum Aufbau eines Protonengradienten (Drozd, 1976; Hollocher et al., 1982; Kumar & Nicholas, 1982). Das hieraus resultierende elektrochemische Potential kann zur ATP-Regeneration genutzt werden (Mitchell, 1966; Drozd, 1976). Das  $H^+/O$ -Verhältnis der Protonentranslokation wird für die Ammoniakoxidation mit 3,4 bzw. für die Hydroxylaminoxidation mit 4,4 angegeben (Hollocher et al., 1982; Poughon et al., 2001). Ein Teil der Elektronen wird zur Reduktion von Pyridinnukleotiden verwendet, welche u. a. für die  $CO_2$ -Fixierung benötigt werden. Diese NAD(P)H-Regeneration erfolgt vermutlich über einen rückläufigen Elektronentransport, der über ein elektrochemisches Potential angetrieben wird (Aleem, 1966; Wood, 1988 b) (Abb. 2.1). Etwa 50 % der aus der Hydroxylaminoxidation gewonnenen Elektronen fließen über den Ubichinonpool zur AMO, 44 % werden auf die terminale Oxidase geleitet und etwa 6 % sind am rückläufigen Elektronentransport beteiligt (Poughon et al., 2001).

Unter anoxischen, sauerstofflimitierten und sogar oxischen Bedingungen sind Ammoniakoxidanten in der Lage, Nitrit anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Poth, 1986; Anderson et al., 1993; Bock et al., 1995; Zart, 1997). Bei der Denitrifikation wird  $NO$ ,  $N_2O$  und  $N_2$  gebildet (Poth & Focht, 1985). Die Nitritreduktase ist ein periplasmatisches, aus vier Untereinheiten aufgebautes, 120 kDa großes kupferhaltige Enzym. Die Bildung dieses Enzyms wird durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck induziert (Hooper, 1968; Miller & Wood, 1983 b; DiSpirito et al., 1985 b; Miller & Nicholas, 1985). Eine  $NO$ -Reduktase oder  $N_2O$ -Reduktase konnten bei Ammoniakoxidanten bisher noch nicht nachgewiesen werden (Hooper et al., 1997). Allerdings wurde im Genom von *Nitrosomonas europaea* ein mutmaßliches Gen für eine  $NO$ -Reduktase detektiert (Whittaker et al., 2000). Die terminale Oxidasereaktion mit Nitrit als Elektronenakzeptor kann wahrscheinlich zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt werden (Wood, 1986).

Einige Gene der dargestellten Elektronentransportkette wurden identifiziert. Sie liegen häufig in mehreren ähnlichen oder identischen Kopien vor. Im 2,2 Mb großen Genom von *Nitrosomonas europaea* wurden drei Gene der HAO (*hao*) detektiert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den ebenfalls in dreifacher Kopie vorliegenden Genen von Cytochrom  $c_{554}$  (*cycA* oder *hcy*) auftreten (McTavish et al., 1993 b; Bergmann et al., 1994; Sayavedra-Soto et al., 1994; Hommes et al., 1996). Die Gene der HAO und Cytochrom  $c_{554}$  werden jedoch nicht gemeinsam transkribiert. Zwei der *cycA*-Gene liegen jeweils mit einem Gen des Tetrahäm c-Cytochroms Cyt  $c_{M552}$  (Cyt  $c_B$ , ORF 2) in einem Operon (Bergmann et al., 1994; Hommes et al., 1996). Das Gen für das Cytochrom P460 (*cyp*) ist im Genom von *Nitrosomonas* in Einzahl vorhanden (McTavish et al., 1993 b).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Schlüsselenzymssystem der Ammoniakoxidanten immunologisch zu untersuchen. Da die Struktur und der enzymatische Mechanismus des zweiten Schlüsselenzyms der Ammoniakoxidation, die Hydroxylaminoreduktase (HAO) weitgehend aufgeklärt ist, wurde in dieser Arbeit das Augenmerk auf das erste Schlüsselenzym, die Ammoniakmonooxygenase (AMO), gerichtet. Für die Untersuchungen der AMO sollten spezifische Antiseren gegen die Untereinheiten des Enzyms hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper sollten neue Erkenntnisse über die physiologischen und biochemischen Eigenschaften der weitgehend unbekanntes AMO gewonnen werden. Weiterhin sollten die Antikörper es ermöglichen, die AMO während der Isolierung zu identifizieren und somit den Weg für die Reinigung und Charakterisierung einer aktiven Form des Enzyms zu ebnet. Dabei sollten es die gewonnenen Ergebnisse ermöglichen, ein Modell der Enzymreaktion der AMO zu entwickeln, welches dazu beitragen kann mehrere offene Fragen der Nitrifikation zu erklären. Neben diesen biochemischen Untersuchungen des Enzyms sollten mit den Antiseren ökologische Untersuchungen durchgeführt werden. So sollte eine Methode zum Nachweis von Ammoniakoxidanten in Anreicherungskulturen von Naturproben entwickelt werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 BAKTERIENSTÄMME

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an den folgenden Bakterienstämmen durchgeführt.

#### 3.1.1 CHEMOLITHOTROPHE AMMONIAK- UND NITRITOXIDANTEN

Die in Tabelle 3.1 und 3.2 aufgeführten Stämme der Ammoniak- und Nitritoxidanten werden in der Stammsammlung der Abteilung für Mikrobiologie im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg gehalten.

Tabelle 3.1: Verwendete Stämme der Ammoniakoxidanten und deren Herkunftsort.

Art	Stamm	isoliert aus	Literatur
GATTUNG <i>NITROSOMONAS</i> ( $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien)			
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	Nm 36	Brackwasser, Nordsee, Dänemark	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas communis</i>	Nm 2	Boden, Insel Korfu, Griechenland	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	Nm 55/4W30	Meerwasser, Kasitsna Bucht, Alaska	(Jones et al., 1988)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Freitag	Abwasser, Hamburg	(Lott, 1990)
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	N904	Gülle, Hamburg	
<i>Nitrosomonas eutropha</i> <sup>1</sup>	Dave	Prozesswasser eines Biofermenters, Hamburg	
<i>Nitrosomonas halophila</i>	Nm 1	Meerwasser, Nordsee	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas marina</i>	Nm 22	Meerwasser, Südpazifik, Australien	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	Nm 90/Nc 5	Industrieabwasser, Marl	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	Nm 45	Boden, Hamburg	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosomonas spec.</i> <sup>2</sup>	Nm R1.24	Sandstein, Regensburger Dom	
<i>Nitrosomonas ureae</i>	Nm 10	Boden, Sardinien, Italien	(Koops et al., 1991)
<i>Nitrosococcus mobilis</i> <sup>3</sup>	Nc 2	Meerwasser, Hafen von Husum, Nordsee	(Koops et al., 1976)
GATTUNG <i>NITROSOSPIRA</i> ( $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien)			
<i>Nitrosospira spec.</i>	Nsp 1	Boden, Sardinien, Italien	
<i>Nitrosospira spec.</i>	Nsp G1.6	Sandstein, Marienkirche in Gelnhausen	

<i>Nitrospira</i> spec.	Nsp M1.3	Sandstein, Alte Pinakothek, München	
<i>Nitrospira</i> spec.	Nsp R6.2	Sandstein, Regensburger Dom	
GATTUNG <i>NITROSOVIBRIO</i> ( $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien)			
<i>Nitrosovibrio</i> spec.	Nv G1.3	Sandstein, Marienkirche in Gelnhausen	
<i>Nitrosovibrio</i> spec.	Nv K7.1	Sandstein, Kölner Dom	(Spieck et al., 1992)
GATTUNG <i>NITROSOLOBUS</i> ( $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien)			
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	NI 13/ C-71/ ATCC 25196	Boden, Paramaribo, Surinam	(Watson et al., 1971; Harms & Koops, 1980)
GATTUNG <i>NITROSOCOCCUS</i> ( $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien)			
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	Nc 4	Salzlagune, Sardinien, Italien	(Koops et al., 1990)
<i>Nitrosococcus oceani</i>	Nc 1/ ATCC 19707	Meerwasser, Atlantik	(Watson, 1965; Trüper & de Clari, 1997)

<sup>1</sup> *Nitrosomonas* spec. Dave zeigte 99,6 % Sequenzähnlichkeit zu der 16S rDNA und 98 % Ähnlichkeit zum Gen *amoA* von *N. eutropha* Nm 57 (M. Wagner, TU München, mündliche Mitteilung). Ebenso besaß *N. spec. Dave* eine 102,3%ige Ähnlichkeit bei der DNA-DNA-Hybridisierung mit *N. eutropha* N904 (DSMZ, mündliche Mitteilung) und wurde daher der Art *N. eutropha* zugeordnet.

<sup>2</sup> siehe Abschnitt 4.4.1

<sup>3</sup> *Nitrosococcus mobilis* ist phylogenetisch eng verwandt mit der Gattung *Nitrosomonas* (Head et al., 1993).

Tabelle 3.2: Verwendete Stämme der Nitritoxidanten und deren Herkunftsort.

Art	Stamm	isoliert aus	Literatur
GATTUNG <i>NITROBACTER</i>			
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	X <sub>14</sub>	Boden, Hamburg	(Bock et al., 1983)
<i>Nitrobacter vulgaris</i>	K <sub>48</sub>	Sandstein, Kölner Dom	(Bock et al., 1990)
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Engel	Boden, Hamburg	(Bock et al., 1990)
GATTUNG <i>NITROSPINA</i>			
<i>Nitrospina gracilis</i>	3	Meerwasser, Küste von Peru	(Watson & Waterbury, 1971)
<i>Nitrospina</i> spec.	347	Schwarzes Meer	
GATTUNG <i>NITROSPIRA</i>			
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	M-1	Heizungssystem, Moskau	(Ehrich et al., 1995)
GATTUNG <i>NITROCOCOCCUS</i>			
<i>Nitrococcus mobilis</i>	231	Meerwasser, Pazifik	(Watson & Waterbury, 1971)

### 3.1.2 CHEMOORGANOTROPHE BAKTERIEN

Als Referenzstämme wurden die Methanoxidanten *Methylococcus capsulatus* Bath NCIMB 11132, *Methylocystis parvus* 4a und *Methylomonas methanica* Oo52006 sowie die weiteren Bakterienstämme \**Achromobacter cycloclaste*, \**Agrobacterium tumefaciens* GM 19023, \**Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, \**Azorhizobium* spec. 24, \**Azospirillum lipoferum* ATCC 29707, \**Bacillus azotoformans* ATCC 29788, *Bacillus subtilis* 019, \**Bradyrhizobium denitrificans*, \**Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* K12/067/ATCC 23716,

*Methylobacterium radiotolerans*, *Paracoccus denitrificans* 001/ATCC 19367, \**Pseudomonas* spec. AK15 und *Pseudomonas* spec. AM1 eingesetzt. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Organismen wurden von C. Cœur der Universität Claude Bernard Lyon I in Frankreich für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Alle übrigen Organismen werden in der Stammsammlung der Abteilung für Mikrobiologie im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg gehalten.

### 3.2 NÄHRMEDIEN UND KULTURFÜHRUNG

Alle beschriebenen Nährmedien wurden 30 min bei 110 °C und bei einem Überdruck von 0,5 bar im Autoklaven sterilisiert. Gefäße mit einem Volumen von 20 l wurden 2 h sterilisiert. Die benötigten Chemikalien wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Merck bezogen.

#### 3.2.1 AMMONIAKOXIDANTEN

##### MINERALISCHES NÄHRMEDIUM

Alle nichtmarinen Ammoniakoxidanten wurden in mineralischem Nährmedium folgender Zusammensetzung angezogen.

##### NÄHRMEDIUM

Stammlösung für Ammoniakoxidanten (10fach)	100 ml
Spurenelementelösung für Ammoniakoxidanten (1000fach)	1 ml
Kresolrot	1 ml
HEPES (Fa. Gerbu)	3 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,147 g
aqua deion.	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Sterilisieren mit 1-M-NaOH-Lösung auf pH 7,3 eingestellt.

##### STAMMLÖSUNG FÜR AMMONIAKOXIDANTEN (10FACH)

NH <sub>4</sub> Cl (10 mM)	5,349 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,544 g
KCl	0,744 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,493 g
NaCl	5,840 g
aqua deion.	ad 1000 ml

## SPURENELEMENTELÖSUNG FÜR AMMONIAKOXIDANTEN (1000FACH)

MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,033 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,049 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,043 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,037 g
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,973 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025 g
aqua deion. mit 0,025 N HCl	ad 1000 ml

## KRESOLROTLÖSUNG

Kresolrot	0,050 g
in 1 ml 1 M NaOH lösen	
aqua deion.	ad 100 ml

Für einige Versuche wurde das Medium leicht abgewandelt. Anstelle von 10 mM Ammonium wurden dem mineralischen Medium 1, 12 bzw. 100 mM Ammonium, 6 mM Harnstoff oder 5 mM L-Glutamin zugefügt. Zum Teil erfolgte eine mixotrophe Anzucht, bei der dem mineralischen Medium 5 mM Na-Pyruvat, 1,5 g/l Hefeextrakt (Fa. Difco) und 1,5 g/l Pepton (Fa. Difco) oder jeweils 9,1 mM Na-Pyruvat und 9,1 mM L-Alanin zugegeben wurde.

**BRACKWASSER-NÄHRMEDIUM**

Die Ammoniakoxidanten *Nitrosomonas aestuarii* Nm 36, *Nitrosomonas halophila* Nm 1 und *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 wurden in Brackwasser-Nährmedium angezogen. Zur Herstellung dieses Mediums wurden dem mineralischen Nährmedium 10 g/l NaCl zugefügt.

**MEERWASSER-NÄHRMEDIUM**

*Nitrosomonas cryotolerans* Nm 55 wurde in 40%igem, *Nitrosomonas marina* Nm 22, *Nitrosococcus oceani* Nc 1 und *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 in 75%igem Meerwasser-Nährmedium folgender Zusammensetzung angezogen.

## NÄHRMEDIUM

NH <sub>4</sub> Cl (10 mM)	0,535 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,054 g
HEPES (Fa. Gerbu)	3 g
Kresolrot	1 ml
Meerwasser (Nordsee)	400 ml (40 %) bzw. 750 ml (75 %)
aqua deion.	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde nach dem Sterilisieren mit 1-M-NaOH-Lösung auf pH 7,3 eingestellt.

## KULTURFÜHRUNG DER AMMONIAKOXIDANTEN

Die Anzucht der Stammkulturen der Ammoniakoxidanten erfolgte in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Medium. Die Kulturen wurden stehend bei 28 °C im Dunkeln inkubiert und der pH-Wert innerhalb der ersten 14 Tage mit steriler 1-M-NaOH-Lösung auf ca. 7,3 nachtitriert. Ab der zweiten Woche wurden die Kulturen bei 16 °C gelagert und alle 3 Monate mit 5%igem Inokulum auf frisches Medium überimpft.

Die Anzucht der Zwischen- und Arbeitskulturen erfolgte in 300-ml- oder 1-l-Erlenmeyerkolben mit 150 bzw. 500 ml Medium. Sie wurden mit 5%igem Inokulum beimpft und stehend bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Der pH-Wert wurde regelmäßig mit 1-M-NaOH-Lösung auf 7,3 eingestellt. Nach zwei bis vierwöchiger Inkubation wurden die Kulturen auf frisches Medium überimpft.

Um größere Zellmengen von *Nitrosomonas eutropha* N904 zu erhalten, wurde ein 5-l-Laborfermenter (Fa. Meredos) eingesetzt (Zart, 1997). Die Zellen wurden kontinuierlich unter Rühren bei 500 Upm in mineralischem Medium mit 100 mM NH<sub>4</sub>Cl angezogen. Die vollständige Biomasserückhaltung erfolgte über ein Hohlfaser-Membranmodul (Sp S6005-6, Cut-off 6 kDa, Fa. Fresenius). Der pH-Wert wurde mittels einer pH-Einstabmeßkette (Fa. Mettler Toledo) mit 20%iger NaCO<sub>3</sub>-Lösung auf 7,3 und die Temperatur bei 28 °C konstant gehalten. Alternativ erfolgte die Massenanzucht der Ammoniakoxidanten in 20-l-Kolben mit 18 l Medium. Die Kolben wurden mit 1%igem Inokulum beimpft und unter Rühren im Dunkeln bei 28 °C inkubiert. Der pH-Wert wurde mit 10%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf 7,3 nachtitriert.

Für Untersuchungen hungernder Zellen wurde *Nitrosomonas* in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml mineralischem Medium bei 28 °C angezogen. Nach dem die Zellen das Ammonium vollständig verbraucht hatten, wurden die Kolben stehend bei 16 °C gelagert. Nach einem Tag bzw. 29, 58, 129 und 360 Tagen wurden die hungernden Zellen für die Versuche geerntet. Für quantitative Immunblotversuche wurden Zellen von *Nitrosomonas eutropha* N904 bei unterschiedlichen pH-Werten (6,5; 7,5; 8,5) oder Temperaturen (10, 16, 20 bzw. 28 °C) in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml mineralischem Medium angezogen. Nachdem die Zellen Ammonium vollständig verbraucht hatten, wurden die Kulturen auf frisches Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen angezogen. Nach dreimaligem Überimpfen der Kultur wurden die Zellen abgeerntet.

### 3.2.2 ANREICHERUNG VON AMMONIAKOXIDANTEN

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden Ammoniakoxidanten aus verschiedenen Naturproben angereichert. Es wurde Belebtschlamm aus dem Belebungsbecken der Kläranlage in Dradenau/Hamburg (pH 8,0), Gartenerde aus dem Neuen Botanischen Garten in Hamburg (pH 7,6), Teichsediment aus dem Neuen Botanischen Garten in Hamburg (pH 7,6)

sowie Baumberger Sandstein (pH 8,4) verwendet. Drei 5 · 5 · 1 cm große Sandsteinproben waren zuvor fünf Jahre im Neuen Botanischen Garten in Hamburg exponiert worden. Die Sandsteinproben wurden aufgrund der Lagerung auf mit Sand gefüllten Petrischalen nahezu ständig feucht gehalten. Zur Herstellung der Anreicherungskulturen wurde jeweils 5 ml Belebtschlammprobe, 5 ml Teichsedimentprobe, 1 g Boden oder 1 g gemörserte Sandsteinprobe auf 150 ml mineralisches Medium in 300-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und zwei Wochen lang stehend bei 28 °C inkubiert.

### 3.2.3 NITRITOXIDANTEN

#### MINERALISCHES NÄHRMEDIUM

Die Anzucht von *Nitrospira moscoviensis* M-1 erfolgte in mineralischem Medium mit 0,2 g/l NaNO<sub>2</sub> (Bock et al. 1990).

#### NÄHRMEDIUM

Stammlösung für Nitritoxidanten (10fach)	100 ml	
Spurenelementelösung für Ammoniakoxidanten (1000fach)	1 ml	
NaNO <sub>2</sub> (3 mM)	0,2 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 8,6 mit KOH

#### STAMMLÖSUNG FÜR NITRITOXIDANTEN (10FACH)

CaCO <sub>3</sub>	0,07 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 g
aqua deion.	ad 1000 ml

#### MIXOTROPHE ANZUCHT

Die Anzucht von *Nitrobacter hamburgensis* X<sub>14</sub>, *Nitrobacter winogradskyi* Engel und *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> erfolgte mixotroph mit 2 g/l NaNO<sub>2</sub>. Für die mixotrophe Anzucht wurden dem mineralischen Medium folgende organische Substanzen zugefügt: Hefeextrakt 1,5 g/l, Pepton 1,5 g/l und Na-Pyruvat 0,55 g/l. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7,4 eingestellt.

#### MEERWASSER-NÄHRMEDIUM

Die Nitritoxidanten *Nitrospina gracilis* 3, *Nitrospina spec.* 347 und *Nitrococcus mobilis* 231 wurden in Meerwasser-Nährmedium angezogen (Watson und Waterbury, 1970).

## NÄHRMEDIUM

Stammlösung für marine Nitritoxidanten (10fach)	100 ml	
Spurenelementelösung für marine Nitritoxidanten (1000fach)	1 ml	
NaNO <sub>2</sub> (20 mM)	1,4 g	
Meerwasser (Nordsee)	700 ml	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 6,0 mit KOH

## STAMMLÖSUNG FÜR MARINE NITRITOXIDANTEN (10FACH)

CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 g
Meerwasser (Nordsee)	700 ml
aqua deion.	ad 1000 ml

## SPURENELEMENTELÖSUNG FÜR MARINE NITRITOXIDANTEN (1000FACH)

CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,5 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,050 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,025 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,025 g
aqua deion.	ad 1000 ml

**KULTURFÜHRUNG DER NITRITOXIDANTEN**

Die Anzucht der Nitritoxidanten erfolgte in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Medium. Die Medien wurden mit 5%igem Inokulum beimpft und stehend bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Kulturen von *Nitrospira moscoviensis* M-1 wurden bei 37 °C angezogen und wöchentlich mit 0,3 mM Nitrit nachgefüttert.

**3.2.4 METHANOXIDANTEN**

Die Methanoxidanten wurden in mineralischem Medium mit 3 % Methan in synthetischer Luft angezogen (Whittenbury et al., 1970). Das Medium enthielt eine erhöhte Konzentration an CuSO<sub>4</sub> (1 mg/l).

## NÄHRMEDIUM

Stammlösung für Methanoxidanten (10fach)	100 ml
Phosphatpuffer (100fach)	10 ml
Spurenelementelösung für Methanoxidanten (1000fach)	1 ml
aqua deion.	ad 1000 ml

Die drei Lösungen wurden getrennt voneinander sterilisiert und danach vereinigt.

## STAMMLÖSUNG (10FACH)

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
KNO <sub>3</sub>	1,0 g
aqua deion.	ad 1000 ml

## PHOSPHATPUFFER (100FACH)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,26 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,33 g	
aqua deion.	ad 1000ml	pH 7,0

## SPURENELEMENTELÖSUNG FÜR METHANOXIDANTEN (1000FACH)

Na <sub>2</sub> -EDTA (Triplex III)	500 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	3 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
CaCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1000 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3 mg
aqua deion.	ad 1000 ml

Die Anzucht der Methanoxidanten erfolgte in 120-ml-Serumflaschen mit 30 ml Medium. Die mit einem Gummistopfen verschlossenen Flaschen wurden mit 3 % Methan in synthetischer Luft (80 % N<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub>, 0,03 % CO<sub>2</sub>, Fa. Messer Griesheim) begast, mit 5% igem Inokulum beimpft und bei 28 °C auf dem Schüttler inkubiert.

**3.2.5 METHYLOTROPHE BAKTERIEN**

Die methylotropen Bakterien *Methylobacterium radiotolerans* und *Pseudomonas spec.* AM1 wurden in mineralischem Medium mit 0,15 % Methanol angezogen (Green et al., 1988).

## NÄHRMEDIUM

Stammlösung für Nitritoxidanten (10fach)	100 ml	
Spurenelementelösung für Ammoniakoxidanten (1000fach)	1 ml	
NH <sub>4</sub> Cl (8 mM)	0,43 g	
HEPES (Fa. Gerbu)	5 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 8,3

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 15 ml/l steril filtriertes Methanol zugefügt.

Die Zellen wurden in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Nährmedium stehend bei 28 °C im Dunkeln inkubiert.

### 3.2.6 WEITERE CHEMOORGANOTROPHE BAKTERIEN

#### *PARACOCCLUS DENITRIFICANS*

Die Anzucht von *Paracoccus denitrificans* 001/ATCC 19367 erfolgte in folgendem Medium.

#### NÄHRMEDIUM

Spurenelementelösung für Ammoniakoxidanten (1000fach)	1 ml	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g	
NH <sub>4</sub> Cl	0,3 g	
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g	
Na-Acetat	0,8 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 7,5

Die Kulturen wurden mit 5%igem Inokulum auf 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Nährmedium überimpft und bei 28 °C auf dem Schüttler inkubiert.

#### *ESCHERICHIA COLI* UND *BACILLUS SUBTILIS*

Die Anzucht von *Escherichia coli* K12/067/ATCC 23716 und *Bacillus subtilis* 019 erfolgte in 300-ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml Standard-I-Nährbouillon (18 g/l aqua deion., Mercknr. 107882) bei 28 °C auf dem Schüttler.

#### WEITERE MIKROORGANISMEN

Alle weiteren unter Abschnitt 3.1.2 genannten Organismen wurden von C. Cœur der Universität Claude Bernard Lyon I in Frankreich nach den Angaben der American Type Culture Collection (ATCC) angezogen und zur Verfügung gestellt. Sie wurden direkt für die Versuche eingesetzt und im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter kultiviert.

### 3.3 REINHEITSKONTROLLEN

Bei jedem Überimpfen wurde von den Reinkulturen der Nitrifikanten ein Tropfen der Kultur auf eine Reinheitsagarplatte und in 5 ml Hefewasserbouillon gegeben. Wenn nach einer zweiwöchigen Inkubation bei 28 °C keine Kolonien auf der Platte auftraten bzw. keine Trübung der Hefewasserbouillon erkennbar war, wurde die Kultur als rein angesehen. Die Reinheitskontrollen aller übrigen Kulturen erfolgte optisch am Phasenkontrastmikroskop.

**REINHEITSAGAR MODIFIZIERT NACH STEINMÜLLER & BOCK (1976)**

NaCl	0,5 g	
Hefeextrakt (Fa. Difco)	1 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g	
Fleischextrakt	5 g	
Casamino acids	5 g	
Agar	15 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 7,4

**HEFEWASSERBOUILLON**

Bactopepton (Fa. Difco)	0,50 g	
Fleischextrakt	0,50 g	
Hefeextrakt (Fa. Difco)	0,50 g	
NaCl	0,58 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 7,4

**3.4 ERNTE DER BAKTERIENZELLEN**

Die Bakterien der Massenanzuchten wurden mit einem Hohlfasermembran-Modul (Ultrafiltrationsmembran aus Polysulfon mit einem Cut-off von 6 kDa, Gesamtoberfläche 0,4 m<sup>2</sup>, Fa. Fresenius) aufkonzentriert. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden in einer Kühlzentrifuge (Kontron-Hermle-Centrikon H-401, Rotor: A 6.9) bei 4 °C und 12.000 g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen und zweimal gewaschen. Bei Einsatz der Zellen für einen nachfolgenden Aktivitätstest wurde die 0,9%ige NaCl-Lösung durch den von Schmidt (1997) entwickelten und leicht abgewandelten PS1-Puffer ersetzt.

**PS1-PUFFER**

HEPES	5 g	
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,20 g	
NH <sub>4</sub> Cl (6,5 mM)	0,35 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 7,4

Nach dem Sterilisieren wurden 1 ml steril filtrierte 300 mM CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O-Lösung zugefügt.

**3.5 ZELLAUFSCHLUSS**

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurden Zellkonzentrationen von ca.  $3 \cdot 10^{10}$  Zellen pro ml eingesetzt. Es wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden angewandt. Der Aufschluss erfolgte aerob bei einem Zellvolumen größer als 800 µl mit der French Pressure Cell Press und bei einem Volumen kleiner als 800 µl mit Ultraschall. Alternativ zum aeroben

Zellaufschluss wurden die Zellen anaerob mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden die unbeschädigten Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 25.000 g (Rotor: Kontron-Hermle A 8.24) niedergeschlagen. Der zellfreie Extrakt im Überstand wurde frisch verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **3.5.1 FRENCH PRESSURE CELL PRESS**

Der Zellaufschluss erfolgte in einer French Pressure Cell Press (American Instrument Company). Die Zellsuspensionen wurden in die French-Press-Zelle (Volumen 3,5 ml) pipettiert und einem Druck von 1,4 kbar ausgesetzt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt.

### **3.5.2 ULTRASCHALL**

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Ultraschallstabes (Ultraschallprozessor UP 200, Fa. Dr. Hielscher GmbH) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen 2 bis 5 min einer Ultraschallstärke von 50 % mit einem Impuls von 0,5 ausgesetzt. Während der Behandlung wurden die Zellen gut gekühlt.

### **3.5.3 GLASPERLEN**

Für die anaerobe Herstellung zellfreier Extrakte erfolgte der Zellaufschluss mittels feiner Glasperlen ( $\varnothing$  150 bis 212  $\mu\text{m}$ , Fa. Sigma). Dazu wurden 1 g Zellen in 15 ml PS1-Puffer (siehe Abschnitt 3.4) gelöst und mit 20 ml Glasperlen unter ständigem Rühren 2 h im Eisbad aufgeschlossen. Die Zellen, die Gefäße und sämtliche Medien wurden zuvor durch Begasung mit einem Stickstoff-Kohlendioxid-Gemisch (0,03 %  $\text{CO}_2$  in  $\text{N}_2$ , Fa. Messer-Griesheim) anaerobisiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten in der anaeroben Werkbank (Glovebox MK3, Fa. DWS Laborgeräte GmbH) in Gegenwart des Stickstoff-Kohlendioxidgemisches.

## **3.6 ANALYTISCHE NACHWEISMETHODEN**

### **3.6.1 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTES**

Für die quantitative Proteinbestimmung von detergenzfreien Proben wurde die Methode von Bradford (1976) angewandt. Bei Versuchen, die am „Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol“ der Universität Claude Bernard Lyon I in Frankreich durchgeführt wurden, erfolgte die Bestimmung mit der BCA-Methode. Enthielt die Probe ein Detergenz, wurde der Proteingehalt mit Hilfe der DC-Proteinanalyse bestimmt. Anhand von Eichgeraden aus

definierten Rinderserum Albumin (BSA)-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0 bis 1,5 mg/ml) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

### **METHODE NACH BRADFORD**

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach Bradford (1976), modifiziert nach Spector (1978). Die Sulfonsäuregruppen des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 reagieren mit den Aminogruppen des Proteins unter Bildung eines blauen Farbkomplexes (Fazekas de St. Groth et al., 1963). Von den Zellextrakten wurden 60 µl mit 1 ml Bradford Reagenz versetzt, 10 s gemischt und 5 min inkubiert. Drei parallele Proben wurden spektralphotometrisch (CADAS 50S, Fa. Dr. Lange) bei 595 nm analysiert. Als Nullwert diente 60 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung versetzt mit 1 ml Bradford Reagenz.

#### **BRADFORD-REAGENZ**

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fa. Serva)	40 mg
Ethanol (96 %)	50 ml
o-Phosphorsäure (85 %)	100 ml
aqua deion.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde nach der Herstellung filtriert.

### **BCA-METHODE**

Zum Teil wurde der Proteingehalt mit der BCA-Methode bestimmt (Smith et al., 1985). Die Methode basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry et. al. (1951). Unter alkalischen Bedingungen bilden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit den Peptidbindungen der Proteine einen Komplex und werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen reagieren dann mit Bicinchoninicsäure (BCA) zu einem violetten Farbkomplex. Die Proteinbestimmung wurde in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) durchgeführt. Jeweils 10 µl der Probe wurden mit 190 µl BCA-Reagenz (Fa. Pierce) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Drei parallele Proben wurden spektralphotometrisch (MR 5000, Fa. DYNATECH) bei 562 nm analysiert. Als Nullwert dienten 10 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung versetzt mit 190 µl BCA-Reagenz.

### **DC-PROTEINANALYSE**

Mit der DC-Proteinanalyse kann der Proteingehalt in Gegenwart von Detergenzien wie z. B. 10 % SDS oder 1 % Triton X-100 bestimmt werden. Die DC-Proteinanalyse basiert, wie die BCA-Methode, auf der Proteinbestimmung nach Lowry et. al. (1951). Im Gegensatz zur BCA-Methode reagieren die an die Proteine gebundenen  $\text{Cu}^+$ -Ionen mit Folinreagenz zu einem blauen Farbkomplex. Die Methode erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Fa. Bio-

Rad, DC Protein Assay). 25 µl der Probe wurden mit 125 µl alkalischer Kupfertatratlösung und 1 ml Folinreagenz versetzt und nach jeder Reagenzzugabe gründlich durchmischt. Drei parallele Proben wurden spektralphotometrisch (CADAS 50S, Fa. Dr. Lange) nach 15 min Inkubation bei 750 nm analysiert. Der Farbkomplex war eine Stunde stabil. Als Nullwert wurde 25 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung mit den Reagenzien versetzt.

### 3.6.2 BESTIMMUNG VON AMMONIUM

Die quantitative Bestimmung von Ammonium erfolgte photometrisch nach einer veränderten Methode von Corbin (1984). Diese Methode basiert auf einem indirekten Nachweis der Ammonium-Ionen durch Reaktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Phtaldialdehyd zu einem gelben N-substituierten 1-(2-Hydroxyethyl)-Thioisoindol.

Ganze Zellen wurden 10 min bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ). Rohextrakte wurden direkt verwendet. Jeweils 50 µl des Überstandes bzw. des Rohextraktes wurden mit 950 µl Derivatisierungsreagenz versetzt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden im Spektralphotometer (CADAS 50 S, Fa. Dr. Lange) bei einer Wellenlänge von 420 nm gegen einen gleichbehandelten Blindwert gemessen. Die Eichung erfolgte mit Ammoniumstandards in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mM.

#### DERIVATISIERUNGSREAGENZ

Phtaldialdehyd	540 mg
Ethanol abs.	10 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol (Fa. Sigma)	50 µl
Phosphatpuffer (0,2 M)	ad 100 ml

#### PHOSPHATPUFFER (0,2 M)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	27,22 g
aqua deion.	ad 1000 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	34,43 g
aqua deion.	ad 1000 ml

Beide Lösungen wurden derart gemischt, dass sich ein pH-Wert von 7,3 einstellte.

### 3.6.3 BESTIMMUNG VON HYDROXYLAMIN

Zur quantitativen Bestimmung von Hydroxylamin wurde eine Methode nach Magee & Burris (1954) modifiziert durch Verstraete & Alexander (1972) und Palling & Hollocher (1985) verwendet. Hydroxylamin bildet mit 8-Hydroxychinolin unter alkalischen Bedingungen

(pH 10 bis 11) einen blaugrünen Farbstoff (Indooxin). Da Nitrit den Nachweis stört, wurde es vorher durch Zugabe von Amidoschwefelsäure entfernt.

Ganze Zellen wurden 10 min bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ). Rohextrakte wurden direkt verwendet. Jeweils 250 µl des Überstandes bzw. des Rohextraktes wurden mit dem gleichen Volumen 0,5%iger Amidoschwefelsäure versetzt und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In drei parallelen Ansätzen wurden 150 µl dieses Gemisches mit dem gleichen Volumen 1 M Salzsäure vermischt. Danach wurden 300 µl aqua deion., 300 µl 1%ige 8-Hydroxychinolinlösung und 300 µl 3 M Natriumcarbonatlösung zugegeben, vermischt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer (CADAS 50 S, Fa. Dr. Lange) bei einer Wellenlänge von 710 nm gegen einen gleichbehandelten Blindwert. Die Eichung erfolgte mit Hydroxylaminstandards in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM.

### **3.6.4 BESTIMMUNG VON NITRIT**

Die quantitative Bestimmung von Nitrit erfolgte nach der Methode von Garrett & Nason (1969). Sie beruht auf dem Prinzip der Bildung eines Diazoniumsalzes aus Sulfanilsäure und Nitrit mit der nachfolgenden Kopplung mit 1-Naphthylamin zu einem roten Azofarbstoff.

Ganze Zellen wurden 10 min bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ). Rohextrakte wurden direkt verwendet. Jeweils 500 µl des Überstandes bzw. des Rohextraktes wurden mit 500 µl 1%iger Sulfanilsäure (1 g Sulfanilsäure in 20 ml konz. HCl und 80 ml aqua deion.) und 500 µl 0,12%iger NEDA-Lösung (NEDA = N-(1-Naphthyl)-ethylen-diammoniumdichlorid) versetzt. Anschließend wurden die Proben 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei 546 nm gegen einen nitritfreien Blindwert im Spektralphotometer (CADAS 50 S, Fa. Dr. Lange) gemessen. Die Eichung erfolgte mit Nitritlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 30 µM.

### **3.6.5 BESTIMMUNG VON METALLIONEN**

#### **BESTIMMUNG VON KUPFER**

Kupferionen wurden quantitativ mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektroskopie bestimmt. Jeweils 200 µl der Probe wurden mit 200 µl 65%iger Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) versetzt und unter Rühren in einem Glasgefäß eingedampft. Der Bodensatz wurde mit 100 µl 65%iger HNO<sub>3</sub> aufgenommen und erneut bis zur Trockene eingedampft. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Glasgefäß mit 1 ml 13%iger HNO<sub>3</sub> versetzt und der Kupfergehalt im Atom-Absorptions-Spektrophotometer (1100 B, Fa. Perkin-Elmer) bestimmt. Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 mg/l dienen als Eichstandards.

## BESTIMMUNG VON EISEN

Die quantitative Bestimmung von Eisen (II)-Ionen und Eisen (III)-Ionen erfolgte photometrisch.  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen bilden mit 1,10-Phenanthroliniumchlorid einen roten Farbkomplex. Der Gesamteisenionengehalt wurde analog nach Reduktion der  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch Hydroxylamin zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gemessen. Aus dem Gesamteisenionengehalt wurde die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionenkonzentration abgeleitet.

Jeweils 5 ml aqua deion. wurden mit 0,4 ml 10,4 M Ammoniumacetat in Eisessig versetzt. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  Probe zugegeben und geschüttelt. Die Proben wurden entweder direkt verwendet oder zuvor 1:1 mit 1 M Salzsäure versetzt und 15 min inkubiert. Bei der Bestimmung des Gesamteisenionengehaltes wurden 0,2 ml einer 2,9-M-Hydroxylammoniumchlorid-Lösung, bei der Bestimmung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen 0,2 ml aqua deion. zugegeben. Nach Zugabe von 10 ml einer 21- $\mu\text{M}$ -1,10-Phenanthroliniumchlorid-Lösung wurde die Probe gut geschüttelt und das Reagenzglas mit aqua deion. auf 10 ml aufgefüllt. Nach erneutem Schütteln wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm im Spektralphotometer (CADAS 50 S, Fa. Dr. Lange) gegen einen Blindwert gemessen. Die Eichung erfolgte mit Eisenstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,4 bis 1,5 mg/l Eisen (II/III)-Ionen.

## 3.7 ISOLIERUNG DES AMOA- UND AMOB-PROTEINS

Zur Isolierung des 27 kDa großen AmoA- und des 41 kDa großen AmoB-Proteins aus *Nitrosomonas eutropha* N904 wurde das Gesamtprotein zunächst elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.11.1). Mit Hilfe der reversiblen Zinkfärbung wurden die 27 kDa bzw. 41 kDa großen Proteinbanden identifiziert (siehe Abschnitt 3.12.2), aus den Gelen geschnitten und entfärbt. Anschließend wurden die Proteine der 27-kDa- und 41-kDa-Bande getrennt voneinander mit Hilfe eines Elektro-Eluters (Model 422, Fa. Bio-Rad) aus den Gelabschnitten herausgelöst. Dazu wurden die Gelabschnitte in Glasröhrchen gegeben, die mit Puffer gefüllt und über Fritten mit Auffangbehältern gekoppelt waren. Die Auffangbehälter waren mit Dialysemembranen (Cut off 12-15 kDa) mit dem umgebenen Puffer verbunden. In Abb. 3.1 ist eine Elutionseinheit dargestellt. Durch einen elektrischen Strom wanderten die Proteine aus den Gelabschnitten durch die Fritten in die Auffangbehälter und wurden durch die Dialysemembranen aufkonzentriert.

Vor dem Zusammensetzen der Elutionseinheiten wurden die Auffangbehälter 1 h bei 60 °C im Laufpuffer der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.11.1) erhitzt. Zudem wurden die Fritten unter Vakuum mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe 15 min im Laufpuffer entgast. Die Fritten wurden nun auf die Glasröhrchen gesetzt und die Elutionseinheit im Laufpuffer zusammengesetzt, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Der Elektro-Eluter wurde mit sechs Elutionseinheiten bestückt. Die untere Kammer wurde mit 600 ml und die obere Kammer und

die Glasröhrchen mit ca. 100 ml Laufpuffer gefüllt. Jeweils 8 Gelabschnitte wurden in den Glasröhrchen vereinigt und bis auf 1 cm über den Fritten zusammengedrückt. Die Elektroelution wurde bei einer Stromstärke von 60 mA für 3 h auf dem Rührer im Eisbad durchgeführt. Nach dieser Zeit wurde der gesamte Laufpuffer durch frischen Laufpuffer ersetzt, der kein SDS enthielt und die Elektroelution unter gleichen Bedingungen für weitere 3 h fortgesetzt. Anschließend wurde die Elutionseinheit herausgenommen, der Puffer im Glasröhrchen entfernt und die Proteine aus den Auffangbehältern (je ca. 400 µl) gesammelt. Die Proteine der 27 kDa- bzw. 41 kDa-Bande wurde eingefroren und später durch Gefriertrocknung (Freezemobile 12, Fa. Virtis) über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Vakuum aufkonzentriert.

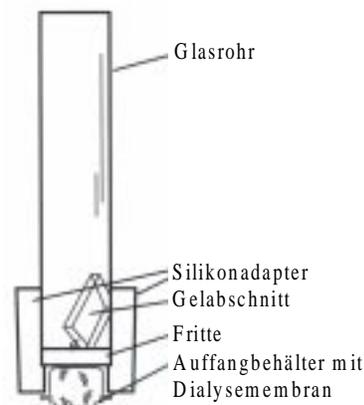


Abb. 3.1: Elutionseinheit des Elektro-Eluters (Model 422, Fa. Bio-Rad).

### 3.8 IDENTIFIZIERUNG DES AMOA- UND AMOB-PROTEINS MIT HILFE DER SEQUENZIERUNG

Zur Identifizierung des AmoA- und AmoB-Proteins wurde das 27 kDa und das 41 kDa große Protein von *Nitrosomonas eutropha* N904 N-terminal sequenziert. Um eine N-terminale Blockierung der Proteine bei der Sequenzierung zu vermeiden, wurde das 27 kDa und das 41 kDa große Protein zunächst mittels einer modifizierten SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.11.1) von den übrigen Proteinen des Gesamtproteins getrennt. Die Proteine wurden dann mit Hilfe eines kontinuierlichen Elektoblots auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen und reversibel gefärbt (siehe Abschnitt 3.14.2). Anschließend wurden die Proteine direkt auf der Membran sequenziert. Die N-terminale Sequenzierung der Proteine erfolgte mit Hilfe des Edman-Abbaus. Sie wurden vom Institut für Biologie und Chemie der Proteine der Universität Claude Bernard Lyon I in Frankreich oder von der Firma Chromatec in Greifswald durchgeführt. Die Proteinsequenzen der beiden Proteine wurden mit homologen Proteinen der EMBL und SwissProt Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen (Altschul et al., 1990).

### 3.9 SYNTHESE EINES AMOA-OLIGOPEPTIDS

Von der Firma Biotrend wurde ein Oligopeptid mit der 15 N-terminalen Aminosäure (AS)-Sequenz des AmoA-Proteins von *Nitrosomonas eutropha* Nm 57 hergestellt. Die N-terminale AS-Sequenz <sup>1</sup>MSIFRTEEILKAAKM<sup>15</sup> wurde aus den Sequenzen der *amo*-Gene abgeleitet (*amoA1* und *amoA2*, GenBank Nummern U51630 und U72670).

### 3.10 HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOA UND AMOB

Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die AmoA erfolgte mit Hilfe des synthetischen Oligopeptids der AmoA von der Firma Biotrend. An das Oligopeptid wurde ein eukaryotisches Protein (KHL, Keyhole Limpet Hämocyanin) gekoppelt. Das künstliche Protein wurde anschließend zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die polyklonalen Antikörper des IgG-Typs wurden über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Im Gegensatz zu der Herstellung der AmoA-Antikörper erfolgte die Herstellung der Antikörper gegen die AmoB mit Hilfe des isolierten AmoB-Proteins aus *Nitrosomonas eutropha* N904 (siehe Abschnitt 3.7). Das gereinigte aufkonzentrierte AmoB-Protein wurde zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Hühner injiziert (Fa. Valbex, Frankreich). Für die Immunisierung wurden 500 µg AmoB-Protein verwendet.

Die Lagerung der AmoA- und AmoB-Antikörper erfolgte bei -20 °C in 10-µl-Portionen.

### 3.11 GELELEKTROPHORESE

Zur Analyse des Proteinmusters, zum Nachweis von Hämproteinen, zur Aufreinigung und Sequenzierung von Proteinen und zur Durchführung von Immunblots wurden Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen und unter nativen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.11.1 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Die SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Bei dieser Methode werden die Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und im Gel hauptsächlich aufgrund ihrer Masse getrennt.

## PROBENVORBEREITUNG

Für die Gelelektrophorese wurden Proteinkonzentrationen von ca. 1,5 mg/ml eingesetzt. Lagen niedrigere Konzentrationen vor, wurden die Proteine durch eine Acetonfällung aufkonzentriert (Hudgin et al., 1974). Dazu wurde bis zu 200 µl Probe mit 1 ml Aceton versetzt und über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 14.000 g zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ). Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment getrocknet. Nach Aufnahme des Sediments mit Lysispuffer (einfach) wurde die Probe 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht mit Aceton gefällte Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Lysispuffer (2fach) versetzt und inkubiert.

### LYSISPUFFER (2FACH)

SDS (Fa. Sigma)	2 g	
Saccharose	20 g	
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	1,21 g	
$\beta$ -Mercaptoethanol (Fa. Sigma)	1 ml	
Bromphenolblau (Fa. Sigma)	1 mg	
aqua deion.	ad 100 ml	pH 6,8

Der Puffer wurde proportioniert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Erfolgte im Anschluss an die Gelelektrophorese eine Peroxidasefärbung der Hämproteine, wurde das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol im Lysispuffer (2fach) durch Dithiothreitol (DTT, 10 mM, Fa. Sigma) ersetzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Lysispuffer versetzt und 5 min bei  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

## GELHERSTELLUNG

Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN II-Kammer (8 · 10 cm, Fa. Bio-Rad) oder in einer PROTEAN II-Kammer (16 · 20 cm, Fa. Bio-Rad) durchgeführt. Es wurde ein diskontinuierliches System mit einer Polyacrylamidkonzentration von 12 % (w/v) im Trenngel und von 4 % (w/v) im Sammelgel mit einer Gelstärke von 0,75 mm oder 1 mm verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte mit Acrylamid und dem Vernetzungsreagenz Methylbisacrylamid nach einer Einwirkung der Radikalstarter APS (Ammoniumperoxodisulfatlösung) und TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylenethyldiamin). Die Trenngellösung für das große Gel (PROTEAN II-Kammer) wurde vor Zugabe der Radikalstarter unter Vakuum mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Trenngellösung wurde bis ca. 2 cm unter dem oberen Rand der Gelkassette gefüllt und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde das Isobutanol entfernt und die Oberfläche mit aqua deion. gespült. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel bis zum

oberen Rand der Gekassetten gefüllt und die Geltaschenformer eingesetzt. Nach Einsetzen der Gekassetten in die Elektrophoresekammern wurden die Kammern mit Laufpuffer (1fach) gefüllt. Zur besseren Polymerisation wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur im Laufpuffer aufbewahrt.

#### TRENNGEL (12 %)

	Mini-PROTEAN II-Kammer	PROTEAN II-Kammer
aqua deion.	3,36 ml	26,88 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	20 ml
10 % SDS (Fa. Sigma)	0,1 ml	0,8 ml
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	4 ml	32 ml
10 % APS (Fa. Sigma)	50 µl	360 µl
TEMED (Fa. Sigma)	10 µl	58 µl

#### SAMMELGEL (4 %)

	Mini-PROTEAN II-Kammer	PROTEAN II-Kammer
aqua deion.	3,05 ml	12,2 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,25 ml	5 ml
10 % SDS (Fa. Sigma)	50 µl	200 µl
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	650 µl	2,6 ml
10 % APS (Fa. Sigma)	25 µl	100 µl
TEMED (Fa. Sigma)	10 µl	40 µl

#### LAUFPUFFER (10FACH)

Tris (1 M)	30 g	
Glycin (2 M)	144 g	
SDS (0,25 M) (Fa. Sigma)	10 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 8,3-8,6

Erfolgte im Anschluss an die Gelelektrophorese eine Hämefärbung der Proteine, wurde dem Laufpuffer 50 µl/l Thioglykolat (Fa. Sigma) zugefügt.

#### ELEKTROPHORESE

Wurden die Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE sequenziert, erfolgte vor Auftragung der Proben eine Entfernung freier Radikale aus dem SDS-Gel. Dieses sollte einer N-terminalen Blockierung der Proteine bei der Sequenzierung vorbeugen. Dazu wurde dem Laufpuffer 700 µl/l Na-Thioglykolat (Fa. Sigma) zugefügt und zunächst an die Gele für 2 h eine Spannung von 100 V angelegt. Nach dem Austauschen des Puffers durch gewöhnlichen Laufpuffer wurden die Proteine in die Taschen gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Taschen des Sammelgels wurden, soweit nicht anders angegeben, mit 15 µg Protein in einem maximalen Volumen von 30 µl (Mini-PROTEAN II-Kammer) bzw. 120 µg Protein in einem maximalen Volumen von 100 µl (PROTEAN II-Kammer) gefüllt. Für die Bestimmung

der relativen Molekülmassen wurden Molekulargewichtsstandards (low range, 14,4 bis 97,4 kDa, 1:20 verdünnt, Fa. Bio-Rad; high molecular standard mixture, 29 bis 205 kDa, Fa. Sigma) mit auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese in der kleinen Kammer (Mini-PROTEAN II-Kammer) erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel (Spannungsquelle, E865, 0-600 V, 0-500 mA, Fa. Consort) für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Wurden im Anschluss an die SDS-PAGE die Hämproteine gefärbt, fand die Gelelektrophorese bei 4 °C statt. Die Gelelektrophorese in der großen Kammer (PROTEAN II-Kammer) wurde über Nacht bei einer konstanten Temperatur von 10 °C und einer Spannung von 80 V durchgeführt. Die Temperatur wurde durch ein zirkulierendes Kühlsystem (F10, Fa. Julabo) konstant gehalten. Zusätzlich wurde die Zirkulation des Laufpuffers in der Gelkammer durch eine angeschlossene Pumpe (MS-Reglo, Fa. IsomaTec) gewährleistet. Am nächsten Morgen wurde die Spannung auf 120 V erhöht und der Gellauf gestoppt, wenn die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht hatte. Es folgte eine Färbung der Gele oder ein Elektrobplot der Proteine auf eine Membran.

### 3.11.2 NATIVE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Die native PAGE erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Jedoch wurde das anionische, denaturierende Detergenz SDS durch das anionische, nichtdenaturierende Detergenz Natriumdesoxychololat ersetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nicht nur aufgrund ihres Molekulargewichtes sondern zusätzlich aufgrund ihrer Ladung. Der Lysispuffer für die native Gelelektrophorese war wie folgt zusammengesetzt.

#### LYSISPUFFER (2FACH)

Natriumdesoxychololat	1,0 g	
Glycerin	5 ml	
Tris	0,8 g	
Bromphenolblau	2 mg	
aqua deion.	ad 100 ml	pH 7,0

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit dem Lysispuffer (2fach) versetzt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Dem Trenngel und Sammelgel (siehe Abschnitt 3.11.1) wurde anstelle von 10 % SDS 25 % Natriumdesoxychololat zugefügt. Es wurden verschiedene Polyacrylamidkonzentrationen von 5 bis 12 % (w/v) im Trenngel eingesetzt. Im Sammelgel wurde stets eine Konzentration von 4 % (w/v) verwendet. Im 10fachen Laufpuffer (siehe Abschnitt 3.11.1) wurde das 1%ige SDS durch 2,5%iges Natriumdesoxychololat ersetzt. Ansonsten erfolgte die Gelelektrophorese wie unter Abschnitt 3.11.1 beschrieben.

### 3.12 FÄRBUNG DER PROTEINBANDEN IM GEL

Die Proteine wurden im Gel entweder mit der reversiblen Coomassie-Blaufärbung oder Zinkfärbung sichtbar gemacht. Zudem wurden Hämproteine über eine Peroxidasefärbung nachgewiesen. Die Coomassie-Blaufärbung erfolgte zur Dokumentation der Proteine im Gel. Die Zinkfärbung wurde bei der Isolierung von Proteinen angewendet.

#### 3.12.1 COMASSIE-BLAUFÄRBUNG

Coomassie-Blau färbt basische Gruppen der Proteine (Weber & Osborn, 1969). Die Gele wurden über Nacht auf dem Schüttler in der Färbelösung inkubiert und anschließend in der gleichen Lösung ohne die Zugabe von Coomassie-Blau für 1 bis 2 h entfärbt. Die Entfärbelösung wurde halbstündlich erneuert.

##### FÄRBELOESUNG

Ethanol (96 %)	400 ml
Essigsäure (96-100 %)	100 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,7 g
aqua deion.	ad 1000 ml

#### 3.12.2 ZINKFÄRBUNG

Die Zinkfärbung der Proteine erfolgte nach einer modifizierten Methode von Fernandez-Patron et al. (1992) (Zinc Stain & Destain Kit, Fa. Bio-Rad). Bei der reversiblen Zinkfärbung handelt es sich um eine Negativfärbung. Proteine werden im Gegensatz zum Gelhintergrund nicht gefärbt. Zur Färbung wurden die Gele 10 min in Imidazolösung (Fa. Bio-Rad) und 30 bis 60 s in Zinksulfatlösung (Fa. Bio-Rad) inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit aqua deion. gestoppt. Zum Entfärben der Proteine wurden die Gele mit aqua deion. gewaschen und 15 min in Entfärberlösung (Tris/Glycinlösung, Fa. Bio-Rad) inkubiert. Die Entfärbelösung wurde alle 5 min ausgewechselt.

#### 3.12.3 PEROXIDASEFÄRBUNG ZUM NACHWEIS VON HÄMPROTEINEN

Der Nachweis von Hämproteinen erfolgte über die Peroxidasefärbung (Francis & Becker, 1984). Partiiell denaturierte Hämproteine besitzen eine Peroxidaseaktivität (Jones & Poole, 1985) und lassen sich in Gelen über diese Reaktion identifizieren. Vorwiegend die kovalent gebundenen Hämgruppen der c-Cytochrome bleiben unter den stark denaturierenden

Bedingungen noch in detektierbaren Mengen an das Protein gebunden. Bei der Peroxidase-reaktion wird Wasserstoffperoxid durch das Reduktionsmittel Dimethoxybenzidin (DMB) zu Wasser reduziert. Im oxidierten Zustand nimmt DMB eine bräunliche Farbe an. Nach einer leicht abgewandelten Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.11.1) wurden die Gele 30 min in 12,5%iger Trichloressigsäure inkubiert. Anschließend wurden die Gele 30 min mit aqua deion. gewaschen und über Nacht mit der Färbelösung inkubiert.

#### FÄRBE LÖSUNG

Dimethoxybenzidin (DMB = o-Dianisidin, Fa. Sigma)	200 mg	
in aqua deion.	180 ml	lösen
Na-Citrat (0,5 M, pH 4,4)	20 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	0,4 ml	

### 3.13 TROCKNUNG UND DOKUMENTATION DER GELE

Die Trocknung der Gele erfolgte unter Vakuum ca. 2 h bei 70 °C mit einer an ein Heizgerät (Dryster, Fa. H. Hözel GmbH) angeschlossenen Vakuumpumpe (UWK 300, Fa. Vacuubrand). Die Gele wurden zwischen zwei Cellulosefolien (Backing Cellophan, Fa. Bio-Rad) fixiert. Die getrockneten Gele wurden mit einem Scanner (ScanMagic 9636S, Fa. Mustek) in einen Computer eingelesen. Mit einem Densitometerprogramm (Gelscan 1.0,  $\alpha$ -Version, Talkoski, unveröffentlicht) ließen sich Profile zeichnen und die Banden quantifizieren (Software Programm origin 4.0, Fa. Microcal).

### 3.14 WESTERNBLOT

Zum Nachweis des AmoA- und AmoB-Proteins in Zellextrakten von Ammoniakoxidanten wurden Westernblots durchgeführt. Dazu wurden die Proteine zunächst ihrer Größe nach elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.11.1) aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein elektrophoretischer Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran. Der Elektrobplot erfolgte gewöhnlich mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems. Die Untereinheiten der AMO wurden danach mit Hilfe der Antikörper auf der Membran nachgewiesen. Wurden die Proteine im Anschluss an den Elektrobplot sequenziert, wurden ein kontinuierliches Puffersystem verwendet.

### 3.14.1 ELEKTROBLOT MIT DISKONTINUIERLICHEM PUFFERSYSTEM

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Cellulosenitrat-Membran (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Fa. Schleicher & Schuell) wurde mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt (Kyse-Andersen, 1984). Die Membran wurde entsprechend der Größe der Gele und die Filterpapiere entsprechend der Elektrodenfläche des Blotgerätes (Pegasus, Fa. PHASE) zugeschnitten. Das Gel und die Membran wurden zwischen in Puffer getränkten Filterpapieren (WHATMAN Chromatographiepapier 3MM) luftblasenfrei eingeschlossen (Abb. 3.2). Die Proteine wurden für 2 h bei einem konstanten Strom von 0,8  $\text{mA}/\text{cm}^2$  Membranfläche auf die Membran transferiert.

Anode
3 Filterpapiere in Blotpuffer I
2 Filterpapiere in Blotpuffer II
Cellulosenitrat-Membran
Gel
4 Filterpapiere in Blotpuffer III
Kathode

Abb. 3.2: Schema des diskontinuierlichen Puffersystems für den ElektrobLOT von Proteinen aus dem Gel auf eine Cellulosenitrat-Membran.

#### BLOTPUFFER I

Tris	18,17 g	
Methanol	100 ml	
aqua deion.	ad 500 ml	pH 10,4

#### BLOTPUFFER II

Tris	1,15 g	
Methanol	100 ml	
aqua deion.	ad 500 ml	pH 10,4

#### BLOTPUFFER III

Tris	1,15 g	
Methanol	100 ml	
Aminocaprinsäure (Fa. Sigma)	0,66 g	
aqua deion.	ad 500 ml	pH 9,4

Nach dem ElektrobLOT wurden die Proteine auf der Membran für 5 min mit Ponceaux-Lösung reversibel rot gefärbt. Für die spätere Orientierung wurden die Molekulargewichtsmarker und

die Proteinspuren mit Bleistift markiert. Die Proteine wurden im Anschluss auf der Membran mit Hilfe der Antikörper gegen AmoA und AmoB immunologisch nachgewiesen.

#### PONCEAUX-FÄRBE LÖSUNG

Ponceaux S (Fa. Sigma)	1 g
Trichloressigsäure	15 g
aqua deion.	ad 500 ml

### 3.14.2 ELEKTROBLLOT MIT KONTINUIERLICHEM PUFFERSYSTEM

Die Proteine wurden mittels Elektrobplot auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Porengröße 0,2 µm, Fa. Schleicher & Schuell) übertragen (Madsudaira, 1987). Dazu wurde der unter Abschnitt 3.14.1 beschriebene Elektrobplot leicht abgewandelt. Für den Elektrobplot wurde ein kontinuierliches Puffersystem mit nur einem Blotpuffer verwendet.

#### BLOTPUFFER

CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure, Fa. Sigma)	1 g	
Methanol (100 %)	50 ml	
aqua deion.	ad 500 ml	pH 11,0

Vor dem Elektrobplot wurde das Gel 5 min in Blotpuffer gewaschen und die Membran mit Methanol angefeuchtet. Im Anschluss an den Elektrobplot wurde die Membran zweimal mit aqua deion. gewaschen und 1 bis 2 min mit 0,1 % Coomassie Blau R-250 in 50 % Methanol reversibel gefärbt. Die Proteinbanden wurden markiert, mit 10 % Essigsäure in 50 % Methanol entfärbt und mit aqua deion. gewaschen. Die Membran wurde getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.14.3 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS

Der Nachweis der AmoA und AmoB wurde stets in zwei getrennten Westernblots durchgeführt. AmoA oder AmoB wurden mit Hilfe der primären und sekundären Antikörper durch die Enzymreaktion einer alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Dieses Enzym war entweder direkt an die sekundären Antikörper gebunden oder indirekt über ein Biotin-Streptavidin-System mit den sekundären Antikörpern verbunden (Abb. 3.3a, b). Beim indirekten Westernblot ist die Sensitivität des Nachweises erhöht.

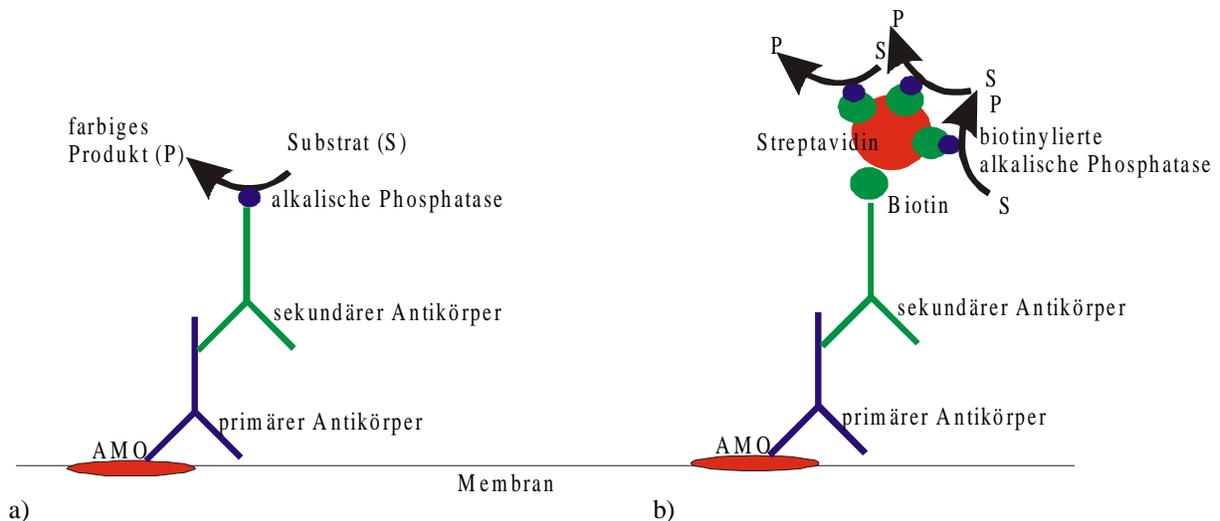


Abb. 3.3: a) Direkter Westernblot mit an sekundären Antikörpern gebundenem Enzym und b) indirekter Westernblot mit an Biotin gebundenem Enzym.

Die Membran wurde für 1,5 h in PBS-Puffer mit 1 % BSA geblockt. Alle Inkubationsschritte wurden in Petrischalen auf einem Schüttler durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den primären Antiseren über Nacht. Die Antikörper gegen AmoA wurden 1:16.000, die Antikörper gegen AmoB 1:32.000 mit Antikörperlösung verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 15 min folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Gegen die AmoA-Antikörper wurden Anti-Kaninchen-Immunglobuline des IgG-Typs und gegen die AmoB-Antikörper wurden Anti-Huhn-Immunglobuline des IgG-Typs eingesetzt. Beim direkten immunologischen Nachweis waren die sekundären Antikörper mit alkalischer Phosphatase (Fa. Sigma) gekoppelt (Abb. 3.3a). Sie wurden 1:10.000 mit Antikörperlösung verdünnt und 3,5 h mit der Membran inkubiert. Beim indirekten immunologischen Nachweis waren die sekundären Antikörper an Biotin (Fa. Biotrend) gekoppelt (Abb. 3.3b). Sie wurden 1:30.000 mit Antikörperlösung verdünnt und 1,5 h inkubiert. Darauf folgte eine weitere 1,5-stündige Inkubation mit 1:3.000 in Antikörperlösung verdünnter Streptavidin-biotinylierter, alkalischer Phosphatase (Fa. Sigma). Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde die Membran zweimal mit PBS-Puffer für 15 min gewaschen und danach zweimal für 5 min mit Substratpuffer gespült. Für die Farbreaktion wurden 20 ml Substratpuffer mit 100 µl einer 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat-Lösung (5 mg/ml Substratpuffer, Fa. Sigma) und 200 µl 4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Lösung (5 mg/ml Substratpuffer, Fa. Sigma) versetzt. Die Inkubation mit dem Substrat erfolgte bis ein deutliches violettes Signal auf der Membran auftrat. Die Reaktion wurde mit aqua deion. gestoppt.

## PBS-PUFFER

NaCl	8,0 g	
KCl	0,2 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g	
aqua deion.	ad 1000 ml	pH 7,4

## ANTIKÖRPERLÖSUNG

BSA (Fa. Sigma)	50 mg
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Fa. Sigma)	25 µl
PBS-Puffer	ad 100 ml

## SUBSTRATPUFFER

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5,3 g
MgCl <sub>2</sub>	0,8 g
aqua deion.	ad 1000 ml

**3.14.4 QUANTITATIVER NACHWEIS DER AMOA UND AMOB IM WESTERNBLOT**

Die Membranen wurden getrocknet und als Dia abfotografiert. Aufgrund besserer Ergebnisse wurden nicht die Membranen selbst, sondern das Dia mit einem Scanner (ScanMagic 9636S, Fa. Mustek) in einen Computer eingelesen. Mit einem Densitometerprogramm (Gelscan 1.0,  $\alpha$ -Version, Talkoswki, unveröffentlicht) ließen sich Profile zeichnen. Die Farbintensitäten der Banden waren proportional zu den Peakflächen. Durch die Integration der Peakflächen wurden die Proteine der Banden quantifiziert (Software Programm origin 4.0, Fa. Microcal). Für die Bestimmung des prozentualen Anteils von AmoA und AmoB am Gesamtprotein von *Nitrosomonas eutropha* N904 wurden Immunblots mit Gesamtprotein unterschiedlicher Proteinkonzentrationen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5.1). In den Untersuchungen wurden stets auch unterschiedliche Konzentrationen angereicherter AmoA bzw. isolierter AmoB als Standards mit auf die selbe Blotmembran aufgetragen. Mit Hilfe der AmoA- und AmoB-Proteine wurden Eichgeraden erstellt. Anhand der Eichgeraden wurde der prozentuale AmoA- und AmoB-Gehalt am Gesamtprotein bestimmt.

### **3.15 PERMEABILISIERUNG GANZER ZELLEN IN REINKULTUREN UND ANREICHERUNGSKULTUREN**

Damit die Antikörper bzw. die Oligonukleotidsonden in die Zellen gelangen konnten, mussten die Zellen zuvor permeabilisiert werden. Die Proben wurden 10 min bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ) und in etwa 100 µl 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen, so dass eine Zelldichte von ca.  $10^8$  bis  $10^9$  Zellen pro ml vorlag. Für die Fixierung und Permeabilisierung wurden die Proben 1:3 mit 4%iger Formaldehydlösung versetzt und für 1h auf Eis fixiert. Die Zellen wurden anschließend 10 min bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haemofuge-Haereus-Christ) und einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in PBS-Puffer aufgenommen, 1:1 mit  $-20\text{ °C}$  kaltem Ethanol versetzt und mindestens über Nacht bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Alternativ wurden Zellen direkt nach dem ersten Zentrifugieren unfixiert in PBS und Ethanol aufgenommen und eingefroren.

#### **4%IGE FORMALDEHYDLÖSUNG**

PBS-Puffer, $60\text{ °C}$ (siehe Abschnitt 3.14.3)	25 ml
Paraformaldehyd	1 g
NaOH (1 M)	20 µl

Das Paraformaldehyd wurde in den erwärmten PBS-Puffer gegeben und durch Erhöhung des pH-Wertes mit NaOH-Lösung gelöst. Danach wurde der pH-Wert mit HCl-Lösung auf 7,5 eingestellt.

### **3.16 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG GANZER ZELLEN**

Für eine optimale Immunfluoreszenz (IF)-Färbung der Zellen wurden für die jeweiligen polyklonalen Antikörper unterschiedliche Methoden verwendet. In beiden Fällen wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe von sekundären Antikörpern gewählt, da so eine Signalverstärkung erreicht werden konnte (Hock, 1996).

#### **3.16.1 IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOA**

Jeweils 3 µl der unfixierten Proben (siehe Abschnitt 3.15) wurden auf einen Objektträger (6 Reaktionsfelder, 8 mm, Fa. Paul Marienfeld) pipettiert und für wenige Minuten bei  $37\text{ °C}$  getrocknet. Danach folgte eine stufenweise Entwässerung der Zellen mit steigender Ethanolkonzentration (50, 80, 96 %) für je 3 min. Nach dem Trocknen der Objektträger mit

Druckluft wurden die Zellen mit Lysozym behandelt. Dazu wurden jeweils 10 µl Lysozymlösung (1 mg/ml in TE-Puffer) auf die Reaktionsfelder pipettiert und für 15 min in einer feuchten Kammer mit TE-Puffer inkubiert. Als feuchte Kammer diente ein 50-ml-PP-Röhrchen (Fa. Greiner) gefüllt mit einem Papiertuch, das mit 2 ml Flüssigkeit getränkt war. Nach der Permeabilisierung wurde der Objektträger kurz mit TE-Puffer gespült und zum Waschen 15 min in ein mit 50 ml TE-Puffer gefülltes Röhrchen gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mittels der Ethanolreihe entwässert. Die Proteine wurden mit Blocklösung (3 % BSA gelöst in PBS-Puffer) geblockt. Dazu wurden 10 µl der Blocklösung auf die Reaktionsfelder pipettiert und in einer feuchten Kammer mit PBS-Puffer für 30 min inkubiert. Überschüssige Blocklösung wurde mit aqua deion. abgespült und der Objektträger getrocknet. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern. Dazu wurden 10 µl der Antikörperlösung (siehe Abschnitt 3.14.3) auf die Reaktionsfelder pipettiert und jeweils 1 µl der AmoA-Antikörper zugefügt. Die Objektträger wurden über Nacht in einer feuchten Kammer mit PBS-Puffer inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit PBS-Puffer für 15 min abgewaschen. Nach Trocknung des Objektträgers erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern für 1 h in einer feuchten Kammer mit PBS-Puffer im Dunkeln. Es wurden 10 µl Antikörperverdünnungslösung mit 1 µl sekundärem Antikörper (1:10 verdünnt mit Antikörperlösung) auf die Reaktionsfelder pipettiert. Als sekundäre Antikörper wurden Anti-Kaninchen-Immunglobuline des IgG-Types eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 gekoppelt waren (Fa. Biotrend). Der Farbstoff Cy2 absorbiert blaues Licht (489 nm) und emittiert grünes Licht (505 nm). Die sekundären Antikörper wurden für 15 min mit PBS-Puffer vom Objektträger gewaschen, der anschließend getrocknet wurde. Im Anschluss an die IF-Färbung wurden die Zellen für 5 min mit DAPI (0,01 mg/ml, Fa. Sigma) gefärbt. DAPI ist ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit UV-Licht blau fluoresziert (Lin et al., 1977). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde zwischen Objektträger und Deckglas Citifluor AF1 (Fa. Plano GmbH) aufgetragen, welches das Ausbleichen der Proben verminderte und die Zellen intensiver fluoreszieren ließ.

#### TE-Puffer

Tris (100 mM)	12,1 g	
Na <sub>2</sub> -EDTA (Titriplex III, 5 mM)	1,46 g	
aqua deion.	ad 100 ml	pH 7,5

### 3.16.2 IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOB

Für die IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoB wurde die Methode der IF-Färbung mit AmoA-Antikörpern leicht abgewandelt (siehe Abschnitt 3.16.1). Für die Färbung wurden fixierte Zellen verwendet (siehe Abschnitt 3.15). Die Lysozymbehandlung entfiel. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte für 1 h. Als sekundäre Antikörper wurden Anti-

Huhn-Immunglobuline des IgG-Types eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt waren (Fa. Biotrend). Der Farbstoff Cy3 absorbiert grünes Licht (552 nm) und emittiert oranges Licht (565 nm).

### 3.16.3 GEKOPPELTE IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOA UND AMOB

Für die gleichzeitige Färbung der Zellen mit den Antikörpern gegen die AmoA und AmoB wurde die unter Abschnitt 3.16.1 beschriebenen Methode leicht verändert. Es wurden jeweils 1 µl primärer Antikörper gegen die AmoA und AmoB zu den 10 µl Antikörperlösung in ein Reaktionsfeld pipettiert und über Nacht inkubiert. Wie die primären Antikörper wurden die sekundären Antikörper gemeinsam in ein Reaktionsfeld pipettiert und 1 h inkubiert.

## 3.17 *IN SITU*-HYBRIDISIERUNG MIT FLUORESZENZMARKIERTEN OLIGONUKLEOTIDSONDEN

Für die *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (engl.: fluorescence *in situ* hybridisation = FISH) von Ammoniakoxidanten wurden drei verschiedene Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Sonde Nso190 detektiert alle getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien (Mobarry et al., 1996) mit Ausnahme von *Nitrosomonas oligotropha* Nm 45 und *Nitrosomonas ureae* Nm 10 (Purkhold et al., 2000). Die Sonde Nsv443 ist gegen *Nitrosolobus muliformis*, *Nitrosospira briensis* und *Nitrosovibrio tenuis* gerichtet (Mobarry et al., 1996; Purkhold et al., 2000). Die Sonde NEU wird zur Detektion der meisten getesteten Nitrosomonaden mit Ausnahme von *N. ureae* Nm 10, *N. communis* Nm 2 und *N. nitrosa* Nm 90 eingesetzt (Wagner et al., 1995; Purkhold et al., 2000). Alle Sonden sind gegen die 16S rRNA gerichtet und waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt. Bei Verwendung der Sonde NEU wurde der nichtmarkierte Kompetitor CTE verwendet (Schleifer et al., 1992).

Die Proben wurden mit Formaldehyd fixiert (siehe Abschnitt 3.15). Im Anschluss wurden die Proben wie für die IF-Färbung beschrieben auf die Objektträger aufgetragen und in einer Ethanolreihe entwässert (siehe Abschnitt 3.16.1). Danach wurden jeweils 8 µl Hybridisierungspuffer auf die Objektträger pipettiert und 1 µl Oligonukleotidsonde darin suspendiert. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer mit Hybridisierungspuffer bei 46 °C für 2 h. Anschließend wurden die Objektträger mit 50 ml Waschpuffer im PP-Röhrchen für 20 min bei 48 °C im Wasserbad gewaschen und anschließend getrocknet. Die DAPI-Färbung und die Vorbereitung der Objektträger für die mikroskopische Untersuchung erfolgte wie bei der IF-Färbung beschrieben (siehe Abschnitt 3.16.1).

## HYBRIDISIERUNGSPUFFER

NaCl (5 M)	360 µl	
Tris/HCl (1 M, pH 7,2)	40 µl	
Formamid (Nsv443)	600 µl	(30 %)
bzw. (Nso190 und NEU-CTE)	800 µl	(40 %)
aqua deion.	ad 2 ml	
SDS (10 %)	2 µl	

## WASCHPUFFER

NaCl (5 M) (Nsv443)	1020 µl
bzw. (Nso190 und NEU-CTE)	460 µl
Tris/HCl (1 M, pH 7,2)	1 ml
aqua deion.	ad 50 ml
SDS (10 %)	50 µl

**3.18 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN****3.18.1 ZELLZAHLBESTIMMUNG VON BAKTERIEN**

Die Gesamtzellzahl der Bakterien wurde im Lichtmikroskop mit einer Helber-Zählkammer bestimmt. Die Zählkammer besitzt ein Raster aus 16 Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Jedes Kleinquadrat hat eine Fläche von 0,0025 m<sup>2</sup> und eine Höhe von 0,02 mm. Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus:

$$\text{Zellzahl} \cdot \text{ml}^{-1} = \text{Zellzahl pro Kleinquadrat} \cdot 2 \cdot 10^7$$

Die Zählung erfolgte im Mikroskop (Fa. Leitz) bei 400facher Vergrößerung. Zur statistischen Absicherung wurden insgesamt 5 Großquadrate ausgezählt.

**3.18.2 EPIFLUORESZENZMIKROSKOPIE**

Die IF-Färbungen und die FISH wurden am Fluoreszenzmikroskop (DM IRBE, Fa. Leica) untersucht. Es wurde ein Neofluotar Objektiv 100x/1,4 Öl verwendet. Die Blaufluoreszenz der DAPI-Färbung wurde mit dem Filter Set A (BP 340-380 exc./RKP 400/LP 425 em., Fa. Leica), die Rotfluoreszenz der Cy3-gekoppelten Antikörper bzw. Oligonucleotidsonden wurde mit dem Filter Set N 2.1 (BP 515-560 exc./RKP 580/LP 590 em., Fa. Leica) und die Grünfluoreszenz der Cy2-gekoppelten Antikörper mit dem Filter Set I 3 (BP 450-490 exc./RKP 510/LP 515 em., Fa. Leica) visualisiert. Die fotografische Dokumentation der Färbungen erfolgte mit einer Spiegelreflexkamera (Fa. Nikon) mit Diafilmen (Fa. Fuji, 200 ASA).

### 3.18.3 KONFOKALE-LASER-RASTER-MIKROSKOPIE

Die IF-Färbung und die FISH wurden mit Hilfe des Konfokalen-Laser-Raster-Mikroskops (CLSM, Typ 4D, Fa. Leica) dokumentiert.

Die Rotfluoreszenz der Cy3-Färbung und die Grünfluoreszenz der Cy2-Färbung wurden getrennt auf zwei Kanälen gemessen. Die Anregung erfolgte mit dem Argon/Krypton-Laser (488/568nm). Die Fluoreszenz im Rotbereich wurde mit dem Langpass-Filter 590 nm, die Fluoreszenz im Grünbereich mit dem Bandpass-Filter 520-560 nm detektiert. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software SCANware 5.1 (Fa. Leica).

### 3.18.4 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen nach Spurr (1969) eingebettet. Sollten die Ultradünnschnitte nach der Einbettung immunocytochemisch mit Hilfe der Immungold (IG)-Markierung untersucht werden, so wurde eine Einbettung bei tiefen Temperaturen in Lowicryl<sup>®</sup> durchgeführt (Roth et al., 1983). Nach der Einbettung der Zellen wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Diese wurden anschließend negativ kontrastiert und im Transmissions-Elektronenmikroskop (Modell 420, Fa. Philips) untersucht.

#### 3.18.4.1 EINBETTUNG NACH SPURR

Die Proben wurden mit 2,5 % Glutaraldehyd in Arsenatpuffer (100 mM  $C_2H_6AsNaO_2 \cdot 3 H_2O$ ) für 2 h fixiert und danach dreimal mit Arsenatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden in 2 % Agar-Noble in Arsenatpuffer resuspendiert und in Würfel mit 2 mm Kantenlänge geschnitten. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C mit 2 % Osmiumtetroxid in Arsenatpuffer kontrastiert bzw. fixiert. Nach sechsmaligem Waschen mit Arsenatpuffer erfolgte eine stufenweise Entwässerung der Zellen mit steigender Acetonkonzentration (15, 30, 50, 70, 90, 100 %) für je 10 min bei 4 °C, gefolgt von zwei 10-minütigen Entwässerungsschritten mit 100 % Aceton bei Raumtemperatur. Die anschließende Einbettung nach Spurr (1969) wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Spurr/Aceton (100 %)	Inkubationszeit [h]
1/3	1
1/1	1
3/1	über Nacht
100 % Spurr	4

Die Proben wurden anschließend in Einbettungsformen aus Silikon gefüllt und mit Spurr überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für 24 h bei 70 °C.

## SPURR-EINBETTUNGSGEMISCH (LVG = LOW VISCOSITY-GEMISCH)

VCD (E.R.L. 4206, Vinylcyclohexendioxid)	5 g
D.E.R. 736 (Diglycidether)	3 g
NSA (Nonenyl-Bernsteinsäureanhydrid)	13 g
DMAE (S-1, Dimethylaminoethanol)	0,2 g

Zuerst wurde die VCD, D.E.R 736 und NSA gut vermischt, dann erst DMAE unter Rühren hinzugegeben.

**3.18.4.2 EINBETTUNG IN LOWICRYL<sup>®</sup> BEI TIEFEN TEMPERATUREN**

Die Einbettung erfolgte entweder in Lowicryl<sup>®</sup> K4M oder Lowicryl<sup>®</sup> HM20 (Fa. Lowi GmbH). Beides sind hoch vernetzende Acryl- und Methacrylverbindungen (Carlemalm et al., 1982). Bei der Einbettung in Lowicryl<sup>®</sup> K4M wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert. Die Lowicryl<sup>®</sup> HM20-Einbettung erfolgte dagegen mit unfixierten Zellen, die vor der Einbettung hochdruckgefroren wurden.

***LOWICRYL<sup>®</sup> K4M EINBETTUNG***

Die Proben wurden mit 2,5 % Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,5, siehe Abschnitt 3.14.3) 1 h auf Eis fixiert und anschließend dreimal mit Glycinlösung (10 mM, in PBS, pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden in 2 % Agar-Noble in Glycinlösung resuspendiert und in Würfel mit 2 mm Kantenlänge geschnitten. Danach wurden die Proben über Nacht bei 4 °C in Glycinlösung aufbewahrt. Es folgte eine stufenweise Entwässerung der Zellen mit steigender Ethanolkonzentration und abnehmender Temperatur nach folgendem Schema.

Ethanol [%]	Inkubationszeit [min]	Temperatur [°C]
15	15	4
30	15	0 bis -5
30	15	-5 bis -15
50	30	-15
50	30	-25
70	60	-35
90	60	-35
96	60	-35
96	60	-35

Die Temperaturen wurden mit Eis und NaCl sowie mit Trockeneis konstant gehalten. Die anschließende Einbettung erfolgte weiterhin bei -35 °C, sie wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt.

Lowicryl <sup>®</sup> K4M/Ethanol (96 %)	Inkubationszeit [h]
1/2	1
1/1	1
3/1	1
100 % Lowicryl <sup>®</sup> K4M	1
100 % Lowicryl <sup>®</sup> K4M	über Nacht
100 % Lowicryl <sup>®</sup> K4M	2

Die Proben wurden anschließend in vorgekühlte Einbettungskapseln aus Gelatine gefüllt und mit Lowicryl<sup>®</sup> K4M überschichtet. Die Polymerisation erfolgte unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 360 nm für 36 h bei - 35 °C und weitere 24 h bei Raumtemperatur.

LOWICRYL<sup>®</sup> K4M (Fa. Lowi GmbH)

Crosslinker	2,7 g
Monomer	17,3 g
Initiator	0,1 g

Zuerst wurde der Crosslinker und das Monomer gut vermischt, dann erst der Initiator unter Rühren hinzugegeben.

#### **LOWICRYL<sup>®</sup> HM20 EINBETTUNG**

Alternativ wurde eine Lowicryl<sup>®</sup> HM20 Einbettung von Dr. H. Hohenberg der elektronenmikroskopischen Abteilung des Heinrich Pette Instituts (Universitätsklinik Hamburg) durchgeführt. Vor der Einbettung wurden die Zellen mit Hilfe einer Hochdruckgefriermaschine (HPM 010, Fa. Bal-Tec) auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff (ca. -210 °C) eingefroren. Dabei wurde ein Druck von 2 kbar angewandt. Im Anschluss wurden die Zellen mit steigender Acetonkonzentrationen in Gegenwart von Uranylacetat bei niedrigen Temperaturen um -50 °C entwässert. Anschließend wurden die Zellen in der Kälte in Lowicryl<sup>®</sup> HM20 eingebettet.

#### **3.18.4.3 HERSTELLUNG VON ULTRADÜNNSSCHNITTEN UND NACHKONTRASTIERUNG**

Die Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (OmU2, Fa. Reichert-Jung) und eines Diamantmessers (Fa. Diatomee) hergestellt. Die ca. 50 nm dicken Schnitte wurden mit Movital (Polyvinylformaldehyd in 0,25 % Chloroform) befilmten Kupfer- oder Nickelnetzchen (300 mesh) aufgenommen. Nickelnetzchen wurden verwendet, wenn die Ultradünnschnitte nach der Einbettung immunocytochemisch mit Hilfe der Immungold (IG)-Markierung untersucht werden sollten (siehe Abschnitt 3.19). Die Schnitte wurden nach Herstellung der Ultradünnschnitte bzw. nach der IG-Markierung 7 min mit 5 % Uranylacetat in Methanol (Watson, 1958) und 10 min mit 2 % Bleicitrat (Reynolds, 1963) nachkontrastiert.

### **3.18.4.4 NEGATIVKONTRASTIERUNG DER AMMONIAKMONOOXYGENASE**

Die gereinigte AMO wurde nach der Immungold-Markierung negativkontrastiert. Dazu wurde die AMO 15 min mit einer in Methanol gesättigten Uranylacetatlösung inkubiert (Valentine et al., 1968 modifiziert nach Beuscher, 1974). Zur Bestimmung der Größe des Enzyms wurde der Durchmesser von rund 100 Enzympartikeln vermessen und die gemessenen Werte gemittelt.

### **3.19 IMMUNCYTOCHEMISCHER NACHWEIS DER AMOA UND AMOB MIT HILFE DER IMMUNGOLDMARKIERUNG**

Für den immuncytochemischen Nachweis von AmoA und AmoB in den Zellen der Ammoniakoxidanten wurde eine Immungold (IG)-Markierung an Ultradünnschnitten der Zellen durchgeführt. Die Einbettung der Zellen erfolgte zuvor in Lowicryl<sup>®</sup> bei Temperaturen von -35 bis -50 °C (siehe Abschnitt 3.18.4.2). Die IG-Markierung nach der Einbettung und Herstellung von Ultradünnschnitten bezeichnet man als „post-embedding labeling“.

Die gereinigte native AMO wurde ebenfalls mittels IG-Markierung nachgewiesen. Dazu wurde ein Tropfen der AMO-Fraktion entnommen und auf ein Kupfernetzchen pipettiert. Der Tropfen wurde 5 min inkubiert, so dass die Proteine an die Netzchen binden konnten. Anschließend wurde der Tropfen mit Filterpapier entfernt. Danach wurde die IG-Markierung durchgeführt, an die sich eine Negativkontrastierung anschloss (siehe Abschnitt 3.18.4.4).

Für die IG-Markierung wurden 100 µl 0,05 M Glycin (in PBS-Puffer) auf Parafilm<sup>®</sup> pipettiert. Die Nickelnetzchen wurden auf diese Tropfen gelegt und für 15 min inkubiert. Danach wurde das Netzchen rückseitig mit Filterpapier getrocknet und anschließend dreimal für 5 min nach dem gleichen Verfahren mit Inkubationspuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Netzchen mit den primären Antikörpern gegen die AmoA oder AmoB inkubiert. Es wurden verschiedenen Verdünnungen (von 1:50 bis zu 1:1250 in Inkubationspuffer) und Inkubationszeiten (von 1 h bis über Nacht) der primären Antikörper getestet. Die AmoB-Antikörper wurden 1:1250 in Inkubationspuffer verdünnt und für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte sechsmal 5 min in Inkubationspuffer gewaschen. Darauf folgte eine 1,5-stündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Diese wurden 1:30 in Inkubationspuffer verdünnt. Gegen die AmoA-Antikörper wurden Anti-Kaninchen-Immunglobuline des IgG-Types eingesetzt, die mit 10,7 nm großen Goldpartikeln gekoppelt waren (Fa. Biotrend). Gegen die AmoB-Antikörper wurden Anti-Huhn-Immunglobuline des IgG-Types gekoppelt mit 9,7 nm großen Goldpartikeln eingesetzt (Fa. Biotrend). Nach der Inkubation erfolgten sechs Waschstreps in Inkubationspuffer, zwei in PBS-Puffer und drei in aqua deion. für jeweils 5 min. Im Anschluss wurden die Schnitte auf den Netzchen nachkontrastiert (siehe Abschnitt 3.18.4.3)

**INKUBATIONSPUFFER**

BSA (Fa. Sigma)	0,1 g	
Gelatine	0,02 g	
PBS-Puffer (siehe Abschnitt 3.14.3)	ad 20 ml	pH 7,6

**3.20 ISOLIERUNG DER AMMONIAKMONOOXYGENASE**

Die Ammoniakmonooxygenase (AMO) wurde mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie angereichert und mit der anschließenden Gradientenzentrifugation gereinigt.

**3.20.1 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE**

In der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer Nettoladung getrennt. In der anionischen Ionenaustauschchromatographie binden negativ geladene Proteine an eine positiv geladene Matrix. Positiv geladene Proteine können die Säule passieren. Die an die Säule gebundenen negativ geladenen Proteine werden im Anschluss mit Hilfe eines NaCl-Salzgradienten eluiert. Dabei konkurrieren die negativen Chloridionen mit den negativ geladenen Gruppen des Proteins um die Bindungsstellen an der Säule. Proteine mit geringer negativer Ladungsdichte verlassen die Säule zuerst. Die Ladung der Proteine ist abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Bei einem pH-Wert größer dem pI sind Proteine negativ, bei einem pH-Wert kleiner dem pI positiv geladen.

Die Isolierung der AMO erfolgte über eine anionische Ionenaustauschchromatographie. Als Trägermatrix wurde positiv geladene Diethylaminoethylagarose (DEAE-Sepharose) verwendet. Zur Isolierung der AMO wurde die von McTavish et al. (1993 a) entwickelte Methode leicht abgewandelt. Der pH-Wert und die Salzkonzentration der Pufferlösung wurden derart gewählt, dass die AMO nicht an die positiv geladene Säule bindet und so von den übrigen Proteinen abgetrennt werden konnte.

**PROBENVORBEREITUNG**

Es wurden 1 g Zellen in 5 ml Probenpuffer aufgenommen und mit 250 µl Proteaseinhibitor (Proteaseinhibitorcocktail ohne Metalchelatoren P8849, Fa. Sigma) versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe der French Pressure Cell Press (siehe Abschnitt 3.5.1). Der Rohextrakt wurde mit 5 mg DNase I (Fa. Sigma) versetzt und mit Probenpuffer auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Membranproteine durch Zugabe von 11,5 ml 20%iger Triton-X-100-Lösung bzw. 6%iger Dodecyl-β-D-maltosid-Lösung durch 15-minütige Inkubation auf Eis in Lösung gebracht. Unlösliche Membranproteine und Zelltrümmer

wurden durch Zentrifugation bei 4 °C 10 min bei 25.000 g (Kontron-Hermele-Centrikon H-401, Rotor A8.24) niedergeschlagen. Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen.

#### PROBENPUFFER (50 mM)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	17,90 g
aqua deion.	ad 1000 ml

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6,89 g
aqua deion.	ad 1000 ml

Beide Lösungen wurden derart gemischt, dass sich ein pH-Wert von 7,5 einstellte.

#### SÄULENCHROMATOGRAPHIE

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Vor dem Auftragen der Probe auf die Säule (HiPrep® 16/10 DEAE, 1,6 · 10 cm, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) wurde diese mit 100 ml Startpuffer, 100 ml Elutionspuffer und erneut mit 100 ml Startpuffer gewaschen. Das Auftragen der Puffer erfolgte mit Hilfe einer Pumpe (MS-Reglo, Fa. IsomaTec), die der Säule vorgeschaltet war. Die Geschwindigkeit der Pumpe wurde auf 5 ml/min eingestellt. Im Anschluss wurde die Probe mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die nichtbindenden Proteine wurden mit Hilfe eines nachgeschalteten Fraktionssammlers (Microcol TDC 80, Fa. Gilson) in 1-ml-Fractionen gesammelt. Nachdem die Probe vollständig auf die Säule aufgetragen wurde, wurde die Säule mit 30 ml Startpuffer nachgespült und das Eluat weiter fraktioniert. Im Anschluss erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Hilfe eines Salzgradienten. Hierzu wurden 100 ml Startpuffer und 100 ml Elutionspuffer in einem Gradientenmischer der Säule vorgeschaltet und die eluierten Proteine fraktioniert.

#### STARTPUFFER (37,6 mM)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	13,47 g
aqua deion.	ad 1000 ml

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	5,19 g
aqua deion.	ad 1000 ml

Beide Lösungen wurden derart gemischt, dass sich ein pH-Wert von 7,5 einstellte. Im Anschluss wurden der Lösung 5 ml 20%ige Triton-X-100-Lösung bzw. 10%ige Dodecyl-β-D-maltosid-Lösung pro Liter zugegeben.

**ELUTIONSPUFFER (37,6 mM)**

NaCl (1 M)	58,44 g
Startpuffer	ad 1000 ml

Die Säulenchromatographie erfolgte in einigen Versuchen unter Ausschluss von Luftsauerstoff in der anaeroben Werkbank (Glovebox MK3, Fa. DWS Laborgeräte GmbH) bei Raumtemperatur in Gegenwart eines Stickstoff-Kohlendioxidgemisches (0,03 % CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, Fa. Messer-Griesheim).

Im Anschluss wurde die Säule mit 100 ml aqua deion., 40 ml 2 M NaCl und 20 ml Startpuffer gewaschen und bis zum nächsten Einsatz bei 4 °C in Startpuffer gelagert. Nach etwa 10 Einsätzen wurde die Säule mit 80 ml 2 M NaCl, 50 ml aqua deion., 80 ml 1 M NaOH, 80 ml 70 % Ethanol und 60 ml aqua deion. regeneriert. Das 70%ige Ethanol wurde in Form eines Gradienten mit aqua deion. aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert.

**3.20.2 GRADIENTENZENTRIFUGATION**

Um die angereicherte AMO zu reinigen, wurde im Anschluss an die Säulenchromatographie eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden 800 µl der Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration der angereicherten AMO auf einen linearen Saccharosegradienten (3,2 ml, 10 bis 35 % Saccharose in Startpuffer (siehe Abschnitt 3.20.1)) gegeben. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1,8 mg/ml eingesetzt. Die angereicherte AMO wurde gegebenenfalls durch Gefriertrocknung aufkonzentriert (Freezemobile 12, Fa. Virtis). Der Gradient wurde bei 4 °C für 19 h bei 120.000 g zentrifugiert (Zentrifuge: Beckman L8-M Ultrazentrifuge, Rotor: SW 60 Ti). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient mit einer Pipette in 500-µl-Fractionen aufgeteilt und der Niederschlag in Startpuffer resuspendiert.

**3.21 BESTIMMUNG DER AMMONIAKOXIDATIONSAKTIVITÄT**

Es wurde die Ammoniakoxidationsaktivität von ganzen Zellen, von zellfreien Extrakten und von angereicherte AMO von *Nitrosomonas eutropha* N904 bestimmt. Es wurden stets Zellen der logarithmischen Wachstumsphase für die Versuche eingesetzt.

Für die Bestimmung der Ammoniakoxidationsaktivität ganzer Zellen und zellfreier Extrakte wurden Zellen abgeerntet und 1 bis 2 g Zellen in 3 ml PS1-Puffer (siehe Abschnitt 3.4) aufgenommen. Die Zellen wurden mit 250 µl Proteaseinhibitor pro g Zellen (Proteaseinhibitorcocktail ohne Metalchelatoren P8849, Fa. Sigma) versetzt. Ein Teil der Zellsuspension wurde auf eine Zellzahl von 1 bis 3 · 10<sup>8</sup> Zellen/ml für den aeroben

Aktivitätstest bzw.  $8 \cdot 10^9$  Zellen/ml für den anaeroben Aktivitätstest ganzer Zellen eingestellt. Die restlichen Zellen wurden zur Herstellung zellfreier Extrakte in der Regel aerob aufgeschlossen (siehe Abschnitt 3.5.1). In einigen Fällen erfolgte der Aufschluss anaerob (siehe Abschnitt 3.5.3). Die zellfreien Extrakte wurden auf eine Proteinkonzentration von 1,5 bis 3 mg/ml PS1-Puffer eingestellt. Im Anschluss wurden zu den ganzen Zellen und dem Rohextrakt jeweils 5 mM NADH (Fa. Fluka) und 10 mg/ml BSA (Fa. Sigma) zugefügt und der Aktivitätstest durch Überführung der Proben in die Reaktionsgefäße gestartet.

Es wurden aerobe und anaerobe Aktivitätstests durchgeführt bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Der aerobe Aktivitätstest erfolgte in unverschlossenen 5-ml-Glasampullen in Gegenwart von Luftsauerstoff. Der anaerobe Aktivitätstest erfolgte ebenfalls in 5-ml-Glasampullen, die jedoch in einer gasdicht verschlossenen 250-ml-Schraubdeckelflasche fixiert waren. Die Flasche wurde über eine Gummimembran mit einem Fluss von 80 ml/min 25 ppm  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  (in Stickstoff 5.0, Fa. Messer-Griesheim) durchspült. Das Einfüllen der Proben in die Reaktionsgefäße und die Probenentnahme erfolgte mit Hilfe von Spritzen und Kanülen über die Gummimembran.

Jeweils 3 ml Probe wurden in die 5-ml-Glasampullen überführt. Mit Magnetrührstäbchen wurde für eine ausreichende Durchmischung und Gasversorgung der Proben gesorgt. Als Kontrolle diente gleichbehandelter, zellfreier PS1-Puffer. Über einen Zeitraum von 4 bis 5 h wurden alle 30 min 300- $\mu\text{l}$ -Proben entnommen, eingefroren und später die Ammonium- und Nitrit- bzw. Hydroxylaminkonzentrationen bestimmt. Bei der Bestimmung der anaeroben Aktivität ganzer Zellen erfolgte die Probenentnahme über einen Zeitraum von 80 h.

Zur Bestimmung der Ammoniakoxidationsaktivität der angereicherten AMO wurden die Fraktionen 20 bis 40 aus der Säulenchromatographie gemeinsam gesammelt (siehe Abschnitt 3.20.1) und für den Aktivitätstest verwendet. Für den Aktivitätstest wurden Proteinkonzentrationen der AMO von 1,2 bis 2,6 mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe von 20 mM Ammoniumchloridlösung, 300  $\mu\text{M}$  Kupfersulfatlösung, 5 mM NADH und 10 mg/ml BSA wurden jeweils 3 ml der angereicherten AMO in die Reaktionsgefäße des aeroben und anaeroben Aktivitätstests überführt. In einigen Versuchen wurden die Ansätze mit den genannten Zusätzen jedoch ohne Ammonium 10 min auf Eis inkubiert, bevor der Aktivitätstest durch die Zugabe von Ammonium gestartet wurde (siehe Abschnitt 4.13.3).

Die spezifische Ammoniakoxidationsaktivität wurde direkt über den Ammoniumverbrauch und/oder indirekt über die Hydroxylaminbildung und/oder Nitritbildung der Zellen, zellfreier Extrakte bzw. angereicherter AMO bestimmt. Die spezifische Aktivität (a) ist die Stoffmenge (n) an Substrat bzw. Produkt, die bezogen auf eine definierte Proteinmenge (m) in einem bestimmten Zeitintervall ( $\Delta t$ ) verbraucht bzw. gebildet wird.

$$a \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \times \text{h}} \right] = \frac{n [\mu\text{mol}]}{m [\text{g}] \times \Delta t [\text{h}]}$$

### **3.22 ABSORPTIONSSPEKTRUM DER AMMONIAKMONOOXYGENASE**

Von der gereinigten AMO wurde ein Absorptionsspektrum unter reduzierenden Bedingungen aufgenommen. Als Reduktionsmittel wurde Na-Dithionit eingesetzt. Es wurden 1 mg/ml AMO mit 10  $\mu$ l 1 M Na-dithionitlösung versetzt und in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke gegeben. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Wellenlängenbereich von 280 bis 650 nm mit einem Doppelstrahlphotometer (Multipurpose recording Spectrophotometer MPS-2000, Fa. Shimadzu) aufgenommen und mit einem Drucker (Graphic printer PR-3, Fa. Shimadzu) aufgezeichnet. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur und einem neutralen pH-Wert. Als Referenz diente eine zweite mit Puffer gefüllte Küvette.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ISOLIERUNG DER UNTEREINHEITEN DER AMMONIAKMONOOXYGENASE

Nach Auftrennung des Gesamtproteins von *Nitrosomonas eutropha* N904 mit Hilfe der SDS-PAGE waren zwei Hauptproteinbanden, ein 27-kDa-Protein und ein 41-kDa-Protein, deutlich zu erkennen (Abb. 4.1a, b). McTavish et al. (1993 a) postulierte, dass diese Proteine die A- bzw. B-Untereinheiten der Ammoniakmonooxygenase (AMO) sind. Die Proteine wurden als AmoA- bzw. AmoB-Protein bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dem Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 das AmoA-Protein angereichert und das AmoB-Protein isoliert.

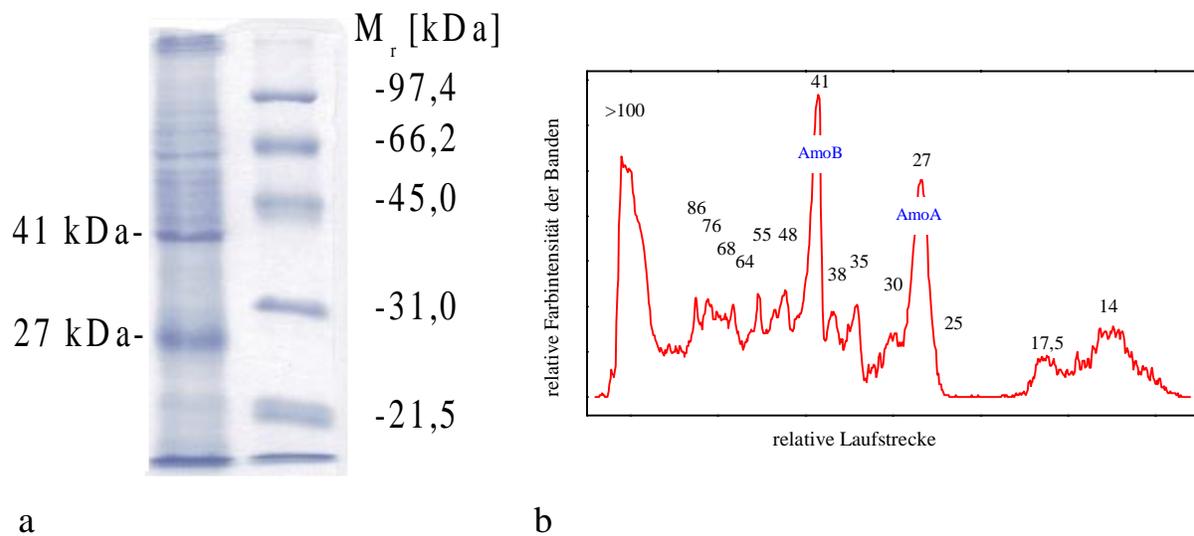


Abb. 4.1: a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12 %-Polyacrylamid) des Gesamtproteins von *N. eutropha* N904 in der linken Spur. Es wurden 15 µg Protein aufgetragen. In der rechten Spur sind Molekulargewichtsstandards dargestellt.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa. b) Densitogramm eines SDS-Gels mit dem Gesamtprotein von *N. eutropha* N904. Die Peakflächen im Densitogramm sind der Intensität der Bandenfärbung proportional. Die Zahlen geben die relativen Molekülmassen der Banden in kDa wieder.

#### 4.1.1 ANREICHERUNG DES AMOA-PROTEINS

Zur Isolierung des AmoA-Proteins aus *N. eutropha* N904 wurde das Gesamtprotein elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.11.1). Im Anschluss wurde das Protein der 27-kDa-Bande N-terminal sequenziert (siehe Abschnitt 3.8). Es wurde die Sequenz der ersten 24 Aminosäuren bestimmt. Pro Edman-Zyklus der Sequenzierung wurden zwei bis drei verschiedene Aminosäuren unterschiedlich hoher Konzentration abgespalten. Die 27-kDa-Bande des SDS-Gels bestand somit aus mindestens zwei Proteinen. Aus den Aminosäuren, die mit höchster Konzentration pro Edman-Zyklus abgespalten

wurden, konnte die Aminosäure (AS)-Sequenz <sup>1</sup>SIFRTEFILKAAKMPHEAVHMSRL<sup>24</sup> abgeleitet werden. Diese Sequenz wurde mit der AS-Sequenz des AmoA-Proteins von *N. eutropha* Nm 57 verglichen. Hierfür wurde die AS-Sequenz der AmoA aus den Gensequenzen abgeleitet. An dieser Stelle sei erwähnt, dass das AmoA-Protein in *N. eutropha* Nm 57 durch zwei fast identische Gene kodiert wird (*amoA1* und *amoA2*, GenBank Nummern U51630 und U72670). Ein Vergleich mit der AS-Sequenz des AmoA-Proteins von *N. eutropha* N904 war nicht möglich, da diese Gensequenzen nicht vorlagen. Das N-terminale Ende des Proteins, welches in der 27-kDa-Bande von *N. eutropha* N904 in höchster Konzentration vorkam, zeigte in diesem Abschnitt 96 % (23/24) AS-Sequenzähnlichkeit zu der Sequenz des AmoA-Proteins von *N. eutropha* Nm 57. Es wurde somit als AmoA-Protein identifiziert. Aus einem Teil der übrigen Aminosäuren des Edman-Abbaus wurde die Sequenz <sup>3</sup>DAPFE<sup>7</sup> abgeleitet. Homologieuntersuchungen mit Hilfe von Proteindatenbanken (siehe Abschnitt 3.8) zeigten, dass diese Sequenz mit der AS-Sequenz des Cytochrom c<sub>554</sub>-Vorläuferproteins von *Nitrosomonas europaea* übereinstimmt (abgeleitet aus der Gensequenz, GenBank Nummer O57142).

Für die weitere Reinigung des AmoA-Proteins wurden die Proteine der 27-kDa-Bande aus dem SDS-Gel eluiert (siehe Abschnitt 3.7) und anschließend von der Firma ChromaTec GmbH (Greifswald) über eine „reversed-phase“-HPLC aufgetrennt. Im Eluat wurde das AmoA-Protein mit Hilfe der Sequenzierung identifiziert. Anhand des Elutionsprofils der HPCL wurde deutlich, dass das AmoA-Protein in hoher Konzentration im Eluat vorhanden war (Abb. 4.2). Etwa 94 % der eluierten Proteine wurden als AmoA-Protein identifiziert. Mit dieser Methode war jedoch keine vollständige Reinigung der AmoA möglich.

Das angereicherte AmoA-Protein wurde für die Bestimmung des AmoA-Gehaltes am Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 mit Hilfe des quantitativen Immunblots verwendet (siehe Abschnitt 4.5.1).

Eine Reinigung der AmoA aus dem Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 war auch mit anderen Methoden wie z. B. der fraktionierten Zentrifugation oder Gradientenzentrifugation und anschließender SDS-PAGE oder nativer Gelelektrophorese nicht möglich (nicht dargestellt).

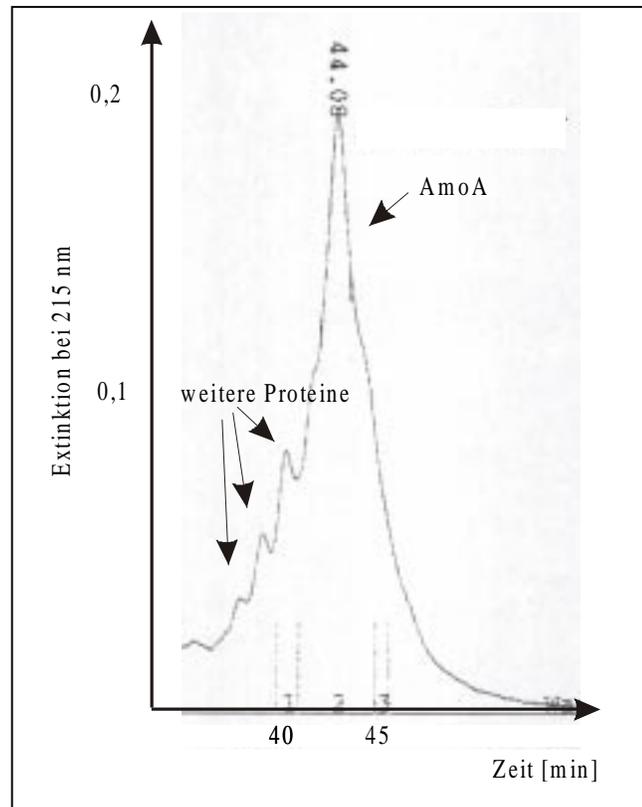


Abb. 4.2: Auftrennung der Proteine der 27-kDa-Bande über reversed-phase HPLC. Es wurden 6 µg Protein auf die Säule aufgetragen. Die 27-kDa-Bande wurde zuvor nach Auftrennung des Gesamtproteins von *N. eutropha* N904 über eine SDS-PAGE aus dem Gel isoliert. Der Peak der AmoA wurde durch Sequenzierung des Proteins identifiziert.

#### 4.1.2 ISOLIERUNG DES AMOB-PROTEINS

Die Isolierung des 41 kDa großen AmoB-Proteins erfolgte analog der Anreicherung des AmoA-Proteins. Dazu wurde das Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein der 41-kDa-Bande N-terminal sequenziert (siehe Abschnitt 3.8). Es wurde die Sequenz der ersten 24 Aminosäuren bestimmt (Abb. 4.3a). Die AS-Sequenz des 41-kDa-Proteins von *N. eutropha* N904 wurde mit den AS-Sequenzen der AmoB-Proteine von *N. eutropha* Nm 57 verglichen (Abb. 4.3b, c). Die AS-Sequenzen des AmoB-Proteine von *N. eutropha* Nm 57 wurden aus den Gensequenzen der *amoB*-Gene abgeleitet, die wie das *amoA*-Gen im Genom in zwei fast identischen Kopien vorhanden sind (*amoB1* und *amoB2*, GenBank Nummern U51630 und U72670).

Pro Edmanzyklus wurde nur eine Aminosäure abgespalten. In der 41-kDa-Bande befand sich demnach nur ein Protein. Das N-terminale Ende des isolierten 41-kDa-Proteins von *N. eutropha* N904 zeigte 82 % (18/22) Sequenzähnlichkeit zu den Aminosäuren 41 bis 62 beider AmoB-Proteine von *N. eutropha* Nm 57. Das N-terminale Ende des isolierten 41-kDa-Proteins war somit 38 Aminosäuren kürzer als das N-terminale Ende der abgeleiteten AmoB-Proteine. Unterschiede zwischen der Sequenz des 41-kDa-Proteins und der AmoB-Proteine wurden meist durch die Aminosäure Glycin (G) im 41-kDa-Protein hervorgerufen. Die AS-

Sequenzen von AmoB1 und AmoB2 von *N. eutropha* Nm 57 unterscheiden sich nur in der 43. und 47. Aminosäure. Die AS-Sequenz des 41-kDa-Proteins von *N. eutropha* N904 stimmt mit der Aminosäure 43 und 47 einer der beiden AmoB-Proteine von *N. eutropha* Nm 57 überein. Aufgrund der hohen Übereinstimmung des 41-kDa-Proteins von *N. eutropha* N904 mit dem AmoB-Protein von *N. eutropha* Nm 57 wurde das 41-kDa-Protein als AmoB-Protein identifiziert. Das AmoB-Protein wurde mittels Elektroelution aus dem Gel eluiert und aufkonzentriert (siehe Abschnitt 3.7). Im Anschluss wurde das reine AmoB-Protein dazu verwendet polyklonale Antikörper des IgG-Typs herzustellen (siehe Abschnitt 3.10, 4.2).

<b>a</b>	3	E R S Q E P F L R M — G V Q G Y D V K K G P	24
<b>b</b>	41	• • P • • • • • • R T • • W • • • • W • •	62
<b>c</b>	41	• • • • • S • • • R T • • W • • • • W • •	62

Abb. 4.3: Vergleich der AS-Sequenz des isolierten 41-kDa-Proteins von *N. eutropha* N904 (a) mit den aus den zwei *amoB* Genen abgeleiteten AS-Sequenzen der beiden AmoB-Proteine von *N. eutropha* Nm 57: AmoB1 (b) und AmoB2 (c). Punkte kennzeichnen die Übereinstimmung mit der AS-Sequenz des aus *N. eutropha* N904 isolierten 41-kDa-Proteins. Der Strich kennzeichnet eine Lücke in der Sequenz.

## 4.2 HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN DIE UNTEREINHEITEN DER AMMONIAKMONOOXYGENASE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen die A- und B-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha* hergestellt. Die Herstellung des AmoA-Antiserums erfolgte mit Hilfe eines synthetischen 15 Aminosäuren langen Oligopeptids der AmoA (siehe Abschnitt 3.9). Dazu wurden die 15 N-terminalen Aminosäuren aus den Gensequenzen der *amoA*-Gene von *N. eutropha* Nm 57 abgeleitet (*amoA1* und *amoA2*, GenBank Nummern U51630 und U72670). Im Anschluss wurden die 15 Aminosäuren <sup>1</sup>MSIFRTEEILKAAKM<sup>15</sup> an ein eukaryotisches Protein gekoppelt und zur Immunisierung in Kaninchen verwendet (siehe Abschnitt 3.10). Im Gegensatz zur Herstellung der AmoA-Antikörper, wurde das AmoB-Antiserum mit Hilfe des isolierten AmoB-Proteins aus *N. eutropha* N904 hergestellt. Das reine AmoB-Protein wurde dazu in Hühner injiziert (siehe Abschnitt 3.10).

### 4.3 ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG DER VERWENDUNG DER ANTIKÖRPER

Zur besseren Übersicht sind die Untersuchungen, die in den folgenden Abschnitten mit Hilfe der Antikörper gegen die AmoA und die AmoB durchgeführt wurden, in einem Flussdiagramm aufgezeichnet (Abb. 4.4). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basierten auf der Herstellung der Antikörper gegen die Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha*.

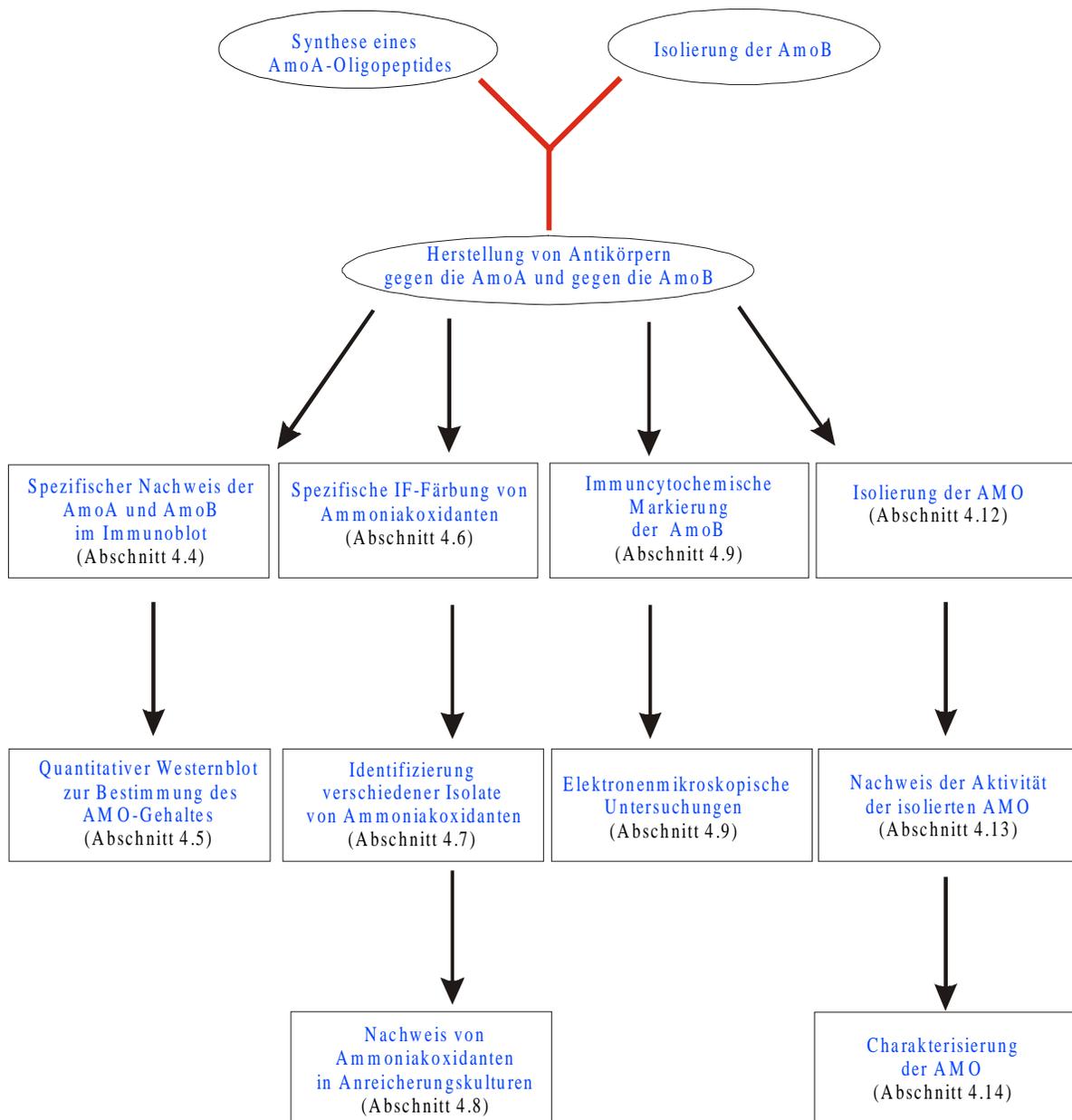


Abb. 4.4: Schematische Darstellung in Form eines Flussdiagrammes der im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die auf dem Einsatz von Antikörpern gegen die AMO von *N. eutropha* beruhen.

#### 4.4 SPEZIFITÄT DER ANTIKÖRPER IM IMMUNBLOT

Die Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen die AmoA und die AmoB wurde mit Hilfe des Westernblots untersucht. Dazu wurden die Antikörper an verschiedenen Arten der fünf Gattungen der Ammoniakoxidanten *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus* getestet. Darüber hinaus wurde die Spezifität der Antikörper unter anderem an Methanoxidanten, Nitritoxidanten und weit verbreiteten Bodenbakterien überprüft.

##### 4.4.1 UNTERSUCHUNGEN DER GATTUNG *NITROSOMONAS* UND *NITROSOCOCCUS MOBILIS*

Es wurde die Spezifität der Antikörper in Zellextrakten von Vertretern der Gattung *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus mobilis* untersucht. Dabei wurden alle zehn beschriebenen Arten von *Nitrosomonas* getestet: *N. aestuarii* Nm 36, *N. communis* Nm 2, *N. cryotolerans* Nm 55, *N. europaea* Freitag, *N. eutropha* N904, *N. eutropha* Dave, *N. halophila* Nm 1, *N. marina* Nm 22, *N. nitrosa* Nm 90, *N. oligotropha* Nm 45, *N. ureae* Nm 10 und *N. spec.* R1.24. Da die Art *Nitrosococcus mobilis* phylogenetisch eng verwandt ist mit der Gattung *Nitrosomonas* (Head et al., 1993), wird sie in diesem Abschnitt mit aufgeführt. Bei allen untersuchten Arten war das AmoA- und AmoB-Protein im Gesamtprotein in hohen Konzentrationen vorhanden und trat in etwa im gleichen Verhältnis auf (Abb. 4.5a).

##### AMOA-ANTI-KÖRPER

Die Antikörper gegen die AmoA reagierten im Westernblot nach Auftragung des Gesamtproteins von *Nitrosomonas eutropha* N904 nur mit dem 27 kDa großen AmoA-Protein (Abb. 4.5b, Spur 5, 11, 12). Andere Proteine wurden nicht markiert.

Weiterhin detektierten die AmoA-Antikörper die 27 kDa großen AmoA-Proteine der halotoleranten und halophilen Arten *N. eutropha* Dave, *N. europaea* Freitag und *N. halophila* Nm 1 sowie der marinen Art *N. aestuarii* Nm 36 (Abb. 4.5b, Spur 1 bis 4). In allen weiteren Arten von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 wurde mit den AmoA-Antikörpern kein Protein markiert (Abb. 4.5b, Spur 6 bis 10, 13 bis 15).

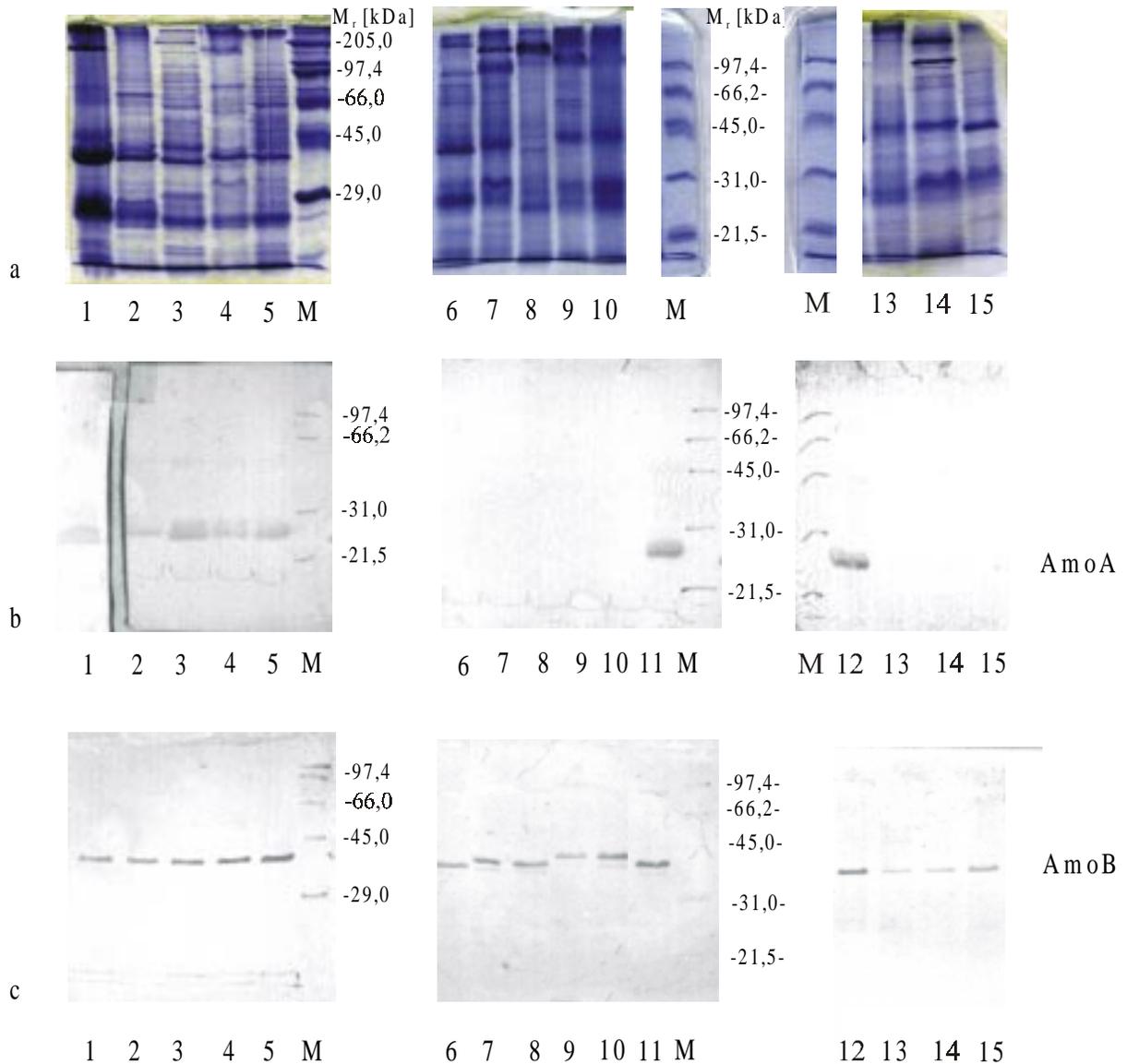


Abb. 4.5: a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12 % Polyacrylamid) der Gesamtproteine aller beschriebenen Arten von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus mobilis*. b) Westernblot mit AmoA-Antikörpern und c) mit AmoB-Antikörpern nach Auftrennung des Gesamtproteins im SDS-Gel. Spur 1: *N. aestuarii* Nm 36, Spur 2: *N. halophila* Nm 1, Spur 3: *N. eutropha* Dave, Spur 4: *N. europaea* Freitag, Spur 5, 11, 12: *N. eutropha* N904, Spur 6: *N. communis* Nm 2, Spur 7: *N. nitrosa* Nm 90, Spur 8: *N. oligotropha* Nm 45, Spur 9: *N. spec.* R 1.24, Spur 10: *N. ureae* Nm 10, Spur 13: *N. cryotolerans* Nm 55, Spur 14: *N. marina* Nm 22, Spur 15: *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 und Spur M: Molekulargewichtsstandards. Pro Spur wurden 15 µg Protein aufgetragen. M<sub>r</sub> = relative Molekülmasse in kDa.

### AMOB-ANTIKÖRPER

Wie die AmoA-Antikörper waren auch die AmoB-Antikörper spezifisch. Sie reagierten im Immunblot nach Auftragung des Gesamtproteins von *N. eutropha* N904 nur mit dem 41 kDa großen AmoB-Protein (Abb. 4.5c, Spur 5, 11, 12). Andere Proteine wurden nicht markiert. Im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern reagierten die AmoB-Antikörper jedoch mit den AmoB-Proteinen aller zehn beschriebenen Arten der Gattung *Nitrosomonas* sowie mit *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 (Abb. 4.5c). Weitere Proteine des Gesamtproteins (Abb. 4.5a) wurden von den Antikörpern nicht markiert. Mit Ausnahme von zwei Stämmen wurde jeweils ein 41-kDa-Protein detektiert. In Zellextrakten von *Nitrosomonas spec.* R1.24 und *Nitrosomonas ureae* Nm 10 reagierten die AmoB-Antikörper mit einem 42,5 kDa großen Protein (Abb. 4.5c, Spur 9, 10). Daher wird angenommen, dass es sich bei dem aus Sandstein isolierten Stamm *N. spec.* R1.24 um einen Vertreter der Art *N. ureae spec.* handelt. Diese Annahme wurde durch DNA-Sequenzierungen bestätigt. *N. spec.* R1.24 zeigte 100 % Sequenzähnlichkeit zu der 16S rDNA und 99,4 % AS-Sequenzähnlichkeit zur AmoA von *N. ureae* Nm 10 (M. Schmid, TU München, persönliche Mitteilung).

#### 4.4.2 UNTERSUCHUNGEN DER GATTUNGEN *NITROSPIRA*, *NITROSOVIBRIO*, *NITROSOLOBUS* UND *NITROSOCOCCUS*

Weiterhin wurde die Spezifität der Antikörper an Zellextrakten von Vertretern der weiteren vier Gattungen *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus* der Ammoniakoxidanten untersucht. Es wurden insgesamt neun Arten getestet: vier Arten von *Nitrospira spec.* (Nsp 1, Nsp G1.6, Nsp M1.3, Nsp R6.2), zwei Arten von *Nitrosovibrio spec.* (Nv G1.3, Nv 7.1), *Nitrosolobus multiformis* Nl 13, *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 und *Nitrosococcus oceani* Nc 1.

### AMOA-ANTIKÖRPER

Die Antikörper gegen AmoA reagierten in Zellextrakten von *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus* mit keinem Protein (nicht dargestellt).

### AMOB-ANTIKÖRPER

Mit den AmoB-Antikörpern wurde dagegen in Zellextrakten der sieben getesteten Arten von *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* jeweils ein 41-kDa-Protein markiert. In Abbildung 4.6 ist exemplarisch der Immunblot jeweils eines Vertreters der Gattungen dargestellt. Mit den Ergebnissen von Abschnitt 4.4.1 lässt sich somit zusammenfassen, dass

die AmoB-Antikörper mit den AmoB-Proteinen aller getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien reagierten.

Im Gegensatz zu den Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien wurde in den Zellextrakten der Ammoniakoxidanten *Nitrosococcus oceani* Nc 1 (Abb. 4.6) und *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 mit den AmoB-Antikörpern kein Protein markiert. Beide Arten gehören zu der  $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien.

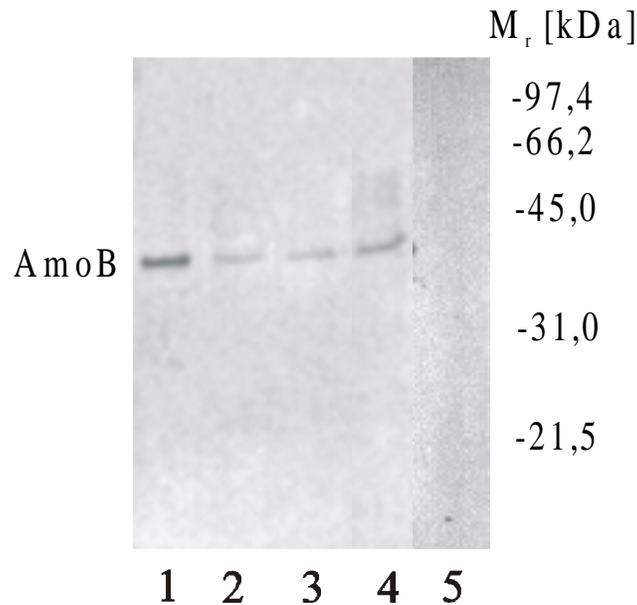


Abb. 4.6: Westernblot mit AmoB-Antikörpern nach Auftrennung des Gesamtproteins von Ammoniakoxidanten verschiedener Gattungen. Spur 1: *Nitrosomonas eutropha* N904, Spur 2: *Nitrosovibrio* spec. K7.1, Spur 3: *Nitrospira* spec. R6.2, Spur 4: *Nitrosolobus multiformis* NI 13, Spur 5: *Nitrosococcus oceani* Nc 4. Molekulargewichtsstandards sind schematisch rechts angegeben. Pro Spur wurden 15  $\mu$ g Protein aufgetragen.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa.

#### 4.4.3 KONTROLLEN ZUR SPEZIFITÄT DER ANTIKÖRPER

##### METHANOXIDANTEN

Sequenzähnlichkeiten zwischen den Genen der partikulären Methanmonooxygenase (pMMO) der Methanoxidanten und der AMO der Ammoniakoxidanten weisen auf eine enge strukturelle und funktionelle Verwandtschaft der beiden Enzymsysteme hin (Holmes et al., 1995). Daher wurde überprüft, ob beide Proteine auch serologische Gemeinsamkeiten aufweisen. Beide Antiseren reagierten jedoch nicht mit den Proteinen der Methanoxidanten *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas methanica* Oo52006 und *Methylocystis parvus* 4a (nicht dargestellt).

## **WEITERE BAKTERIEN**

Darüberhinaus wurde geprüft, ob die Antiseren mit dem Ammoniak-oxidierenden Enzym des heterotrophen Ammoniakoxidanten *Paracoccus denitrificans* 001 reagieren. Zusätzlich wurde die Spezifität der Antiseren an sieben Arten von Nitritoxidanten und an 13 Arten chemoorganotropher Bakterien, insbesondere an weit verbreiteten Bodenbakterien, getestet. Alle untersuchten Bakterien sind unter 3.1.1 und 3.1.2 aufgeführt. Die Antiseren reagierten mit keinem der getesteten Bakterien im Westernblot (nicht dargestellt).

## **4.5 QUANTITATIVER NACHWEIS DER AMMONIAKMONOOXYGENASE IM WESTERNBLOT**

Mit Hilfe der Antikörper gegen AmoA und AmoB wurde in quantitativen Immunblots der prozentuale Anteil des AmoA- und AmoB-Proteins am Gesamtprotein der Zellen von *N. eutropha* N904 bestimmt. Der prozentuale Gehalt an AmoA und AmoB wurde in Abhängigkeit verschiedener Anzuchtbedingungen ermittelt. Getestet wurde der Einfluss der Ammoniumkonzentration, alternativer Substrate, der Wachstumsphase der Zellen, des pH-Werts und der Temperatur.

### **4.5.1 BESTIMMUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER AMOA UND AMOB AM GESAMTPROTEIN VON *N. EUTROPHA***

Der prozentuale Anteil der AmoA und AmoB am Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 wurde zuerst bei Zellen ermittelt, die unter Standardbedingungen kultiviert worden waren (mineralisches Medium mit 10 mM Ammonium, pH 7,3, 28 °C). Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Als Eichkurven dienten definierte Konzentrationen der angereicherten AmoA (0,1 bis 1,8 µg) (Abb. 4.7c, d) bzw. der reinen AmoB (0,01 µg bis 0,42 µg) (Abb. 4.8c, d). Bei beiden Eichkurven stieg die Farbintensität der Immunfärbung linear mit der Proteinmenge. Auch bei der Immunfärbung der Gesamtproteine von *N. eutropha* N904 mit den AmoA-Antikörpern (Abb. 4.7a, b) und mit den AmoB-Antikörpern (Abb. 4.8a, b), war ein Anstieg der Farbintensität mit zunehmender Proteinmenge zu beobachten. Ein Nachweis der AmoA und AmoB war ab einer Proteinmenge von ca. 0,1 µg möglich. In beiden Fällen kam es bei einer Gesamtproteinmenge von 10 µg jedoch zu einer Sättigung der Färbung. Die Messwerte, die innerhalb der Eichgeraden lagen, wurden zur Bestimmung der prozentualen AmoA- und AmoB-Gehalte am Gesamtprotein herangezogen.

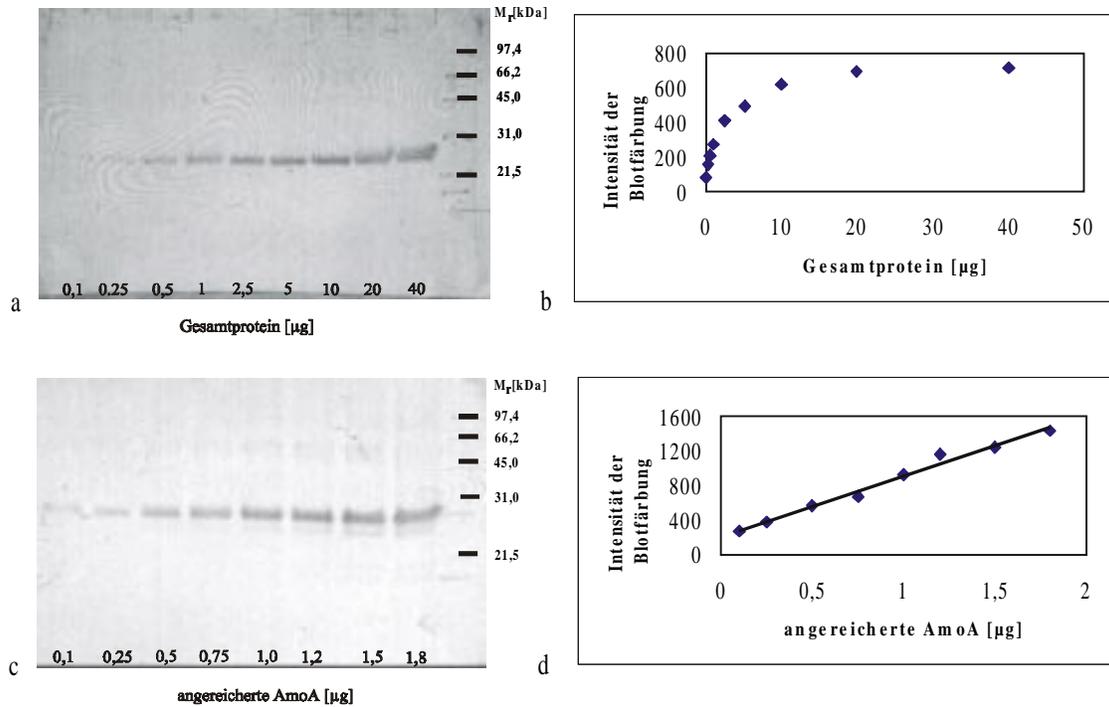


Abb. 4.7: Direkter Westernblot mit AmoA-Antikörpern und Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 (a) bzw. mit angereicherter AmoA (c) in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Die Proteingehalte sind unten, die Molekulargewichtsstandards sind rechts neben den Westernblots angegeben. M<sub>r</sub> = relative Molekülmasse in kDa. Neben den Westernblots ist die Farbintensität der Immunfärbung in Abhängigkeit von der Gesamtproteinmenge (b) bzw. der Proteinmenge der angereicherten AmoA (d) graphisch dargestellt. Die Farbintensitäten wurden mit Hilfe eines Densitometerprogramms bestimmt (siehe Abschnitt 3.14.4).

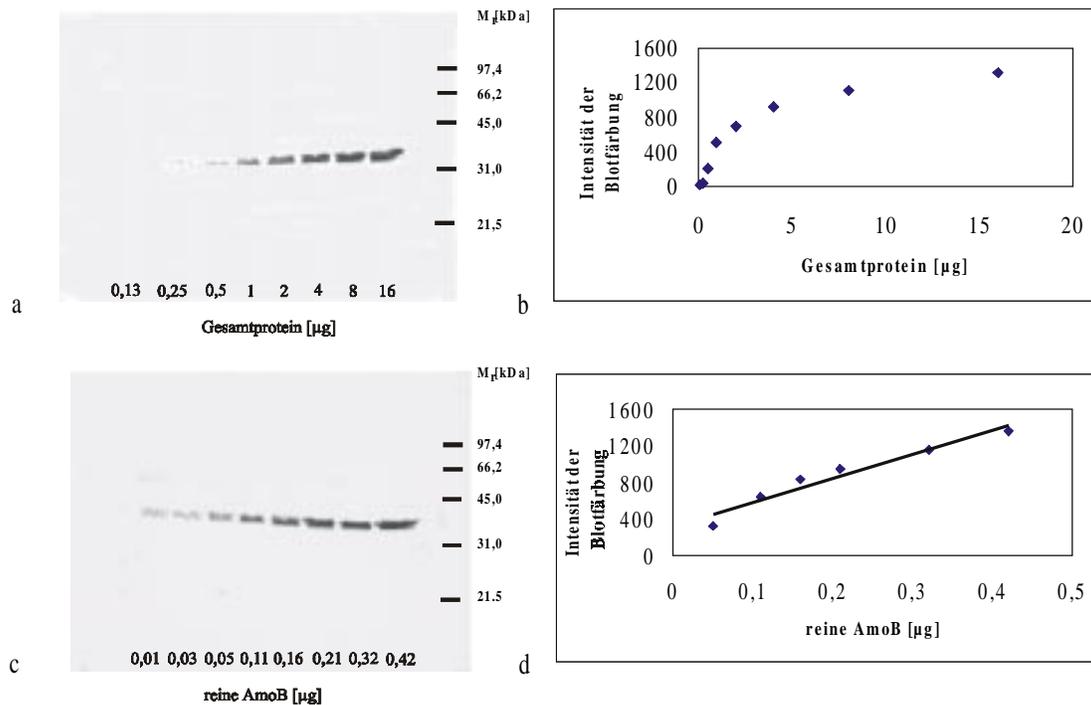


Abb. 4.8: Indirekter Westernblot mit AmoB-Antikörpern und Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 (a) bzw. mit reiner AmoB (c) in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Die Proteingehalte sind unten, die Molekulargewichtsstandards sind rechts neben den Westernblots angegeben. M<sub>r</sub> = relative Molekülmasse in kDa. Neben den Westernblots ist die Farbintensität der Immunfärbung in Abhängigkeit von der Gesamtproteinmenge (b) bzw. der Proteinmenge der reinen AmoB (d) graphisch dargestellt. Die Farbintensitäten wurden mit Hilfe eines Densitometerprogramms bestimmt (siehe Abschnitt 3.14.4).

Wie in Tabelle 4.1 aufgeführt, konnte ein prozentualer AmoA-Gehalt von  $6,9 \pm 2,0$  % und ein prozentualer AmoB-Gehalt von  $5,9 \pm 1,8$  % am Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 bestimmt werden. Die A- und die B-Untereinheit kamen somit in der Zelle in etwa im gleichen Verhältnis vor. Zur Berechnung der AmoA- und AmoB-Gehalte am Gesamtprotein wurden jeweils vier ähnliche Versuche durchgeführt. Die Standardabweichung der Ergebnisse vier gleicher Versuche lag bei  $\pm 9$  %.

Tabelle 4.1: Prozentuale AmoA- und AmoB-Gehalte am Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 berechnet aus den Farbintensitäten der Immunblotfärbungen. Die Zellen wurden in Gegenwart von 10 mM Ammonium angezogen. Die Standardabweichung vier gleicher Versuche lag bei  $\pm 9$  %.

Gesamtprotein [µg]	prozentualer AmoA-Gehalt		prozentualer AmoB-Gehalt	
	[µg]	%	[µg]	%
10	0,54	5,4	n.u.	n.u.
8	n.u.	n.u.	0,30	3,8
5	0,31	6,2	n.u.	n.u.
4	n.u.	n.u.	0,21	5,3
2,5	0,23	9,2	n.u.	n.u.
2	n.u.	n.u.	0,13	6,5
1	n.a.	n.a.	0,08	8,0
Mittelwert		$6,9 \pm 2,0$ %		$5,9 \pm 1,8$ %

n.a. = Wert ist anhand der verwendeten Eichkurve nicht ablesbar

n.u. = dieser Gesamtproteingehalt wurde im Immunblot nicht mit den AmoA- bzw. AmoB-Antikörpern untersucht.

#### 4.5.2 ABHÄNGIGKEIT DES AMOA- UND AMOB-GEHALTES VON DER AMMONIUM-KONZENTRATION

Bei Anzucht von *N. eutropha* N904 in mineralischem Medium mit einer niedrigen Ammoniumkonzentration von 1 mM wurde ein Anteil von  $11,4 \pm 1,9$  % AmoA am Gesamtprotein gefunden. Dieser lag deutlich über dem AmoA-Gehalt von Zellen, die mit 10 mM Ammonium kultiviert wurden. Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, betrug der AmoA-Gehalt in diesen Zellen  $6,9 \pm 2,0$  %. Dagegen wurde in Gegenwart hoher Ammoniumkonzentrationen von 100 mM ein niedriger prozentualer AmoA-Gehalt von  $3,0 \pm 1,8$  % gemessen (Abb. 4.9a, b).

Auch im Fall der AmoB nahm der prozentuale Gehalt am Gesamtprotein von *N. eutropha* N904 mit zunehmender Ammoniumkonzentration im Anzuchtsmedium ab. In Gegenwart von 1 mM Ammonium wurde ein AmoB-Gehalt von  $14,0 \pm 1,4$  % gemessen. Bei Anzucht mit 10 mM Ammonium lag ein AmoB-Gehalt von  $5,9 \pm 1,8$  % (siehe Abschnitt 4.5.1) und bei Anzucht mit 100 mM Ammonium ein AmoB-Gehalt von  $4,0 \pm 0,8$  % vor (Abb. 4.9c, d).

Diese Ergebnisse zeigten, dass der AmoA- und AmoB-Gehalt in den Zellen von *N. eutropha* N904 abhängig von der Ammoniumkonzentration ist. Außerdem traten das AmoA- und

AmoB-Protein in den Zellen unabhängig von der Substratkonzentration im Medium stets in etwa im Verhältnis 1:1 auf.

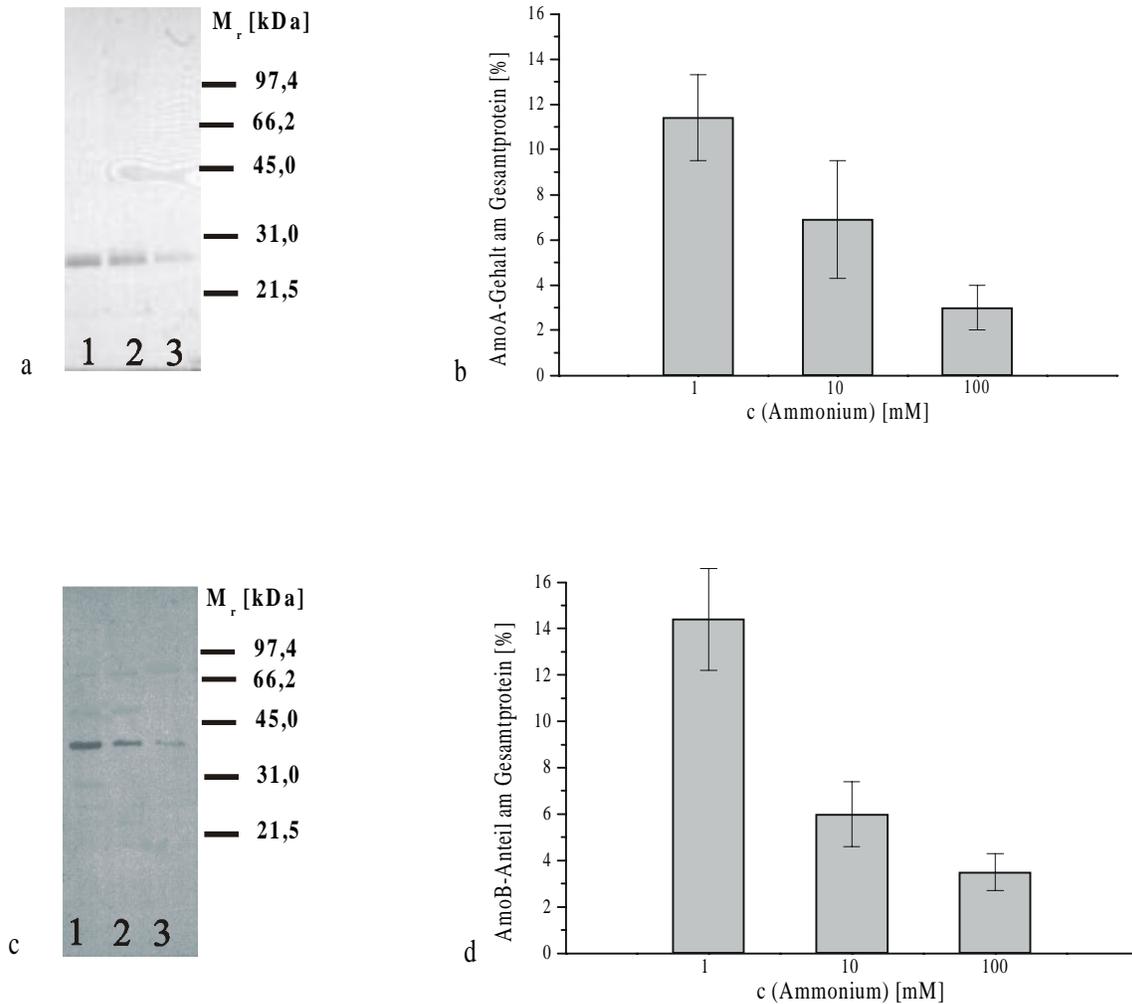


Abb. 4.9: Quantitativer Immunblot von AmoA (a, b) und AmoB (c, d) an zellfreien Extrakten von *N. eutropha* N904. a, c) Westernblot mit Antikörpern gegen AmoA (a) und AmoB (c) mit einer Proteinmenge von je 4 µg. Spur 1: Zellen wurden in mineralischem Medium mit 1 mM, Spur 2: mit 10 mM, Spur 3: mit 100 mM Ammonium angezogen. Molekulargewichtsstandards sind rechts angegeben.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa. b, d) Abnahme des prozentualen Gehaltes an AmoA (b) und AmoB (d) am Gesamtprotein mit zunehmender Ammoniumkonzentration in mineralischem Medium. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei Versuchen wieder.

#### 4.5.3 ABHÄNGIGKEIT DES AMOA- UND AMOB-GEHALTES VON ALTERNATIVEN SUBSTRATEN

*Nitrosomonas* kann neben Ammonium auch Harnstoff und die Aminosäure Glutamin als Ammoniakquelle nutzen (Koops et al., 1991; Pinck, 1998). Dabei können aus Harnstoff zwei und aus Glutamin ein Ammoniummolekül gewonnen werden. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss diese alternativen Substrate auf den AmoA- und AmoB-Gehalt von *Nitrosomonas* haben.

*N. aestuarii* Nm 36 wurde mit 6 mM Harnstoff bzw. mit 12 mM Ammonium angezogen. Zellen, die in Gegenwart von Harnstoff gewachsen sind, zeigten einen um etwa 30 % höheren

AmoA- und AmoB-Gehalt als Zellen, die mit einer äquivalenten Menge an Ammonium angezogen wurden (Abb. 4.10). Auch bei der Anzucht von *N. eutropha* Dave mit 5 mM Glutamin wurde ein etwa 30 % höherer Gehalt an AmoA und AmoB im Vergleich zur Anzucht mit 5 mM Ammonium gefunden (nicht dargestellt).

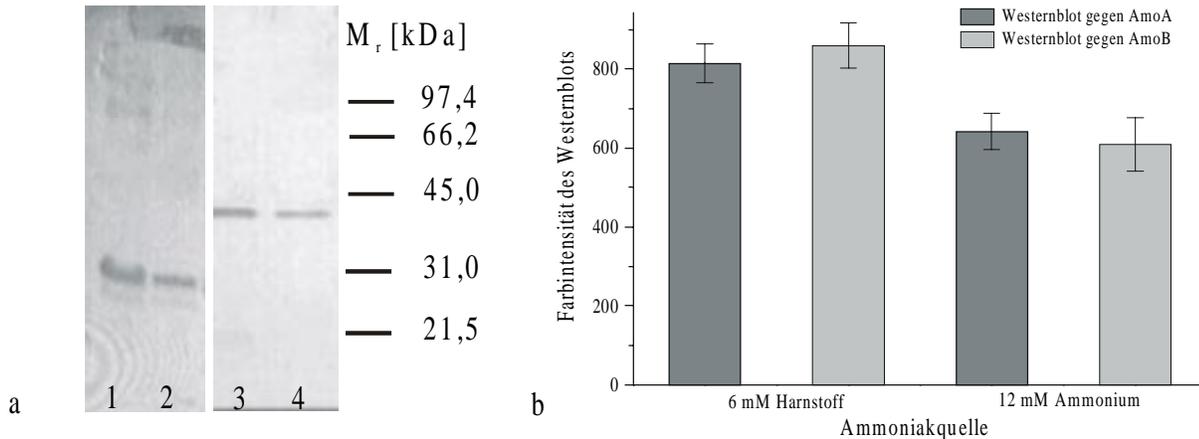


Abb. 4.10: Quantitativer Immunblot von AmoA und AmoB an zellfreien Extrakten von *Nitrosomonas aestuarii* Nm 36. a) Westernblot gegen AmoA (Spur 1, 2) und AmoB (Spur 3, 4) mit Auftragung einer jeweiligen Proteinmenge von 4 µg. Die Zellen wurden in Gegenwart von 6 mM Harnstoff (Spur 1, 3) oder 12 mM Ammonium (Spur 2, 4) angezogen. Molekulargewichtsstandards sind rechts angegeben.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa. b) Farbintensität des Westernblots in Abhängigkeit des Substrates. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei Versuchen wieder.

Zellen von *N. eutropha* N904, die mixotroph mit 10 mM Ammonium in Gegenwart von Na-Pyruvat, Hefeextrakt und Pepton oder Na-Pyruvat oder L-Alanin gewachsen sind, zeigten in etwa den gleichen AmoA- und AmoB-Gehalt wie lithotroph angezogene Zellen (nicht dargestellt).

#### 4.5.4 AMOA- UND AMOB-GEHALT IN HUNGERNDEN ZELLEN VON *NITROSOMONAS*

Es wurde der AmoA- und AmoB-Gehalt in hungernden Zellen von *Nitrosomonas* gemessen, die lange Zeit in Abwesenheit von Ammonium überdauerten. Dazu wurden die Zellen zunächst in Gegenwart von 10 mM Ammonium angezogen und nach vollständigem Substratverbrauch bis zu einem Jahr bei 16 °C gelagert (siehe Abschnitt 3.2.1). Der Gehalt der Untereinheiten der AMO in Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurde mit dem Gehalt in Zellen verglichen, die 29, 58, 129 und 360 Tage in Abwesenheit von Ammonium hungerten.

Der AmoA- und AmoB-Gehalt der Zellen von *N. eutropha* N904 der logarithmischen Wachstumsphase war in etwa genauso hoch wie der Gehalt an AmoA und AmoB von Zellen, die 29 Tage in Abwesenheit von Ammonium hungerten. Der AmoA- und AmoB-Gehalt der

Zellen stieg jedoch mit der Dauer der Hungerzeit deutlich an. Nach einer Lagerung der Zellen für 60 Tage bei 16 °C in Abwesenheit von Ammonium war der AmoA-Gehalt von  $6,9 \pm 2,0 \%$  auf  $11,4 \pm 1,3 \%$  und der AmoB-Gehalt von  $5,9 \pm 1,8 \%$  auf  $9,7 \pm 0,9 \%$  gestiegen. Dieses entsprach etwa dem doppelten Gehalt an AmoA bzw. AmoB wachsender Zellen oder Zellen, die nur 29 Tage gehungert hatten. Der Anteil der AMO-Untereinheiten blieb in den hungernden Zellen von *N. eutropha* N904 ab dem 60. Tag konstant. Selbst nach einem Jahr Lagerung in Abwesenheit von Ammonium wurde in den Zellen noch AmoA und AmoB nachgewiesen. In Abb. 4.11 ist exemplarisch der AmoB Gehalt in Zellen von *N. eutropha* N904 in Abhängigkeit von der Zeit, in der die Zellen ohne Ammonium überdauerten, aufgezeichnet. Der AmoA-Gehalt in den hungernden Zellen stimmte mit dem AmoB-Gehalt überein und ist nicht dargestellt.

Neben den AmoA- und AmoB-Gehalten wurde die spezifische Ammoniakoxidationsaktivität der Zellen bestimmt. Die durchschnittlich höchste Aktivität mit  $2,6 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  hatten Zellen der logarithmischen Wachstumsphase. Die Aktivität nahm in den hungernden Zellen innerhalb des ersten Monats in Abwesenheit von Ammonium auf etwa ein Drittel ab ( $0,9 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Nach einem Jahr wurde in den hungernden Zellen noch eine Aktivität von  $0,5 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  nachgewiesen. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so ist festzustellen, dass der Gehalt beider Untereinheiten der AMO nicht mit der Ammoniakoxidationsaktivität der Zellen korrelierte.

Versuche mit Zellen von *N. eutropha* Dave und *N. europaea* Freitag führten zu ähnlichen Ergebnissen (nicht dargestellt).

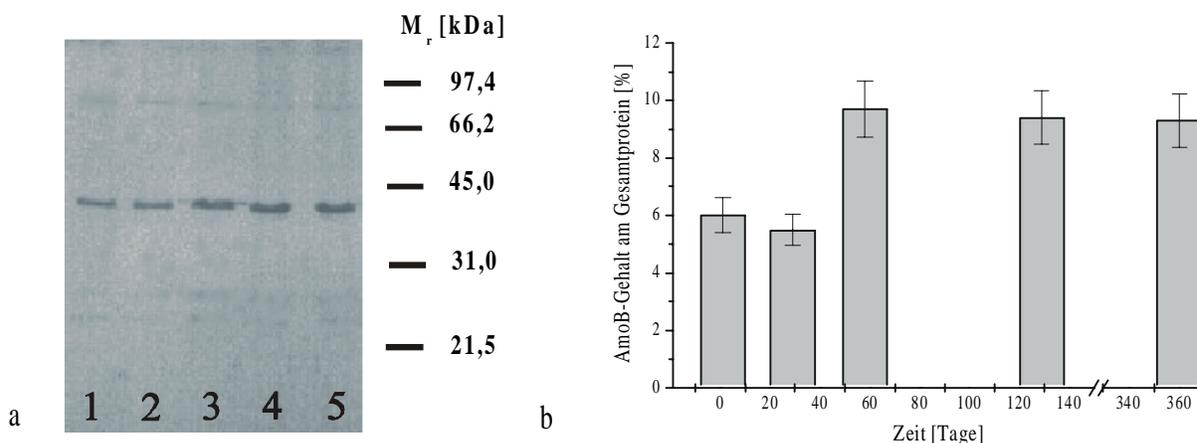


Abb. 4.11: Quantitativer Immunblot von AmoB an zellfreien Extrakten hungernder Zellen von *N. eutropha* N904. a) Westernblot gegen AmoB mit Auftragung einer jeweiligen Proteinmenge von 4 µg. Spur 1: Zellen der logarithmischen Wachstumsphase, Spur 2: Zellen, die 29 Tage ohne Ammonium bei 16 °C lagerten, Spur 3: Zellen hungerten 58 Tage, Spur 4: Zellen hungerten 129 Tage, Spur 5: Zellen hungerten 360 Tage. Molekulargewichtsstandards sind rechts angegeben.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa. b) Zunahme des prozentualen AmoB-Gehaltes der Zellen in Abhängigkeit von der Zeit, in der die Zellen ohne Ammonium überdauerten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von zwei Versuchen wieder.

#### **4.5.5 ABHÄNGIGKEIT DES AMOA- UND AMOB-GEHALTES VON DER TEMPERATUR UND DEM pH-WERT**

*N. eutropha* N904 wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (10, 16, 20, 28 °C) und pH-Werten (6,5; 7,5; 8,5) angezogen. Zur Adaptation der Zellen an die Anzuchtsbedingungen wurden die Kulturen nach Verbrauch von 10 mM Ammonium dreimal auf frisches Medium überimpft. Danach wurde der AmoA und AmoB-Gehalt der Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase überprüft.

In allen Kulturen war der Anteil von AmoA und AmoB am Gesamtprotein in etwa gleich hoch (nicht dargestellt). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass weder die Temperatur noch der pH-Wert einen Einfluss auf den Gehalt der AMO-Untereinheiten von *N. eutropha* N904 haben.

#### **4.6 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON AMMONIAKOXIDANTEN IN REINKULTUREN**

Es wurde untersucht, ob die Zellen der Ammoniakoxidanten mit den entwickelten Antikörpern mittels Immunfluoreszenz (IF)-Färbung der AMO sichtbar gemacht werden können. Für diese Versuche wurden zunächst Reinkulturen verwendet. Die Zellgrenzschichten mussten vor der IF-Färbung permeabilisiert werden, damit die Antikörper ins Innere der Zelle gelangen konnten. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte über sekundäre Antikörper, die mit einem Farbstoff gekoppelt waren. Für das Anfärben der AmoA und AmoB wurden zwei unterschiedliche Farbstoffe gewählt.

##### **4.6.1 FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG DER ZELLEN**

Bei der Färbung der Ammoniakoxidanten mit Hilfe der AmoA-Antikörper wurde auf eine vorherige Fixierung der Zellen mit Formaldehyd verzichtet, da eine Färbung nach Formaldehyd-Fixierung mittels AmoA-Antikörper nicht möglich war. Eine optimale Färbung der Ammoniakoxidanten mit Hilfe der AmoA-Antikörper wurde durch Permeabilisierung in PBS/Ethanol mit anschließender Lysozymbehandlung erreicht. Dagegen wurde mit Hilfe der AmoB-Antikörper eine optimale Färbung nach einer Fixierung mit Formaldehyd ohne die Verwendung von Lysozym erzielt. Bei gleichzeitiger Färbung mit AmoA- und AmoB-Antikörpern wurde die für die Färbung mit den AmoA-Antikörpern beschriebene Permeabilisierung angewendet.

#### 4.6.2 IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOA

Mit Hilfe der IF-Färbung unter Verwendung der AmoA-Antikörpern war eine Färbung lithotroph angezogener Zellen von *N. eutropha* N904 möglich. Eine Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI zeigte, dass fast jede Zelle mit Hilfe der Antikörper gefärbt wurde (Abb. 4.12a, b). Die Zellen wurden hauptsächlich in der Zellperipherie gefärbt (Abb. 4.12c). In einigen Fällen war die Fluoreszenz zudem über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 4.12b, 4.15a). Kontrollexperimente ohne primäre Antikörper zeigten keine Fluoreszenz.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Westernblot (siehe Abschnitt 4.4.1) wurden mit Hilfe der AmoA-Antikörper fast alle beschriebenen Arten der Gattungen *Nitrosomonas* detektiert. Nur die Art *Nitrosococcus mobilis* Nc 2, die phylogenetisch eng mit der Gattung *Nitrosomonas* verwandt ist, wurde nicht angefärbt. Bei den verschiedenen Arten war die Fluoreszenzfärbung unterschiedlich stark ausgeprägt. So wurden die marinen Arten *N. marina* Nm 22 und *N. cryotolerans* Nm 55 schwächer angefärbt als die halophilen und halotoleranten Arten *N. eutropha*, *N. europaea* und *N. halophila*. Die unterschiedlichen Abstufungen der Färbung der Arten von *Nitrosomonas* sind in Tabelle 4.2 angegeben. Die halophilen und halotoleranten Nitrosomonaden, die mit der IF-Färbung am intensivsten gefärbt wurden, konnten mit den AmoA-Antikörpern auch im Immunblot detektiert werden (siehe Abschnitt 4.4.1).

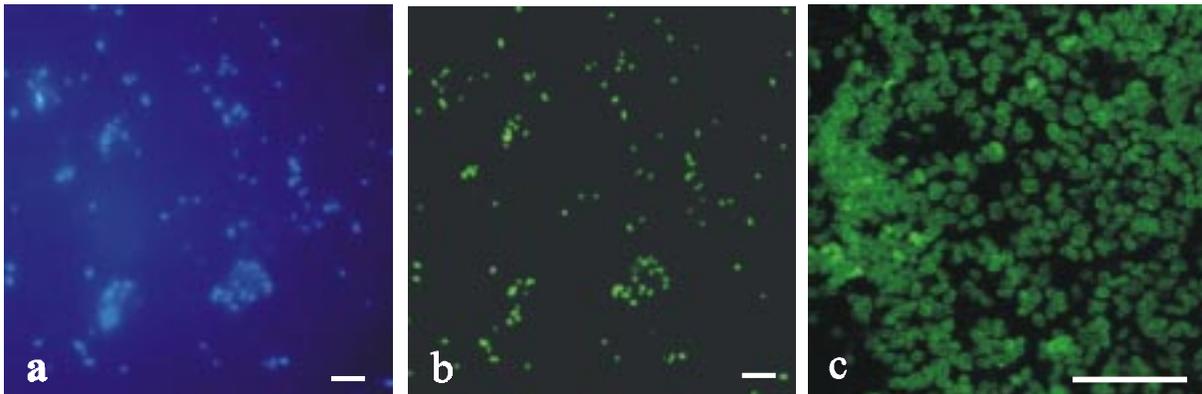


Abb. 4.12: IF-Untersuchungen mit AmoA-Antikörpern an Zellen von *N. eutropha* N904. a) DAPI-Färbung. b) IF-Färbung der gleichen Zellen c) vergrößerte Darstellung der IF-Färbung anderer Zellen von *N. eutropha* N904. Größenbalken = 10  $\mu\text{m}$ . Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die DAPI-Färbung in (a) wurde mit dem Leica Filterset A (BP 340-380 exc./RKP 400/LP 425 em.) und die IF-Färbung mit dem Filter Set I 3 (BP 450-490 exc./RKP 510/LP 515 em.) dargestellt. Die IF-Färbung in (c) wurde mit dem CLSM und einem Zoom von 2,9 aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (488 exc./BP 520-590 em.)).

Tabelle 4.2: IF-Färbungen mit Hilfe der AmoA-Antikörper verschiedener Arten der Gattung *Nitrosomonas*. - = keine, + = leichte, ++ = mittlere und +++ = starke Fluoreszenzfärbung der Zellen.

Art	Stamm	Stärke der IF-Färbung
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	Nm 36	+++
<i>Nitrosomonas communis</i>	Nm 2	++
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	Nm 55	+
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Freitag	+++
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	N904	+++
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Dave	+++
<i>Nitrosomonas halophila</i>	Nm 1	+++
<i>Nitrosomonas marina</i>	Nm 22	+
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	Nm 90	++
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	Nm 45	++
<i>Nitrosomonas ureae</i>	Nm 10	++
<i>Nitrosococcus mobilis</i> <sup>1</sup>	Nc 2	-

<sup>1</sup> *Nitrosococcus mobilis* ist phylogenetisch eng verwandt mit der Gattung *Nitrosomonas* (Head et al., 1993).

Die getesteten Arten der vier weiteren Gattungen der Ammoniakoxidanten (*Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus*) wurden mit den AmoA-Antikörpern nicht gefärbt. Auch die IF-Färbungen von Methanoxidanten, Nitritoxidanten und verschiedenen chemoorganotrophen Bakterien waren negativ. Alle getesteten Bakterien sind in der Tabelle 4.5 des Abschnittes 4.10 aufgeführt.

#### 4.6.3 IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOB

Mit Hilfe der IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoB war eine Färbung lithotroph angezogener Zellen von *N. eutropha* N904 möglich. Die Zellen wurden stets in der Zellperipherie gefärbt (Abb. 4.13).

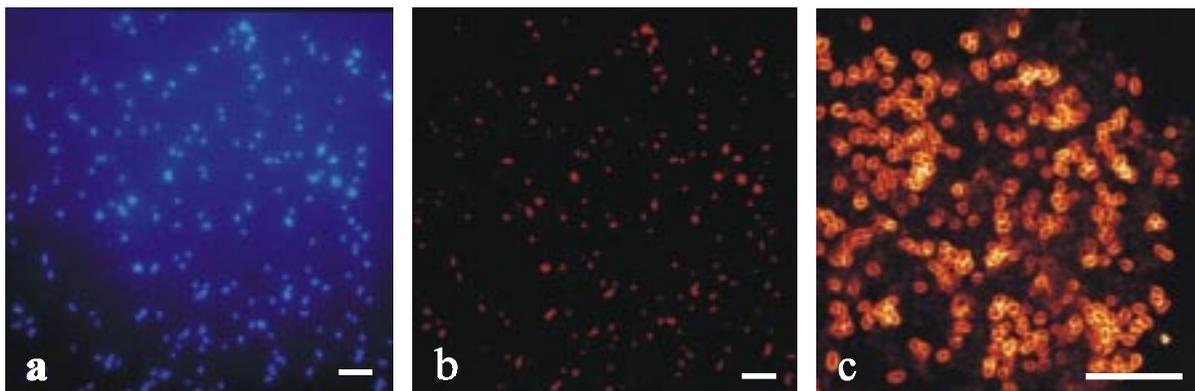


Abb. 4.13: IF-Untersuchungen mit AmoB-Antikörpern an Zellen von *N. eutropha* N904. a) DAPI-Färbung b) IF-Färbung der gleichen Zellen c) vergrößerte Darstellung der IF-Färbung anderer Zellen von *N. eutropha* N904. Größenbalken = 10 µm. Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die DAPI-Färbung in (a) wurde mit dem Leica Filterset A (BP 340-380 exc./RKP 400/LP 425 em.) und die IF-Färbung mit dem Filter Set N 2.1 (BP 515-560 exc./RKP 580/LP 590 em.) dargestellt. Die IF-Färbung in (c) wurde mit dem CLSM und einem Zoom von 2,4 aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (568 exc./LP 590 em.)).

Die ringförmige Färbung war im Vergleich zur IF-Färbung mit den AmoA-Antikörpern intensiver. Eine Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI zeigte, dass auch in diesem Fall fast jede Zelle mit Hilfe der AmoB-Antikörper gefärbt wurde. Kontrollexperimente ohne primäre Antikörper zeigten keine Fluoreszenz.

Analog zu den Ergebnissen im Westernblot (siehe Abschnitt 4.4) konnten mit den AmoB-Antikörpern alle 20 getesteten Arten der vier Gattungen der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien (*Nitrosomonas* mit der Art *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus*) deutlich angefärbt werden. Die getesteten Arten sind in der Tabelle 4.5 des Abschnittes 4.10 aufgeführt. Zellen der Gattungen *Nitrosomonas* mit *Nitrosococcus mobilis* und *Nitrosovibrio* wurden in der Zellperipherie gefärbt (Abb. 4.14a-c). In den Zellen der Gattungen *Nitrospira* und *Nitrosolobus* traten Fluoreszenzsignale außerdem im Inneren der Zelle auf (Abb. 4.14d, e). Die Fluoreszenzsignale korrelierten mit der Lage der Membranen. Diese sind bei den Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrospira* und *Nitrosovibrio* sowie bei der Art *Nitrosococcus mobilis* in der Zellperipherie angeordnet. Bei den Zellen von *Nitrospira* folgt die Cytoplasmamembran jedoch dem Verlauf der spiralig, eng gewundenen Zellen. Die lobulären Zellen von *Nitrosolobus* werden durch die intracytoplasmatische Membranen (ICMs) partiell kompartimentiert. Daraus folgt, dass sich die fünf Gattungen der Ammoniakoxidanten aufgrund der Morphologie und der charakteristischen IF-Signale im Fluoreszenzmikroskop unterscheiden lassen.

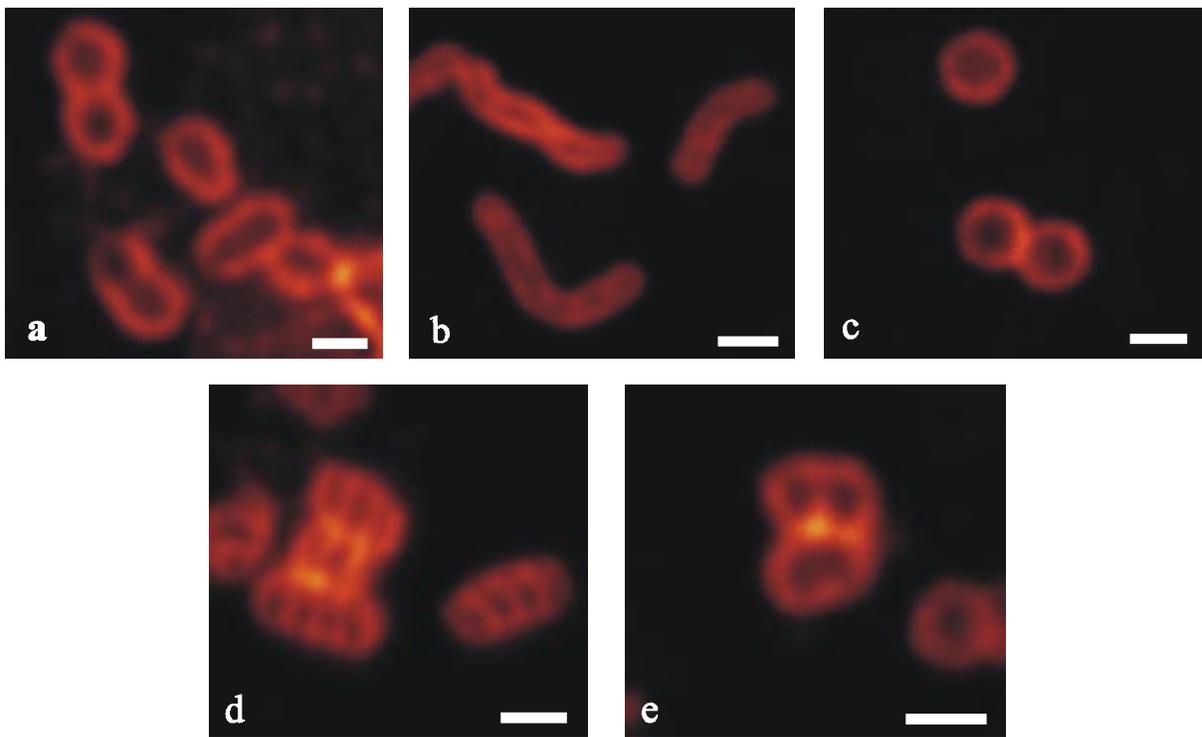


Abb. 4.14: IF-Färbung mit AmoB-Antikörpern von Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. a) *Nitrosomonas eutropha* N904 (Zoom 16,4) b) *Nitrosovibrio* spec. Nv K7.1 (Zoom 17,0) c) *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 (Zoom 15,8) d) *Nitrospira* spec. Nsp R6.2 (Zoom 20,0) e) *Nitrosolobus multififormis* Nl 13 (Zoom 23,0). Größenbalken = 1  $\mu$ m. Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die IF-Färbungen wurden mit dem CLSM bei unterschiedlichen Zoom-Einstellungen aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (568 exc./LP 590 em.)).

Im Gegensatz zu den Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien wurden die Zellen der beiden Vertreter *Nitrosococcus oceani* Nc 1 und *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 der  $\gamma$ -Proteobakterien sowie der Methanoxidant *Methylococcus capsulatus* Bath nur sehr schwach gefärbt (nicht dargestellt). Weitere IF-Färbungen von Methanoxidanten, Nitritoxidanten und chemoorganotropher Bakterien waren negativ. Im Gegensatz zu den IF-Färbungen mit den AmoA-Antikörpern trat bei den IF-Färbungen dieser Bakterien mit den AmoB-Antikörpern eine leichte Hintergrundfluoreszenz auf. Die Hintergrundfärbung ließ sich deutlich von der Zellfärbung der Ammoniakoxidanten unterscheiden. Alle getesteten Bakterien sind ebenfalls in der Tabelle 4.5 des Abschnittes 4.10 aufgeführt.

#### 4.6.4 GEKOPPELTE IF-FÄRBUNG MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DIE AMOA UND AMOB

Weiterhin konnten die Zellen von *N. eutropha* N904 mit Hilfe der IF-Färbung gleichzeitig mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB markiert werden. Bei dieser „gekoppelten“ IF-Färbung der Zellen wurde deutlich, dass die Fluoreszenzmarkierung der AmoA-Antikörper dabei weiter im Zellinneren lag als die Markierung der Antikörper gegen die AmoB (Abb. 4.15). Daher erschienen die Zellen bei der gekoppelten IF-Färbung zweifarbig.

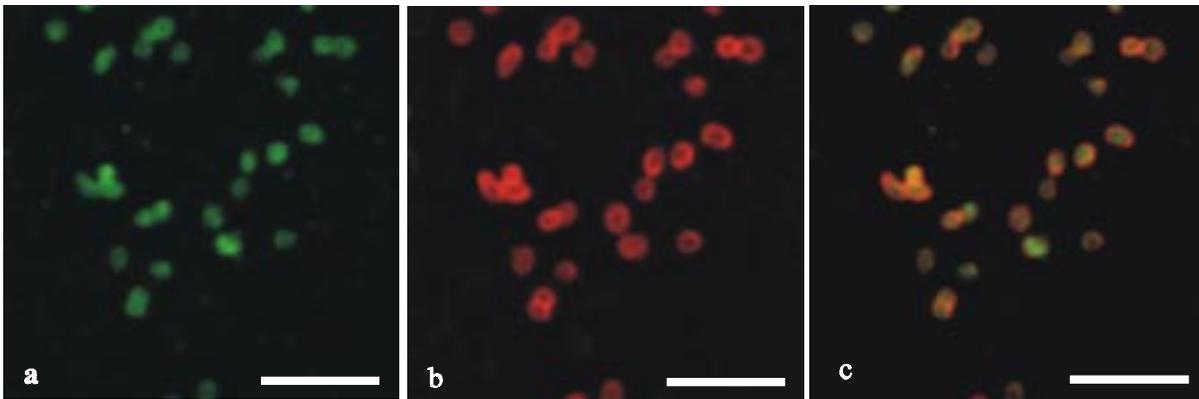


Abb. 4.15: Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB von *N. eutropha* N904. a) Grünfluoreszenz der Cy2-gefärbten AmoA-Antikörper b) Rotfluoreszenz der AmoB-Antikörper c) gemeinsame Darstellung der unter (a) und (b) abgebildeten Fluoreszenzen. Größenbalken = 5  $\mu$ m. Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die IF-Färbungen wurden mit dem CLSM bei einem Zoom von 6,3 aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (488/568 exc./LP 590 und BP 520-560 em.)).

In Kontrollexperimenten, bei denen einer der beiden primären oder sekundären Antikörper weggelassen wurde, waren die Zellen stets einfarbig markiert. Eine unspezifische Kreuzreaktion der vier eingesetzten Antikörper konnte daher ausgeschlossen werden.

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben (siehe Abschnitt 4.6.2, 4.6.3), detektieren die AmoA-Antikörper mit Hilfe der IF-Technik nur die Gattung *Nitrosomonas* mit Ausnahme von *Nitrosococcus mobilis*. Dagegen färben die AmoB-Antikörper alle Gattungen der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Aufgrund der spezifischen Markierung der Gattung *Nitrosomonas* durch beide Antikörper, wurde im Folgenden mit Hilfe der

gekoppelten IF-Färbung getestet, ob die Gattung *Nitrosomonas* in definierten Mischkulturen von den anderen Gattungen der Ammoniakoxidanten zu unterscheiden war. Dazu wurden definierte Mischkulturen aus *Nitrosomonas eutropha* N904 und *Nitrosococcus mobilis* oder je einem Vertreter der Gattungen *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* hergestellt. In diesen Mischkulturen konnte *N. eutropha* N904 mit Hilfe der gekoppelten IF-Färbung eindeutig identifiziert werden (Abb. 4.16). *N. eutropha* N904 wurde mit den Antikörpern gegen AmoA und AmoB rotgrün bzw. gelbgrün gefärbt, die übrigen Gattungen wurden nur mit den AmoB-Antikörpern rot gefärbt.

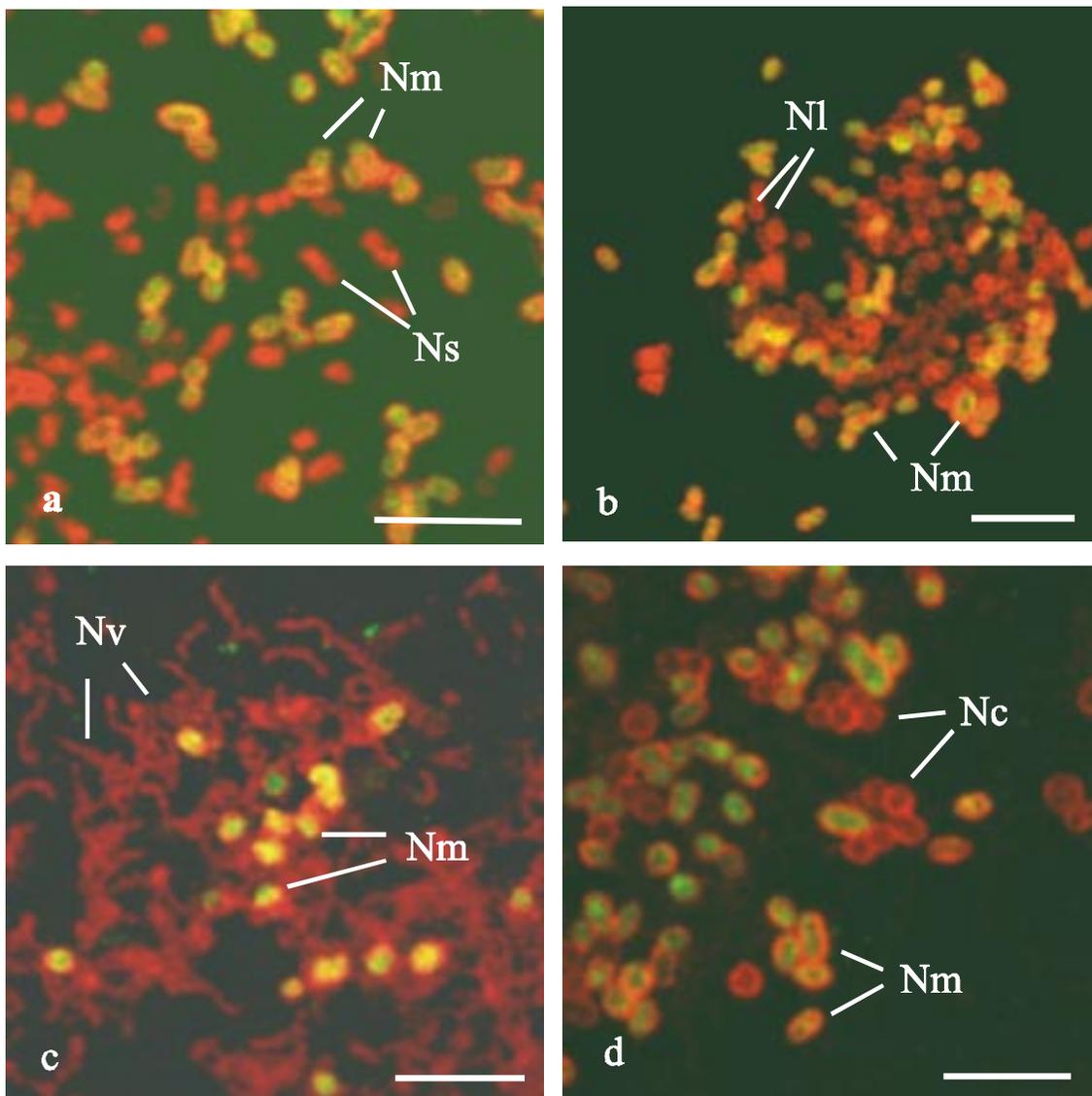


Abb. 4.16: Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB einer definierten Mischkultur aus *N. eutropha* N904 (Nm) und a) *Nitrospira* spec. G1.6 (Ns) (Zoom 5,4) b) *Nitrosolobus multififormis* Nl 13 (Nl) (Zoom 3,8) c) *Nitrosovibrio* spec. K7.1 (Nv) (Zoom 5,0) d) *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 (Nc) (Zoom 6,2). Gemeinsame Darstellung der Grünfluoreszenz der Cy2-gefärbten AmoA-Antikörper und Rotfluoreszenz der Cy3-gefärbten AmoB-Antikörper. Größenbalken = 5  $\mu$ m. Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die IF-Färbungen wurden mit dem CLSM bei unterschiedlichen Zoom-Einstellungen aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (488/568 exc./LP 590 und BP 520-560 em.)).

#### 4.7 IDENTIFIZIERUNG VERSCHIEDENER ISOLATE VON AMMONIAKOXIDANTEN

Vier verschiedene Stämme von Ammoniakoxidanten, die noch nicht näher charakterisiert sind, wurden mit unterschiedlichen mikroskopischen Methoden untersucht, um sie auf Gattungsebene einzuordnen. Die Zellen wurden mit dem Lichtmikroskop, dem Fluoreszenzmikroskop und dem Elektronenmikroskop untersucht. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde die gekoppelte IF-Färbung mit den AmoA- und AmoB-Antikörpern (siehe Abschnitt 4.6.4) und die *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (FISH) angewandt. Die in Tabelle 4.3 aufgeführten Ammoniakoxidanten waren von Sandsteinoberflächen historischer Gebäude isoliert worden (Spieck, mündliche Mitteilung). Unter dem Lichtmikroskop waren alle Zellen stäbchenförmig (Tabelle 4.3). Die Zellen ließen sich mit dieser Methode nicht eindeutig der Gattung *Nitrosomonas* mit gerader Stäbchenform oder *Nitrospira* mit spiralig gewundener Stäbchenform zuordnen.

Tabelle 4.3: Gattungszuordnung verschiedener Reinkulturen von Ammoniakoxidanten, die von Sandsteinoberflächen historischer Gebäude isoliert worden sind. Die Klassifizierung erfolgte mit Hilfe der Lichtmikroskopie, der Fluoreszenzmikroskopie nach IF-Färbung der Zellen mit AmoA- oder AmoB-Antikörpern und der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Als Referenzstämmen dienen *Nitrosomonas eutropha* N904 und *Nitrospira spec.* Nsp 1.

Stamm	Herkunft	Lichtmikroskop	Morphologie		TEM
			IF-Färbung AmoA	IF-Färbung AmoB	
R1.24	Sandstein, Regensburger Dom	Stäbchen	+, gerade	+, gerade	gerade
R6.2	Sandstein, Regensburger Dom	Stäbchen	-	+, gewunden	gewunden
G1.6	Sandstein, Marienkirche in Gelnhausen	Stäbchen	-	+, gewunden	gewunden
M1.3	Sandstein, Alte Pinakothek in München	Kurzstäbchen	-	+, gewunden	n.b.
<i>Nitrosomonas eutropha</i> N904	Gülle, Hamburg	Stäbchen	+, gerade	+, gerade	gerade
<i>Nitrospira spec.</i> Nsp 1	Boden, Sardinien	Kurzstäbchen	-	+, gewunden	n.b.

+ = positive IF-Färbung, - = negative IF-Färbung, n. b. = nicht bestimmt.

Der Stamm R1.24 wurde bei der IF-Färbung sowohl mit den AmoA- als auch mit den AmoB-Antikörpern gefärbt. Bei beiden Färbungen zeigte dieser Stamm die Gestalt eines geraden Stäbchens (siehe Abb. 4.12c bzw. 4.14a). Die Stämme R6.2, G1.6 und M1.3 wurden dagegen nur mit den AmoB-Antikörpern und nicht mit den AmoA-Antikörpern gefärbt. Nach der IF-Färbung dieser Stämme mit den AmoB-Antikörpern waren eindeutig gewundene Zellen nachweisbar (siehe Abb. 4.14d). Aufgrund der IF-Färbung und der typischen Morphologie der Zellen konnte der Stamm R1.24 der Gattung *Nitrosomonas* und die Stämme R6.2, G1.6 und

M1.3 der Gattung *Nitrospira* zugeordnet werden. Die Gattungszuordnung der Isolate wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen unterstützt. Der Stamm R1.24 hatte unter dem Elektronenmikroskop die Gestalt eines geraden Stäbchens wie *Nitrosomonas* und die Stämme R6.2 und G1.6 (siehe Abb. 4.21c) zeigten eine für die Gattung *Nitrospira* typische gewundene Zellform (Tabelle 4.3). Die Zellen von Stamm R1.24 waren etwa  $0,7 \cdot 1,4 \mu\text{m}$  groß und enthielten Carboxysomen (nicht dargestellt). In den Zellen von R6.2 und G1.6 wurden keine Carboxysomen nachgewiesen, sie waren  $0,5 \cdot 1,1 \mu\text{m}$  bzw.  $0,5 \cdot 1,3 \mu\text{m}$  groß und hatten drei bis vier bzw. vier bis sechs Windungen (nicht dargestellt).

Im Fall des Stammes R1.24 wurde die Zuordnung zur Gattung *Nitrosomonas* außerdem anhand von DNA-Sequenzierungen der 16S rDNA und *amoA* bestätigt. Der Stamm R1.24 kann vermutlich der Art *Nitrosomonas ureae* zugeordnet werden (siehe Abschnitt 4.4.1).

Weiterhin wurde versucht, die Isolate mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (FISH) gegen die 16S rRNA einzuordnen. Es wurde eine Sonde verwendet, die fast alle getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien detektiert (Sonde Nso190). Zudem wurden Sonden gegen die Verwandtschaftsgruppe *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrospira briensis* und *Nitrosovibrio tenuis* (Sonde Nsv443) und gegen fast alle getesteten Arten der Gattung *Nitrosomonas* (Sonde NEU-CTE) eingesetzt. Mit der Sonde Nso190 wurden die in Tabelle 4.3 genannten Isolate und Kontrollstämme gefärbt mit Ausnahme des Stammes R1.24. Dagegen reagierten die Sonden NEU-CTE und Nsv443 nur mit den Kontrollstämmen *Nitrosomonas eutropha* N904 bzw. mit *Nitrospira spec. Nsp 1*. Die Sonden NEU-CTE und Nsv443 detektierten keines der Gebäudeisolate. Mit Hilfe der genannten Sonden war somit keine Gattungszuordnung dieser Neuisolate möglich.

#### 4.8 *IN SITU* UNTERSUCHUNGEN IN ANREICHERUNGSKULTUREN VON AMMONIAKOXIDANTEN

Neben den Untersuchungen in den Reinkulturen von Ammoniakoxidanten (siehe Abschnitt 4.6, 4.7) sollte untersucht werden, ob eine Anwendung der AmoA- und AmoB-Antikörper auch in Anreicherungskulturen möglich war. Dazu wurde an zwei Wochen alten Anreicherungskulturen von Ammoniakoxidanten aus Belebtschlamm-, Teichsediment-, Boden- und Sandsteinproben (siehe Abschnitt 3.2.2) eine gekoppelte IF-Färbung mit den Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung unter Verwendung der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde NEU-CTE untersucht. Diese Sonde ist gegen fast alle getesteten Arten der Gattung *Nitrosomonas* gerichtet (siehe Abschnitt 3.17).

In den Anreicherungskulturen der Belebtschlammproben waren die mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbten Zellen freisuspendiert oder an Flockenmaterial gebunden. In den Flocken lagen die Zellen in Form von Mikrokolonien oder als Einzelzellen vor. Etwa 90 % der freisuspendierten DAPI-gefärbten Zellen wurden mit den Antikörpern gegen AmoA und AmoB angefärbt. Es wurde aufgrund der spezifischen IF-Färbung vermutet, dass die Zellen der Gattung *Nitrosomonas* angehörten. Nur etwa 5 % der freisuspendierten DAPI-gefärbten Zellen waren ausschließlich mit den AmoB-Antikörpern detektierbar. Diese Zellen konnten aufgrund der IF-Färbung und Morphologie der Gattung *Nitrospira* oder *Nitrosococcus* (der  $\beta$ -Proteobakterien) zugeordnet werden. In den Flocken wurden etwa 40 % der Einzelzellen und Zellen der Mikrokolonien mit den AmoA-Antikörpern angefärbt (Abb. 4.17). Im Gegensatz zur Markierung mit den AmoA-Antikörpern war die Markierung mit den AmoB-Antikörpern durch unspezifische Reaktionen der primären Antikörper an den Flocken beeinträchtigt. Es konnte nicht zwischen der roten Hintergrundfluoreszenz und der roten Fluoreszenz der Zellen differenziert werden (Abb. 4.17c). Die Zellen der Mikrokolonien und Einzelzellen wurden aufgrund der Färbung mit den AmoA-Antikörpern der Gattung *Nitrosomonas* zugerechnet. Aufgrund der unspezifischen Reaktion der AmoB-Antikörper mit dem Flockenmaterial konnten die Ammoniakoxidanten der übrigen Gattungen der  $\beta$ -Proteobakterien in der Flocke nicht detektiert werden.

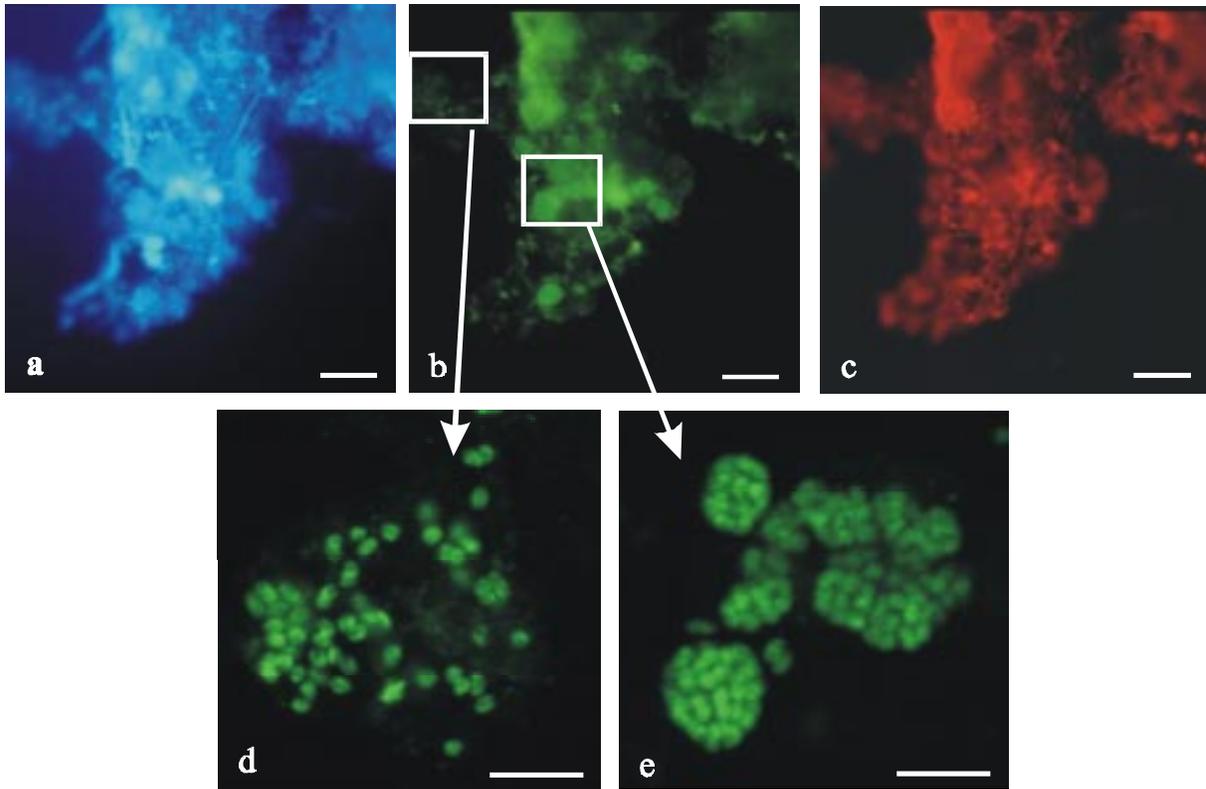


Abb. 4.17: Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB einer zwei Wochen alten Anreicherungskultur einer Belebtschlammprobe aus dem Klärwerk Dradenau in mineralischem Ammoniakoxidantenmedium. a, b, c) Darstellung einer Flocke d) Ausschnitte der Flocke mit Einzelzellen (Zoom 4,9) e) Ausschnitt der Flocke mit Mikrokolonien (Zoom 4,7) a) DAPI-Färbung b, d, e) IF-Färbung mit AmoA-Antikörpern c) IF-Färbung mit AmoB-Antikörpern. Größenbalken in a, b, c = 20  $\mu\text{m}$ , in d, e = 5  $\mu\text{m}$ . Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die DAPI-Färbung in (a) wurde mit dem Leica Filterset A (BP 340 –380 exc./RKP 400/LP 425 em.) aufgenommen. Die Grünfluoreszenz der Cy2-Färbung wurde mit dem Filter Set I 3 (BP 450-490 exc./RKP 510/LP 515 em.) und die Rotfluoreszenz der Cy3-Färbung mit dem Filter Set N 2.1 (BP 515-560 exc./RKP 580/LP 590 em.) dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerungen in (d, e) wurden mit dem CLSM bei einem unterschiedlichen Zoom aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (488 exc./BP 520-590 em.)).

Mit der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde NEU-CTE wurden, wie mit den AmoA-Antikörpern, etwa 90 % der freisuspendierten Zellen (Abb. 4.18a, b) sowie etwa 40 % der Einzelzellen und Zellen der Mikrokolonien in den Flocken gefärbt (Abb. 4.18c, d). Die spezifische Sondenfärbung lässt vermuten, dass in den Anreicherungskulturen der Belebtschlammproben viele Nitrosomonaden vorhanden waren. Allerdings kam es bei der Sondenfärbung zu leichten unspezifischen Reaktionen mit dem Flockematerial, so dass Hintergrundfluoreszenz auftrat. Diese war etwas stärker als die leichte Hintergrundfluoreszenz der IF-Färbung mit den AmoA-Antikörpern. Sie führten dazu, dass an einigen Stellen die rot fluoreszierenden Zellen nicht von der roten Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden konnten. Die unspezifischen Reaktionen traten vor allem im Inneren der Flocken auf (Abb. 4.18d). Allgemein war die Intensität der Sondenfärbung sehr viel schwächer als die IF-Färbung (Abb. 4.18b).

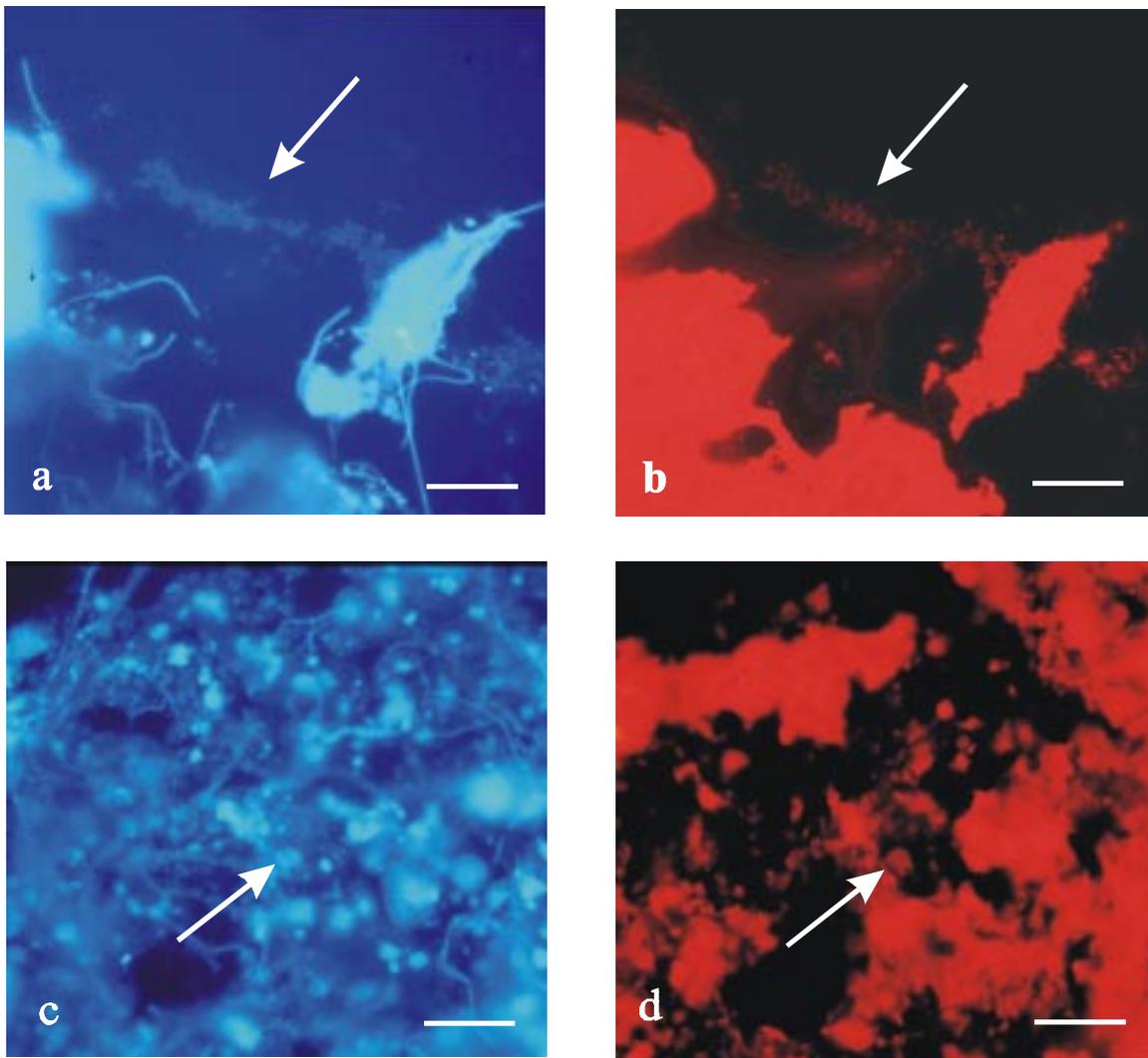


Abb. 4.18: *In situ*-Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde NEU-CTE einer zwei Wochen alten Anreicherungskultur einer Belebtschlammprobe aus dem Klärwerk Dradenau in mineralischem Ammoniakoxidantenmedium. a, b) Darstellung freisuspendierter Zellen (Pfeil) in der Nähe einer Flocke. c, d) Darstellung von Einzelzellen und Mikrokolonien (Pfeil) in der Flocke. a, c) DAPI-Färbung b, d) Sonden-Färbung. Größenbalken = 20  $\mu\text{m}$ . Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die DAPI-Färbung in (a, c) wurde mit dem Leica Filterset A (BP 340 –380 exc./RKP 400/LP 425 em.) aufgenommen. Die Rotfluoreszenz der Cy3-Färbung in (b, d) wurde mit dem Filter Set N 2.1 (BP 515-560 exc./RKP 580/LP 590 em.) dargestellt.

In den Anreicherungskulturen der Baumberger Sandsteinproben waren die DAPI-gefärbten Zellen überwiegend an Partikel gebunden. Die Zellen lagen als Einzelzellen vor. Etwa 68 % der DAPI-gefärbten Zellen wurden mit den Antikörpern gegen die AmoA und AmoB gefärbt. Durch die spezifische IF-Färbung wurden sie als Zellen der Gattung *Nitrosomonas* identifiziert (Abb. 4.19). Etwa 17 % der Zellen wurden nur mit den AmoB-Antikörpern gefärbt und konnten aufgrund ihrer Morphologie der Gattung *Nitrosospira* oder *Nitrosovibrio* zugeordnet werden (Abb. 4.20a). Das Anfärben der Zellen mit den AmoA- und AmoB-Antikörpern war auch in Gegenwart der Partikel möglich. Es kam nur zu geringfügiger Hintergrundfluoreszenz, von der sich die Zellen jedoch deutlich abhoben.

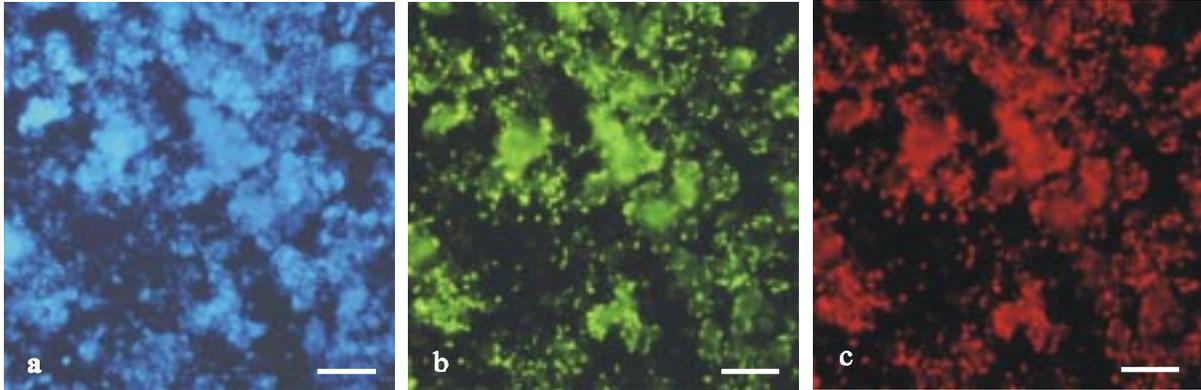


Abb. 4.19: Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB einer zwei Wochen alten Anreicherungskultur einer Baumberger Sandsteinprobe in mineralischem Ammoniakoxidantenmedium. a) DAPI-Färbung b) IF-Färbung mit AmoA-Antikörpern c) IF-Färbung mit AmoB-Antikörpern. Größenbalken = 20  $\mu\text{m}$ . Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die DAPI-Färbung in (a) wurde mit dem Leica Filterset A (BP 340 –380 exc./RKP 400/LP 425 em.) aufgenommen. Die Grünfluoreszenz der Cy2-Färbung in (b) wurde mit dem Filter Set I 3 (BP 450-490 exc./RKP 510/LP 515 em.) und die Rotfluoreszenz der Cy3-Färbung in (c) mit dem Filter Set N 2.1 (BP 515-560 exc./RKP 580/LP 590 em.) dargestellt.

Bei der Untersuchung der Anreicherungskulturen der Sandsteinproben mit der Sonde NEU-CTE kam es zu deutlichen, unspezifischen Reaktionen der Sonde mit den Sandsteinpartikeln. In Nähe der Partikel war es nicht möglich, die Fluoreszenz der unspezifischen Färbung von der Färbung der Zellen zu unterscheiden. Es wurden nur vereinzelt freisuspendierte Zellen markiert, die nicht in Verbindung mit Partikeln standen. Es konnte daher nur die Aussage getroffen werden, dass Nitrosomonaden in der Anreicherung vorhanden waren, aber nicht wie viele (nicht dargestellt).

In den Anreicherungskulturen der Teichsedimentproben lagen freisuspendierte Zellen und an Flockenmaterial gebundene Einzelzellen und Mikrokolonien vor. Insgesamt wurden etwa 25 % der DAPI-gefärbten Zellen mit Hilfe der gekoppelten IF-Färbung markiert. Etwa 50 % der freisuspendierten DAPI-gefärbten Zellen wurden mit Hilfe der AmoB-Antikörper gefärbt. Im Inneren der Flocken kam es mit den AmoB-Antikörpern im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern zu leichten unspezifischen Reaktionen. In den Flocken war somit keine Detektion mit den AmoB-Antikörpern möglich. Mit den AmoA-Antikörpern wurden nur vereinzelt freisuspendierte Zellen oder an Flockenmaterial gebundene Zellen detektiert. Aufgrund der spezifischen IF-Färbung mit den AmoB-Antikörpern und der Morphologie der Zellen wurden die freisuspendierten Ammoniakoxidanten fast ausschließlich der Gattung *Nitrosospira* zugeordnet (Abb. 4.20b).

Mittels FISH wurde mit der Sonde NEU-CTE keine Zellen detektiert (nicht dargestellt). Dieses stimmt mit den Ergebnissen der IF-Färbung und somit der Abwesenheit von *Nitrosomonas* in den Anreicherungskulturen der Teichsedimentproben überein.

In den Anreicherungskulturen der Bodenproben wurden mit der IF-Färbung etwa 85 % der DAPI-gefärbten Zellen detektiert. Die Zellen lagen häufig in Form von Einzelzellen vor und waren freisuspendiert oder an Bodenpartikel gebunden. Diese Zellen wurden fast ausschließlich nur mit den AmoB-Antikörpern und nicht mit den AmoA-Antikörpern gefärbt. Aufgrund der spezifischen IF-Färbung und der Morphologie der Zellen wurden diese überwiegend den Gattungen *Nitrospira* und *Nitrosolobus* zugeordnet (Abb. 4.20c). Darüber hinaus wurden coccoide Zellen gefärbt, die nicht eindeutig klassifiziert werden konnten. Kleine Zellen der Gattung *Nitrosolobus* erschienen in Reinkultur ebenfalls häufig coccoid, so dass es sich bei diesen Zellen entweder um Vertreter der Gattung *Nitrosolobus* oder *Nitrosococcus* (der  $\beta$ -Proteobakterien) handelte. Bei der gekoppelten IF-Färbung kam es zu einer leichten Reaktion der AmoB-Antikörper mit den Bodenpartikeln. Allerdings hoben sich die Zellen von der Hintergrundfluoreszenz deutlich ab.

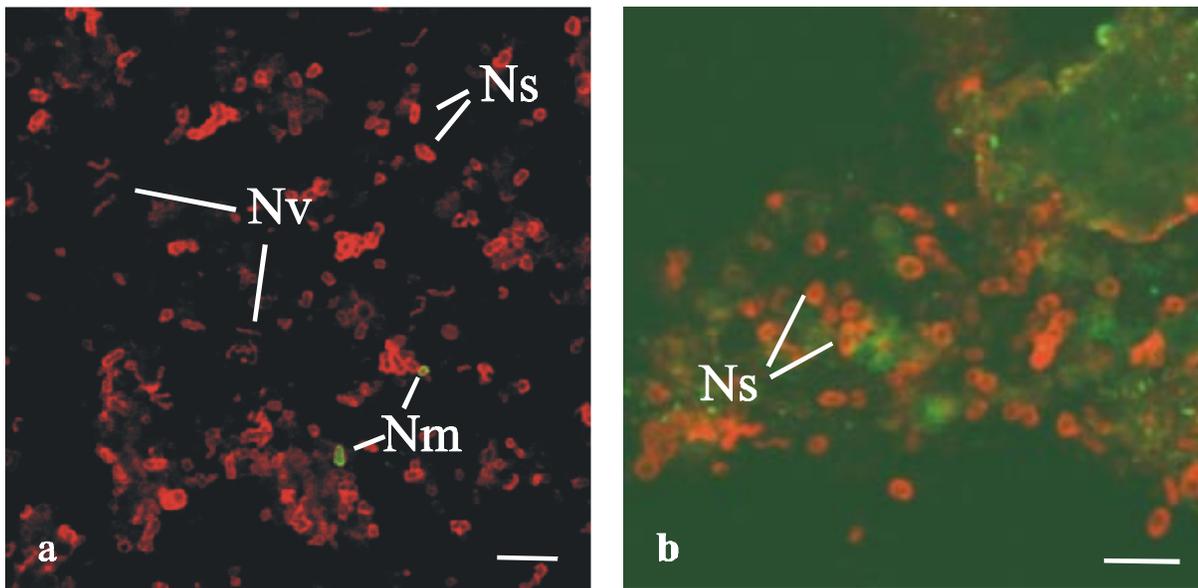
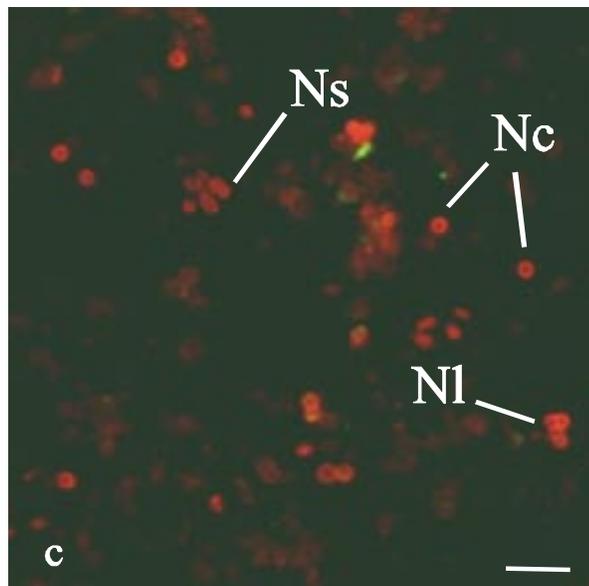


Abb. 4.20: Gekoppelte IF-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB von zwei Wochen alter Anreicherungskulturen in mineralischem Ammoniakoxidantenmedium. Es wurde a) Baumberger Sandstein, welcher 5 Jahre im Neuen Botanischen Garten Hamburg exponiert war (Zoom 1,9) b) Teichsediment des Neuen Botanischen Gartens Hamburg (Zoom 2,8) und c) Boden des Neuen Botanischen Gartens Hamburg (Zoom 2,3) angereichert. Gemeinsame Darstellung der Grünfluoreszenz der Cy2-gefärbten AmoA-Antikörper und der Rotfluoreszenz der Cy3-gefärbten AmoB-Antikörper. Größenbalken = 5  $\mu$ m. Es wurde ein Neofluotar Objektiv: 100x/1,4 Öl verwendet. Die IF-Färbungen wurden mit dem CLSM bei unterschiedlichen Zoom-Einstellungen aufgenommen (Leica TCS 4D, Argon-/Krypton-Laser (488/568 exc./Lp. 590 und BP 520-560 em.)). Nc = *Nitrosococcus* oder *Nitrosolobus*, Nl = *Nitrosolobus*, Nm = *Nitrosomonas*, Ns = *Nitrospira*, Nv = *Nitrosivibrio*.



Die Proben wurden ebenfalls mit der fluoreszenzmarkierten NEU-CTE-Sonde untersucht. Bei der Sondenfärbung kam es jedoch zu starken unspezifischen Reaktionen der Oligonukleotide mit den Bodenpartikeln. Mit den Sonden wurden keine freisuspendierten Zellen markiert (nicht dargestellt). Es konnte daher keine Aussage getroffen werden, ob Nitrosomonaden in den Proben vorhanden waren.

Die Ergebnisse der gekoppelten IF-Färbung und der *in situ*-Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde NEU-CTE der vier Anreicherungskulturen unterschiedlicher Naturproben sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Gekoppelte Immunfluoreszenz (IF)-Färbung mit Antikörpern gegen AmoA und AmoB und *in situ*-Hybridisierung mit der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde NEU-CTE an zwei Wochen alten Anreicherungskulturen von Naturproben. Es wurden Belebtschlammproben des Klärwerks Dradenau/Hamburg, Baumberger Sandsteinproben, die 5 Jahre im Neuen Botanischen Garten Hamburg exponiert waren sowie Teichsediment- und Bodenproben des Neuen Botanischen Gartens Hamburg untersucht. Die Anreicherung erfolgte in mineralischem Ammoniakoxidantenmedium. Aufgrund der spezifischen IF-Färbung und Morphologie der Zellen, war es möglich die Ammoniakoxidanten einer Gattung zuzuordnen.

Anreicherung	spezifische IF-Färbung	Oligonukleotidsonde NEU-CTE (Wagner et al., 1995)
Belebtschlamm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- etwa 90 % der freisuspendierten Zellen wurden mit AmoA- + AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> <li>- etwa 5 % der freisuspendierten Zellen wurden nur mit AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrospira</i> und <i>Nitrosococcus</i></li> <li>- in den Flocken wurden etwa 40 % der Zellen der Mikrokolonien und Einzelzellen mit den AmoA-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> <li>- in den Flocken kommt es mit den AmoB-AK zu unspezifischen Färbungen ⇒ keine Aussage, ob neben <i>Nitrosomonas</i> noch andere Gattungen vorkommen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Färbung von etwa 90 % der freisuspendierten Zellen sowie etwa 40 % der Einzelzellen und Zellen der Mikrokolonien der Flocken ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> <li>- leichte unspezifische Färbung der Flocken</li> </ul>
Sandstein	<ul style="list-style-type: none"> <li>- etwa 68 % der Zellen wurden mit den AmoA- + AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> <li>- etwa 17 % der Zellen wurden nur mit AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrospira</i> und <i>Nitrosovibrio</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- deutliche unspezifische Färbung mit den Sandsteinpartikeln ⇒ keine Aussage, ob an den Partikeln Nitrosomonaden vorkommen</li> <li>- es wurden nur wenige freisuspendierte Zellen mit der Sonde gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> </ul>
Teichsediment	<ul style="list-style-type: none"> <li>- etwa 50 % der freisuspendierten Zellen wurden nur mit AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrospira</i></li> <li>- nur vereinzelte Zellen wurden mit AmoA- + AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> <li>- in den Flocken kommt es mit den AmoB-AK zu unspezifischen Färbungen ⇒ keine Aussage, ob andere Gattungen als <i>Nitrosomonas</i> vorkommen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- es wurden keine Zellen gefärbt ⇒ <b>keine Nitrosomonaden</b></li> </ul>
Boden	<ul style="list-style-type: none"> <li>- etwa 85 % der Zellen wurden nur mit den AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrospira</i>, <i>Nitrosolobus</i> und <b>coccoide Ammoniakoxidanten</b></li> <li>- vereinzelte Zellen wurden mit AmoA- + AmoB-AK gefärbt ⇒ <i>Nitrosomonas</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- deutliche unspezifische Färbung mit den Bodenpartikeln ⇒ keine Aussage, ob <i>Nitrosomonas</i> vorkommt</li> </ul>

AK = Antikörper

## **4.9 IMMUNCYTOCHEMISCHER NACHWEIS DER AMOA UND AMOB MIT HILFE DER IMMUNGOLDMARKIERUNG**

Des weiteren sollten mit Hilfe der AmoA- und AmoB-Antikörper die Untereinheiten der AMO mittels immuncytochemischen Nachweises in der Zelle lokalisiert werden. Dazu wurden an Ultradünnschnitten von Ammoniakoxidanten Immungold (IG)-Markierungen der AmoA oder AmoB durchgeführt.

### **4.9.1 IG-MARKIERUNG DER AMOA**

Eine IG-Markierung des AmoA-Proteins in Ultradünnschnitten von *Nitrosomonas eutropha* N904 war nicht möglich. Die Reaktionen der primären AmoA-Antikörper war bei allen getesteten Versuchsbedingungen stets unspezifisch.

Es wurden zwei unterschiedliche Einbettungsmethoden der Zellen getestet (siehe Abschnitt 3.18.4.2). Die Zellen wurden entweder mit Formaldehyd fixiert und in Lowicryl<sup>®</sup> K4M eingebettet oder ohne vorherige Fixierung hochdruckgefroren und in Lowicryl<sup>®</sup> HM20 eingebettet. Zudem wurden unterschiedliche Einwirkzeiten von ein bis 16 Stunden und Verdünnungen von 1:50 bis 1:1250 der AmoA-Antikörper getestet.

Bei hohen Verdünnungen der primären Antikörper größer als 1:600 fanden sich keine Goldpartikel auf den Netzchen. Bei niedrigen Verdünnungen waren die Goldpartikel unregelmäßig über die Netzchen verteilt. Sie fanden sich sowohl außerhalb der Zellen als auch im Cytoplasma und an den intracytoplasmatischen Membranen (ICMs). In Kontrollexperimenten ohne die primären Antikörper wurden keine Zellen immuncytochemisch markiert (nicht dargestellt).

### **4.9.2 IG-MARKIERUNG DER AMOB**

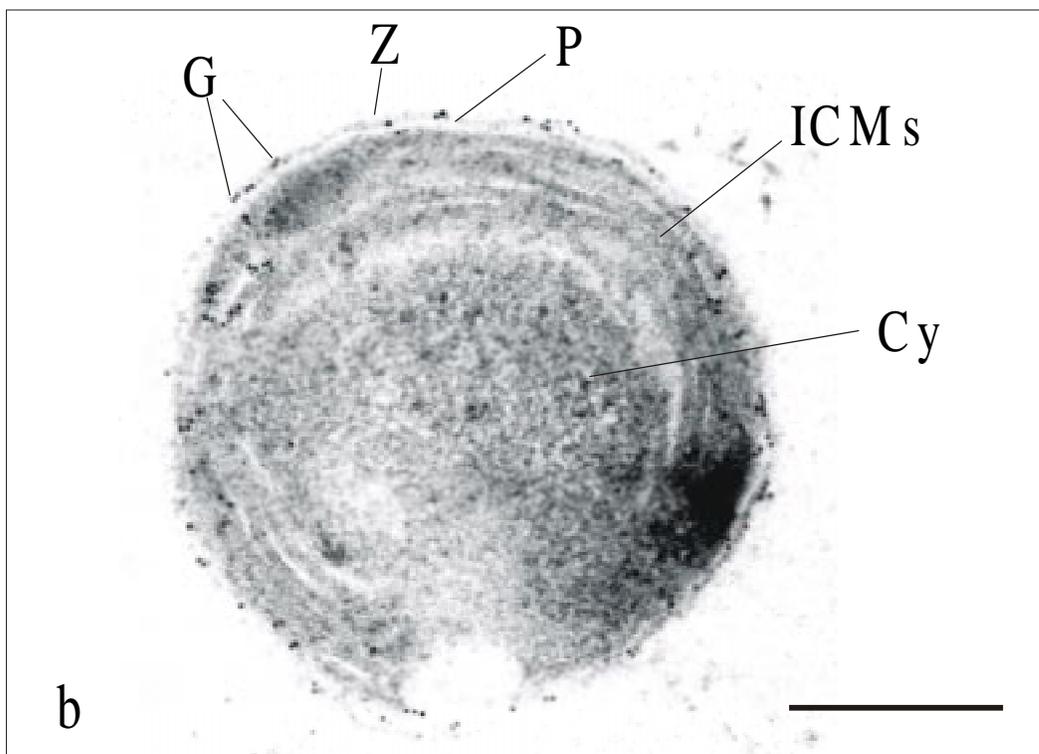
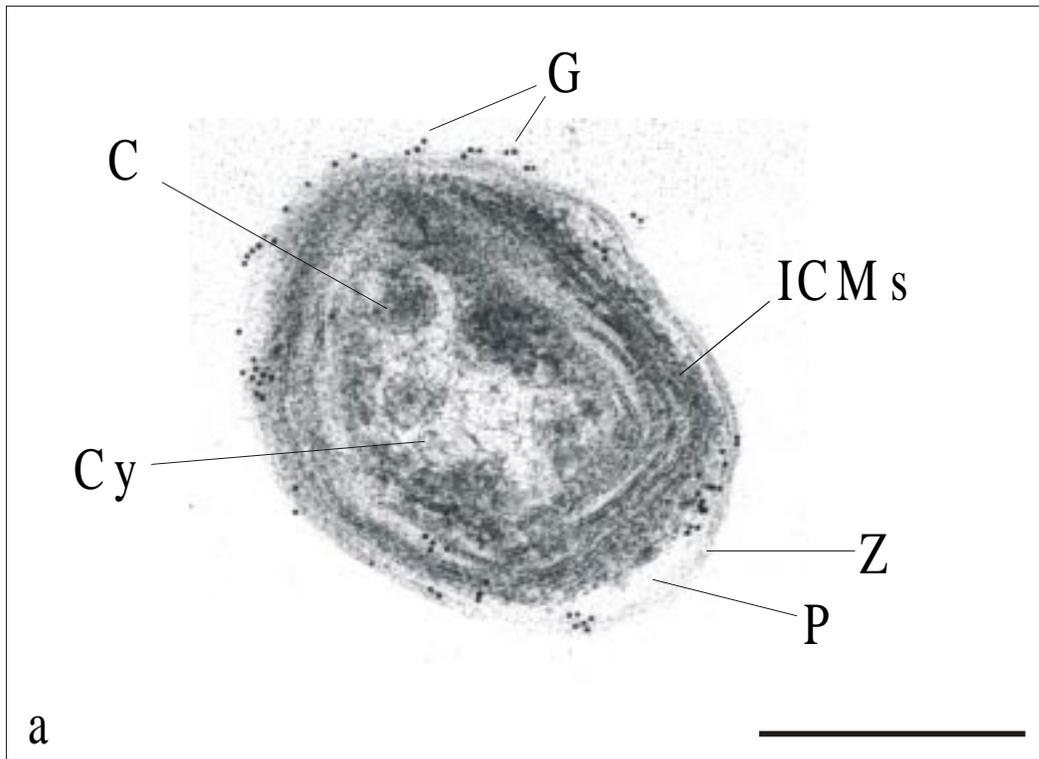
Das AmoB-Protein konnte durch den immuncytochemischen Nachweis mit Hilfe der AmoB-Antikörper in Ultradünnschnitten von *Nitrosomonas eutropha* N904 lokalisiert werden. Lithotroph angezogene Zellen der exponentiellen Wachstumsphase waren zuvor bei tiefen Temperaturen in Lowicryl<sup>®</sup> K4M eingebettet worden. In den Ultradünnschnitten waren die ringförmig, parallel zur Zellperipherie angeordneten intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) deutlich zu erkennen (Abb. 4.21a). Die 10 nm großen elektronendichten Goldpartikel markierten hauptsächlich die Zellperipherie. Insgesamt wurden die Goldpartikel von ca. 300 Ultradünnschnitten vier verschiedener Einbettungen ausgezählt. Etwa  $92 \pm 6$  % der IG-Markierung fand sich in Nähe der äußeren Cytoplasmamembran. Nur etwa  $7 \pm 6$  % der Goldpartikel waren mit den ICMs verbunden (Abb. 4.21a). Wenige Goldpartikel befanden

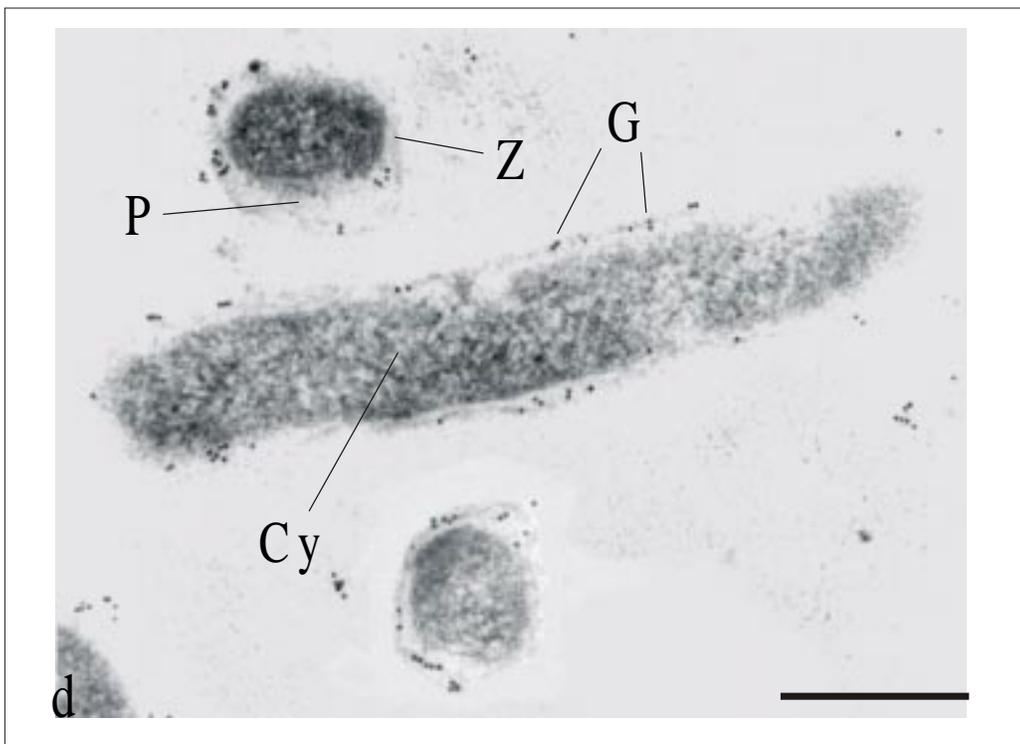
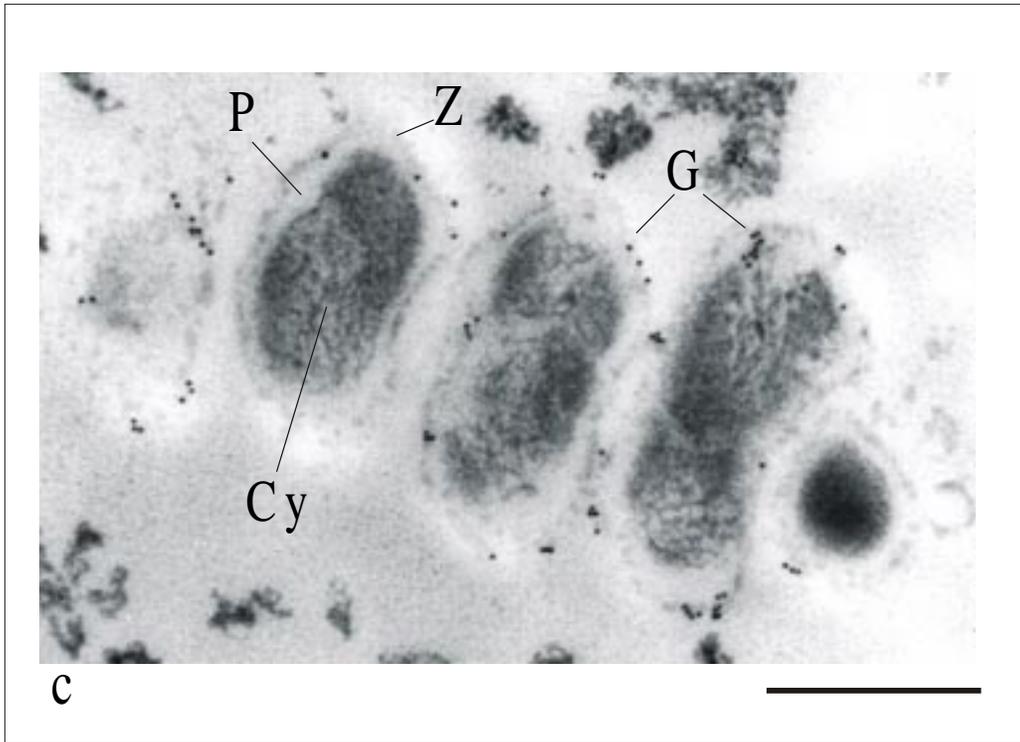
sich im Cytoplasma und außerhalb der Zellen. In Kontrollexperimenten ohne die primären Antikörper wurden keine Zellen immunocytochemisch markiert (nicht dargestellt).

Neben *Nitrosomonas eutropha* N904 wurde jeweils ein Vertreter der übrigen vier Gattungen der Ammoniakoxidanten immunocytochemisch untersucht. Zudem wurden Untersuchungen an dem Methanoxidanten *Methylococcus capsulatus* Bath und dem Nitritoxidanten *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> durchgeführt. Alle Vertreter der Gattungen *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien wurden mit den AmoB-Antikörpern deutlich markiert (Abb. 4.21b-e). Dagegen traten bei den immunocytochemischen Untersuchungen in den Zellen von *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 (Abb. 4.21f) und *Methylococcus capsulatus* Bath (nicht dargestellt) der  $\gamma$ -Proteobakterien nur vereinzelt Goldpartikel auf. Die Zellen von *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> wurde mit den AmoB-Antikörpern nicht markiert (nicht dargestellt).

In den Zellen von *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 waren die ICMs parallel zur Zellperipherie angeordnet (Abb. 4.21b). Wie bei *Nitrosomonas eutropha* N904 befanden sich die Goldpartikel nach einer IG-Markierung überwiegend in der Nähe der äußeren Cytoplasmamembran. Dagegen wurden die ICMs nur selten markiert (Abb. 4.21b). Im Gegensatz zu *Nitrosomonas eutropha* N904 und *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 besaßen Zellen von *Nitrospira* spec. G1.6 und *Nitrosovibrio* spec. K7.1 keine ICMs (Abb. 4.21c, d). Bei beiden waren die Goldpartikel deutlich in der Zellperipherie angeordnet. Die Goldmarkierungen folgten in den Zellen von *Nitrospira* spec. G1.6 den spiralig gewundenen Zellgrenzschichten (Abb. 4.21c) bzw. in den Zellen von *Nitrosovibrio* spec. K7.1 den gewölbten Zellgrenzschichten (Abb. 4.21d). In Abb. 4.21c ist der Längsschnitt einer Zelle von *Nitrospira* spec. G1.6 mit fünf Windungen abgebildet, in dem die Einzelabschnitte der Zelle getrennt voneinander erscheinen. In den Zellen von *Nitrosolobus multiformis* N1 13 war das Cytoplasma durch die ICMs partiell kompartimentiert (Abb. 4.21e). Die Goldpartikel befanden sich in der Zellperipherie und entlang der Kompartimentierung der Zelle (Abb. 4.21e). In den Zellen von *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 traten ICMs auf. Diese waren im Gegensatz zu *Nitrosomonas eutropha* N904 und *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 in Form eines Membranstapels zentral angeordnet (Abb. 4.21f). Die IG-Markierung von *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 fiel bei gleicher Verdünnung der AmoB-Antikörper schwächer aus, als die IG-Markierung der Zellen der übrigen Gattungen der Ammoniakoxidanten. Die Goldpartikel befanden sich überwiegend in der Zellperipherie und traten nur sehr selten in Verbindung mit dem zentralen Membranstapel auf (Abb. 4.21f). Wie in den Zellen von *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 waren die ICMs in den Zellen von *Methylococcus capsulatus* Bath zentral angeordnet. Jedoch waren in den Zellen des Methanoxidanten zwei bis drei Membranstapel vorhanden (nicht dargestellt). Ähnlich der IG-Markierung von *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 wurden die Zellen des Methanoxidanten

*Methylococcus capsulatus* Bath mit den AmoB-Antikörpern nur schwach markiert. Die Goldpartikel traten auch dort stets in der Zellperipherie und selten an den zentral angeordneten Membranstapeln auf (nicht dargestellt). Auch in den Zellen von *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> wurden ICMs in Form polarer Kappen ausgebildet. Die Zellen wurden mit den AmoB-Antikörpern jedoch nicht markiert (nicht dargestellt).





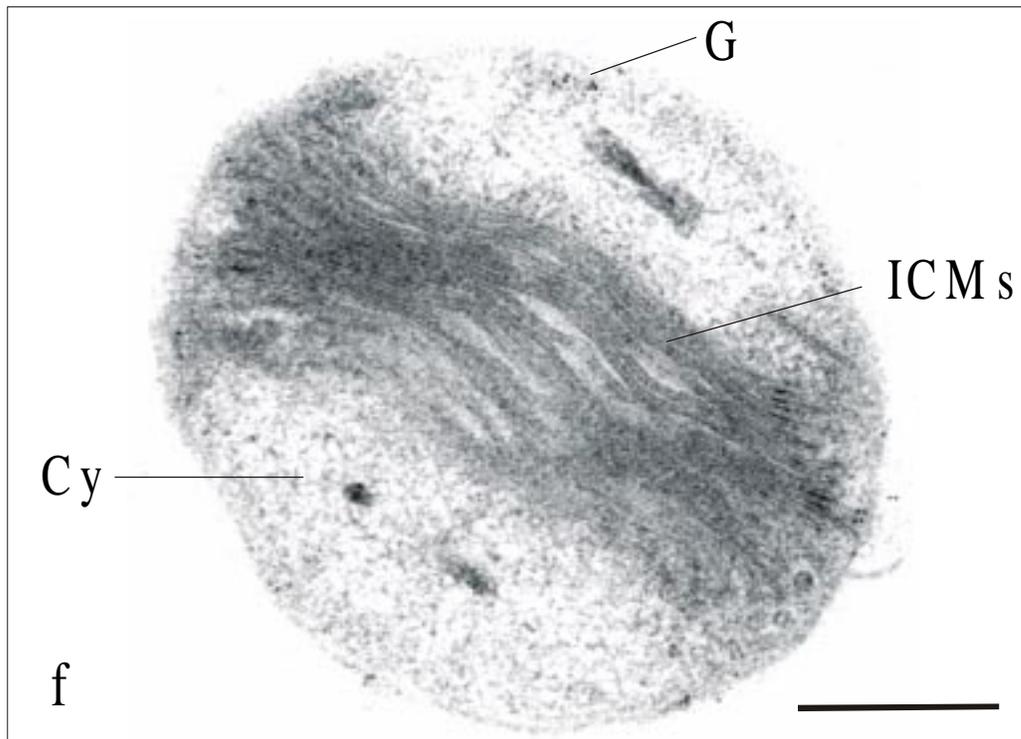
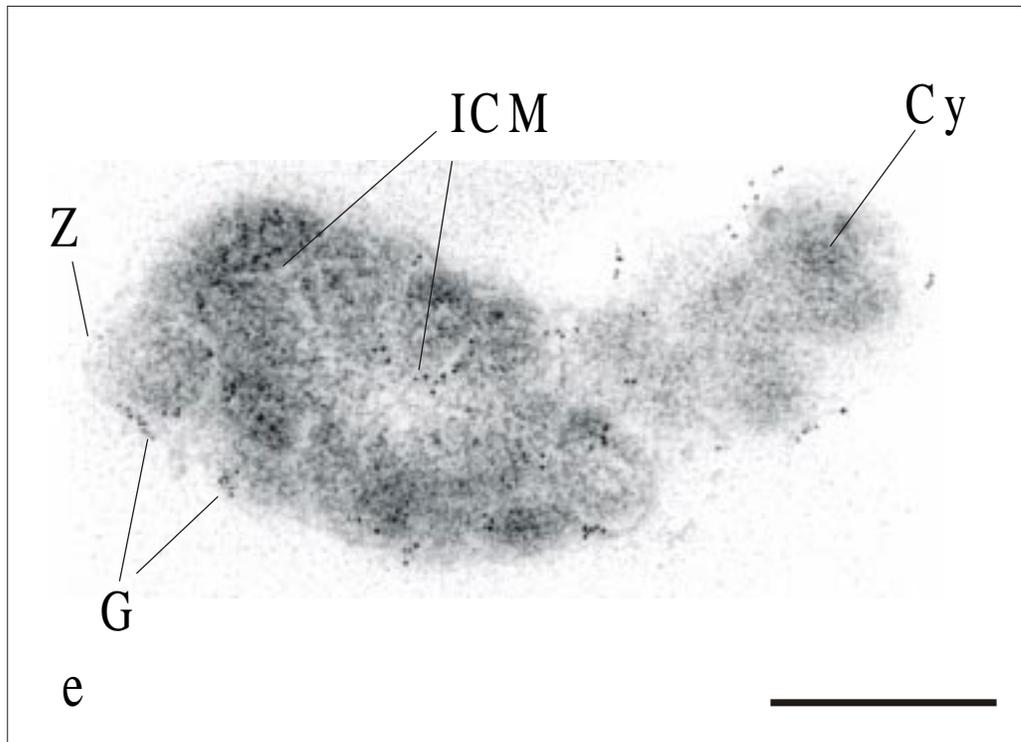


Abb. 4.21: Immuncytochemischer Nachweis der AmoB. Immungoldmarkierung an Ultradünnschnitten nach Einbettung in Lowicryl® K4M bei  $-35^{\circ}\text{C}$  von a) *Nitrosomonas eutropha* N904, Vergrößerung 79.200fach b) *Nitrosococcus mobilis* Nc 2, Vergrößerung 64.400fach c) *Nitrospira* spec. G1.6, Vergrößerung 61.200fach d) *Nitrosovibrio* spec. K7.1, Vergrößerung 63.000fach e) *Nitrosolobus multiformis* Nl 13, Vergrößerung 63.700fach f) *Nitrosococcus halophilus* Nc 4, Vergrößerung 65.800fach. Aufnahme der Zellen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (Fa. Philips, Modell 420). Größenbalken  $0,4\ \mu\text{m}$ . C = Carboxysom, Cy = Cytoplasma, G = 10 nm große Goldpartikel, ICM = intracytoplasmatische Membranen, P = perimplasmatischer Raum, Z = Zellwand.

#### 4.10 ÜBERBLICK ÜBER DIE IMMUNOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN MIT DEN ANTIKÖRPERN

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den Antikörpern gegen die AmoA und AmoB in der Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Tabelle vergleicht die Ergebnisse, die mit den Methoden des Immunblots, der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung und des immunocytochemischen Nachweises an Reinkulturen erzielt wurden (siehe Abschnitt 4.4, 4.6, 4.9).

Im Westernblot wurden mit den AmoA-Antikörpern vier Arten der Gattung *Nitrosomonas* detektiert. Es wurde das AmoA-Protein der halotoleranten Arten *N. eutropha* und *N. europaea*, die halophile Art *N. halophila* und die marine Art *N. aestuarii* markiert. Bei der IF-Färbung konnten mit diesen Antikörpern hingegen alle beschriebenen Arten von *Nitrosomonas* gefärbt werden. Eine IG-Markierung von *N. eutropha* war mit den AmoA-Antikörpern nicht möglich.

Die Antikörper gegen die AmoB wiesen im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern ein breiteres Wirkungsspektrum auf. Im Immunblot, bei der IF-Färbung und bei der IG-Markierung detektierten sie das AmoB-Protein aller getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Darüber hinaus markierten die AmoB-Antikörper bei der IF-Färbung die beiden Arten der Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus* sowie den nahe verwandten Methanoxidanten *Methylococcus capsulatus* schwach. Die AmoB von *Nitrosococcus oceani* und die B-Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase (pMMOB) von *Methylococcus capsulatus* wurde zudem mit den AmoB-Antikörpern immunocytochemisch nachgewiesen.

Tabelle 4.5: Untersuchungen von Ammoniakoxidanten, Methanoxidanten, Nitritoxidanten und verschiedenen chemoorganotrophen Bakterien mit den Antikörpern gegen AmoA und AmoB im Westernblot, bei der IF-Färbung und im immuncytochemischen Nachweis.

Art	Stamm	Westernblot		IF-Färbung		IG-Markierung	
		AmoA- AK	AmoB- AK	AmoA- AK	AmoB- AK	AmoA- AK	AmoB- AK
Ammoniakoxidanten der $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien							
<i>Nitrosomonas aestuarii</i>	Nm 36	+	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas communis</i>	Nm 2	-	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	Nm 55	-	+	+/-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Freitag	+	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	N904	+	+	+	+	<b>n.n.</b>	+
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Dave	+	+	+	+	n.b.	+
<i>Nitrosomonas halophila</i>	Nm 1	+	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas marina</i>	Nm 22	-	+	+/-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	Nm 90	-	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	Nm 45	-	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas spec.</i>	Nm R1.24	-	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosomonas ureae</i>	Nm 10	-	+	+	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Nc 2	-	+	-	+	n.b.	+
<i>Nitrospira spec.</i>	Nsp 1	-	+	-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrospira spec.</i>	Nsp G1.6	-	+	-	+	n.b.	+
<i>Nitrospira spec.</i>	Nsp M1.3	-	+	-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrospira spec.</i>	Nsp R6.2	-	+	-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosovibrio spec.</i>	Nv G1.3	-	+	-	+	n.b.	n.b.
<i>Nitrosovibrio spec.</i>	Nv K7.1	-	+	-	+	n.b.	+
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	Nl 13	-	+	-	+	n.b.	+
Ammoniakoxidanten der $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien							
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	Nc 4	-	-	-	+/-	n.b.	+/-
<i>Nitrosococcus oceani</i>	Nc 1	-	-	-	+/-	n.b.	n.b.
Methanoxidanten der $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien							
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Bath	-	-	-	+/-	n.b.	+/-
<i>Methylomonas methanica</i>	Oo52006	-	-	-	-	n.b.	n.b.
Methanoxidanten der $\alpha$ -Unterklasse der Proteobakterien							
<i>Methylocystis parvus</i>	4a	-	-	-	-	n.b.	n.b.
Nitritoxidanten							
<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	X <sub>14</sub>	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Nitrobacter vulgaris</i>	K <sub>48</sub>	-	-	-	-	n.b.	-
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Engel	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Nitrospina gracilis</i>	3	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Nitrospina spec.</i>	347	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Nitrospira moscoviensis</i>	M-1	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Nitrococcus mobilis</i>	231	-	-	-	-	n.b.	n.b.
verschiedene chemoorganotrophe Bakterien							
<i>Achromobacter cycloclaste</i>		-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GM 19023	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC 8750	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Azorhizobium spec.</i>	24	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Azospirillum lipoferum</i>	ATCC 29707	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Bacillus azotoformans</i>	ATCC 29788	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Bacillus subtilis</i>	019	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Bradyrhizobium denitrificans</i>		-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Chromobacterium violaceum</i>		-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 23716	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ATCC 19367	-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Paracoccus denitrificans</i>		-	-	-	-	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas spec.</i>	AK15	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas spec.</i>	AM1	-	-	-	-	n.b.	n.b.

+ = positive Reaktion, +/- = leichte Reaktion, - = keine Reaktion mit den Antikörpern  
AK = Antikörper, n.b. = nicht bestimmt, **n.n.** = nicht nachweisbar

#### 4.11 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN VON *N. EUTROPHA*

Im Rahmen der folgenden Untersuchungen wurde überprüft, welchen Einfluss die Ammoniumkonzentration im Anzuchtsmedium auf die Ultrastruktur der Zellen von *N. eutropha* N904 hat.

Zellen, die in mineralischem Medium mit 1 bzw. 10 mM Ammonium angezogen wurden, hatten deutliche ringförmige, parallel zur Zellperipherie angeordnete intracytoplasmatische Membranen (ICMs) (Abb. 4.22a, b). Dagegen waren die ICMs in Zellen, die mit 100 mM Ammonium kultiviert wurden, weniger deutlich ausgeprägt (Abb. 4.22c). Allgemein kann festgestellt werden, dass die Anzahl der Membranen bei Anzucht der Zellen in Gegenwart geringer Ammoniumkonzentrationen deutlich höher war, als bei Anzucht in Gegenwart hoher Ammoniumkonzentrationen. Zellen, die mit wenig Ammonium (1 mM) gewachsen waren, enthielten durchschnittlich 4,5 ICMs pro Querschnitt. Zellen, die mit 10 mM bzw. 100 mM Ammonium angezogen wurden, besaßen durchschnittlich 2,8 ICMs bzw. 2,0 ICMs pro Querschnitt. Es wurden 200 Zellen ausgezählt. In den Zellen, die mit 10 mM und 100 mM Ammonium angezogen wurden, traten gehäuft elektronendichte Einschlusskörper auf, bei denen es sich vermutlich um Glykogen ähnliche Reservestoffe handelt. Außerdem waren im Cytoplasma der Zellen polyedrische Carboxysomen, Ribosomen und Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure (PHB) zu erkennen.

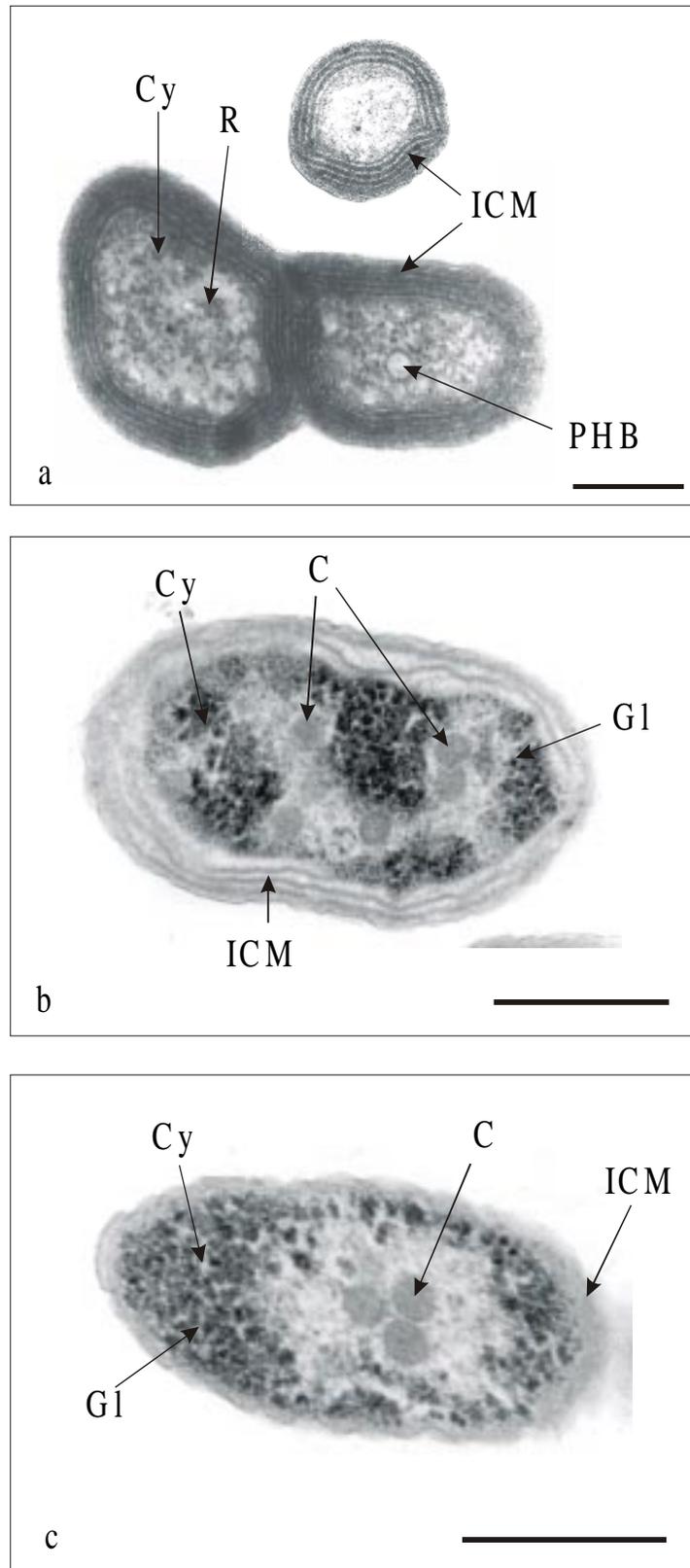


Abb. 4.22: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von *N. eutropha* N904 nach Einbettung in Spurr. Die Zellen wurden in Gegenwart von a) 1 mM Ammonium b) 10 mM Ammonium und c) 100 mM Ammonium in mineralischem Medium angezogen. Vergrößerungen (a) 41.800fach, (b) 51.400fach, (c) 63.000fach. Größenbalken = 0,4  $\mu\text{m}$ . C = Carboxysomen, Cy = Cytoplasma, Gl = Glykogen, ICM = intracytoplasmatische Membranen, PHB = Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure und R = Ribosomen.

## 4.12 ISOLIERUNG DER AMMONIAKMONOOXYGENASE

Neben den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen immunologischen Untersuchungen an ganzen Zellen und zellfreien Extrakten der Ammoniakoxidanten, wurde im Folgenden mit Hilfe der Antikörper versucht, die Ammoniakmonooxygenase (AMO) aus *Nitrosomonas eutropha* N904 zu isolieren. Die Antikörper ermöglichten dabei während der Isolierung die Identifizierung des Enzyms. Die AMO wurde mittels Ionenaustauschchromatographie angereichert und mit einer anschließenden Gradientenzentrifugation gereinigt.

### 4.12.1 IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE

Zellfreie Extrakte lithoautotroph angezogener Zellen von *N. eutropha* N904 der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei pH 7,5 auf eine anionische Ionenaustauschsäule aufgetragen. Die Proteine, die nicht an die positiv geladene Matrix gebunden haben, wurden fraktioniert gesammelt. In Abb. 4.23 sind die Proteinkonzentrationen und die Absorption bei 550 nm der nichtbindenden Fraktionen eines Versuches exemplarisch dargestellt.

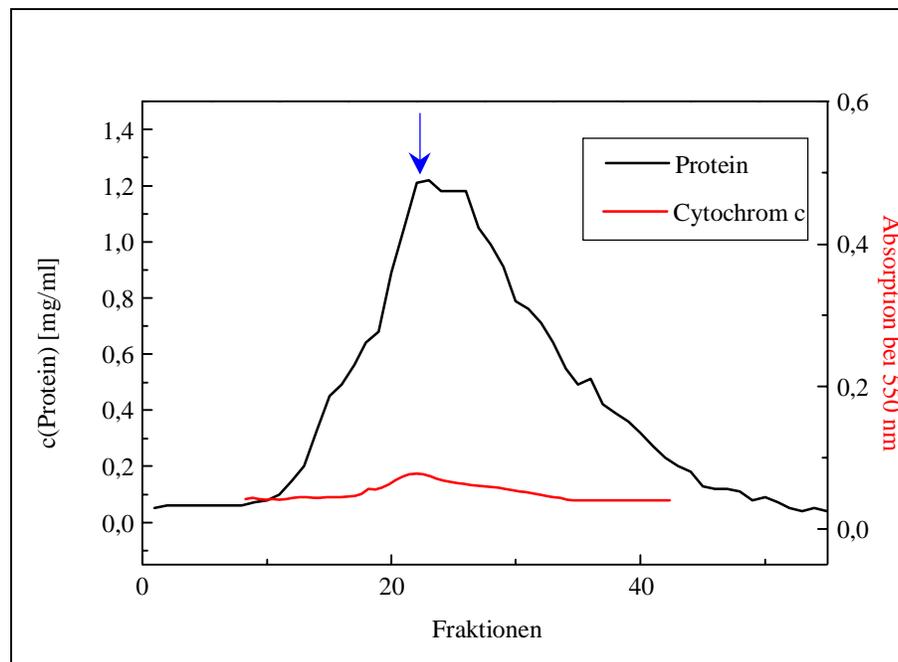


Abb. 4.23: Proteinkonzentration und Absorption bei 550 nm der 1-ml-Fractionen, die während der Auftragung zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 auf die DEAE-Säule (HiPrep® 16/10 DEAE) nicht an die positiv geladene Matrix der Säule gebunden haben. Die Absorption bei 550 nm gibt die Cytochrom c-Konzentration wieder. Für diesen Versuch wurde zellfreier Extrakt von 1 g Zellen in 5 ml Probenpuffer aufgenommen, aufgeschlossen, mit 1,65 ml 20%iger Triton-X-100-Lösung versetzt und unverdünnt mit einer absoluten Proteinmenge von 99 mg auf die Säule aufgetragen. Nach der Probenauftragung wurde die Säule mit Startpuffer gespült. Während der Spülung wurde die Sammlung der Fraktionen fortgeführt (siehe Abschnitt 3.20.1). Die mit einem Pfeil (↓) markierte Fraktion 23 wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen, immunologisch im Westernblot untersucht sowie zur weiteren Reinigung der AMO mit Hilfe der Gradientenzentrifugation verwendet (siehe Abschnitt 4.12.2).

In den Fraktionen 12 bis 50 waren Proteine mit einer Gesamtproteinmenge von 15,8 mg vorhanden. Bei Auftragung einer Anfangsproteinmenge von 99 mg entsprach dieses einem Proteinanteil von 15,9 %. Bis zur Fraktion 23 kam es zu einer Zunahme der Proteinkonzentration, die in den weiteren Fraktionen wieder abnahm (Abb. 4.23). Die nicht an die Säule bindenden Proteine hatten eine leichte Rotfärbung und absorbierten Licht der Wellenlänge von 550 nm. Da die Absorption bei 550 nm die Cytochrom c-Konzentration wiedergibt, kann daraus geschlossen werden, dass die Fraktionen c-Cytochrome enthielten. Die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration (Fraktion 23, Pfeil in Abb. 4.23) wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Im Gel trat in dieser Fraktion fast ausschließlich ein 41-kDa- und ein 27-kDa-Protein auf (Abb. 4.24a). Die Proteine kamen etwa im Verhältnis 1:1 vor. In sehr geringer Konzentration wurde zudem ein 30-kDa-Protein detektiert. Mit Hilfe des Immunblots wurde nachgewiesen, dass es sich bei den beiden Hauptproteinen um die AmoA und AmoB handelte (Abb. 4.24b). Daraus kann geschlossen werden, dass die AMO mit Hilfe der anionischen Ionenaustauschchromatographie stark angereichert werden kann. Da die AMO bei einem pH-Wert von 7,5 nicht an die positiv geladene Säule gebunden hat, ist der isoelektrische Punkt der AMO größer als pI 7,5.

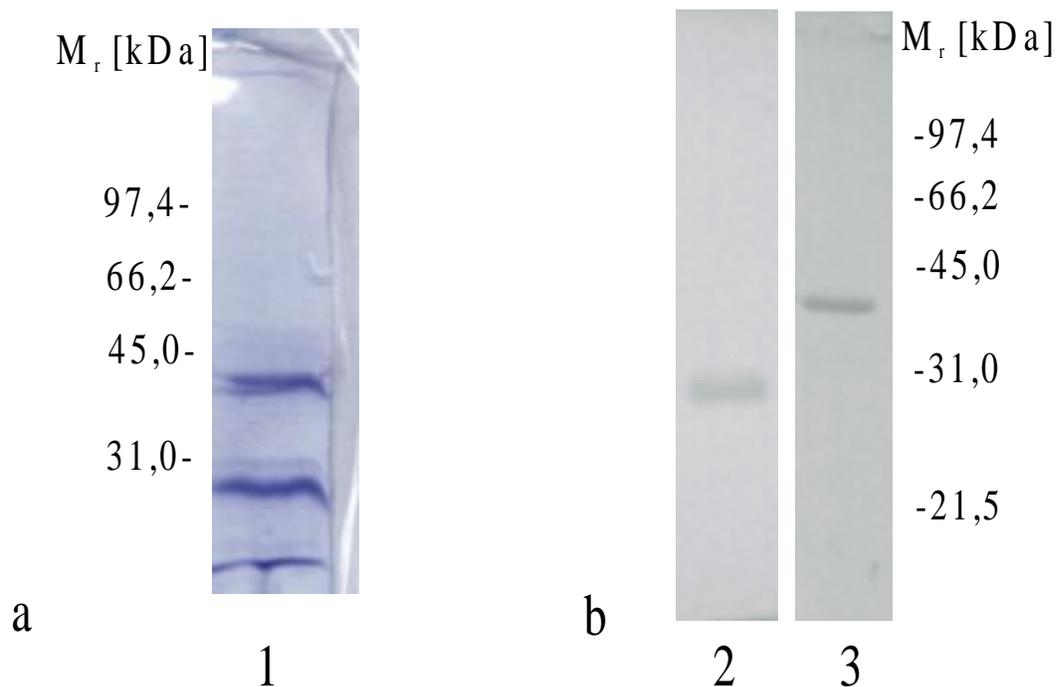


Abb. 4.24: a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12 % Polyacrylamid) der Fraktion 23 (Spur 1), die während der Auftragung zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 auf die DEAE-Säule (HiPrep® 16/10 DEAE) gesammelt wurde. b) Westernblot mit AmoA-Antikörpern (Spur 2) und AmoB-Antikörpern (Spur 3) der Fraktion 23. Im SDS-Gel wurden 15 µg Protein, im Westernblot 4 µg Protein pro Spur aufgetragen. Molekulargewichtsstandards sind schematisch links neben dem Gel bzw. rechts neben dem Blot dargestellt.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa.

Nach dem Vorlauf wurden die Proteine, die an die Säule gebunden hatten, mittels eines Salzgradienten eluiert und fraktioniert gesammelt. In Abb. 4.25 sind die Proteinkonzentration und die Absorption bei 550 nm der eluierten Fraktionen eines Versuches exemplarisch dargestellt.

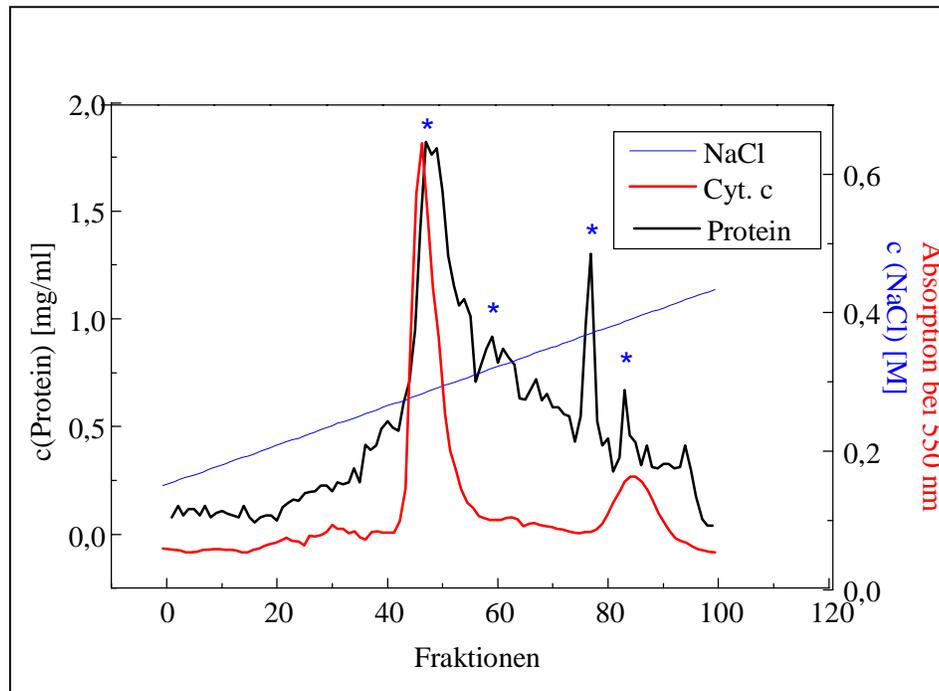


Abb. 4.25: Proteinkonzentration und Absorption bei 550 nm der Fraktionen, die mittels Salzgradient nach Auftragung der zellfreien Extrakte von *N. eutropha* N904 von der DEAE-Säule (HiPrep® 16/10 DEAE) eluiert wurden. Die Absorption bei 550 nm gibt die Cytochrom c-(Cyt c)-Konzentration wieder. Für diesen Versuch wurde zellfreier Extrakt von 1 g Zellen mit einer absoluten Proteinmenge von 87 mg auf die Säule aufgetragen. Die mit Sternchen (\*) gekennzeichneten Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und immunologisch im Westernblot untersucht.

Im Eluat waren mehrere Proteinpeaks zu erkennen. Die Fraktionen 44 und 83 waren deutlich rot gefärbt, sie absorbierten Licht der Wellenlänge von 550 nm und enthielten somit Cytochrom c. Die Fraktionen 44, 59, 78 und 83 (\* in Abb. 4.25) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 4.26) und im Westernblot mit Antikörpern gegen die AmoA und AmoB untersucht. In Fraktion 44 traten Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa, 46 kDa und 27 kDa deutlich hervor. In Fraktion 59 war ein 46-kDa- und 27-kDa-Protein zu erkennen. In Fraktion 78 wurden 22, 23, 27 und 46 kDa große Proteine detektiert. In Fraktion 83 wurde ein 30-kDa-Protein angereichert. Mit Hilfe des Immunblots konnte in keiner dieser Fraktionen ein AmoA- oder AmoB-Protein nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Aufgrund der Molekulargewichte der Proteine und des hohen Gehaltes an c-Cytochromen wurde vermutet, dass es sich bei der Fraktion 44 um eine Anreicherung der Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO) handelte. Das in dieser Fraktion angereicherte 46-kDa-Protein ist vermutlich ein zusätzliches c-Hämprotein, welches häufig zusammen mit der HAO isoliert wurde (DiSpirito et al., 1985 a). Das in Fraktion 83 angereicherte 30-kDa-Protein

könnte das Cytochrom c-Tetrahämprotein  $c_{M552}$  sein (Whittaker et al., 2000). Dieses Protein wurde im SDS-Gel in Form einer 30-kDa-Bande detektiert (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse der Elution zeigen, dass die Untereinheiten der AMO nicht an die anionische Säule binden.

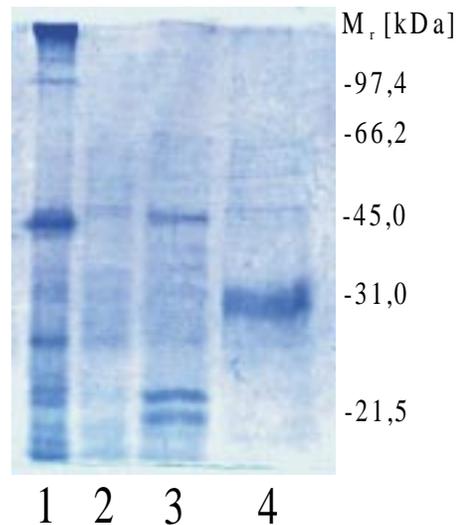


Abb. 4.26: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12 % Polyacrylamid) der Proteine, die mittels Salzgradienten nach Auftragung zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 von der DEAE-Säule (HiPrep® 16/10 DEAE) eluiert wurden. Es wurde zellfreier Extrakt von 1 g Zellen mit einer absoluten Proteinmenge von 87 mg auf die Säule aufgetragen. Spur 1: Fraktion 44, Spur 2: Fraktion 59, Spur 3: Fraktion 78, Spur 4: Fraktion 83. Pro Spur wurden 15 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Molekulargewichtsstandards sind rechts wiedergegeben.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa.

#### 4.12.2 GRADIENTENZENTRIFUGATION

Die mit Hilfe der Säulenchromatographie angereicherte AMO wurde mittels Gradientenzentrifugation gereinigt. Dazu wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration der angereicherten AMO (entsprechend Fraktion 23 in Abschnitt 4.12.1) mit Hilfe eines linearen Saccharosegradienten (10-35 % Saccharose) aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.20.2). In Abb. 4.27 ist exemplarisch ein typischer Saccharosegradient schematisch dargestellt. Die Fraktionen F1 und F2a zeigten eine deutliche orange Färbung. Die Fraktion F2b war milchig trüb und das Sediment P hellbraun gefärbt. Aus den absoluten Proteinmengen der Fraktionen war ablesbar, dass sich 17 % des aufgetragenen Proteins in der Fraktion F1 und F2a und 78 % in dem Sediment P wiederfanden.

Fraktion		Protein [ $\mu$ g]	Saccharose [%]
F1		237	10-13
F2a		109	13-15
F2b		43	15-16
F3		29	16-19
F4		0	19-23
F5		0	23-26
F6		0	26-29
F7		0	29-32
P		1698	32-35

Abb. 4.27: Schematische Darstellung eines mit der angereicherten AMO beaufschlagten linearen Saccharosegradienten (10-35 %) nach 19 h Zentrifugation bei 4 °C und 120.000 g. Die AMO wurde zuvor mittels anionischer Ionenaustauschromatographie aus zellfreien Extrakten von *N. eutropha* N904 angereichert und durch Gefriertrocknung aufkonzentriert. Es ist die absolute Proteinmenge sowie die Saccharosekonzentration der Fraktionen dargestellt.

Die Proteine der Fraktionen F1, F2a, F2b und das Sediment P wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie-Blaufärbung sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Peroxidasefärbung wurden zusätzlich kovalent an Proteine gebundene Hämgruppen und somit c-Cytochrome gefärbt. Zudem wurden die genannten Fraktionen im Immunblot mit Antikörpern gegen die AmoA und AmoB untersucht.

Anhand der Peroxidasefärbung wurde deutlich, dass in den orange gefärbten Fraktionen F1 und F2a Cytochrome des c-Typs mit einem Molekulargewicht von 67 kDa und in geringer Konzentration mit einem Molekulargewicht von 40 kDa vorkamen (Abb. 4.28). In diesen Fraktionen wurde neben den Hämproteinen ein 27-kDa- und 30-kDa-Protein detektiert. In der Fraktion F2b wurde ein 27-kDa-Protein jedoch keine Cytochrome nachgewiesen. Aufgrund der deutlichen milchigen Trübung der Fraktion F2b und der geringen Proteinkonzentration wird vermutet, dass in dieser Fraktion Speicherstoffe wie z. B. Glykogen vorhanden waren. Im Sediment P wurden ebenfalls keine Cytochrome detektiert. Dort traten die für die AMO charakteristischen Proteine, ein 27-kDa- und ein 41-kDa-Protein, in hohen Konzentrationen auf. Dabei war das 41-kDa-Protein in etwas höherer Konzentration vorhanden als das 27-kDa-Protein. Neben diesen Proteinen wurden in geringen Konzentrationen Proteine im 54-, 80- und 100-kDa-Bereich detektiert (Abb. 4.28).

Mit Hilfe des Immunblots mit AmoA-Antikörpern wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem 27-kDa-Protein aller Fraktionen um die AmoA handelte (Abb. 4.29a). Im Sediment P wurden neben dem 27 kDa großen AmoA-Protein auch Proteine mit einem Molekulargewicht von 54, 80 und 100 kDa mit den AmoA-Antikörpern markiert. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesen Proteinen um die dimere, tertiäre und tetramere Aggregationsform der AmoA. Diese Aggregationsformen waren auch bei der Hitzebehandlung des Rohextraktes von *N. eutropha* N904 mit den AmoA-Antikörpern im Westernblot nachweisbar (nicht dargestellt).

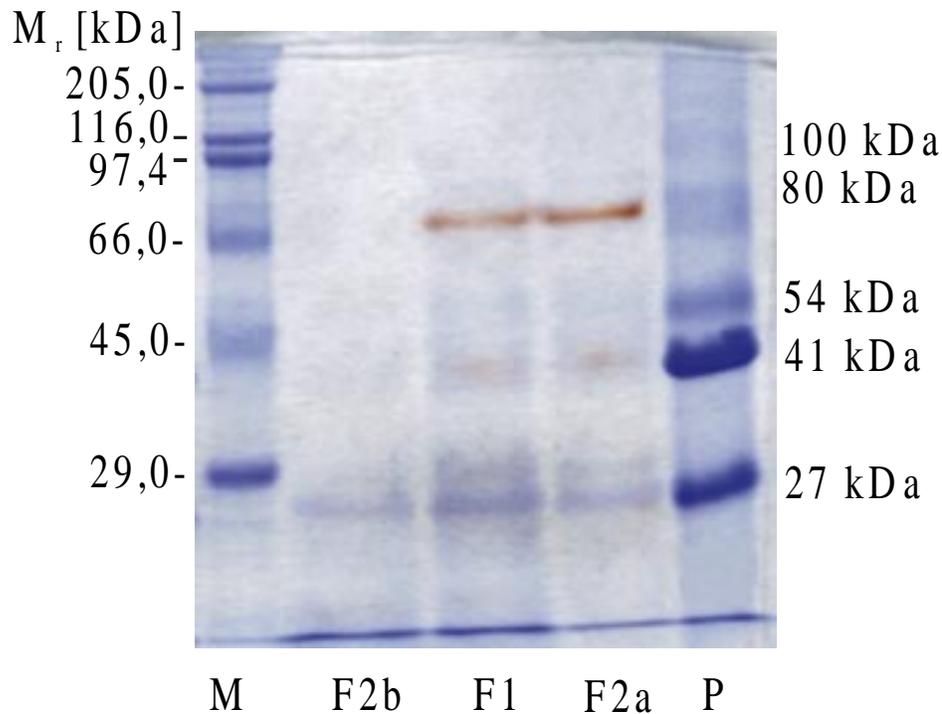


Abb. 4.28: Elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen F1, F2a, F2b und des Sedimentes P aus dem linearen Saccharosegradienten (10-35 %). Das SDS-Gel (12 % Polyacrylamid) wurde anschließend mit der Peroxidase- und Coomassie-Färbung gefärbt. Die Peroxidase-Färbung ist an der braunen Färbung der Banden und die Coomassie-Färbung ist an der blauen Färbung der Banden zu erkennen. Pro Spur wurden 15 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Molekulargewichtsstandards sind in der Spur M dargestellt.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa.

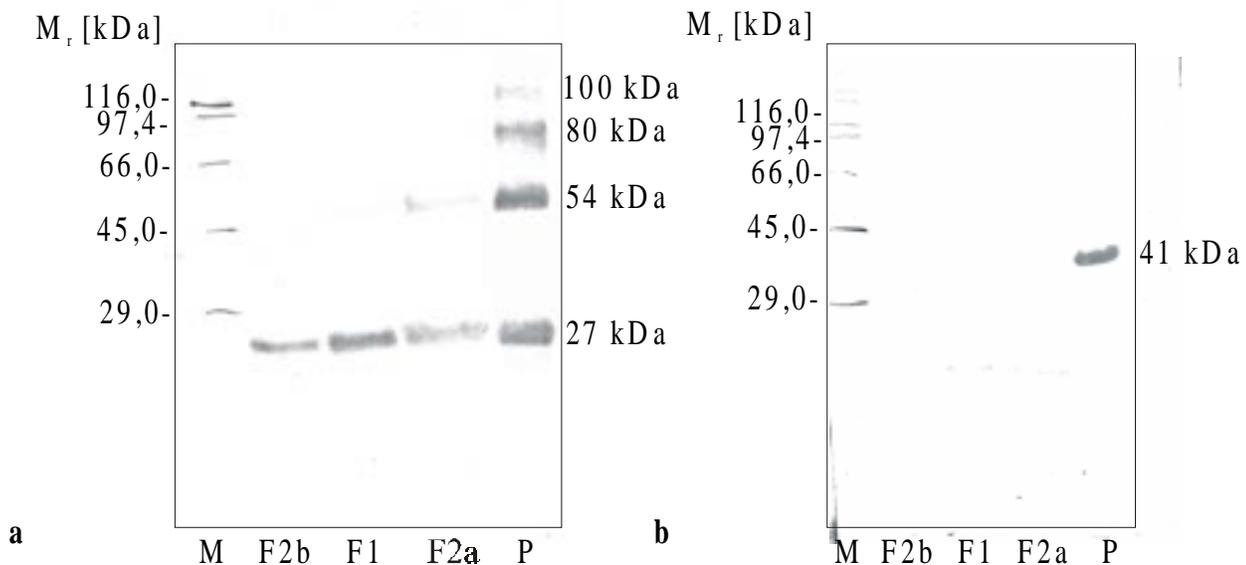


Abb. 4.29: Westernblot mit Antikörpern gegen AmoA (a) und AmoB (b) von Proteinen der Fraktionen F1, F2a, F2b und des Sedimentes P des linearen Saccharosegradienten (10-35 %). Pro Spur wurden 4 µg Protein aufgetragen. Die Molekulargewichtsstandards sind in den Spuren M aufgetragen.  $M_r$  = relative Molekülmasse in kDa.

Dabei traten sie nach einer Inkubation für 10 min bei 65 °C bzw. 5 min bei 100 °C in Gegenwart von Lysispuffer der SDS-PAGE auf.

Mit Hilfe der AmoB-Antikörper wurde nachgewiesen, dass es sich bei dem 41-kDa-Protein im Sediment P um die AmoB handelte (Abb. 4.29b). In den anderen Fraktionen wurde kein AmoB-Protein detektiert. Im Gegensatz zur AmoA traten keine Aggregate des AmoB-Proteins auf, obwohl auch das AmoB-Protein beim Erhitzen in Gegenwart von Reduktionsmitteln aggregierte (nicht dargestellt).

Damit wurde gezeigt, dass mittels Dichtegradientenzentrifugation eine Reinigung der AMO möglich war. Verunreinigende Cytochrome des c-Typs und ein 30-kDa-Protein wurden bei niedrigen Dichten zurückgehalten, während sich die gereinigte AMO im Sediment wiederfand. Anhand der Proteinmengen (Abb. 4.27) und der Intensität der Bandenfärbungen im SDS-Gel (Abb. 4.28) konnte ermittelt werden, dass der Anteil an c-Cytochromen und des 30-kDa-Proteins in der angereicherten AMO vor der Reinigung mit der Gradientenzentrifugation etwa 6 % betrug.

#### **4.13 NACHWEIS DER AMMONIAKOXIDATIONSAKTIVITÄT**

Im Folgenden wurde untersucht, ob die angereicherte Ammoniakmonooxygenase (AMO) in der Lage war, Ammoniak zu oxidieren. Es wurde die Ammoniakoxidationsaktivität ganzer Zellen von *N. eutropha* N904 gemessen und anschließend die Aktivität zellfreier Extrakte getestet. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit zellfreien Systemen ermöglichten die Entwicklung eines Enzymtests für die angereicherte AMO (siehe auch Block, 2001). Es wurden die spezifische aerobe und die anaerobe (Schmidt & Bock, 1997) Ammoniakoxidationsaktivität getestet. Bei den Aktivitätstests wurden Substanzen wie  $Mg^{2+}$ , Phosphate, NADH, Rinderserumalbumin (BSA) und  $Cu^{2+}$  eingesetzt, für die schon in vorausgegangenen Tests eine Aktivitätssteigerung der Ammoniakoxidation beschrieben wurde (Loveless & Painter, 1968; Suzuki & Kwok, 1970; Suzuki et al., 1981). In Gegenwart dieser Substanzen war eine Bestimmung von Ammonium und somit die Aktivitätsbestimmung über den Ammoniumverbrauch nicht möglich. Die spezifische Aktivität wurde daher über die Nitribildung und/oder Hydroxylaminbildung gemessen. Pro Versuchsansatz wurde die Aktivität zweier paralleler Proben bestimmt.

##### **4.13.1 AKTIVITÄT GANZER ZELLEN**

In fünf Versuchsansätzen besaßen 1 bis  $3 \cdot 10^8$  Zellen/ml über einen Zeitraum von 4 h eine spezifische aerobe Ammoniakoxidationsaktivität von 500 bis 13.000  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die aerobe Aktivität ganzer Zellen schwankte somit erheblich. Der für die folgenden

Berechnungen eingesetzte Mittelwert der Ammoniakoxidationsaktivitäten lag bei  $5.366 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Über diesen Zeitraum kam es zu einer kontinuierlichen Nitritbildung. In zellfreien Kontrollen wurde kein Nitrit gebildet (nicht dargestellt).

In einer anaeroben Stickstoffatmosphäre mit 25 ppm Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) bzw. Distickstofftetraoxid ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) wiesen  $8 \cdot 10^9$  Zellen/ml in zwei Versuchsansätzen über einen Zeitraum von 80 h eine spezifische anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität von 120 bis  $190 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  auf. Der Mittelwert der Aktivitäten lag bei  $155 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Über diesen Zeitraum kam es zu einer kontinuierlichen Nitritbildung. Die kontinuierliche chemische Nitritbildung in den Kontrollen, die durch die Reaktion von  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  mit Wasser bedingt war, wurde bei den ermittelten Aktivitäten berücksichtigt.

Anaerob in Gegenwart von  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  war die spezifische Aktivität ganzer Zellen somit deutlich geringer als aerob in Gegenwart von Sauerstoff.

#### 4.13.2 AKTIVITÄT ZELLFREIER EXTRAKTE

Die zellfreien Extrakte von *N. eutropha* N904 wurden aus ganzen Zellen hergestellt, deren spezifische Aktivität bekannt war (vergleiche Abschnitt 4.13.1). Zunächst erfolgte die Charakterisierung des verwendeten Puffers. Es wurde der Einfluss von Rinderserumalbumin (BSA) und des Detergenzes Triton X-100 geprüft. Triton X-100 wurde bei der säulenchromatographischen Anreicherung der AMO eingesetzt. Zudem wurde der Einfluss von Sauerstoff auf das zellfreie System getestet. Es wurden die Aktivitäten nach einem Aufschluss der Zellen unter oxischen und anoxischen Bedingungen miteinander verglichen.

Ein Nachweis der aeroben und anaeroben Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte war nur in Gegenwart der Substanzen  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , NADH und Proteaseinhibitoren möglich (siehe Abschnitt 3.21). In Abwesenheit dieser Substanzen wurde keine Aktivität nachgewiesen. Über einen Versuchszeitraum von 4 bis 5 h war die Nitritbildung der zellfreien Extrakte konstant. Die spezifischen Aktivitäten waren von der eingesetzten Proteinkonzentration mit 1,5 bis 3 mg/ml unabhängig. Ohne den Zusatz von BSA wurden aerob Aktivitäten von 30 bis  $173 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  gemessen. Die Aktivitäten zellfreier Extrakte unterlagen somit in Gegenwart von Sauerstoff deutlichen Schwankungen. Anaerob in Gegenwart von 25 ppm  $\text{NO}_2$  bzw.  $\text{N}_2\text{O}_4$  besaßen zellfreie Extrakte Aktivitäten von 12 bis  $15 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Tabelle 4.6). Durch die Zugabe von BSA zu den zellfreien Extrakten konnte sowohl die aerobe als auch die anaerobe Aktivität in etwa verdoppelt werden (Tabelle 4.6). In den zellfreien Kontrollen wurde aerob kein Nitrit gebildet. In Gegenwart von  $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  kam es in den Kontrollen zu einer geringfügigen Nitritbildung, die bei den ermittelten anaeroben Aktivitäten berücksichtigt wurde. In den zellfreien Extrakten wurde kein Hydroxylamin gebildet.

Tabelle 4.6: Spezifische aerobe und anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 in Gegenwart von Luftsauerstoff bzw. in Gegenwart von 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Die Zellen wurden aerob aufgeschlossen. Die Aktivitätstests wurden in PS1-Puffer mit und ohne den Zusatz von 10 mg/ml BSA über einen Zeitraum von 4 bis 5 h durchgeführt. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1,5 bis 3 mg/ml eingesetzt. Die relative Fehlergrenze der Parallelen in den Versuchsansätzen lag bei ± 5 %.

Atmosphäre	Anzahl der Ansätze	Zusatz	Aktivität NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [μmol · g Protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ]	
			von bis	Mittelwert
O <sub>2</sub> (21 %)	3	kein BSA	30-173	79
O <sub>2</sub> (21 %)	7	BSA	68-217	154
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	2	kein BSA	12-15	14
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	5	BSA	14-104	38

Die mittleren Aktivitäten der zellfreien Extrakte waren in Gegenwart von Sauerstoff in etwa fünfmal höher als in Gegenwart von 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Die zellfreien Extrakte wiesen in etwa 3 % der aeroben Aktivität und in etwa 25 % der anaeroben Aktivität ganzer Zellen auf.

Wurden die zellfreien Extrakte in Abwesenheit von Sauerstoff hergestellt, konnte keine aerobe Ammoniakoxidationsaktivität gemessen werden. Dagegen wurde die anaerobe Aktivität der zellfreien Extrakte durch den Zellaufschluss unter anoxischen Bedingungen erheblich gesteigert (Tabelle 4.7). Demnach ist die AMO nach einem anaeroben Zellaufschluss sauerstoffempfindlich. Die höchste Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte mit durchschnittlich 184 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> · g Protein<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> wurde nach einem anaeroben Zellaufschluss in Gegenwart von NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gemessen (Tabelle 4.7). Sie war sogar höher als die anaerobe Aktivität ganzer Zellen.

Tabelle 4.7: Spezifische aerobe und anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 in Gegenwart von Luftsauerstoff bzw. in Gegenwart von 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Die Zellen wurden aerob oder anaerob aufgeschlossen. Die Aktivitätstests wurden über einen Zeitraum von 4 bis 5 h durchgeführt. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1,5 bis 3 mg/ml eingesetzt. Die relative Fehlergrenze der Parallelen in den Versuchsansätzen lag bei ± 5 %.

Atmosphäre	Anzahl der Ansätze	Zellaufschluss	Aktivität NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [μmol · g Protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ]	
			von bis	Mittelwert
O <sub>2</sub> (21 %)	7	aerob	68-217	154
O <sub>2</sub> (21 %)	4	anaerob	0	0
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	5	aerob	14-104	38
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	4	anaerob	0-370	184

Das Detergenz Triton X-100 hatte in jedem Fall einen hemmenden Einfluss auf die spezifische Ammoniakoxidationsaktivität. In Gegenwart von Triton X-100 im Startpuffer der Säulenchromatographie (siehe Abschnitt 3.20.1) wurde die aerobe und anaerobe Aktivität der zellfreien Extrakte in etwa um die Hälfte verringert (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Spezifische aerobe und anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte von *N. eutropha* N904 in Gegenwart von Luftsauerstoff bzw. in Gegenwart von 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Die Zellen wurden aerob aufgeschlossen. Die Aktivitätstests wurden in PS1-Puffer oder Startpuffer der Säulenchromatographie (siehe Abschnitt 3.20.1) über einen Zeitraum von 4 bis 5 h durchgeführt. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1,5 bis 3 mg/ml eingesetzt. Die relative Fehlergrenze der Parallelen in den Versuchsansätzen lag bei ± 5 %.

Atmosphäre	Anzahl der Ansätze	Puffer	Aktivität NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [μmol · g Protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ]	
			von bis	Mittelwert
O <sub>2</sub> (21 %)	7	PS1-Puffer	68-217	154
O <sub>2</sub> (21 %)	4	Startpuffer mit Triton X-100	0-211	71
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	5	PS1-Puffer	14-104	38
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	5	Startpuffer mit Triton X-100	3-91	24

#### 4.13.3 AKTIVITÄT ANGEREICHERTER AMMONIAKMONOOXYGENASE

Darauffolgend wurde untersucht, ob die mit Hilfe der Säulenchromatographie angereicherte Ammoniakmonooxygenase (AMO) Ammoniak zu Hydroxylamin oxidieren konnte. Dazu wurde mit den Fraktionen, die die Proteine AmoA und AmoB enthielten, ein Aktivitätstest durchgeführt. Die AMO wurde aus ganzen Zellen bzw. zellfreien Extrakten angereichert, deren Aktivitäten bekannt waren (vergleiche Abschnitt 4.13.1 bzw. 4.13.2).

In den oben angegebenen Puffern konnte in Gegenwart von Triton X-100 erstmals eine Ammoniakoxidationsaktivität angereicherter AMO über die Bildung von Hydroxylamin nachgewiesen werden. In einem Versuchszeitraum von 3,5 bis 4,5 h kam es in einigen Versuchsansätzen zu einer konstanten Hydroxylaminbildung. Eine Nitritbildung trat nicht auf. In enzymfreiem PS1-Puffer sowie in Eluaten der Säulenchromatographie ohne AmoA- und AmoB-Protein wurde kein Hydroxylamin gebildet.

Die aeroben und anaeroben spezifischen Hydroxylaminbildungsraten waren nach Anreicherung der AMO in Gegenwart von Sauerstoff mit durchschnittlich 9 bzw. 10 μmol NH<sub>2</sub>OH · g Protein<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> in etwa gleich hoch (Tabelle 4.9). Wenn die AMO in Abwesenheit von Sauerstoff angereichert wurde, war die aerobe Ammoniakoxidation im Gegensatz zur anaeroben Ammoniakoxidation deutlich gehemmt (Tabelle 4.9). Auch die angereicherte AMO war somit nach einer Isolierung unter anoxischen Bedingungen sauerstoffempfindlich.

Tabelle 4.9: Spezifische aerobe Ammoniakoxidationsaktivität in Gegenwart von Luftsauerstoff und anaerobe Aktivität in Gegenwart von 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> angereicherter AMO aus *N. eutropha* N904. Die AMO wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie unter oxischen oder anoxischen Bedingungen angereichert. Die Zellen wurden zuvor aerob aufgeschlossen. Die Aktivitätstests wurden über einen Zeitraum von 4 bis 5 h durchgeführt. Es wurden Proteinkonzentrationen der AMO-Fraktion von 1,2 bis 2,6 mg/ml eingesetzt. Die relative Fehlergrenze der Parallelen in den Versuchsansätzen lag bei ± 5 %.

Atmosphäre	Anzahl der Ansätze	Säule	Aktivität NH <sub>2</sub> OH [μmol · g Protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ]	
			von bis	Mittelwert
O <sub>2</sub> (21 %)	6	aerob	0-21	9
O <sub>2</sub> (21 %)	7	anaerob	0-9	2
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	6	aerob	2-24	10
NO <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (25 ppm)	8	anaerob	3-26	10

Wurden die angereicherten AMO-Fractionen vor der Zugabe von Ammonium, das heißt vor dem Start des Aktivitätstests, 10 min in Gegenwart von 5 mM NADH inkubiert, so wurde die spezifische Hydroxylaminbildung in etwa um die Hälfte verringert (nicht dargestellt).

In weiterführenden Versuchen wurde bei der Anreicherung der AMO anstelle des Detergenzes Triton X-100 das Detergenz Dodecyl-β-D-maltosid verwendet. In Gegenwart dieses Detergenzes kam es zu keiner Steigerung der spezifischen Aktivität, denn nach beiden Anreicherungsmethoden wurden ähnliche Hydroxylaminbildungsraten der AMO gemessen (nicht dargestellt).

Obwohl die AMO mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie deutlich angereichert wurde (Abschnitt 4.12), kam es zu keiner Steigerung der spezifischen Ammoniakoxidationsaktivität, sie nahm bei der Anreicherung der AMO sogar deutlich ab (Tabelle 4.10). In Gegenwart von Sauerstoff besaßen zellfreie Extrakte von *N. eutropha* N904 in Startpuffer etwa 1,3 % und die angereicherte AMO etwa 0,2 % der mittleren aeroben Aktivität ganzer Zellen. In Gegenwart von NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> wiesen zellfreie Extrakte in Startpuffer dagegen etwa 15,5 % und das isolierte Enzym etwa 6,5 % der mittleren anaeroben Aktivität ganzer Zellen auf.

Tabelle 4.10: Abnahme der spezifischen aeroben und anaeroben Ammoniakoxidationsaktivität bei der Anreicherung der AMO von *N. eutropha* N904 mit Hilfe der Säulenchromatographie.

	mittlere spezifische Aktivität [NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> bzw. NH <sub>2</sub> OH μmol · g Protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> ]	Aktivität [%] bezogen auf die Aktivität ganzer Zellen
<b>aerobe Aktivität in Gegenwart von Sauerstoff</b>		
ganze Zellen	5.366	100
zellfreie Extrakte <sup>1</sup>	71	1,3
angereicherte AMO <sup>2</sup>	9	0,2
<b>anaerobe Aktivität in Gegenwart von Stickstoffdioxid 25 ppm NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.</b>		
ganze Zellen	155	100
zellfreie Extrakte <sup>1</sup>	24	15,5
angereicherte AMO <sup>2</sup>	10	6,5

<sup>1</sup> Die Zellen wurden aerob aufgeschlossen. Die Messung der Aktivität erfolgte in Startpuffer mit dem Detergenz Triton X-100

<sup>2</sup> Die Anreicherung der AMO erfolgte mit einer aeroben Säule

## 4.14 CHARAKTERISIERUNG DER AMMONIAKMONOOXYGENASE

In den folgenden Untersuchungen wurde die Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *N. eutropha* N904 biochemisch charakterisiert. Dazu wurde ein Absorptionsspektrum des Enzyms erstellt. Zudem wurde die relative Molekülmasse mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese bestimmt, und es wurde der Gehalt an Kupfer und Eisen ermittelt. Weiterhin wurde die AMO elektronenmikroskopisch visualisiert. Die Untersuchungen wurden entweder an der mit Hilfe der Säulenchromatographie angereicherten AMO oder an der mittels Gradientenzentrifugation gereinigten AMO durchgeführt.

### 4.14.1 ABSORPTIONSSPEKTRUM

Es wurde ein Absorptionsspektrum von der gereinigten AMO aufgenommen. Die Absorptionmessung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen mit Natriumdithionit bei Raumtemperatur. Im Absorptionsspektrum der gereinigten AMO war das für Proteine charakteristische Absorptionsmaximum bei 290 nm deutlich zu erkennen (Abb. 4.30). Zusätzlich trat eine schwache Bande bei 409 nm auf. In der Ausschnittsvergrößerung wurden zwei weitere Banden bei 523 nm und 552 nm sichtbar. Diese Banden sind charakteristische Absorptionsmaxima von Cytochromen des c-Typs, insbesondere Cytochrom  $c_{552}$  (Lemberg & Barrett, 1973). Cytochrom  $c_{552}$  von *Nitrosomonas europaea* besitzt im reduzierten Zustand eine  $\alpha$ -Bande bei 552 nm, eine  $\beta$ -Bande bei 523 nm und eine  $\gamma$ -Bande bei 416 nm (Yamanaka & Shinra, 1974). Die Intensität der  $\alpha$ -Bande bei 552 nm war mit einer Extinktion von 0,018 sehr gering. Mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $30.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  der  $\alpha$ -Bande des Cytochrom  $c_{552}$  von *Nitrosomonas europaea* (Yamanaka & Shinra, 1974) errechnet sich eine Cytochrom c-Konzentration von  $0,59 \mu\text{M}$ . Bei Einsatz einer Proteinkonzentration von  $1 \text{ mg/ml}$  (siehe Abschnitt 3.22) ergibt sich für das  $10 \text{ kDa}$  große Cytochrom  $c_{552}$  (Yamanaka & Shinra, 1974) somit ein Gewichtsanteil von  $0,59 \%$  an der gereinigten AMO. Charakteristische Absorptionsbanden weiterer Cytochrome traten in der gereinigten AMO nicht auf. Das Absorptionsspektrum zeigte, dass die Enzympräparation der AMO nur in Spuren mit Cytochrom c kontaminiert war.

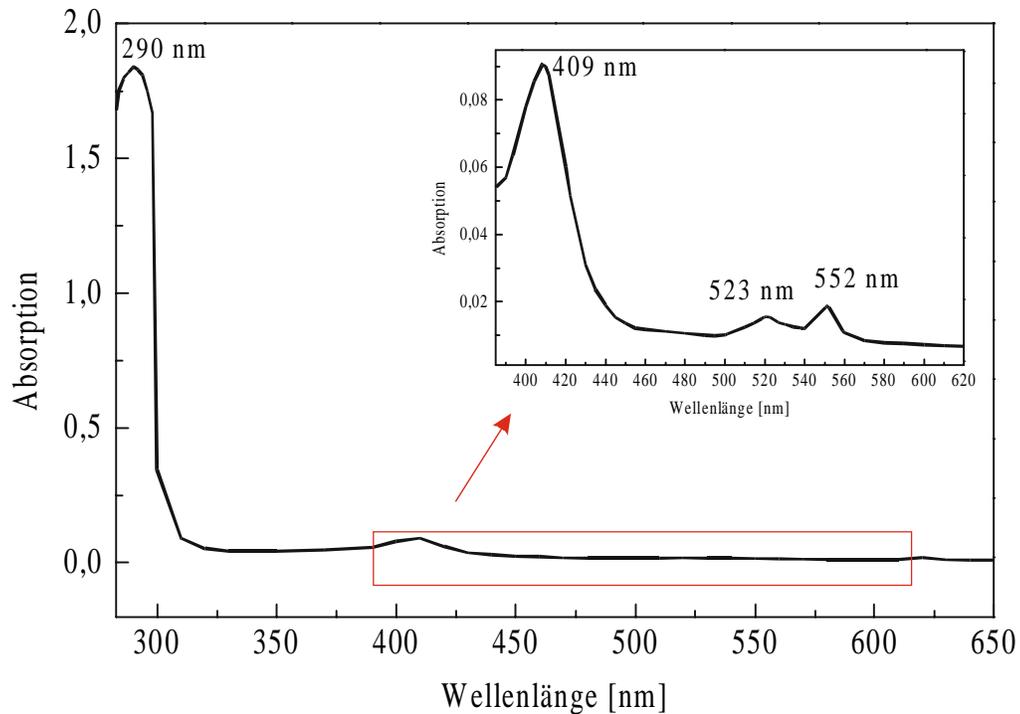


Abb. 4.30: Absorptionsspektrum gereinigter AMO aus *N. eutropha* N904 unter reduzierenden Bedingungen bei pH 7,3. Die Reduktion erfolgte mit Natriumdithionit. Es wurden 1 mg Enzym pro ml Puffer eingesetzt. Oben rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung des Absorptionsspektrums dargestellt.

#### 4.14.2 RELATIVE MOLEKÜLMASSE

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse der AMO wurde eine native Gelelektrophorese (7,5%iges Trenngel) in Gegenwart von Natriumdesoxycholat durchgeführt (Abb. 4.31). Die Untersuchungen erfolgten mit angereicherter AMO. Im nativen Gel waren mehrere Proteinbanden zu erkennen. Deutliche Banden waren bei 205 kDa, 136 kDa und 68 kDa zu sehen. Die Antikörper gegen die AmoA und AmoB reagierten im Immunblot mit allen Proteinbanden des Gels (nicht dargestellt). Daraus lässt sich schließen, dass die A- und B-Untereinheit der AMO in allen Banden vorhanden war. Die native AMO hatte somit kein einheitliches Molekulargewicht.

Mit Hilfe des quantitativen Immunblots wurde nachgewiesen, dass beide Untereinheiten der AMO im Verhältnis 1:1 vorlagen (siehe Abschnitt 4.5.1). Bei einer äquimolaren Konzentration von AmoA und AmoB mit einem Molekulargewicht von 27 kDa bzw. 41 kDa ergibt sich für die kleinste Einheit des Enzyms eine relative Molekülmasse von 68 kDa. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den 68 kDa großen Proteinen um Monomere (AB), bei der 136-kDa-Bande um Dimere ( $A_2B_2$ ) bzw. bei der 204-kDa-Bande um Trimere ( $A_3B_3$ ) des AMO-Heterodimers ( $A_nB_n$ ) handelt.

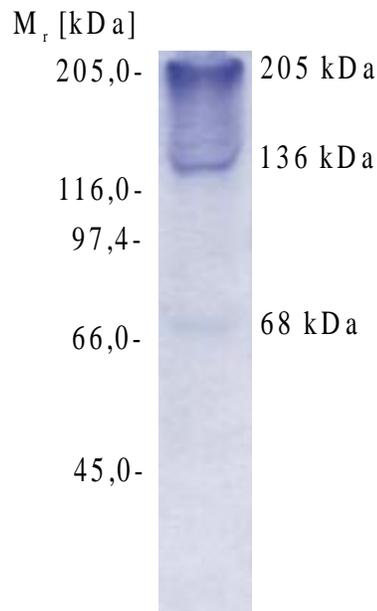


Abb. 4.31: Coomassie gefärbtes natives Gel (7,5 % Polyacrylamid) angereicherter AMO aus *N. eutropha* N904. Es wurden 15 µg Protein aufgetragen. Molekulargewichtsstandards sind links wiedergegeben.  $M_r$  = relative Molekülmasse.

#### 4.14.3 KUPFER- UND EISENGEHALT

Für die AMO wurde vielfach postuliert, dass sie Kupfer (Loveless & Painter, 1968; Ensign et al., 1993) oder Eisen (Zahn et al., 1996) enthält. Es wurden daher die Kupfer-, Eisen (II)- und Eisen (III)-Gehalte der gereinigten AMO ermittelt. Mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektroskopie wurde in vier Parallelversuchen ein Gehalt von  $6,56 \pm 2$  ng Cu/mg Protein gemessen. Dieses entspricht in etwa dem Gehalt von einem Kupferatom pro AMO-Dimer ( $A_2B_2$ ). Das in dem enzymfreien Puffer befindliche Kupfer wurde bei der Berechnung des Kupfergehaltes der AMO berücksichtigt. Im Gegensatz zum Kupfer wurden keine Eisen (II)- und Eisen (III)-Ionen nachgewiesen.

#### 4.14.4 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die angereicherte AMO wurde mit Hilfe der Immungold (IG)-Markierung durch die AmoB-Antikörper markiert und nach Negativ-Kontrastierung elektronenmikroskopisch dargestellt (siehe Abschnitt 3.18.4.4, 3.19). Die Goldpartikel traten stets in Verbindung mit partikulären Strukturen auf (Abb. 4.32a). Hingegen wurden in Fraktionen der Säulenchromatographie, in denen das AmoA- und AmoB-Protein nicht nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 4.12), keine Goldpartikel gebunden (nicht dargestellt). Bei höherer Vergrößerung waren einheitliche Partikel mit einem Durchmesser von  $6,7 \pm 1,2$  nm zu erkennen (Abb. 4.32b). Für die Bestimmung der Größe wurden 100 Partikel ausgemessen. In einigen Fällen war das Zentrum der Partikel dunkel gefärbt. Die Partikel waren stets aggregiert.

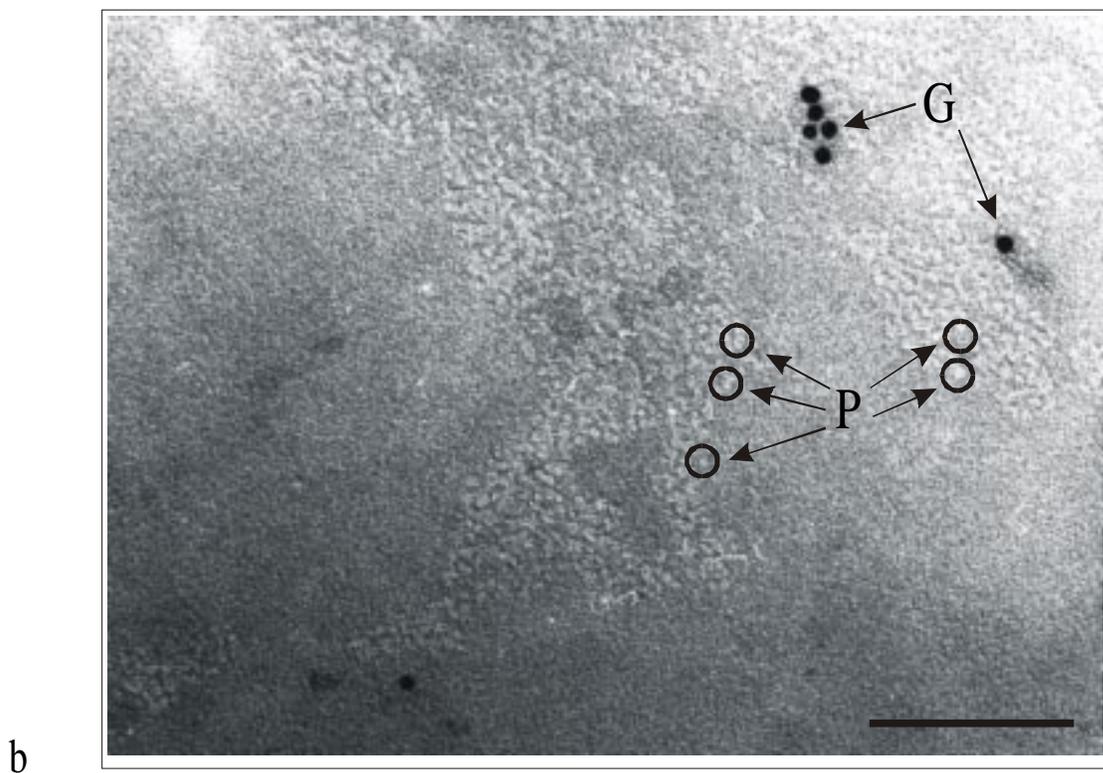
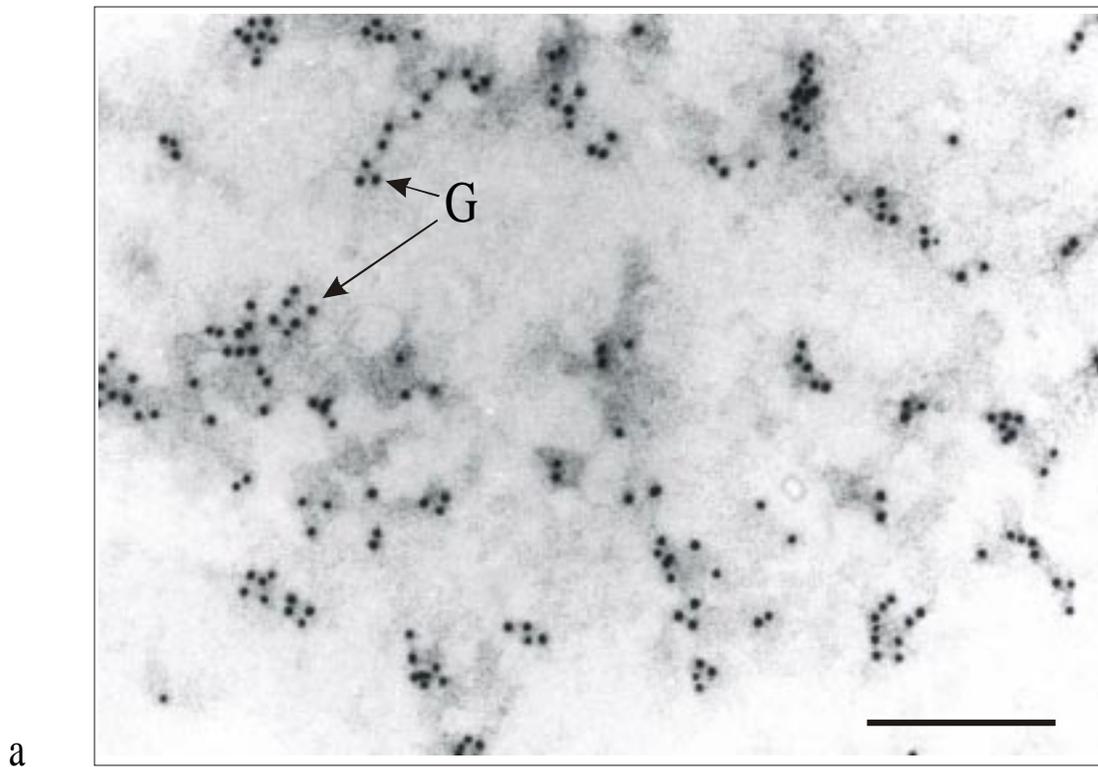


Abb. 4.32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der angereicherten AMO aus *N. eutropha* N904. Immungoldmarkierung der AmoB und nachfolgender Negativkontrastierung. Es sind Goldpartikel (G) der IG-Markierung und partikuläre Strukturen (P) der AMO zu erkennen. a) Vergrößerung 120.000fach, Größenbalken 0,2  $\mu\text{m}$  b) Vergrößerung 260.000fach, Größenbalken 0,1  $\mu\text{m}$ .



## 5 DISKUSSION

Die beschriebenen Vertreter der Ammoniakoxidanten sind bis auf zwei marine Arten phylogenetisch eng verwandt (Teske et al., 1994). Es wird daher vermutet, dass die Schlüsselenzysysteme, insbesondere die Ammoniakmonooxygenase (AMO), innerhalb dieser Gruppe weitgehende Übereinstimmungen aufweisen (Böttcher, 1996). Jedoch sind weder die Struktur noch der vollständige enzymatische Mechanismus der AMO der Ammoniakoxidanten in der Literatur beschrieben. Die Aufreinigung der AMO in ihrer aktiven Form wurde durch die Instabilität des Enzyms in zellfreien Extrakten verhindert. Daher wurden die meisten Eigenschaften der AMO aus Versuchen mit ganzen Zellen hergeleitet. Nach der Hemmung der AMO mit radioaktivmarkiertem Acetylen wurden zwei Proteine, die AmoA und AmoB, identifiziert (McTavish et al., 1993 a), die als mögliche Untereinheiten des Enzyms in Betracht kommen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sowohl das AmoA-Protein als auch das AmoB-Protein Bestandteile des ammoniakoxidierenden Enzyms sind. Der Nachweis gelang mit Hilfe von Antikörpern gegen die AmoA und die AmoB, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Die AMO wurde in aktiver Form isoliert und charakterisiert. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung der Antikörper den quantitativen Nachweis der AMO unter bestimmten Wachstumsbedingungen. Außerdem konnten die Antiseren für die *in situ* Detektion von Ammoniakoxidanten in Anreicherungskulturen eingesetzt werden.

### 5.1 ANTIKÖRPER GEGEN DAS AMOA- UND AMOB-PROTEIN

Gegen das AmoA-Protein wurden polyklonale Antikörper mit Hilfe eines synthetischen 15 Aminosäuren (AS) großen Oligopeptids hergestellt, das der N-terminalen Sequenz der AmoA von *Nitrosomonas eutropha* Nm 57 entsprach. Die Antikörper waren somit nur gegen einen sehr kleinen Bereich des 275 AS langen AmoA-Proteins gerichtet. Der N-terminale Abschnitt des hydrophoben Proteins ist in *Nitrosomonas europaea* hydrophil (McTavish et al., 1993 a). Die Herstellung der polyklonalen AmoB-Antikörper erfolgte hingegen mit Hilfe des 420 AS langen (Bergmann & Hooper, 1994 a) gereinigten AmoB-Proteins aus *Nitrosomonas eutropha* N904. Vergleiche mit den zwei *amoB*-Gensequenzen aus *Nitrosomonas eutropha* Nm 57 (*amoB1* und *amoB2*, GenBank Nummern U51630 und U72670) deuteten darauf hin, dass das isolierte AmoB-Protein ein Gemisch aus beiden Genprodukten war. Die hydrophobe N-terminale Signalsequenz (McTavish et al., 1993 a) war in dem isolierten AmoB-Protein nicht vorhanden. Sie wurde vermutlich bei der Translokation der AmoB in den periplasmatischen Raum abgespalten.

Die Antikörper gegen das AmoA- und AmoB-Protein reagierten spezifisch mit der jeweiligen Untereinheit der AMO. Die AmoA-Antikörper markierten im Immunblot das AmoA-Protein der *Nitrosomonas*-Arten *N. eutropha*, *N. europaea*, *N. halophila* und *N. aestuarii*. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung war darüber hinaus eine leichte Markierung der sechs weiteren getesteten Arten von *Nitrosomonas* (*N. communis*, *N. cryotolerans*, *N. marina*, *N. nitrosa*, *N. oligotropha*, *N. ureae*) möglich. Die unterschiedlichen Reaktionen der AmoA-Antikörper im Immunblot und die unterschiedlich starken IF-Färbungen hängen möglicherweise damit zusammen, dass die Antikörper polyklonal sind und somit gegen unterschiedliche antigene Determinanten gerichtet sind. Sobald eine AS einer antigenen Determinante verändert ist, können Antikörper, die gegen diese Determinante gerichtet sind, nicht mehr binden. Die Reaktion der Antikörper fällt daher schwächer aus. Für die Herstellung der AmoA-Antikörper wurde die N-terminale AmoA-Sequenz von *Nitrosomonas eutropha* Nm 57 verwendet. *N. eutropha* ist mit *N. europaea* und *N. halophila* nahe verwandt (Purkhold et al., 2000), was sich entsprechend in der deutlichen Reaktion der Antikörper im Immunblot und in der intensiven IF-Färbung der Organismen widerspiegelt. Sequenzvergleiche der AmoA-Proteine von *N. eutropha* und *N. europaea* zeigten, dass die N-terminalen Sequenzen der Proteine identisch sind (GenBank Nummern U51630, U72670; McTavish et al., 1993 a). Die anderen Arten von *Nitrosomonas* sind mit *N. eutropha* weniger verwandt und unterscheiden sich daher möglicherweise in den N-terminalen AS-Sequenzen der AmoA-Proteine von *N. eutropha*. Dieses würde erklären, warum diese Arten mit Ausnahme von *N. aestuarii* bei der IF-Färbung schwach gefärbt waren bzw. die AmoA-Proteine im Immunblot nicht detektiert wurden. Die 15 N-terminalen AS der AmoA-Proteine der verschiedenen *Nitrosomonas*-Arten sind bisher nicht bekannt. Bei den unterschiedlich starken Reaktionen der Antikörper im Immunblot und bei der IF-Färbung spielen verschiedene AmoA-Gehalte in den Zellen wahrscheinlich keine Rolle, da die AmoA-Gehalte der *Nitrosomonas*-Arten im SDS-Gel ähnlich hoch waren (siehe Abb. 4.5a, Abschnitt 4.4.1). Die übrigen Gattungen der Ammoniakoxidanten (*Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrosococcus*) wurden mit den AmoA-Antikörpern sowohl im Immunblot, als auch bei der IF-Färbung nicht detektiert. Vermutlich weicht die AS-Sequenz der AmoA von *Nitrosococcus mobilis* trotz der nahen Verwandtschaft zu *Nitrosomonas eutropha* in den ersten sieben N-terminalen AS derart ab, dass die Antikörper nicht binden konnten. Die N-terminale AS-Sequenz der AmoA von *Nitrosococcus mobilis* ist erst ab der achten AS beschrieben (GenBank Nummer AF037108). Ab der achten AS ist sie mit der AmoA-Sequenz von *Nitrosomonas eutropha* identisch. Die N-terminalen Abschnitte der AmoA-Proteine von *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* unterscheiden sich deutlich von der N-terminalen AmoA-Sequenz der Gattung *Nitrosomonas* (siehe GenBank Nummern bei Klotz & Norton, 1998). Die Aminosäuren (AS) in Position 3 und 4 sind nicht vorhanden und die Glutaminsäure in Position 7 ist durch eine Asparaginsäure ersetzt (Norton et al., 1996). Bei *Nitrosococcus oceani* stimmen nur fünf der 15 N-terminalen AS der AmoA mit den 15 N-terminalen AS der AmoA von *Nitrosomonas eutropha* überein (Alzerreca et al., 1999).

Weiterhin lässt sich erklären, warum die AmoA-Antikörper nicht mit der A-Untereinheit des mit der AMO verwandten Enzyms Methanmonooxygenase (pMMO) der getesteten Methanoxidanten reagierte. Die 15 AS der A-Untereinheit der pMMO (PmoA) von *Methylococcus capsulatus* sind mit Ausnahme einer AS mit den 15 N-terminalen AS von *Nitrosococcus oceani* identisch (Alzerreca et al., 1999).

Da die AmoA-Antikörper bei der IF-Färbung im Gegensatz zum Immunblot alle Arten von *Nitrosomonas* detektierten, war die Methode der IF-Färbung empfindlicher als der Immunblot. Das hängt möglicherweise damit zusammen, dass sowohl bei der IF-Färbung im Gegensatz zum Immunblot einzelne Zellen untersucht wurden, als auch das Antikörper/Proteinverhältnis bei der IF-Färbung um den Faktor 400 höher war als beim Immunblot.

Im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern besaßen die AmoB-Antikörper im Immunblot ein breiteres Wirkungsspektrum. Sie detektierten spezifisch die AmoB aller getesteten Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien. Das breitere Wirkungsspektrum ist darauf zurückzuführen, dass die AmoB-Antikörper im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern nicht nur gegen einen kleinen N-terminalen Abschnitt des Proteins, sondern gegen das gesamte Protein gerichtet waren. Zudem sind die AmoB-Proteine innerhalb der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien deutlich konserviert. Sie zeigen hohe AS-Sequenzähnlichkeiten (ca. 73 %) (Alzerreca et al., 1999). Die AmoB-Antikörper reagierten im Immunblot jedoch nicht mit den Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien. Dieses ist vermutlich auf die geringen AS-Sequenzähnlichkeiten der AmoB-Proteine beider Unterklassen zurückzuführen. Die AmoB von *Nitrosococcus oceani* hat nur 38 % AS-Sequenzähnlichkeit zur AmoB der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien (Alzerreca et al., 1999). Die physiologisch verwandte partikuläre Methanmonooxygenase (pMMO) der Methanoxidanten wurde ebenfalls nicht mit den AmoB-Antikörpern im Immunblot markiert. Die B-Untereinheit der pMMO (PmoB) von *Methylococcus capsulatus* zeigt nur 40 % AS-Sequenzähnlichkeit zur AmoB der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien (Alzerreca et al., 1999).

Wie schon bei den Untersuchungen mit den AmoA-Antikörpern beobachtet wurde, war die IF-Färbung und die Immungold (IG)-Markierung empfindlicher als der Immunblot. Bei beiden Methoden wurden Ammoniakoxidanten der  $\gamma$ -Proteobakterien und *Methylococcus capsulatus* schwach markiert.

## 5.2 AMOA- UND AMOB-PROTEIN

Die Antiseren ermöglichten es, die Untereinheiten der AMO während der Reinigung des Enzyms zu identifizieren. Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gradientenzentrifugation ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen, eine aktive Form der

Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha* zu isolieren und zu charakterisieren. Antikörper sind schon häufig zur Isolierung und/oder Charakterisierung von Schlüsselenzymen verwendet worden, wie z. B. Antikörper gegen die Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO) von *Nitrosomonas europaea* (Nejidat et al., 1997) und Antikörper gegen die partikuläre Methanmonooxygenase (pMMO) von *Methylococcus capsulatus* (Zahn & DiSpirito, 1996). In dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass das AmoA- und AmoB-Protein Untereinheiten der aktiven AMO sind. Beide Untereinheiten traten in der aktiven AMO-Fraktion ungefähr im gleichen Verhältnis auf. Des Weiteren wurde in der aktiven AMO-Fraktion in sehr geringen Mengen ein 30 kDa-Protein nachgewiesen. Bei diesem Protein könnte es sich um das 31 kDa große AmoC-Protein handeln (Klotz et al., 1997). Für diese Annahme spricht, dass auch die isolierte aktive Form der partikulären Methanmonooxygenase (pMMO) aus drei Untereinheiten (PmoA, PmoB, PmoC) besteht (Zahn & DiSpirito, 1996; Nguyen et al., 1998). Die AMO und die pMMO sind vermutlich verwandt, denn sie weisen trotz unterschiedlicher physiologischer Aktivität viele Gemeinsamkeiten auf (Holmes et al., 1995; Klotz & Norton, 1998). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich bei dem 30 kDa-Protein um eine Vorstufe der 27 kDa großen AmoA (Hyman & Arp, 1992; Schmidt et al., 2001 b) handelt. Dieses ist jedoch eher unwahrscheinlich, da das 30-kDa-Protein nicht mit den AmoA-Antikörpern detektiert werden konnte.

Weitere Versuche zeigten, dass die A- und B-Untereinheiten der AMO auch in den Zellen von *Nitrosomonas eutropha* stets ungefähr im Verhältnis 1:1 vorkamen. Dieses stimmt mit genetischen Untersuchungen überein, die zeigten, dass die Gene *amoA* und *amoB* gemeinsam transkribiert werden (Sayavedra-Soto et al., 1998). Mit Hilfe des Immunblots wurde ein prozentualer AMO-Anteil (AmoA + AmoB) am Gesamtprotein von *Nitrosomonas eutropha* nach Anzucht mit 10 mM Ammonium von  $12,8 \pm 2$  % gemessen. Ähnliche Werte ergaben sich bei der Isolierung des nativen Enzyms. Die verwandte pMMO ist mit einem Gehalt von 20 bis 40 % am Gesamtprotein in Zellen von Methanoxidanten vorhanden (Zahn & DiSpirito, 1996; Nguyen et al., 1998). Der AMO-Gehalt war jedoch abhängig von der Ammoniumkonzentration im Medium. Zellen, die mit wenig Ammonium (1 mM) angezogen wurden, enthielten deutlich mehr AMO als Zellen, die mit viel Substrat (100 mM) gewachsen waren. Dieses ist vermutlich dadurch zu erklären, dass bei Substratkonzentrationen, die unter dem  $K_m$ -Wert der AMO liegen, die Aktivität der AMO verringert ist und durch hohe Konzentrationen des Enzyms ausgeglichen werden muss. Der  $K_m$ -Wert der AMO von *Nitrosomonas eutropha* liegt für Ammonium bei einem pH-Wert von 7,3 bei ca. 1,8 mM (Schmidt & Bock, 1998). Dagegen ist die Aktivität der AMO bei hohen Ammoniumkonzentrationen maximal, so dass geringere AMO-Konzentrationen zum Wachstum ausreichen. Plausibel ist auch, dass beim Wachstum mit Harnstoff und Glutamin anstelle von freiem Ammonium eine erhöhte AMO-Konzentration gefunden wurde. Beim Wachstum mit den alternativen Ammoniakquellen liegen nach der Ammoniumfreisetzung aus

den organischen Verbindungen in der Zelle nur geringe Konzentrationen an Ammonium vor (Burton & Prosser, 2001). Dieses entspricht dem oben genannten Wachstum in Gegenwart geringer Ammoniumkonzentrationen. Die Ammoniumkonzentration im Anzuchtmedium korrelierte zudem mit der Anzahl der intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) von *Nitrosomonas eutropha*. Zellen, die mit geringen Substratkonzentrationen (1 mM) gewachsen waren, besaßen viele ICMs. Bei hohen Ammoniumkonzentrationen hatten die Zellen dagegen nur wenige ICMs. Da die AMO als membrangebundenes Enzym beschrieben worden ist (Hyman & Wood, 1985), deuten die Ergebnisse indirekt darauf hin, dass die AMO in den ICMs lokalisiert ist. Wenn viel AMO synthetisiert wird, müssen demnach viele ICMs gebildet werden, um die AMO in den Membranen unterzubringen. Dieses erscheint sinnvoll, da die AMO bei Anzucht mit 1 mM Ammonium etwa 25 % des Gesamtproteins und somit fast 60 % des Membranproteins ausgemacht hat. Auch bei Methanoxidanten führt Substratmangel zu einer deutlichen Erhöhung des pMMO-Gehaltes und gleichzeitig zu einer erhöhten Anzahl der ICMs (Nguyen et al., 1998). Da die ICMs von *Methylococcus capsulatus* nur in Verbindung mit der pMMO auftreten und nicht gebildet werden, wenn die sMMO die Methanoxidation katalysiert, wird auch dort vermutet, dass die pMMO auf den ICMs lokalisiert ist (Prior & Dalton, 1985 b).

Hungernde Zellen von *Nitrosomonas* besaßen einen höheren Gehalt an AMO als wachsende Zellen. Ein Nachweis der AMO-Proteine war selbst ein Jahr nach dem Substratverbrauch der Zellen noch möglich. In den hungernden Zellen wurde jedoch nur eine geringe Ammoniakoxidationsaktivität nachgewiesen. Diese Restaktivität in hungernden Zellen von *Nitrosomonas* wurde bereits mehrfach beschrieben (Jones & Morita, 1985; Johnstone & Jones, 1988; Nejidat et al., 1997; Wilhelm et al., 1998). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass der Gehalt der AMO nicht mit der Aktivität der Zellen korrelierte (siehe auch Stein & Arp, 1998). Trotz der hohen AMO-Konzentrationen in hungernden Zellen, scheint die AMO kein konstitutives Enzym zu sein, welches fortwährend synthetisiert wird, da es in Abwesenheit von Ammonium zum vollständigen Abbau der AMO-mRNA kommt (Sayavedra-Soto et al., 1996). Zudem ist in Zellen von *Nitrosomonas* vier Wochen nach Substratverbrauch keine endogene Atmung mehr nachzuweisen (Johnstone & Jones, 1988). Vielmehr scheint die AMO während der Hungerperioden vor dem Abbau geschützt zu sein. Dadurch wird eine sofortige Energieversorgung der Zellen gewährleistet, sobald das Substrat wieder zur Verfügung steht. Der höhere AMO-Gehalt in hungernden Zellen ist wahrscheinlich im Vergleich zu wachsenden Zellen auf den Abbau ungeschützter Proteine zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse wurden für das zweite Schlüsselenzym der Ammoniakoxidanten, die Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO), gewonnen (Nejidat et al., 1997). Im Immunblot bleibt der Gehalt der HAO hungernder Zellen konstant. Zudem wurde eine Restaktivität des Enzyms in hungernden Zellen detektiert, obwohl keine mRNA der HAO mehr nachzuweisen war (Wilhelm et al., 1998; Sayavedra-Soto et al., 1996).

Auch die Immunfluoreszenz (IF)-Untersuchungen deuten daraufhin, dass das AmoA- und AmoB-Protein von *Nitrosomonas* im Bereich der Cytoplasmamembran und den ICMs lokalisiert sind. Fluoreszenzsignale waren nach der IF-Färbung mit den AmoA- und AmoB-Antikörpern vorwiegend in der Zellperipherie zu sehen. Nach der IF-Färbung der Zellen von *Nitrosomonas* mit den AmoB-Antikörpern trat stets ein deutliches ringförmiges Signal auf. Die Fluoreszenzsignale der AmoA-Antikörper fanden sich darüber hinaus auch häufig weiter im Inneren der Zellen. Anhand der gekoppelten IF-Färbung mit Antikörpern gegen die AmoA und AmoB wurde deutlich, dass das IF-Signal der AmoB-Antikörper stets weiter in der Zellperipherie lag als das Signal der AmoA-Antikörper. Es wird daher vermutet, dass sich das überwiegend hydrophile AmoB-Protein (Bergmann & Hooper, 1994 a) an der periplasmatischen Seite der Membranen befindet und das hydrophile N-terminale Ende der AmoA, welches von den AmoA-Antikörpern detektiert wird, auf der inneren, cytoplasmatischen Seite der Membranen liegt. Wenn viele ICMs in den Zellen von *Nitrosomonas* vorhanden waren, befanden sich daher die Fluoreszenzsignale auch weiter im Inneren der Zelle. Hatten die Zellen dagegen weniger ICMs, traten die Signale nur in der Zellperipherie auf. Im Gegensatz zu den AmoA-Antikörpern detektierten die AmoB-Antikörper neben *Nitrosomonas* auch die weiteren Gattungen der Ammoniakoxidanten aus der  $\beta$ -Unterklasse der Proteobakterien. Auch in diesen Organismen wurden die IF-Signale in der Nähe der Cytoplasmamembran bzw. den ICMs detektiert. In *Nitrosococcus mobilis*, der wie *Nitrosomonas* peripher angeordnete ICMs besitzt, fanden sich die Signale in der Zellperipherie. Zellen von *Nitrosovibrio*, die keine ICMs besitzen, wurden ebenfalls vorwiegend in der Zellperipherie gefärbt. Da die Zellen von *Nitrosovibrio* jedoch mit 0,3  $\mu\text{m}$  sehr schmal sind (Spieck et al., 1992), konnten die IF-Signale nicht immer der Zellperipherie oder der Zellmitte zugeordnet werden. Bei *Nitrosospira* und *Nitrosolobus* traten auch im Inneren der Zelle IF-Signale auf. Dieses lässt sich damit erklären, dass die Cytoplasmamembran in den spiralig, eng gewundenen Zellen von *Nitrosospira* ins Innere gewölbt sein kann und die Zellen von *Nitrosolobus* durch ICMs partiell kompartimentiert werden.

Die Lage der AMO-Untereinheiten in den Zellen der Ammoniakoxidanten wurde weiterhin mit Hilfe der Immungold (IG)-Markierung untersucht. Im Gegensatz zu den AmoB-Antikörpern war es mit den AmoA-Antikörpern nicht möglich, die Zellen von *Nitrosomonas* immuncytochemisch zu untersuchen. Vermutlich haben die Vorbehandlungen der Zellen mit Formaldehyd oder das Hochdruckgefrieren die antigenen Determinanten der AmoA derart verändert, dass die AmoA-Antikörper nicht binden konnten. Es ist bekannt, dass Aldehydfixierungen zu einer starken Vernetzung von Proteinen führen und somit Antikörperbindungen verhindern können (Hyatt, 1991). Die IG-Markierungen mit den AmoB-Antikörpern wurde durch die Aldehydbehandlung der Zellen nicht behindert. Die Goldpartikel befanden sich bei allen Gattungen der Ammoniakoxidanten, mit Ausnahme von

*Nitrosolobus*, stets im Bereich der äußeren Cytoplasmamembran. Die Goldmarkierungen traten somit bei *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* und *Nitrosovibrio* in der Zellperipherie auf. In *Nitrosospira* folgten die Goldmarkierungen dem Verlauf der ins Cytoplasma ragenden Cytoplasmamembran. In *Nitrosolobus* wurden neben der äußeren Cytoplasmamembran zudem die ICMs markiert, die die Zellen partiell kompartmentierten. In der Nähe der peripheren bzw. zentralen ICMs der Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* wurden überraschenderweise nur selten Goldpartikel detektiert. Die genaue Lokalisation, ob die AmoB-Proteine frei im Periplasma oder an die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran gebunden waren, konnte jedoch nicht bestimmt werden. Dieses ist auf den großen Abstand zwischen dem AmoB-Protein und der Goldmarkierung zurückzuführen, der durch den Einsatz sekundärer Antikörper in etwa 30 nm groß ist (Rohde et al., 1988). Bei einer Dicke der Membranen von 8 nm ist dieser Abstand etwa viermal größer als die Doppelmembranen dick sind (Murray & Watson, 1965). Die Ergebnisse der IG-Markierung stehen im Widerspruch zu den physiologischen Untersuchungen, die zeigten, dass der AMO-Gehalt mit der Anzahl der ICMs korrelierte. Außerdem gehen Murray & Watson (1965) davon aus, dass alle cytoplasmatischen Membranen (die äußere und die ICMs) gleichwertig sind, d. h. aus den gleichen Bausteinen aufgebaut sind. Sie beschreiben, dass die ICMs durch Einstülpungen der äußeren Membran ins Cytoplasma entstehen und im Falle von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus mobilis* stets mit der äußeren Cytoplasmamembran in Verbindung bleiben. Mögliche Erklärungen, warum die IG-Markierung mit den AmoB-Antikörpern bei *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* nur in Nähe der äußeren Cytoplasmamembran und nicht mit den ICMs auftraten, sind die Folgenden:

- I) Die AmoB ist gleichmäßig über die gesamten Membranen, d. h. die äußere Cytoplasmamembran und die ICMs, verteilt. Die Antikörper konnten jedoch nur die AmoB-Proteine der äußeren Cytoplasmamembran detektieren, da die übrigen AmoB-Proteine möglicherweise räumlich verdeckt sind. Der periplasmatische Raum zwischen den ICMs ist sehr viel kleiner als zwischen der Zellwand und der äußeren Membran. Hinweise, dass die Antikörper an Teilen der Membran aufgrund räumlicher Hindernisse nicht binden, geben die immunocytochemischen Untersuchungen der  $\beta$ -Untereinheit der Nitritoxidoreduktase (NOR) von *Nitrobacter* (Spieck et al., 1996). Mit dieser Vermutung ließe sich erklären, warum jedoch die ICMs von *Nitrosolobus* mit den Antikörpern markiert werden können. Im Gegensatz zu den ICMs in *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus*, die durch Einstülpungen der äußeren Cytoplasmamembran gebildet werden, entstehen die ICMs von *Nitrosolobus* durch Einstülpungen der Cytoplasmamembran und Teilen der inneren Zellwand, wie z. B. der Mureinschicht (Watson et al., 1971). Daher ist es möglich, dass die Größe des periplasmatischen Raumes auch im Inneren der Zelle von *Nitrosolobus* konstant gehalten wird.
- II) Die AmoB-Proteine sind möglicherweise unregelmäßig über die Membranen von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* verteilt. An der äußeren Cytoplasmamembran befindet

sich eine höhere AmoB-Konzentration als an den ICMs. Für diese Vermutung spricht, dass die ICMs von *Nitrosococcus oceani* gegenüber der äußeren Cytoplasmamembran strukturelle Unterschiede aufweisen (Remsen et al., 1967). Weiterhin ist auch in anderen Fällen eine Differenzierung von Membranen beobachtet worden. In *Halobacterium* bedeckt das Pigment Bakteriorhodopsin nicht die gesamte Cytoplasmamembran, sondern ist nur auf einzelne Flecken (Purpurnembranen) beschränkt (Blaurock & Stoeckenius, 1971). Zudem sind die photosynthetischen Enzymkomplexe in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten unregelmäßig verteilt (Anderson und Anderson, 1982). Gegen eine Differenzierung der Cytoplasmamembran und der ICMs von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* spricht jedoch, dass in Bakterien, die ICMs ausbilden, die Enzyme gleichmäßig in den Membranen angeordnet sind. In photosynthetischen Bakterien sind die Photosysteme (Cohen-Bazire, 1962; Fuller, 1963) und in *Nitrobacter* ist die NOR (Spieck et al., 1996) gleichmäßig über die ICMs verteilt.

### 5.3 IDENTIFIZIERUNG VON AMMONIAKOXIDANTEN

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsspektren der AmoA- und AmoB-Antikörper und der Morphologie der Zellen war es mit der IF-Färbung möglich, die fünf verschiedenen Gattungen der Ammoniakoxidanten immunologisch zu unterscheiden. Ammoniakoxidanten konnten in Rein- und definierten Mischkulturen sowie in Anreicherungskulturen detektiert und einer bestimmten Gattung zugeordnet werden. Neuisolate aus Sandstein wurden mit Hilfe der AmoB-Antikörper schnell und eindeutig als Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* oder *Nitrospira* identifiziert. Die Ergebnisse wurden anhand der charakteristischen Ultrastruktur der Gattungen mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. Es wird vermutet, dass die Antikörper auch weitere nicht beschriebene Neuisolate der Ammoniakoxidanten detektieren. Dagegen war mit Hilfe der drei eingesetzten 16S rRNA-Sonden keine Gattungszuordnung der Neuisolate möglich. Weder die NEU-CTE-Sonde (detektiert *Nitrosomonas*) noch die Nsv443-Sonde (detektiert *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus*) und zum Teil auch nicht die Nso190-Sonde (detektiert  $\beta$ -Ammoniakoxidanten) reagierten mit den Neuisolaten. Das zeigt, dass die AmoB-Antikörper ein größeres Wirkungsspektrum und somit einen Vorteil gegenüber den eingesetzten Oligonukleotidsonden hatten. Bisher ist noch keine spezifische Oligonukleotidsonde bekannt, die alle Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien markiert (Purkhold et al., 2000). Die bisher beschriebenen 16S rRNA-Sonden erfassen oft nur bestimmte Arten.

Darüber hinaus konnte die IF-Färbung erfolgreich in Anreicherungskulturen angewandt werden. Dabei wurden die Antikörper gegen die AmoA und AmoB gleichzeitig verwendet (gekoppelte IF-Färbung). In den Anreicherungen aus Belebtschlamm (Dradenau/Hamburg) wurde ein Großteil der Zellen der Gattung *Nitrosomonas* zugeordnet. Die Anwesenheit von

*Nitrosomonas* wurde mit der NEU-CTE-Sonde (detektiert *Nitrosomonas*) bestätigt. Weiterhin konnte dieses Ergebnis durch Untersuchungen von Schnier (2001) gestützt werden, der in 10 Wochen alten Anreicherungskulturen aus der gleichen Belebtschlammprobe mit Hilfe der Elektronenmikroskopie fast ausschließlich *Nitrosomonas* detektierte. *Nitrosomonas* wird auch in der Literatur als dominierender Vertreter der Ammoniakoxidanten in Abwasser beschrieben (Völsch et al., 1990; Mobarry et al., 1996; Koops & Pommerening-Röser, 2001). Juretschko et al. (1998) wiesen dagegen in Belebtschlamm hauptsächlich *Nitrosococcus mobilis* ähnliche Ammoniakoxidanten nach. In Anreicherungskulturen von verwittertem Sandstein wurde ebenfalls überwiegend die Gattung *Nitrosomonas* detektiert. Die Gattungen *Nitrosospira* und *Nitrosovibrio* waren in dieser Probe nur in geringeren Mengen nachweisbar. Dieses ist erstaunlich, da aus Sandsteinproben historischer Gebäude vorwiegend Vertreter der Gattung *Nitrosovibrio* (Meincke et al., 1989; Spieck et al., 1992) und *Nitrosospira* (vorliegende Arbeit, siehe Abschnitt 4.7) und nicht *Nitrosomonas* isoliert wurden. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die unterschiedliche Positionierung der Sandsteinproben zurückzuführen. In dieser Arbeit wurden Proben verwendet, die durch die Lagerung auf einem Sandbett nahezu ständig feucht waren. Die Sandsteinproben wurden 5 Jahre im Neuen Botanischen Garten/Hamburg exponiert und zeigten deutliche Biofilmbildung. Dagegen stammten die übrigen Proben von trockenen Gebäudeoberflächen. Im Gegensatz zu den Belebtschlamm- und Sandsteinproben dominierte in Anreicherungskulturen von Teichsediment die Gattung *Nitrosospira*. Dieses stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen überein (Hiorns et al., 1995; Hastings et al., 1998; Whitby et al., 1999). In Anreicherungskulturen von Bodenproben (Gartenerde, pH 7,6) wurden Zellen der Gattung *Nitrosospira* und *Nitrosolobus* detektiert. Zudem traten coccoide Zellen auf, die nicht eindeutig einer Gattung zugeordnet werden konnten. Da junge Zellen von *Nitrosolobus* nach der IF-Färbung coccoid erschienen, ist es möglich, dass es sich ebenfalls um Vertreter dieser Gattung handelte. Auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen der gleichen 10 Wochen alten Kulturen wurden überwiegend Vertreter der Gattung *Nitrosolobus* detektiert (Schnier, 2001). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die Gattungen *Nitrosolobus* (Walker, 1978; McDonald, 1986) und *Nitrosospira* (Belser & Schmidt, 1978; Hiorns et al., 1995; Hastings et al., 1997; Jiang & Bakken, 1999) häufig in hoher Zahl in Lehm- und Ackerböden mit einem neutralen pH-Wert vertreten sind.

Aufgrund unspezifischer Reaktionen der AmoB-Antikörper mit den Flocken der Anreicherungen der Belebtschlamm- und Teichsedimentproben war mit diesen Antikörpern in den Flocken keine Detektion möglich. In den Flocken konnten Ammoniakoxidanten aber mit Hilfe der AmoA-Antikörper nachgewiesen werden. Mit der NEU-CTE-Oligonukleotidsonde kam es nur zu leichten unspezifischen Reaktionen. Die unspezifischen Reaktionen der AmoB-Antikörper traten nicht bei den Untersuchungen der Anreicherungen von Sandstein- und Bodenproben auf. Im Gegensatz zu den Antikörpern wurde die Detektion mit der NEU-CTE-Sonde in den Sandstein- und Bodenproben durch unspezifische Reaktionen der Sonde mit Gesteins- und Humuspartikeln deutlich behindert. Die Antikörper erwiesen sich somit bei der

Untersuchung der Sandstein- und Bodenproben gegenüber den Sonden aufgrund der geringeren Hintergrundfluoreszenz als vorteilhaft. Zudem waren die Signale der IF-Färbung sehr viel intensiver als die der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden (FISH) und blichen nicht so schnell aus.

Darüber hinaus haben die in dieser Arbeit entwickelten Antikörper gegen die AMO-Untereinheiten erhebliche Vorteile gegenüber den Antikörpern, die bisher zur Detektion von Ammoniakoxidanten in Naturproben eingesetzt wurden (z. B. Völsch et al., 1990; Smorzewski & Schmidt, 1991; Sanden et al., 1994). Die bisherigen Antikörper sind gegen Zellwandaußenschichten von Ammoniakoxidanten gerichtet. Da die Zellwandaußenschichten erhebliche serologische Unterschiede innerhalb einer Art aufweisen, konnten die Antikörper selbst innerhalb eines Ökosystems nicht alle Vertreter einer Art, sondern nur bestimmte Serotypen detektieren (Belser & Schmidt, 1978; Ward & Carlucci, 1985). Die in dieser Arbeit entwickelten Antikörper gegen das konservierte Schlüsselenzym erlauben es dagegen möglicherweise, alle Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien in einem Habitat zu erfassen. Erste Ergebnisse der IF-Färbungen an Anreicherungskulturen von Naturproben unterstützen diese Annahme. Antikörper gegen konservierte Schlüsselenzyme, wie z. B. die Nitritoxidoreduktase der Nitritoxidanten oder die Nitritreduktase von denitrifizierenden Bakterien, wurden bereits erfolgreich zum Nachweis dieser Bakteriengruppen in Anreicherungskulturen und Naturproben angewandt (Ward et al., 1993; Bartosch et al., 1999, 2001; Bothe et al., 2000).

## 5.4 EIGENSCHAFTEN DER AMO

Wie bereits erwähnt, ermöglichten die Antiseren, die AMO während der Anreicherung und Reinigung aus *Nitrosomonas eutropha* N904 zu identifizieren. Die Antikörper bereiteten somit nicht nur den Weg für ökologische Untersuchungen der Ammoniakoxidanten, sondern auch für die biochemische Charakterisierung des Schlüsselenzyms. Die AMO wurde bei der Ionenaustauschchromatographie bei einem pH-Wert von 7,5 nicht an die positiv geladene Säule gebunden. Daher ist der isoelektrische Punkt der AMO vermutlich größer als pI 7,5. Dieser Wert liegt nahe den in der Literatur angegebenen pI-Werten der AMO-Untereinheiten. Für die AmoA wird ein Wert von pI 7,9 (McTavish et al., 1993 a) und für die AmoB ein Wert von pI 6,8 (Bergmann & Hooper, 1994 a) angegeben. Mit Hilfe der anschließenden Gradientenzentrifugation wurde die AMO von c-Cytochromen gereinigt. Vor der Gradientenzentrifugation betrug der Anteil der c-Cytochrome an der angereicherten AMO in etwa 6 %. Nach der Zentrifugation konnte der c-Cytochrom-Anteil der gereinigten AMO auf 0,6 % gemindert werden. Mit Hilfe des Absorptionsspektrums konnte gezeigt werden, dass es sich dabei höchstwahrscheinlich um Cytochrom  $c_{552}$  handelte. Weitere Proteine wurden in der gereinigten AMO-Fraktion mit Hilfe der SDS-PAGE nicht detektiert. Das 27 kDa große AmoA- und das 41 kDa große AmoB-Protein traten im Sediment jedoch nicht im Verhältnis

1:1 auf. Das war darauf zurückzuführen, dass es im Sediment zur Bildung von dimeren, tertiären und tetrameren Aggregationsformen der AmoA kam. Diese lassen sich vermutlich auf die hydrophobe Eigenschaft der AmoA zurückführen. Sie wurden ebenso nach Hitzebehandlung des Gesamtproteins in Anwesenheit von Reduktionsmitteln beobachtet. Die Aggregationsformen ließen sich nicht in Gegenwart des Detergenzes SDS in der PAGE auflösen. Solche „festen“ Aggregate der AmoA sind bereits von Hyman & Arp (1993) beschrieben worden. Die hydrophilere AmoB aggregierte hingegen nicht. Zur Aggregation der AmoB kam es erst nach längerem Erhitzen in Gegenwart von Reduktionsmitteln. Im Gegensatz zur AmoB wurde die AmoA zusätzlich in den löslichen Fraktionen nachgewiesen, was weiterhin das ungleiche Verhältnis der AMO-Untereinheiten im Sediment erklärt. Vermutlich handelt es sich um verschieden große AmoA-Aggregate, die sich während der Zentrifugation von dem AMO-Protein abgelöst haben. Diese AmoA-Aggregate ließen sich jedoch im Gegensatz zu den „festen Aggregaten“ des Sedimentes mit SDS-Lysispuffer auftrennen.

Nach dem Auftrennen der angereicherten AMO im nativen Gel wurden monomere (AB), dimere ( $A_2B_2$ ) und tertiäre ( $A_3B_3$ ) Formen des AmoA-AmoB-Heterodimers nachgewiesen. Es konnte daher kein einheitliches Molekulargewicht der AMO bestimmt werden. Dass in der angereicherten AMO jedoch einheitliche Formen des Enzyms vorkamen, wurde mit Hilfe der Negativkontrastierung unter dem Elektronenmikroskop gezeigt. In der angereicherten AMO-Fraktion wurden ungefähr 7 nm große Partikel abgebildet. Die Partikel waren aggregiert und konnten mit Hilfe der AmoB-Antikörper markiert werden. Wie spurenanalytische Untersuchungen zeigten, enthielt die gereinigte AMO in etwa ein Kupferatom pro AMO-Dimer ( $A_2B_2$ ). Es wurde bereits mehrfach postuliert, dass die AMO Kupfer enthält, da die AMO durch Metallchelatoren wie Allylthioharnstoff gehemmt wird und die Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Extrakte durch die Anwesenheit von Kupfer gesteigert wird (Loveless & Painter, 1968; Bédard & Knowles, 1989; Ensign et al., 1993). Aufgrund der Hemmung der AMO durch Metallchelatoren, welche vorwiegend Cu (I)-Ionen binden (Hubley et al., 1975), wird vermutet, dass das Kupfer in der AMO in Form von einwertigem Kupfer vorkommt (Bédard & Knowles, 1989). Auch die verwandte partikuläre Methanmonooxygenase (pMMO) der Methanoxidanten enthält Kupfer. Pro pMMO-Monomer (PmoA+PmoB+PmoC) wurden 12 bis 15 Kupferatome nachgewiesen (Zahn & DiSpirito, 1996; Nguyen et al., 1998). Wie in der pMMO scheinen auch in der AMO mehrere Kupferatome pro Enzymeinheit vorzuliegen. Vermutlich ist jedoch ein Großteil der Kupferionen während der Aufreinigung der AMO verloren gegangen, denn bei der Aufreinigung der pMMO wurde ebenfalls ein Verlust von Kupfer beschrieben (Zahn & DiSpirito, 1996). Nach den vorliegenden Untersuchungen enthielt die AMO kein Eisen. Für die Abwesenheit von Eisen in der AMO spricht, dass die Ammoniakoxidationsaktivität in zellfreien Extrakten durch die Zugabe von Eisen nicht gesteigert werden konnte (Ensign et al., 1993). Dagegen wurde von Zahn et al. (1996) aufgrund von EPR-(elektromagnetischen

Resonanz)-Spektren der Membranen postuliert, dass die AMO Eisen enthält. Zur Anwesenheit von Eisen in der verwandten pMMO gibt es ebenfalls widersprüchliche Hinweise (Zahn & DiSpirito, 1996; Nguyen et al., 1998).

## 5.5 AKTIVITÄT DER AMO

In den Fraktionen der angereicherten AMO ist es erstmals gelungen, Ammoniakoxidationsaktivität nachzuweisen. In der Literatur ist bisher nur die Aktivität von zellfreien Extrakten von *Nitrosomonas* beschrieben worden (Suzuki & Kwok, 1981). Bei der weiteren Aufreinigung dieser Extrakte kam es stets zu einem Verlust der Aktivität. In der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische aerobe Ammoniakoxidationsaktivität in Gegenwart von Luftsauerstoff ( $O_2$ ) und die spezifische anaerobe Aktivität in Gegenwart von 25 ppm Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) bzw. Distickstofftetraoxid ( $N_2O_4$ ) bestimmt. Unter anoxischen Bedingungen wird  $NO_2$  bzw.  $N_2O_4$  als Sauerstoffdonator der Oxidationsreaktion der AMO genutzt (Schmidt, 1997; Schmidt & Bock, 1997, 1998).  $N_2O_4$  stellt vermutlich das eigentliche Oxidationsmittel dar, da  $NO_2$  bei 20 °C zu 72 % als Dimer ( $N_2O_4$ ) vorliegt (Remy, 1957). Die Enzymaktivität der angereicherten AMO wurde mit der Aktivität ganzer Zellen und zellfreier Extrakte verglichen. Ganze Zellen hatten die höchste Aktivität. Nach der Herstellung der zellfreien Extrakte und der Anreicherung der AMO nahm die spezifische Aktivität ab. Unter oxischen Bedingungen besaßen zellfreie Extrakte nur 1,3 % und die angereicherte AMO nur 0,2 % der spezifischen aeroben Aktivität ganzer Zellen. Unter anoxischen Bedingungen wurden in zellfreien Extrakten 15,5 % und in der angereicherten AMO 6,5 % der spezifischen anaeroben Aktivität ganzer Zellen gemessen. Die aerobe Ammoniakoxidationsaktivität nahm somit während der Anreicherung der AMO stärker ab als die anaerobe Aktivität. Allerdings war die Aktivität ganzer Zellen in Gegenwart von  $NO_2/N_2O_4$  deutlich geringer als in Gegenwart von  $O_2$ . Die höhere Aktivität unter oxischen Bedingungen ist wie folgt zu erklären:

- I) Der AMO standen unter oxischen Bedingungen sehr viel höhere Konzentrationen an Oxidationsmittel (21 %  $O_2$  = 210.000 ppm  $O_2$ ) zur Verfügung als unter anoxischen Bedingungen (25 ppm  $NO_2/N_2O_4$ ). Jedoch führt der Einsatz höherer Konzentrationen an  $NO_2/N_2O_4$  zu einer Abnahme der Aktivität (Schmidt, 1997). Dieses ist auf toxische Nebeneffekte des  $NO_2/N_2O_4$  zurückzuführen (Mancinelli & McKay, 1983; Henry et al., 1991; Zumft, 1993) wie z. B. die Autooxidation ungesättigter Fettsäuren, welche eine Schädigung der Membranstrukturen bewirkt (Pryor & Lightsey, 1981). Zu einer weiteren Verringerung der verfügbaren  $NO_2/N_2O_4$ -Menge kam es durch die chemische Reaktion von  $NO_2$  bzw.  $N_2O_4$  mit Wasser zu Nitrit und Nitrat (Mancinelli & McKay, 1983).
- II) Die spezifische Aktivität der Zellen und zellfreien Extrakte wurde über die Nitritbildungsrate bestimmt. Unter anoxischen Bedingungen kann es jedoch zur

Denitrifikation kommen, was zum Verlust von Nitrit führt (Bock et al., 1995; Schmidt, 1997; Zart, 1997). Diese kann trotz hoher Ammoniumumsatzraten eine geringe Aktivität unter anoxischen Bedingungen vortäuschen.

Die spezifischen Aktivitäten der Zellen, zellfreien Extrakte und der angereicherten AMO unterlagen deutlichen Schwankungen (siehe auch Block, 2001). Solche Schwankungen sowie die Abnahme der Aktivität während der Aufreinigung von Enzymen sind typisch für Membranproteine. Sie sind auch bei der Isolierung der pMMO (Smith & Dalton, 1989; Zahn & DiSpirito, 1996; Nguyen et al., 1998) und der Cytochromoxidase (Baker et al., 1987) beschrieben worden.

Da eine Ammoniakoxidationsaktivität in zellfreien Extrakten nur in Gegenwart von Rinderserumalbumin (BSA),  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , NADH und Proteaseinhibitoren gemessen werden konnte, wurden diese Substanzen auch in den Aktivitätstests mit der angereicherten AMO verwendet. Mit BSA wurde die Aktivität der zellfreien Extrakte in dieser Arbeit verdoppelt. Eine Steigerung der Aktivität und Stabilisierung zellfreier Extrakte durch BSA ist bereits beschrieben worden (Suzuki & Kwok, 1970; Suzuki et al., 1981; Ensign et al., 1993; Juliette et al., 1995). Es wird postuliert, dass BSA Lipasen hemmt und freie Fettsäuren binden kann (Juliette et al., 1995). Freie Fettsäuren verändern den Flüssigkeitsgrad der Membranen und somit die Anordnung der Enzyme in der Membran. Außerdem wirken sie als Entkoppler der Atmungskette (Rottenberg & Hashimoto, 1986; Skulachev, 1991). Möglicherweise können die Fettsäuren sogar direkt am hydrophoben aktiven oder allosterischen Zentrum der AMO angreifen und diese hemmen. Eine Stabilisierung der Aktivität zellfreier Systeme durch die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , NADH und Proteaseinhibitoren lässt sich wie folgt erklären.  $Mg^{2+}$ -Ionen werden zur Erhaltung des aktiven Zustandes der Membran benötigt (Watson et al., 1970). Durch die Zugabe von Kupfer kann vermutlich das während der Aufreinigung verlorengegangene Kupfer der AMO teilweise ersetzt werden. NADH kann als künstlicher Elektronendonator der AMO dienen (Suzuki et al., 1981) und Proteaseinhibitoren, die keine Metallchelatoren enthalten, steigern die Aktivität durch die Hemmung von Proteasen (Juliette et al. 1995; Block, 2001).

Der hohe Ammoniakoxidationsaktivitätsverlust während der Anreicherung der AMO ist vermutlich auf verschiedene Faktoren zurückzuführen.

- I) Die Membranstruktur wurde während der Aufreinigung der AMO vollständig aufgelöst. Dazu wurde das Detergenz Triton X-100 eingesetzt. Dieses Detergenz bewirkte schon in zellfreien Extrakten eine deutliche Hemmung der Aktivität. Weiterhin scheint für die Funktion des Enzyms eine intakte Membranumgebung wichtig zu sein. Bei der vollständigen Auflösung der Membranstrukturen wird die enge Kopplung zwischen der AMO und der Hydroxylaminoreduktase (HAO) aufgehoben und dadurch der Elektronentransfer zwischen den Enzymen gestört. Von Whittaker et al. (2000) wurde postuliert, dass die AMO auf einen Protonengradienten und somit ein Membranpotential angewiesen ist. Die Kopplung der AMO-Reaktion mit dem Transport von Protonen

und/oder Elektronen würde auch die hohe Anzahl der transmembranen Abschnitte der AmoA erklären (McTavish et al., 1993 a). Zudem wurde beschrieben, dass das Membranpotential als elektrisches Feld auf die Konformation eines Proteins wirkt (Tsong & Astumian, 1987). Das Membranpotential hält das Enzym in einer aktiven Konformation. Nach dem Herauslösen der AMO aus dem Membranverband fehlt der Einfluss des Membranpotentials und die AMO wird durch eine Konformationsänderung in eine inaktive Form überführt. Weiterhin werden bei der Auflösung der Membranstrukturen freie Fettsäuren frei, die die AMO hemmen.

- II) Die Abnahme der spezifischen Aktivität während der Anreicherung der AMO könnte auch auf den Verlust von katalytischem Kupfer aus dem Enzym zurückzuführen sein. Für diesen Verlust spricht, dass nur geringe Konzentrationen an Kupfer im gereinigten Enzym nachgewiesen wurden. Aufgrund von Hemmversuchen wurde angenommen, dass die AMO vorwiegend Cu (I)-Ionen enthält. In Gegenwart von Sauerstoff werden diese zu Cu (II)-Ionen oxidiert. Die Cu (II)-Ionen sind im Gegensatz zu den Cu (I)-Ionen labil gebunden und gehen während der aeroben Aufreinigung leichter verloren (Zahn & DiSpirito, 1996).

In einigen Versuchen wurde zum Herauslösen der AMO aus der Membran anstelle von Triton X-100 das Detergenz Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid verwendet. Es wurde erhofft, durch die Verwendung von Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid höhere spezifische Aktivitäten der angereicherten AMO zu erhalten. Eine Isolierung der aktiven pMMO (Smith & Dalton, 1989; Nguyen et al., 1998) und des ammoniakoxidierenden Enzyms des heterotrophen Ammoniakoxidanten *Paracoccus denitrificans* (Moir et al., 1996) war nur mit Hilfe dieses Detergenzes möglich. In Gegenwart von Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid wurden jedoch die spezifischen Ammoniakoxidationsaktivitäten nicht gesteigert.

Nach dem Zellaufschluss in Gegenwart von Sauerstoff war die aerobe spezifische Aktivität der zellfreien Extrakte höher als die anaerobe spezifische Aktivität. Wurden die Zellen dagegen in Abwesenheit von Sauerstoff aufgeschlossen, war keine aerobe Aktivität in zellfreien Extrakten mehr nachweisbar. Andererseits wurde die anaerobe Aktivität zellfreier Extrakte gesteigert. Ähnliche Ergebnisse wurden in dieser Arbeit mit der angereicherten AMO erzielt. Eine Abnahme der aeroben Aktivität nach einem Zellaufschluss unter anoxischen Bedingungen wurde bereits von Suzuki et al. (1981) und Block (2001) beschrieben.

## 5.6 ENZYMMODELL DER AMO

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein hypothetisches Enzymmodell (Abb. 5.1) für die AMO entwickelt. In diesem Modell sind zwei Kupferionen an das katalytische Zentrum der AMO gebunden. Wie schon Schmidt et al. (2001 a) postulierten,

wird in diesem Modell angenommen, dass  $\text{NO}_2$  bzw.  $\text{N}_2\text{O}_4$  nicht nur unter anoxischen, sondern auch unter oxischen Bedingungen den eigentlichen Sauerstoffdonator der Ammoniakoxidation darstellt. Die Stickoxide sind in Form eines Kupfernitrosylkomplexes an die AMO gebunden. Die aerobe Ammoniakoxidation findet in drei Teilschritten statt. Diese drei Teilreaktionen basieren auf dem Enzymmodell der AMO von Shears & Wood (1985). Im ersten Schritt (1) wird Ammoniak zu Hydroxylamin oxidiert. Als Oxidationsmittel dient das enzymgebundene  $\text{N}_2\text{O}_4$ . Dieses wird zum enzymgebundenen Stickstoffmonoxid (NO) reduziert. Die endergonische Ammoniakoxidation ist dabei mit der exergonischen Redoxreaktion von  $\text{N}_2\text{O}_4$  und Protonen zu NO und Wasser gekoppelt. Die Elektronen für diese Reaktion werden vom Kupfer bereitgestellt. Dabei werden die Cu (I)-Ionen zu Cu (II)-Ionen oxidiert. Im zweiten Schritt (2) werden Elektronen auf die AMO übertragen. Die Cu (II)-Ionen werden wieder zu Cu (I)-Ionen reduziert. Im dritten Schritt (3) wird das enzymgebundene NO mit Hilfe von Sauerstoff zu  $\text{N}_2\text{O}_4$  oxidiert. Die AMO ist nun bereit, Ammoniak erneut zu oxidieren (siehe Schritt 1). Unter oxischen Bedingungen liegt somit ein Stickoxidkreislauf vor. Ein Stickstoffzyklus wurde bereits von Zart (1997) vorgeschlagen.

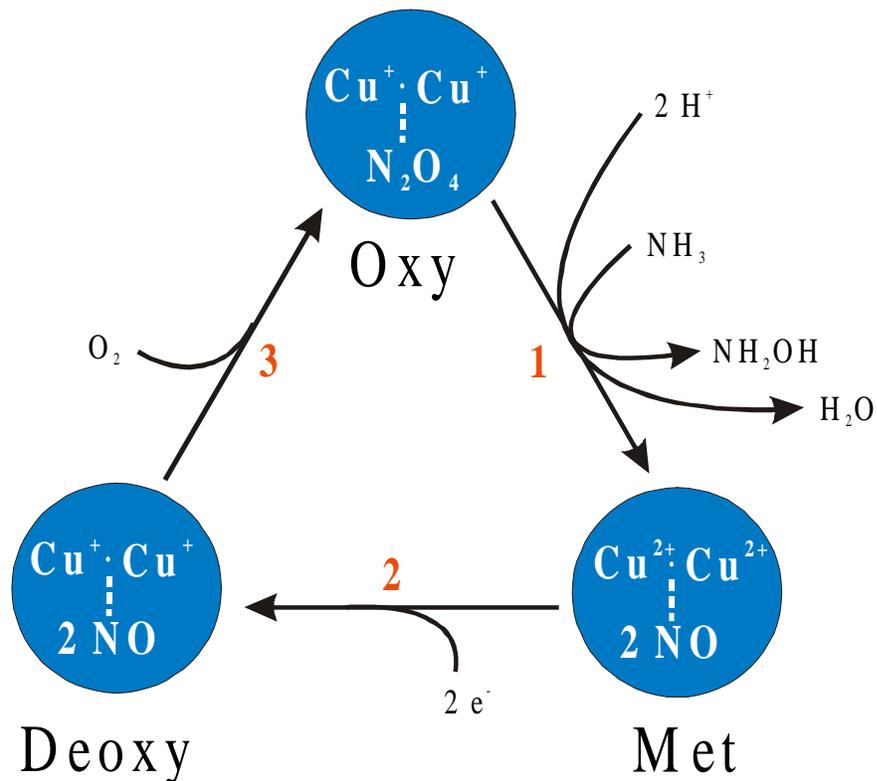
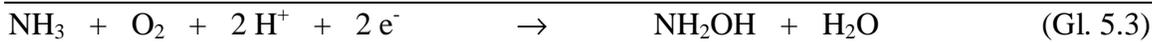


Abb. 5.1: Hypothetisches Modell des Reaktionsmechanismus der Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha*. Dargestellt sind die Oxy-, Met- und Deoxyformen der AMO. (1) Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin und Reduktion von  $\text{N}_2\text{O}_4$  zu NO unter Bildung von Wasser. (2) Übertragung von zwei Elektronen auf die AMO. (3) Oxidation von NO zu  $\text{N}_2\text{O}_4$ . Das Schema basiert auf dem Enzymmodell von Shears & Wood (1985).

Aus den Teilreaktionen ergeben sich folgende Gleichungen (Gl. 5.1, 5.2) (Schmidt et al., 2001 a).



Die Gesamtgleichung (Gl. 5.3) entspricht der Gleichung, die auch ursprünglich für die aerobe Ammoniakoxidation angegeben wurde (vergleiche Gl. 2.3) (Rees & Nason, 1966; Dua et al., 1979; Andersson & Hooper, 1983; Hyman & Wood, 1985). Der Mechanismus der Reaktion ist jedoch unterschiedlich. Für eine ständige Beteiligung von Stickoxiden an der Ammoniakoxidation spricht, dass Stickoxide auch unter oxischen Bedingungen die Ammoniakoxidationsaktivität steigern (Zart & Bock, 1998). Zudem wurde nachgewiesen, dass Stickoxide die Synthese des AmoA-Proteins induzieren (Schmidt, 2001 b).

Die anaerobe Ammoniakoxidation mit  $\text{N}_2\text{O}_4$  findet im Gegensatz zur aeroben Oxidation mit  $\text{O}_2$  nur in zwei Teilschritten statt. Der dritte Schritt (3 in Abb. 5.1 und Gl. 5.2) erfolgt nicht, da kein Sauerstoff zur Verfügung steht. Das enzymgebundene NO wird durch  $\text{N}_2\text{O}_4$  des Mediums ersetzt und NO wird ins Medium abgegeben. Die NO-Freisetzung bei der anaeroben Ammoniakoxidation steht in Einklang mit den Ergebnissen von Schmidt (1997), Schmidt & Bock (1997, 1998) und Schmidt et al. (2001 a).

Der angegebene, dreistufige Mechanismus beruht auf dem Reaktionsmechanismus der kupferhaltigen Monooxygenasen Tyrosinase und Hämocyanin (Lerch et al., 1986). Die drei Zustände der AMO werden dabei als Oxy-, Met- und Deoxyform bezeichnet (Abb. 5.1) (Shears & Wood, 1985; Bédard & Knowles, 1989). In diesem Modell wird die Deoxyform durch Metallchelatoren gehemmt. Neueste Ergebnisse zeigten, dass vermutlich auch Acetylen an die Deoxyform bindet und somit die aerobe, nicht aber die anaerobe Ammoniakoxidation hemmt (Schmidt et al., 2001 a). Da Acetylen an das AmoA-Protein bindet und diese markiert (McTavish et al., 1993 a), hat die AmoA wahrscheinlich, nicht wie bisher vermutet, die Funktion der Aktivierung von Ammoniak. Die AmoA scheint vielmehr Sauerstoff zu aktivieren.

Anhand des Modells der AMO können die Ergebnisse der Aktivitätstests interpretiert werden, insbesondere die Sauerstoffempfindlichkeit der Zellextrakte nach einem anaeroben Zellaufschluss im Gegensatz zum aeroben Zellaufschluss. Werden die Zellen für den Aktivitätstest in Gegenwart von Sauerstoff und Ammonium aufgeschlossen, kann enzymgebundenes NO zu  $\text{N}_2\text{O}_4$  oxidiert werden (Schritt 3, Abb. 5.1). Der Stickoxidzyklus der AMO ist damit geschlossen. Im nachfolgenden Aktivitätstest hatten die zellfreien Extrakte in

Gegenwart von  $O_2$  eine höhere spezifische Aktivität als in Gegenwart von 25 ppm  $NO_2/N_2O_4$ . Dies ist darauf zurückzuführen, dass den Zellen anaerob weniger Oxidationsmittel ( $NO_2/N_2O_4$ ) als aerob ( $O_2$ ) zur Verfügung steht. Werden die Zellen hingegen in Abwesenheit von Sauerstoff aufgeschlossen, kann die Oxidation von  $NO$  zu  $N_2O_4$  nicht stattfinden (Schritt 3, Abb. 5.1). Bei der Herstellung der Extrakte geht vermutlich das enzymgebundene  $NO$  aus der Deoxyform verloren. Kommen die zellfreien Extrakte nun im anschließenden aeroben Enzymtest mit Sauerstoff in Kontakt, ist keine aerobe Ammoniakoxidation möglich. Da keine Stickoxide mehr an das Enzym gebunden sind, kann der dritte Teilschritt der AMO-Reaktion nicht stattfinden. Für diese Vermutungen spricht, dass eine aerobe Ammoniakoxidation der angereicherten AMO erst nach Begasung mit  $NO$  zu messen war (Block, 2001). Hingegen wurde nach einem Aufschluss unter anoxischen Bedingungen eine anaerobe Ammoniakoxidation mit  $NO_2/N_2O_4$  festgestellt. Zwar wird auch hier angenommen, dass bei dem Aufschluss der Zellen Stickoxide verloren gehen, diese können jedoch durch Stickoxide des Mediums ersetzt werden. Dabei wurde die anaerobe Aktivität der zellfreien Extrakte nach einem anaeroben Zellaufschluss im Gegensatz zu der anaeroben Aktivität nach einem aeroben Zellaufschluss sogar noch gesteigert. Dieses ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es in Gegenwart von Sauerstoff und Elektronen beim Zellaufschluss stets zu einer Bildung von Sauerstoffradikalen kommen kann, die mit  $NO$  weiter zu Peroxynitrit ( $ONO_2$ ) reagieren können und alle Enzyme der Zelle schädigen. Da die Elektronenübertragungsreaktion an der Deoxyform der AMO (Abb. 5.1, Schritt 2) stattfindet, ist diese Zustandsform der AMO besonders sauerstoffempfindlich. Diese Sauerstoffradikalreaktionen treten bei dem Zellaufschluss unter anoxischen Bedingungen nicht auf.

Weiterhin erklärt das Modell, warum nach einer aeroben Vorinkubation der angereicherten AMO mit dem Reduktionsmittel  $NADH$  niedrigere spezifische Aktivitäten gemessen wurden als nach einer Vorinkubation mit Ammonium. Nach einer Inkubation von  $NADH$  in Abwesenheit von Ammonium, und somit bei einem Elektronenüberschuss, kam es in Gegenwart von  $O_2$  zur Bildung von Peroxyverbindungen, die die Enzymsysteme hemmten. War dagegen zunächst nur Ammonium und kein  $NADH$  vorhanden, lag kein hemmender Elektronenüberschuss vor.

## 5.7 OFFENE FRAGEN

Trotz der vorgestellten Ergebnisse, sind noch wichtige Fragen aus dem Bereich der allgemeinen Physiologie der Nitrifikanten offen. Hierzu gehört die Frage, warum bisher noch kein chemolithoautotropher Organismus gefunden wurde, der Ammoniak direkt zu Nitrat oxidieren kann. Offensichtlich scheint eine Unverträglichkeit im Bereich der Schlüsselenzyme vorzuliegen. Unterschiede bestehen darin, dass Ammoniakoxidanten für die Aktivierung des Sauerstoffs in der Monooxygenasereaktion Stickoxide benötigen. Die Oxidation des Nitrits findet dagegen mit Wasser statt. Das Zwischenprodukt der

Ammoniakoxidation, Hydroxylamin, hemmt zudem die Nitritoxidation. Weiterhin haben die Stickoxide bei den Ammoniak- und den Nitritoxidanten unterschiedliche Funktionen. Bei Ersteren dient  $N_2O_4$  in einem internen Stickoxidzyklus als Cofaktor der AMO und ermöglicht dadurch zudem eine Ammoniakoxidation unter anoxischen Bedingungen. Nitritoxidanten sind nicht auf Stickoxide angewiesen, gleichwohl kann NO als Substrat dienen, welches zu Nitrat oxidiert wird.

Weiterhin nur unzureichend beantwortet bleibt die Frage, warum Ammoniakoxidanten nicht mit ihrem Zwischenprodukt Hydroxylamin wachsen können. Eine Antwort auf diese Frage bietet das in Abb. 5.1 dargestellte Enzymmodell der AMO. Durch die Oxidation von Hydroxylamin entsteht ein Überschuss an Elektronen, welcher auf die AMO geleitet wird und dort durch die Abwesenheit von Ammoniak nicht abfließen kann. Dieser Elektronenüberschuss führt, wie bereits dargestellt, durch die Aktivierung von Sauerstoff zur Bildung toxischer Peroxyverbindungen und hemmt die Zellen irreversibel. Ein Wachstum mit Hydroxylamin ist nur bei gleichzeitiger Hemmung der AMO mit Acetylen möglich (Oesterreicher, 2001). Acetylen hemmt die sauerstoffaktivierende Reaktion der AMO und unterbindet somit die Radikalreaktionen. Vermutlich ist der Elektronenüberschuss an der AMO in Abwesenheit von Ammonium auch der Grund, warum Ammoniakoxidanten nicht fakultativ lithoautotroph mit organischen Substanzen wachsen können. Das Wachstum mit organischen Substanzen wird zudem durch einen unvollständigen Citratzyklus und die Abwesenheit einer NADH-Oxidase verhindert (Hooper, 1969; Watson et al., 1971).

## 5.8 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen die AMO von *Nitrosomonas eutropha* boten eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. So war es mit Hilfe der Antikörper möglich, Ammoniakoxidanten in Anreicherungskulturen von Naturproben nachzuweisen. Sie besitzen deutliche Vorteile gegenüber den herkömmlich eingesetzten Antikörpern gegen Zellwandaußenschichten der Ammoniakoxidanten. Außerdem boten sie eine alternative Nachweismethode zu der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (FISH). Neben der Anwendung der Antikörper in Anreicherungskulturen sollte in Zukunft auch versucht werden, Ammoniakoxidanten *in situ* in Naturproben nachzuweisen. Zur Charakterisierung der Ammoniakoxidanten eines Habitates ist es empfehlenswert, verschiedene Methoden zur Identifizierung gleichzeitig anzuwenden. Neben dem Einsatz der Antikörper und Oligonukleotidsonden sollte dabei auch die Isolierung der Ammoniakoxidanten nicht vernachlässigt werden, um die Ergebnisse an Reinkulturen abzusichern.

Neben den beschriebenen ökologischen Untersuchungen wurden die Antikörper vor allem zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der AMO eingesetzt. Dabei ist hervorzuheben, dass mit Hilfe der Antikörper eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über das

---

Schlüsselenzym gewonnen wurden. Vor allem die Isolierung des aktiven Enzyms aus *Nitrosomonas eutropha* ist von besonderer Bedeutung. Die vorgelegten Ergebnisse stellen den ersten Schritt auf dem Weg zur vollständigen Beschreibung der Struktur und des enzymatischen Mechanismus der AMO dar. Die aus den Ergebnissen abgeleiteten Vorstellungen eines Funktionsmodells der AMO gelten streng genommen nur für *Nitrosomonas eutropha*. Aufgrund der hohen serologischen Gemeinsamkeiten der AMO aller Ammoniakoxidanten, ist es jedoch wahrscheinlich, dass dieses Modell auch für die übrigen Gattungen der Ammoniakoxidanten der  $\beta$ -Proteobakterien Gültigkeit hat. Mit Hilfe der neuen Kenntnisse ist es möglich, die Ammoniakoxidation und damit einen wichtigen Teilabschnitt des Stickstoffkreislaufes besser zu verstehen und gegebenenfalls zu regulieren.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aamand, J., T. Ahl und E. Spieck.** 1996. Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi*, and *N. vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2352-2355.
- Abeliovich, A. und A. Vonshak.** 1992. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol.* **158**:267-270.
- Aleem, N. I. H.** 1966. Generation of reducing power in chemosynthesis. II. Energy linked reduction of pyridine nucleotides in chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**:216-224.
- Allison, S. M. und J. I. Prosser.** 1991. Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils. *Soil Biol. Biochem.* **23**:45-51.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Alzerreca, J. J., J. M. Norton und M. G. Klotz.** 1999. The *amo* operon in marine ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:21-29.
- Anderson, J. H.** 1965. Studies on the formation of nitrogenous gas from hydroxylamine by *Nitrosomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* **97**:337-339.
- Anderson, J. M. und B. Anderson.** 1982. The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends Biochem. Sci.* **7**:288-292.
- Anderson, I. C. und J. S. Levine.** 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3525-3533.
- Anderson, I. C., M. Poth, J. Homstead und D. Burdige.** 1993. A comparison of NO and N<sub>2</sub>O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:938-945.
- Andersson, K. K. und A. B. Hooper.** 1983. O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O are each the source of one O in NO<sub>2</sub><sup>-</sup> produced from NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by *Nitrosomonas*: <sup>15</sup>N-NMR evidence. *FEBS Lett.* **164**:236-240.
- Andersson, K. K., J. D. Lipscomb, M. Valentine, E. Munck und A. B. Hooper.** 1986. Tetraheme cytochrome c<sub>554</sub> from *Nitrosomonas europaea*: heme-heme interactions and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **261**:1126-1138.
- Arciero, D. M., T. Vanneli, M. Logan und A. B. Hooper.** 1989. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**:640-643.
- Arciero, D. M., C. Balny und A. B. Hooper.** 1991. Spectroscopic and rapid kinetic studies of reduction of cytochrome c-554 by hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochemistry* **30**:11466-11472.
- Arciero, D. M. und A. B. Hooper.** 1993. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an octa-heme subunit. *J. Biol. Chem.* **268**:14645-14654.
- Arciero, D. M., A. B. Hooper, M. Cai und R. Timkovich.** 1993. Evidence for the structure of the active site heme P460 in hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*. *Biochemistry* **32**:9370-9378.

- Arrigo, K. R., G. Dieckmann, M. Gosselin, D. H. Robinson, C. H. Fritsen und C. W. Sullivan.** 1995. High resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo Sound, Antarctica: biomass, nutrient, and production profiles within a dense microalgal bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**:1-3.
- Baker, G. M., M. Noguchi und G. Palmer.** 1987. The reaction of cytochrome oxidase with cyanide. Preparation of the rapidly reaction form and its conversion to the slowly reacting form. *J. Biol. Chem.* **262**:595-604.
- Bano, N. und J. T. Hollibaugh.** 2000. Diversity and distribution of DNA sequence with the affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1960-1969.
- Bartosch, S.** 1999. Identifizierung von Nitritoxidanten mit monoklonalen Antikörpern gegen die Nitritoxidoreduktase. Dissertation. Universität Hamburg.
- Bartosch, S., I. Wolgast, E. Spieck und E. Bock.** 1999. Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4126-4133.
- Bartosch, S., C. Hartwig, E. Spieck und E. Bock.** 2001. Immunological detection of *Nitrospira*-like bacteria in various soils. *Microbiol. Ecol.*, im Druck.
- Bédard, C. und R. Knowles.** 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* **53**:68-84.
- Belser, L. W. und E. L. Schmidt.** 1978. Serological diversity within a terrestrial ammonia-oxidizing population. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:589-593.
- Belser, L. W.** 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **16**:309-333.
- Belser, L. W. und E. L. Schmidt.** 1981. Inhibitory effect of nitrapyrin on the three genera of ammonia oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:819-821.
- Bergmann, D. J. und A. B. Hopper.** 1994 a. Sequence of the gene, *amoB*, for the 43 kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **204**:759-762.
- Bergmann, D. J. und A. B. Hooper.** 1994 b. The primary structure of cytochrome P460 of *Nitrosomonas europaea*: presence of a c-heme binding motif. *FEBS Lett.* **353**:324-326.
- Bergmann, D. J., D. M. Arciero und A. B. Hooper.** 1994. Organization of the hao gene cluster of *Nitrosomonas europaea*: genes for two tetraheme c cytochromes. *J. Bacteriol.* **176**: 3148-3153.
- Beuscher, N., F. Mayer und G. Gottschalk.** 1974. Citrate lyase from *Rhodospseudomonas gelatinosa*: purification, electron microscopy and subunit structure. *Arch. Microbiol.* **100**:307-328.
- Blaurock, A. E. und W. Stoeckenius.** 1971. Structure of purple membrane. *Nature New Biol.* **233**:152-155.
- Block, H.** 2001. Biochemische Charakterisierung der Ammoniakmonooxygenase (AMO). Diplomarbeit. Universität Hamburg.
- Bock, E., H. Sundermeyer-Klinger und E. Stackebrandt.** 1983. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**:281-284.
- Bock, E., H.-P. Koops, U. C. Möller und M. Rudert.** 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **153**:105-110.
- Bock, E., I. Schmidt, R. Stüven und D. Zart.** 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **163**:16-20.
- Bothe, H., G. Jost, M. Schloter, B. B. Ward und K.-P. Witzel.** 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:673-690.

- Böttcher, B. und H.-P. Koops.** 1994. Growth of lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria on hydroxylamine. FEMS Microbiol. Lett. **122**:263-266.
- Böttcher, B.** 1996. Untersuchungen zur Phylogenie des Ammoniak oxidierenden Systems nitrifizierender Bakterien. Dissertation, Universität Hamburg.
- Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.
- Bruns, M. A., J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, J. I. Prosser und E. A. Paul.** 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and succesional soils. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2994-3000.
- Burton, S. A. und J. I. Prosser.** 2001. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. Appl. Environ. Microbiol. **67**:2952-2957.
- Carlemalm, E., R. M. Garavito und W. Villinger.** 1982. Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. J. Microsc. **126**:123-143.
- Clark, C. und E. L. Schmidt.** 1966. Effect of mixed culture of *Nitrosomonas europaea* stimulated by uptake and utilization of pyruvate. J. Bacteriol. **91**:367-373.
- Cohen-Bazire, G.** 1963. Some observations on the organization of the photosynthetic apparatus in purple and green bacteria, 89-110. In H. Gest, A. San Pietro und L. P. Vernon (Hrsg.), Bacterial photosynthesis. Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Cooper, A. B.** 1983. Population ecology of nitrifiers in a stream receiving geothermal inputs of ammonium. Appl. Environ. Microbiol. **45**:1170-1177.
- Corbin, J. L.** 1984. Liquid chromatographic-fluorescence determination of ammonia from nitrogenase reactions: a 2 min assay. Appl. Environ. Microbiol. **47**:1027-1030.
- Coyne, M. S., A. Arunakumari, B. A. Averill und J. M. Tiedje.** 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2924-2931.
- Crossman, L. C., J. W. B. Moir, J. J. Enticknap, D. J. Richardson und S. Spiro.** 1997. Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. Microbiol. **143**:3775-3783.
- Daum, M., W. Zimmer, H. Papen, K. Kloos, K. Nawrath und H. Bothe.** 1998. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. Current Microbiol. **37**:281-288.
- de Boer, W., H. Duyts und H. J. Laanbroek.** 1989. Urea stimulated autotrophic nitrification in suspensions of fertilized, acid soil. Soil Biol. Biochem. **21**:349-354.
- de Boer, W., P. J. A. Klein Gunnewiek, M. Veenhuis, E. Bock und H. J. Laanbroek.** 1991. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3600-3604.
- de Bruijn, P., A. A. van de Graaf, M. S. M. Jetten, L. A. Robertson und J. G. Kuenen.** 1995. Growth of *Nitrosomonas europaea* on hydroxylamine. FEMS Microbiol. Lett. **125**:179-184.
- Diaz, M. C. und B. B. Ward.** 1997. Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities. Mar. Ecol. Prog. Ser. **156**:97-107.
- DiSpirito, A. A., L. R. Taaffe und A. B. Hooper.** 1985 a. Localization and concentration of hydroxylamine oxidoreductase and cytochromes c-552, c-554, c<sub>m</sub>-552 and a in *Nitrosomonas europaea*. Biochim. Biophys. Acta **806**:320-330.
- DiSpirito, A. A., L. R. Taaffe, J. D. Lipscomb und A. B. Hooper.** 1985 b. A "blue" copper oxidase from *Nitrosomonas europaea*. Biochim. Biophys. Acta **827**:320-326.

- DiSpirito, A. A., J. D. Lipscomb und A. B. Hooper.** 1986. A three-subunit cytochrome aa<sub>3</sub> from *Nitrosomonas europaea*. J. Biol. Chem. **261**:17048-17056.
- Drozd, J. W.** 1976. Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **110**:257-262.
- Dua, R. D., B. Bhandari und D. J. D. Nicholas.** 1979. Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. FEBS Lett. **106**:401-404.
- Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig und E. Bock.** 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Arch. Microbiol. **164**:16-23.
- Ensign, S. A., M. R. Hyman und D. J. Arp.** 1993. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas* by copper. J. Bacteriol. **175**:1971-1998.
- Fazekas de St. Groth, S., R. G. Webster und A. Datyner.** 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biophys. Acta **283**:155-166.
- Fernandez-Patron C., L. Castellanos-Serra und P. Rodriguez.** 1992. Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. BioTechniques. **12**:564.
- Fox, B. G., W. A. Froland, J. E. Dege und J. D. Limpscomb.** 1989. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph. J. Biol. Chem. **264**:10023-10033.
- Francis, R. T. jr. und R. B. Becker.** 1984. Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. Anal. Biochem. **136**:509-514.
- Fujiwara, T., T. Yamanaka und Y. Fukumori.** 1995. The amino acid sequence of *Nitrosomonas europaea* cytochrome c-552. Current Microbiol. **31**:1-4.
- Fuller, R. C.** 1963. Comparative structure and activities of the microbial photosynthetic apparatus, 223-241. In D. Mazia und A. Tyler (Hrsg.), General physiology of cell specialization. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Garrett, R. H. und A. Nason.** 1969. Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase. J. Biol. Chem. **244**:2870-2882.
- Golovocheva, R. S.** 1976. Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. Microbiol. **45**:329-331.
- Green, P. N., I. J. Bousfield und D. Hood.** 1988. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmani* sp. nov., *M. fuyisawanease* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**:124-127.
- Harms, H., H.-P. Koops und H. Wehrmann.** 1976. An ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov.gen.nov.sp. Arch. Microbiol. **108**:105-111.
- Harms, H. und H.-P. Koops.** 1980. Taxonomie und Verbreitung lithotropher Ammoniak oxidierender Bakterien. Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg. **17**:73-88.
- Hartwig, C.** 1999. Anreicherung von *Nitrospira* aus Naturproben. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Hastings, R. C., M. T. Ceccherini, N. Mi Claus, J. R. Saunders, M. Bazzicalupo und A. J. McCarthy.** 1997. Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure. FEMS Microbiol. Ecol. **23**:45-54.
- Hastings, R. C., J. R. Saunders, G. H. Hall, R. W. Pickup und A. J. McCarthy.** 1998. Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake. Appl. Environ. Microbiol. **64**:3674-3682.

- Head, I. M., W. D. Hiorns, T. M. Embley, A. J. McCarthy und J. R. Saunders.** 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1147-1153.
- Henry, Y., C. Ducrocq, J.-C. Drapier, D. Servent., C. Pellat und A. Guissani.** 1991. Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur. Biophys. J.* **20**:1-5.
- Hiorns, W. D., R. C. Hastings, I. M. Head, A. J. McCarthy, J. R. Saunders, R. W. Pickup und G. H. Hall.** 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrosospira* in the environment. *Microbiol.* **141**:2793-2800.
- Hock, B.** 1996. Advances in immunochemical detection of microorganisms. *Ann. Biol. Clin.* **54**:243-252.
- Hollocher, T. C., M. E. Tate und D. J. D. Nicholas.** 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definitive <sup>18</sup>O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **256**:10834-10836.
- Hollocher, T. C., S. Kumar und D. J. D. Nicholas.** 1982. Respiration-dependent proton translocation in *Nitrosomonas europaea* and its apparent absence in *Nitrobacter agilis* during inorganic oxidations. *J. Bacteriol.* **149**:1013-1020.
- Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Lstrom und J. C. Murrell.** 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:203-208.
- Hommel, N. G., L. A. Sayavedra-Soto und D. J. Arp.** 1996. Mutagenesis of hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea* by transformation and recombination. *J. Bacteriol.* **178**:3710-3714.
- Hommel, N. G., L. A. Sayavedra-Soto und D. J. Arp.** 1998. Mutagenesis and expression of *amo*, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **180**:3353-3359.
- Hooper, A. B.** 1968. A nitrite-reducing enzyme form *Nitrosomonas europaea* - preliminary characterization with hydroxylamine as electron donor. *Biochim. Biophys. Acta* **162**:49-65.
- Hooper, A. B.** 1969. Biochemical basis of obligate autotrophy of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **97**:776-779.
- Hooper, A. B., R. H. Erickson und K. R. Terry.** 1972. Electron transport systems of *Nitrosomonas*: isolation of a membrane-envelope fraction. *J. Bacteriol.* **110**:430-438.
- Hooper, A. B. und K. R. Terry.** 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **115**:480-485.
- Hooper, A. B. und K. R. Terry.** 1974. Photoinactivation of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* **119**:899-906.
- Hooper, A. B., P. Maxwell, und K. R. Terry.** 1978. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: absorption spectra and content of heme and metal. *Biochemistry* **17**:2984-2989.
- Hooper, A. B. und K. R. Terry.** 1979. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* - production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta* **571**:12-20.
- Hooper, A. B. und C. Balny.** 1982. Reaction of oxygen with hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: fast kinetics. *FEBS Lett.* **144**:299-303.
- Hooper, A. B., P. Debey, K. K. Anderson und C. Balny.** 1983. Heme P460 of hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*. Reaction with CO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* **134**:83-87.
- Hooper, A. B., T. Vannelli, D. J. Bergmann und D. M. Arciero.** 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Ant. van Leeuwenhoek* **71**:59-67.

- Hoppert, M., T. J. Mahony, F. Mayer und D. J. Miller.** 1995. Quaternary structure of the hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **163**:300-306.
- Horz, H. P., J. H. Rotthauwe, T. Lukow und W. Liesack.** 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. J. Microbiol. Methods **39**:197-204.
- Hubley, J. H., A. W. Thomson und J. F. Wilkinson.** 1975. Specific inhibitors of methane oxidation in *Methylosinus trichosporium*. Arch. Microbiol. **102**:199-202.
- Hudgin, R. L., W. E. Pricer und G. Ashwell.** 1974. Isolation and properties of a rabid liver binding protein specific for asialoglycoproteins. J. Biol. Chem. **249**:5536.
- Hyatt, A. D.** 1991. Immunogold labelling techniques, 59-81. In R. Harris (Hrsg.), Electron microscopy in biology. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Hyman, M. R. und P. M. Wood.** 1983. Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Biochem. J. **21**:31-37.
- Hyman, M. R. und P. M. Wood.** 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. Biochem. J. **227**:719-725.
- Hyman, M. R., A. W. Sansome-Smith, J. H. Shears und P. M. Wood.** 1985. A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone. Arch. Microbiol. **143**:302-306.
- Hyman, M. R., I. B. Murton und D. J. Arp.** 1988. Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. Appl. Environ. Microbiol. **54**:3187-3190.
- Hyman, M. R. und D. J. Arp.** 1992. <sup>14</sup>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>- and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-labelling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. J. Biol. Chem. **267**:1534-1545.
- Hyman, M. R. und D. J. Arp.** 1993. An electrophoretic study of the thermal- and reductant-dependent aggregation of the 27 kDa component of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. Electrophoresis **14**:619-627.
- Hyman, M. R. und D. J. Arp.** 1995. Effects of ammonia on the de novo synthesis of polypeptides in cells of *Nitrosomonas europaea* denied ammonia as an energy source. J. Bacteriol. **177**:4974-4979.
- Hyman, M. R., S. A. Russell, R. L. Ely, K. J. Williamson und D. J. Arp.** 1995. Inhibition, inactivation, and recovery of ammonia-oxidizing activity in cometabolism of trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **61**:1480-1487.
- Hynes, R. K. und R. Knowles.** 1978. Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. **4**:319-321.
- Hynes, R. K. und R. Knowles.** 1982. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. Can. J. Microbiol. **28**:334-340.
- Igarashi, N., H. Moriyama, T. Fujiwara, Y. Fukumori und N. Tanaka.** 1997. The 2.8 Å structure of hydroxylamine oxidoreductase from nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. Nature Struct. Biol. **4**:276-284.
- Iverson, T. M., D. M. Arciero, B. T. Hsu, M. S. P. Logan, A. B. Hooper und D. C. Rees.** 1998. Heme packing motifs revealed by the crystal structure of the tetra-heme cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea*. Nature Struct. Biol. **5**:1005-1012.
- Jiang, Q. Q. und L. R. Bakken.** 1999. Comparison of *Nitrospira* strains isolated from terrestrial environments. FEMS Microbiol. Ecol. **30**:171-186.

- Johnstone, B. H. und R. D. Jones.** 1988. Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonium-oxidizing bacterium. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**:295-303.
- Jones, R. D. und R. Y. Morita.** 1983. Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:401-410.
- Jones, C. W. und R. K. Poole.** 1985. The analysis of cytochromes. *Meth. Microbiol.* **18**:285-328.
- Jones, R. D. und R. Y. Morita.** 1985. Survival of a marine ammonium oxidizer under energy-source deprivation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **26**:175-179.
- Jones, R. D., R. Y. Morita, H.-P. Koops und S. W. Watson.** 1988. A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **34**:1122-1128.
- Juliette, L. Y., M. R. Hyman und D. J. Arp.** 1995. Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity in vitro. *J. Bacteriol.* **177**:4908-4913.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H.-P. Koops und M. Wagner.** 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3042-3051.
- Keener, W. K. und D. J. Arp.** 1993. Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2501-2510.
- Keener, W. K. und D. J. Arp.** 1994. Transformation of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1914-1920.
- Keener, W. K., S. A. Russell und D. J. Arp.** 1998. Kinetic characterization of the inactivation of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by alkyne, aniline and cyclopropane derivatives. *Biochim. Biophys.* **1388**:373-385.
- Klotz, M. G., J. Alzerreca und J. M. Norton.** 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* **150**:65-73.
- Klotz, M. G. und J. M. Norton.** 1998. Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**:303-311.
- Kok, M., R. Oldenhuis, M. P. G. van der Linden, C. H. C. Meulenber, J. Kingma und B. Witholt.** 1989. *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene: sequence and expression. *J. Biol. Chem.* **264**:5435-5441.
- Konuma, S., H. Satoh, T. Mino und T. Matsu.** 2001. Comparison of enumeration methods of ammonia-oxidizing bacteria. *Wat. Sci. Techn.* **43**:107-114.
- Koops, H.-P., H. Harms und H. Wehrmann.** 1976. Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. *Arch Microbiol.* **107**:277-282.
- Koops, H.-P. und H. Harms.** 1985. Deoxyribonucleic acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **141**: 214-218.
- Koops, H.-P., B. Böttcher, U. C. Möller, A. Pommerening-Röser und G. Stehr.** 1990. Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Arch. Microbiol.* **154**:244-248.
- Koops, H.-P., B. Böttcher, U. C. Möller, A. Pommerening-Röser und G. Stehr.** 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov.,

- Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. J. Gen. Microbiol. **137**:1689-1699.
- Koops, H.-P. und U. C. Möller.** 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria, 2625-2637. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer (Hrsg.), The Prokaryotes, Bd. 3. Springer Verlag, New York.
- Koops, H.-P. und A. Pommerening-Röser.** 2001. Distribution and ecophysiology of nitrifying bacteria emphasizing cultured species. FEMS Microbiol. Ecol. **1255**:1-9.
- Körner, H., K. Frunzke, K. Döhler und W. G. Zumft.** 1987. Immunochemical patterns of distribution of nitrous oxide reductase and nitrite reductase (cytochrome cd<sub>1</sub>) among denitrifying pseudomonas. Arch. Microbiol. **148**:20-24.
- Krümmel, A. und H. Harms.** 1982. Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. Arch. Microbiol. **133**:50-54.
- Kuenen, J. G. und L. A. Robertson.** 1994. Combined nitrification-denitrification processes. FEMS Microbiol. Rev. **15**:109-117.
- Kumar, S. und D. J. D. Nicholas.** 1982. A proton motive force-dependent adenosine-5'-triphosphate synthesis in speroplasts of *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. **14**:21-25.
- Kyse-Andersen, J.** 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10**: 203-209.
- Laanbroek, H. J. und S. Gerards.** 1993. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. Arch. Microbiol. **159**:453-459.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
- Lees, H.** 1946. Effect of copper-enzyme poisons on soil nitrification. Nature **158**:97.
- Lemberg, R. und J. Barrett.** 1973. Bacterial cytochromes and cytochromes oxidases, 217-326. In: R. Barrett und J. Lemberg (Hrsg.), Cytochromes. London, New York: Academic Press.
- Lerch, K., M. Huber, H.-J. Schneider, R. Drexel und B. Linzen.** 1986. Different origins in the metal binding site in binuclear copper proteins, tyrosinase and hemocyanin. J. Inorg. Biochem. **26**:213-217.
- Libscomb.** 1994. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. Annu. Rev. Microbiol. **48**:371-399.
- Likens, G. E., F. H. Borman und N. M. Johnson.** 1969. Nitrification: Importance to nutrient losses in cutover forested ecosystems. Science **163**:1205-1206.
- Lin, M. S., D. E. Comings und O. S. Alfi.** 1977. Optical studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. Chromosoma **60**:15-26.
- Lontoh, S., A. A. DiSpirito, C. L. Krema, M. R. Whittaker, A. B. Hooper und J. D. Semrau.** 2000. Differential inhibition *in vivo* of ammonia monooxygenase, soluble methane monooxygenase and membrane-associated methane monooxygenase by phenylacetylene. Environ. Microbiol. **2**:485-494.
- Lott, U.** 1990. Charakterisierung und Identifizierung eines Ammoniakoxidanten aus Abwasser. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Loveless, J. E. und H. A. Painter.** 1968. The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. J. Gen. Microbiol. **52**:1-14.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265-275.

- Magee, W. E. und R. H. Burris.** 1954. Fixation of N<sub>2</sub> and utilization of combined nitrogen by *Nostoc muscorum*. Amer. J. Bot. **41**:777-782.
- Mancinelli, R. L. und C. P. McKay.** 1983. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. Appl. Environ. Microbiol. **46**:198-202.
- Mansch, R. und E. Bock.** 1998. Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. Biodegradation **9**:47-64.
- Martiny, H. und H.-P. Koops.** 1982. Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic ammonia oxidizing bacteria. Ant. van Leeuwenhoek **48**:327-336.
- Masson, P., D. M. Arciero, A. B. Hooper und C. Balny.** 1990. Electrophoresis at elevated hydrostatic pressure of the multiheme hydroxylamine oxidoreductase. Electrophoresis **11**:128-133.
- Matin, A.** 1978. Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **32**:311-318.
- Matsudaira P.** 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. **262**:10035-10038.
- Matulewich, V. A., P. F. Strom und M. S. Finstein.** 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. Appl. Environ. Microbiol. **29**:265-268.
- McCaig, A. E., C. J. Philips, J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, S. M. Harvey, R. A. Herbert, T. M. Embley und J. I. Prosser.** 1999. Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. Appl. Environ. Microbiol. **65**:213-220.
- McDonald, R. M.** 1986. Nitrification in soil: an introductory history, 1-16. In J. I. Prosser (Hrsg.), Nitrification. IRL Press, Oxford.
- McTavish, H., J. A. Fuchs und A. B. Hooper.** 1993 a. Sequence of the gene coding for ammonia-monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. **175**:2436-2444.
- McTavish, H., F. LaQuier, D. Arciero, M. Logen, G. Mundfrom, J. A. Fuchs und A. B. Hooper.** 1993 b. Multiple copies of genes coding for electron transport proteins in the bacterium *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. **175**:2445-2447.
- McTavish, H., D. M. Arciero und A. B. Hooper.** 1995. Interactions with membranes of cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea*. Arch. Biochem. Biophys. **324**:53-58.
- Meincke, M., E. Krieg und E. Bock.** 1989. *Nitrosovibrio* spp., the dominant ammonia oxidizing bacteria in building stones. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2108-2110.
- Mendum, T. A., R. E. Sockett und P. R. Hirsch.** 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in arable soils to nitrogen fertilizer. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4155-4162.
- Miller, D. J. und P. M. Wood.** 1983 a. Two membrane-bound b-type cytochromes in *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. **20**:323-326.
- Miller, D. J. und P. M. Wood.** 1983 b. The soluble cytochrome oxidase of *Nitrosomonas europaea*. J. Gen. Microbiol. **129**:1645-1650.
- Miller, D. J. und D. J. D. Nicholas.** 1985. Characterization of a soluble cytochrome oxidase/nitrite reductase from *Nitrosomonas europaea*. J. Gen. Microbiol. **131**:2851-2854.
- Mitchell, P.** 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. **41**:445-502.

- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann und D. A. Stahl. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2156-2162.
- Moir, J. W. B., L. C. Crossman, S. Spiro und D. J. Richardson. 1996. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* **387**:71-74.
- Murray, R. G. E. und S. W. Watson. 1965. Structure of *Nitrosocystis oceanus* and comparison with *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *J. Bacteriol.* **89**:1594-1609.
- Nejidat, A., H. Shmueli und A. Abeliovich. 1997. Effect of ammonia starvation on hydroxylamine oxidoreductase activity of *Nitrosomonas europaea*. *J. Biochem.* **121**:957-960.
- Nguyen, H.-H., S. J. Elliott, J. H.-K. Yip und S. I. Chan. 1998. The particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a novel copper-containing three-subunit enzyme. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**:7957-7966.
- Nishio, T., T. Yoshikura, K. Chiba und Z. Inouye. 1994. Effects of organic acids on heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* OKK17. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**:1574-1578.
- Noda, N., H. Ikuta, Y. Ebie, A. Hirata, S. Tsuneda, M. Matsumura, T. Sumino und Y. Inamori. 2000. Rapid quantification and *in situ* detection of nitrifying bacteria in biofilms by monoclonal antibody method. *Wat. Sci. Techn.* **41**:301-308.
- Nold, S. C., J. Zhou, A. H. Devol und J. M. Tiedje. 2000. Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the  $\beta$ -subdivision of the *Proteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4532-4535.
- Norton, J. M., J. M. Low und M. G. Klotz. 1996. The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three identical copies in *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**:181-188.
- Oesterreicher, S. 2001. Anzucht von *Nitrosomonas eutropha* mit Hydroxylamin. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Olson, T. C. und A. B. Hooper. 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: an extracytoplasmatic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *Microbiol. Lett.* **19**:47-50.
- Ortiz de Montellano, P. R. und K. L. Kunze. 1980. Self-catalyzed inactivation of hepatic cytochrome P-450 by ethenyl substrates. *J. Biol. Chem.* **255**:5578-5585.
- Painter, H. A. 1986. Nitrification in the treatment of sewage and waste-water, 185-211. In J. I. Prosser (Hrsg.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Palling, D. J. und T. C. Hollocher. 1985. Basis and optimization of the indoxine method to determine oximes. *Microchim. Acta* **2**:137-144.
- Pinck, C. 1998. Versuche zum Nachweis des heterotrophen Wachstums von *Nitrosomonas* spec. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Pommerening-Röser, A., G. Rath und H.-P. Koops. 1996. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *System. Appl. Microbiol.* **19**:344-351.
- Poth, M. und D. D. Foelt. 1985. <sup>15</sup>N kinetic analyses of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1134-1141.
- Poth, M. 1986. Dinitrogen production from nitrite by *Nitrosomonas* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:957-959.
- Poughon, L., C.-G. Dussap und J.-B. Gros. 2001. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* **72**:416-433.

- Prior, S. D. und H. Dalton.** 1985 a. Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol. Lett.* **29**:105-109.
- Prior, S. D. und H. Dalton.** 1985 b. The effect of copper ions on membrane content and methane monooxygenase activity in methanol-grown cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **131**:155-163.
- Prosser, J. I.** 1989. Autotrophic nitrification in bacteria, 125-181. *In* A. H. Rose und D. W. Tempest (Hrsg.), *Advances in microbial physiology*, Bd. 30. Academic Press, London.
- Pryor, W. A. und J. W. Lightsey.** 1981. Mechanisms of nitrogen dioxide reaction: Initiation of lipid peroxidation and production of nitrous acids. *Science* **214**:435-437.
- Purkhold, U., A. Pommerening-Röser, S. Juretschko, M. C. Schmid, H.-P. Koops und M. Wagner.** 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368-5382.
- Rees, M. und A. Nason.** 1966. Incorporation of atmospheric oxygen into nitrite formed during ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **133**:398-401.
- Remsen, C. C., F. W. Valois und S. W. Watson.** 1967. Fine Structure of the cytomembranes of *Nitrosocystis oceanus*. *J. Bacteriol.* **94**:422-433.
- Remy, H.** 1957. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Bd. 1, Akadem. Verlagsgemeinschaft Geest + Portig KG.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.
- Robertson, L. A. und J. G. Kuenen.** 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantothropa*: oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.* **134**:857-863.
- Rohde, M., H. Gerberding, T. Mund und G.-W. Köhring.** 1988. Immunoelectron microscopic localization of bacterial enzymes: Pre- and post-embedding labelling techniques on resin-embedded samples, 175-210. *In* F. Mayer (Hrsg.), *Methods in microbiology*. Academic Press, London.
- Roth, J., M. Bendayan, E. Carlemalm, W. Villiger und M. Garavito.** 1983. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **29**:663-671.
- Rottenberg, H. und K. Hashimoto.** 1986. Fatty acid uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* **25**:1747-1755.
- Rotthauwe, J. H., K. P. Witzel und W. Liesack.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4704-4712.
- Sanden, B., C. Grunditz, Y. Hansson und G. Dalhammar.** 1994. Quantification and characterisation of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. *Water Sci. Tech.* **29**:1-6
- Saraswat, N., J. E. Alleman und T. J. Smith.** 1994. Enzyme immunoassay detection of *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1969-1973.
- Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes und D. J. Arp.** 1994. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **176**:504-510.
- Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, S. A. Russell und D. J. Arp.** 1996. Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. *Mol. Microbiol.* **20**:541-548.

- Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, J. J. Alzerreca, D. J. Arp, J. M. Norton und M. G. Klotz. 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. FEMS Microbiol. Lett. **167**:81-88.
- Schleifer, K.-H., R. Amann, W. Ludwig, C. Rothemund, N. Springer und S. Dorn. 1992. Nucleic acid probes for the identification and *in situ* detection of *Pseudomonas*, 127-134. In E. Galli, S. Silver und B. Witholt (Hrsg.), *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Schmidt, I. 1997. Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Schmidt, I. und E. Bock. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. Arch. Microbiol. **167**:106-111.
- Schmidt, I. und E. Bock. 1998. Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. Ant. van Leeuwenhoek **73**:271-278.
- Schmidt, I., E. Bock und M. S. M. Jetten. 2001 a. Ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha* with NO<sub>2</sub> as oxidant is not inhibited by acetylene. Microbiol. **147**:2247-2253.
- Schmidt, I., D. Zart und E. Bock. 2001 b. Effects of gaseous NO<sub>2</sub> on cells of *Nitrosomonas eutropha* previously incapable of using ammonia as an energy source. Ant. van Leeuwenhoek **79**:39-47.
- Schnier, P. 2001. Einfluss von Stickoxiden auf Nitrifikanten. Diplomarbeit. Universität Hamburg.
- Semrau, J. D., A. Chistoserdov, J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino und E. Kenna. 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. J. Bacteriol. **177**:3071-3079.
- Shears, J. H. und P. M. Wood. 1985. Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia monooxygenase. Biochem. J. **226**:499-507.
- Shears, J. H. und P. M. Wood. 1986. Tri- and tetra-methylhydroquinone as electron donors for ammonia monooxygenase in whole cells of *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. **33**:281-284.
- Sinigalliano, C. D., D. Kuhn und R. D. Jones. 1995. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria from an indigenous bacterial population from seawater. Appl. Environ. Microbiol. **61**:2702-2706.
- Skulachev, V. P. 1991. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. FEBS **294**:158-162.
- Smith, D. D. S. und H. Dalton. 1989. Solubilisation of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). Eur. J. Biochem. **182**:667-671.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk. 1985. Management of protein using bicinchoninic acids. Anal. Biochem. **150**:76.
- Smorzewski, W. T. und E. L. Schmidt. 1991. Numbers, activities, and diversity of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in a freshwater, eutrophic lake sediment. Can. J. Microbiol. **37**:828-833.
- Sowitzki, S. 1992. Populationsdynamik nitrifizierender Bakterien in der Elbe bei Hamburg sowie serologische Spezifität ihrer antigenen Determinanten für die Zellzahlbestimmung mit der Immunofluoreszenz-Technik. Dissertation. Universität Hamburg.
- Spector, T. 1978. Refinement of coomassie-blue method of protein quantification. Ann. Biochem. **86**:142-146.
- Spieck, E., M. Meincke und E. Bock. 1992. Taxonomic diversity of *Nitrosovibrio* strains isolated from building sandstones. FEMS Microbiol. Ecol. **102**:21-26.

- Spieck, E., J. Aamand, S. Bartosch und E. Bock.** 1996. Immunocytochemical detection and location of the membrane-bound nitrite oxidoreductase in cells of *Nitrobacter* and *Nitrospira*. FEMS Microbiol. Lett. **139**:71-76.
- Spiller, H., E. Dietsch und E. Kessler.** 1976. Intracellular appearance of nitrite and nitrate in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii*. Planta **129**:175-181.
- Spurr, A. R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastr. Res. **26**:31-43.
- Stams, A. J. M., E. M. Flaming und E. C. L. Marnette.** 1990. The importance of autotrophic versus heterotrophic oxidation of atmospheric ammonium from forest ecosystems with acid soils. FEMS Microbiol. Ecol. **74**:337-344.
- Stehr, G., B. Böttcher, B. Dittberner, G. Rath und H.-P. Koops.** 1995. The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. FEMS Microbiol. Ecol. **17**:177-186.
- Stein, L. Y., D. J. Arp und M. R. Hyman.** 1997. Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH<sub>3</sub> availability. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4588-4592.
- Stein, L. Y. und D. J. Arp.** 1998. Ammonium limitation results in the loss of ammonia-oxidizing activity in *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1514-1521.
- Steinmüller, W. und E. Bock.** 1976. Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. Arch. Microbiol. **108**:299-304.
- Stirling, D. I. und H. Dalton.** 1977. Effect of metal-binding agents and other compounds on methane oxidation by two strains of *Methylococcus capsulatus*. Arch. Microbiol. **114**:71-76.
- Stouthamer, A. H., A. P. N. de Boer, J. van der Oost und R. J. M. van Spanning.** 1997. Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria. Ant. van Leeuwenhoek **71**:33-41.
- Stüven, R., M. Vollmer und E. Bock.** 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **158**:439-443.
- Stüven, R. und E. Bock.** 2001. Nitrification and denitrification as a source for NO and NO<sub>2</sub> production in high-strength wastewater. Wat. Res. **35**:1905-1914.
- Suzuki, I. und S.-C. Kwok.** 1969. Oxidation of ammonia by spheroplasts of *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. **99**:897-898.
- Suzuki, I. und S.-C. Kwok.** 1970. Cell-free ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* extracts: effects of polyamines, Mg<sup>2+</sup> and albumin. Biochem. Biophys. Res. Commun. **39**:950-955.
- Suzuki, I., U. Dular und S.-C. Kwok.** 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. J. Bacteriol. **12**:556-558.
- Suzuki, I. und S.-C. Kwok.** 1981. A partial resolution and reconstitution of the ammonia-oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: role of cytochrome c<sub>554</sub>. Can. J. Biochem. **59**:484-488.
- Suzuki, I., S.-C. Kwok, U. Dular und D. C. Y. Tsang.** 1981. Cell-free ammonia-oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: general conditions and properties. Can. J. Biochem. **59**:477-483.
- Suzuki, M., T. Haychawa, J. P. Shaw, M. Rekik und S. Harayama.** 1991. Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. J. Bacteriol. **173**:1690-1695.
- Szwerinski, H., S. Gaiser und D. Bardtke.** 1985. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference to test in biofilm reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. **21**:125-128.

- Taljanidisz, J., L. Stewart, A. J. Smith und J. P. Klinman. 1989. Structure of bovine adrenal dopamine B-monooxygenase, as deduced from cDNA and protein sequencing: evidence that the membrane-bound form of the enzyme is anchored by an uncleaved signal peptide. *Biochemistry* **28**:1054-1061.
- Teske, A., E. Alm, J. M. Regan, S. Toze, B. E. Rittmann und D. A. Stahl. 1994. Evolutionary relationship among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* **176**:6623-6630.
- Trüper, H. G. und L. de Clari. 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:908-909.
- Tsang, D. C. Y. und I. Suzuki. 1982. Cytochrome c554 as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can. J. Biochem.* **60**:1018-1024.
- Tsong, T. Y. und R. D. Astumian. 1987. Electroconformational coupling and membrane protein function. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* **50**:1-45.
- Utåker, J. B. und J. Nes. 1998. A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**:72-88.
- Valentine, R. C., B. M. Shapiro und E. R. Stadtman. 1968. Regulation of glutamine synthetase XII. Electron microscopy of the enzyme from *E. coli*. *Biochemistry* **7**:2143-2150.
- van Miegroet, H. und D. W. Cole. 1985. Acidification in red alder and douglas fir soils: importance of nitrification. *Soil Sci. Am. J.* **49**:1274-1279.
- Vannelli, T., M. Logan, D. M. Arciero und A. B. Hooper. 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1169-1171.
- Vannelli, T. und A. B. Hooper. 1993. Reductive dehalogenation of the trichloromethyl group of nitrapyrin by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3597-3601.
- Verstraete, W. und M. Alexander. 1972. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Microbiol.* **110**:955-961.
- Völsch, A., W. F. Nader, H. K. Geiss, G. Nebe und C. Birr. 1990. Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **140**:153-158.
- Voytek, M. A. und B. B. Ward. 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1444-1450.
- Voytek, M. A. 1996. Detection, abundance and diversity of aquatic nitrifying bacteria. Dissertation, Universität Santa Cruz, Kalifornien.
- Voytek, M. A., J. C. Priscu und B. B. Ward. 1999. The distribution and relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria in lakes of the McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Hydrobiologia* **401**:113-130.
- Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops und K. H. Schleifer. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:251-264.
- Walker, N. 1978. On the diversity of nitrifiers in nature, 346-347. In D. Schlessinger (Hrsg.), *Microbiology* 1978. Am. Soc. Microbol., Washington, D. C.
- Ward, B. B. und M. J. Perry. 1980. Immunofluorescent assay for the marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus oceanus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:913-918.
- Ward, B. B. 1982. Oceanic distribution of ammonium oxidizing bacteria determined by immunofluorescent assay. *J. Mar. Res.* **40**:1155-1172.

- Ward, B. B. und A. F. Carlucci.** 1985. Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in sewage plants by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2430-2435.
- Ward, B. B., A. R. Cockcroft und K. A. Kilpatrick.** 1993. Antibody and DNA probes for detection of nitrite reductase in seawater. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2285-2293.
- Ward, B. B., D. P. Martino, M. C. Diaz und S. B. Joye.** 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline mono lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2873-2881.
- Watson, M. L.** 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Biophys. Biochem. Cytol.* **4**:475-478.
- Watson, S. W.** 1965. Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. n. *Limnol. Oceanogr.* **10**(Suppl.):R274-R289.
- Watson, S. W. und C. C. Remsen.** 1969. Macromolecular subunits in the walls of marine nitrifying bacteria. *Science* **163**:685-686.
- Watson, S. W. und C. C. Remsen.** 1970. Cell envelope of *Nitrosocystis oceanus*. *J. Ultrastruct. Res.* **33**:148-160.
- Watson, S. W., M. A. Asbell und F. W. Valois.** 1970. Ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosocystis oceanus*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **38**:1113-1119.
- Watson, S. W.** 1971. Re-isolation of *Nitrospira briensis* S. Winogradsky and H. Winogradsky, 450-456. In: Buchanan and N. E. Gibbson (Hrsg.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Watson, S. W. und M. Mandel.** 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **107**:563-569.
- Watson, S. W. und J. B. Waterbury.** 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Arch Microbiol.* **77**:203-230.
- Watson, S. W., L. B. Graham, C. C. Remsen und F. W. Valois.** 1971. A lobular, ammonia-oxidizing bacterium. *Nitrosolobus multiformis* nov. gen. nov. sp. *Arch. Microbiol.* **76**:183-203.
- Watson, S. W., F. W. Valois und J. B. Waterbury.** 1981. The family *Nitrobacteraceae*, 1005-1022. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel (Hrsg.), *The Prokaryotes*, Bd. 1. Springer Verlag Berlin.
- Watson, S. W., E. Bock, H. Harms, H.-P. Koops und A. B. Hooper.** 1989. Nitrifying bacteria, 1808-1834. In J. T. Stanley, M. P. Bryant, N. Pfennig und J. G. Holt (Hrsg.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Bd. 3. Baltimore MD, Williams & Wilkins Co.
- Weber, K. und M. Osborn.** 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412.
- Whitby, C. B., J. R. Saunders, J. Rodriguez, R. W. Pickup und A. McCarthy.** 1999. Phylogenetic differentiation of two closely related *Nitrosomonas* spp. that inhabit different sediment environments in an oligotrophic freshwater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4855-4862.
- Whittaker, M., D. Bergmann, D. Arciero und A. B. Hooper.** 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**:346-355.
- Whittenbury, R., K. C. Phillips und J. F. Wilkinson.** 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**:205-218.

- Wilhelm, R., A. Abeliovich und A. Nejidat.** 1998. Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *J. Biochem.* **124**:811-815.
- Woese, C. R., W. G. Weisburg, B. J. Paster, C. M. Hahn, R. S. Tanner, N. R. Krieg, H.-P. Koops, H. Harms und E. Stackebrandt.** 1984. The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**:327-336.
- Woese, C. R., W. G. Weisburg, C. M. Hahn, B. J. Paster, L. B. Zablen, B. J. Lewis, T. J. Macke, W. Ludwig und E. Stackebrandt.** 1985. The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:25-33.
- Wood, P. M.** 1986. Nitrification as a bacterial energy source, 39-62. *In* J. I. Prosser (Hrsg.), Nitrification. Special publications of the society of general microbiology. Bd. 20. IRL Press.
- Wood, P. M.** 1988 a. Monooxygenase and free radical mechanisms for biological ammonia oxidation, 217-243. *In* J. A. Cole und S. Ferguson (Hrsg.), The nitrogen and sulfur cycles. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wood, P. M.** 1988 b. Chemolithotrophy, 183-230. *In* C. Anthony (Hrsg.), Bacterial energy transduction. Academic Press, New York.
- Yamanaka, T. und M. Shinra.** 1974. Cytochrome c-552 and cytochrome c-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. *J. Biochem.* **75**:1265-1273.
- Youvan, D. C., E. J. Bylina, M. Alberti, H. Begusch und J. E. Hearst.** 1984. Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction center, B870 antenna, and flanking polypeptide from *R. capsulatus*. *Cell* **37**:949-957.
- Zahn, J. A., C. Duncan und A. A. DiSpirito.** 1994. Oxidation of hydroxylamine by cytochrome P-460 of obligate methylotroph *Methylococcus capsulatus* Bath. *J. Bacteriol.* **176**:5879-5887.
- Zahn, J. A. und A. A. DiSpirito.** 1996. Membrane-associated methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Bacteriol.* **178**:1018-1029.
- Zahn, J. A., D. M. Arciero, A. B. Hooper und A. A. DiSpirito.** 1996. Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* **397**:35-38.
- Zart, D.** 1997. Entwicklung eines Verfahrens zur Entfernung von Ammonium-Stickstoff mit Hilfe einer Reinkultur von *Nitrosomonas eutropha*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Zart, D. und E. Bock.** 1998. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. *Arch. Microbiol.* **169**:282-286.
- Zumft, W. G.** 1993. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**:253-264.

## VERÖFFENTLICHUNG

Teile der vorliegenden Arbeit wurden, nach vorheriger Genehmigung durch den Fachbereich Biologie der Universität Hamburg, veröffentlicht. Die Publikation ist auf den folgenden Seiten wiedergegeben.

**Pinck, C., C. Cœur, P. Potier und E. Bock.** 2001. Polyclonal antibodies recognizing the AmoB protein of ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of the class Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:118-124.

## Polyclonal Antibodies Recognizing the AmoB Protein of Ammonia Oxidizers of the $\beta$ -Subclass of the Class *Proteobacteria*

CLAUDIA PINCK,<sup>1\*</sup> CAROLINE COEUR,<sup>2</sup> PATRICK POTIER,<sup>2</sup> AND EBERHARD BOCK<sup>1</sup>

*Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, D-22609 Hamburg, Germany,<sup>1</sup> and Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France<sup>2</sup>*

Received 5 June 2000/Accepted 22 September 2000

**A 41-kDa protein of *Nitrosomonas eutropha* was purified, and the N-terminal amino acid sequence was found to be nearly identical with the sequence of AmoB, a subunit of ammonia monooxygenase. This protein was used to develop polyclonal antibodies, which were highly specific for the detection of the four genera of ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria* (*Nitrosomonas*, including *Nitrosococcus mobilis*, which belongs phylogenetically to *Nitrosomonas*; *Nitrospira*; *Nitrosolobus*; and *Nitrosovibrio*). In contrast, the antibodies did not react with ammonia oxidizers affiliated with the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria* (*Nitrosococcus oceanii* and *Nitrosococcus halophilus*). Moreover, methane oxidizers (*Methylococcus capsulatus*, *Methylocystis parvus*, and *Methylomonas methanica*) containing the related particulate methane monooxygenase were not detected. Quantitative immunoblot analysis revealed that total cell protein of *N. eutropha* consisted of approximately 6% AmoB, when cells were grown using standard conditions (mineral medium containing 10 mM ammonium). This AmoB amount was shown to depend on the ammonium concentration in the medium. About 14% AmoB of total protein was found when *N. eutropha* was grown with 1 mM ammonium, whereas 4% AmoB was detected when 100 mM ammonium were used. In addition, the cellular amount of AmoB was influenced by the absence of the substrate. Cells starved for more than 2 months contained nearly twice as much AmoB as actively growing cells, although these cells possessed low ammonia-oxidizing activity. AmoB was always present and could even be detected in cells of *Nitrosomonas* after 1 year of ammonia starvation.**

Nitrification, the microbial oxidation of ammonia to nitrate, is an essential part of the microbial nitrogen cycle in marine, freshwater, and soil environments. Two physiologically different groups of chemolithoautotrophic bacteria, the ammonia and nitrite oxidizers, are involved in this oxidation. The ammonia oxidizers derive their energy from the oxidation of ammonia to nitrite. The first step, the oxidation of ammonia to hydroxylamine is catalyzed by ammonia monooxygenase (AMO) (18, 60). Hydroxylamine is further oxidized to nitrite by hydroxylamine oxidoreductase (HAO) (5, 53). Since the AMO is an important key enzyme of nitrification, many efforts have been initiated to isolate the enzyme. However, it has not been purified thus far since the enzyme is not stable once isolated from the cells (16, 51, 52). Therefore, little is known about its structure and enzymatic mechanism. Information on the molecular properties of AMO has been deduced from studies with intact cells. It was demonstrated that the AMO has a broad substrate specificity (4, 22, 28, 54) and is irreversibly inhibited by C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (25, 26). A similar substrate range and inhibitor profiles including C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> effects were found for the biochemically related particulate methane monooxygenase (pMMO) of methane oxidizing bacteria (7, 14, 20, 42). Moreover, the AMO and the pMMO may be evolutionary related, since their encoding genes share high sequence similarities (3, 19).

Inactivation of AMO by <sup>14</sup>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> labels a membrane bound 27-kDa polypeptide, which is called AmoA (21). This protein

seems to be the active-site-containing subunit of the enzyme (21, 24). A corresponding gene *amoA* has been identified and, within the same operon, another gene called *amoB* was sequenced (39). The *amoB* codes for a 41-kDa polypeptide (AmoB), which could be copurified with the 27-kDa AmoA (10, 39). Upstream of the *amoA-amoB* tandem, a third gene was identified, *amoC* (3, 30). The numbers of copies of the *amo* operon seem to be genus specific. Two nearly identical copies are present in strains of *Nitrosomonas* and *Nitrosovibrio*, and three copies were found in strains of *Nitrospira* and *Nitrosolobus* (29, 31, 39, 41, 45), whereas only a single copy could be detected in marine *Nitrosococcus* strains of the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria* (3). However, neither the expressed polypeptides of *amoA* and *amoB* nor the purified proteins from *Nitrosomonas* cell homogenates showed ammonia-oxidizing activity (21, 23).

In previous studies antibodies were developed using whole cells of ammonia oxidizers, which recognize epitopes of the cell wall (8, 43, 47, 55, 56). These antibodies were applied in ecological studies to detect and count ammonia oxidizers in bacterial communities by using fluorescence microscopy. Their application was supposed to overcome the disadvantages of traditional counting methods such as the most-probable-number technique (38), which often underestimates the number of ammonia oxidizers in the natural environment (9). However, the application of these antibodies was limited since ammonia oxidizers show high serological diversity even within one genus. Therefore, ecologically relevant strains had to be isolated prior to antibody development. In the case of nitrite-oxidizing bacteria, it was shown that antibodies recognizing the conserved key enzyme can be used for the detection of all known genera of these organisms (6). They can be applied for studies of the

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für Allgemeine Botanik, Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg, Germany. Phone: 49-40-42816-426. Fax: 49-40-42816-400. E-mail: pinck@mikrobiologie.uni-hamburg.de.

key enzyme, as well as for the detection of as-yet-nonisolated strains in the environment.

In this study, the AmoB subunit of the AMO of *N. eutropha* N904 was used for the development of polyclonal antibodies. Evidence is given that these antibodies are highly specific for all genera of ammonia oxidizers affiliated with the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria*. Quantitative immunoblot analysis was used to measure the cellular amount of AmoB of *Nitrosomonas eutropha* N904 under different growth and starvation conditions.

(This study is based in part on the doctoral study of C. Pinck at the University of Hamburg.)

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** The strains of ammonia oxidizers isolated from soil and used in this study were *Nitrosomonas communis* Nm 2 (34), *Nitrosomonas oligotropha* Nm 45 (34), *Nitrosomonas ureae* Nm 10 (34), *Nitrosospora* sp. strain Nsp 1, and *Nitrosolobus multiformis* NI 13 (ATCC 25196). *Nitrosomonas europaea* Freitag and *Nitrosomonas nitrosa* Nm 90 (34) were obtained from sewage. The strains *Nitrosomonas* sp. strain Dave and *N. eutropha* N904 originated from a biowaste fermenter and from cattle manure, respectively. *Nitrosomonas* sp. strain Nm R1.24, *Nitrosospora* sp. strain Nsp G1.6, *Nitrosospora* sp. strain Nsp M1.3, *Nitrosospora* sp. strain Nsp R6.2, *Nitrosovibrio* sp. strain Nv G1.3, and *Nitrosovibrio* sp. strain Nv K7.1 (49) were isolated from the sandstone of historical buildings. The marine ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of the *Proteobacteria* isolates *Nitrosomonas aestuarii* Nm 36 (34), *Nitrosomonas cryotolerans* Nm 55, *Nitrosomonas halophila* Nm 1 (34), *Nitrosomonas marina* Nm 22 (34), *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 (32), and the two marine ammonia oxidizers belonging to the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria* isolates *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 (33) and *Nitrosococcus oceani* Nc 1 (ATCC 19707) were obtained from seawater.

The nitrite oxidizers *Nitrobacter hamburgensis* X<sub>14</sub> (11) and *Nitrobacter winogradskyi* Engel (12) originated from soil. *Nitrosospora moscoviensis* M-1 (15) was obtained from a heating system. *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> (12) originated from the sandstone of historical buildings; *Nitrospina gracilis* 3(211) (57), *Nitrospina* sp. strain 347, and *Nitrosococcus mobilis* 231 (57) were isolated from seawater.

All ammonia oxidizers, nitrite oxidizers, the methane oxidizers *Methylococcus capsulatus* Bath (NCIMB 11132), *Methylocystis parvus* 4a, *Methylomonas methanica* Oo52006, and *Bacillus subtilis* 019, *Escherichia coli* K-12/067 (ATCC 23716), *Methylobacterium radiotolerans*, *Paracoccus denitrificans* 001 (ATCC 19367), and *Pseudomonas* sp. strain AM1 are stored in the culture collection of the Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung Mikrobiologie, Universität Hamburg. The strains *Achromobacter cycloclastes*, *Agrobacterium tumefaciens* GM 19023, *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750), *Azorhizobium* sp. strain 24, *Azospirillum lipoferum* (ATCC 29707), *Bacillus azotoformans* (ATCC 29788), *Bradyrhizobium denitrificans*, *Chromobacterium violaceum*, and *Pseudomonas* sp. strain AK 15 were obtained from C. Coeur (University of Lyon I, Villeurbanne, France).

Terrestrial and freshwater ammonia oxidizers were grown at 28°C in mineral salt medium (34) in the presence of 10 mM ammonium. *N. cryotolerans* Nm 55, *N. aestuarii* Nm 36, *N. halophila* Nm 1, and *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 were grown in the same medium containing 10 g of NaCl liter<sup>-1</sup>. *N. marina* Nm 22, *Nitrosococcus oceani* Nc 1, and *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 were cultivated in seawater medium, with the following composition: 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g of HEPES, and 1 ml of 0.05% (wt/vol) cresol red solution per liter of 40% seawater.

For quantitative immunoblots, *N. eutropha* N904 was grown lithoautotrophically in mineral salt medium containing different concentrations of NH<sub>4</sub>Cl (1, 10, or 100 mM). After cells of *N. eutropha* N904 were grown for 10 days with different substrate concentrations, the AmoB amount was determined. For mixotrophic growth the mineral salt medium was supplemented with 5 mM pyruvate, 1.5 g of yeast extract (Difco) liter<sup>-1</sup>, and 1.5 g of peptone (Difco) liter<sup>-1</sup>, and either 9.1 mM pyruvate or 9.1 mM alanine.

Batch cultures of *N. eutropha* N904, *Nitrosomonas* sp. strain Dave and *N. europaea* Freitag were starved of ammonia at 16°C in the dark. To test the AmoB amount by immunoblotting, samples were obtained after 1, 29, 58, 129, and 360 days of ammonia starvation.

*Nitrobacter hamburgensis* X<sub>14</sub>, *Nitrobacter winogradskyi* Engel, and *Nitrobacter vulgaris* K<sub>48</sub> were grown mixotrophically in the presence of 2 g of NaNO<sub>2</sub> liter<sup>-1</sup> (12). *Nitrosospora moscoviensis* M-1 was cultivated in mineral medium with 0.2 g of NaNO<sub>2</sub> liter<sup>-1</sup> (15). *Nitrospina gracilis* 3(211), *Nitrospina* sp. strain 347, and

*Nitrosococcus mobilis* 231 were cultivated in seawater media according to the method of Watson and Waterbury (57). The cultures were incubated at 28°C, except for *Nitrosospora moscoviensis* M-1, which was incubated at 37°C.

The methane oxidizers were cultivated in nitrate mineral salt medium (58) including 0.25  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> at 3% methane synthetic air atmosphere. The methylo-trophs were grown in mineral medium containing 0.15% (wt/vol) methanol (17). All other bacterial strains were cultivated according to the American Type Culture Collection and National Collection of Industrial and Marine Bacteria instructions.

**AmoB isolation, sequencing, and production of antibodies.** Cells of *N. eutropha* N904 were harvested by centrifugation, washed twice, and suspended in 0.9% NaCl. Cell homogenates were prepared by passing the cell suspension (10<sup>10</sup> cells ml<sup>-1</sup>) through a French pressure cell at 140 MPa or by sonification on ice for 15 to 30 min by using a Biorupter apparatus. The protein concentrations of the crude extracts were determined colorimetrically according to the method of Bradford (13) as modified by Spector (48). Crude extracts were adjusted to 3.0 mg of protein ml<sup>-1</sup>. The samples were diluted (1:1) with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue and then solubilized for 15 min at room temperature. Samples (75  $\mu$ l) were loaded onto lanes of 0.75-mm-thick SDS-polyacrylamide gels, prepared as described by Laemmli (36). The stacking and separating gels contained 4 and 12% polyacrylamide, respectively. Electrophoresis was performed at 80 V and 10°C by using a PROTEAN II Slab Cell (20 by 16 cm; Bio-Rad). After electrophoresis the gels were reversibly stained by using the Zinc Stain & Destain Kit (Bio-Rad) to determine the position of the 41-kDa protein. The protein bands were cut out of the gels. The staining of the slices was removed, and the protein was electroeluted from the gel at 60 mA for 6 h in an Electro-Eluter Model 422 (Bio-Rad). The protein was concentrated by lyophilization (Freezemobile 12; Virtis). Antiserum against this polypeptide was produced by Valbex (Villeurbanne, France) in chickens. Injections of 50  $\mu$ g of protein were given at prescribed intervals.

For protein sequencing by Edman degradation, the 41-kDa protein was isolated by a modified SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In order to avoid N-terminal blockage the gel had been pre-electrophoresed for 2 h, adding 0.07% sodium thioglycolate to the Laemmli running buffer. The separated proteins were electroblotted (Pegasus; PHASE) onto a 0.2- $\mu$ m-pore-size polyvinylidene difluoride membrane filter (Schleicher & Schuell), using the procedure described by Matsudaira (37). The amino acid sequencing of the isolated protein was done by the Institute of Biology and Chemistry of Proteins (University of Lyon I, Villeurbanne, France). Protein sequences were used to search for homologous proteins in the EMBL and SwissProt data banks (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (2).

**Immunoblotting.** Cells were harvested, and crude extracts were prepared as described above. SDS-PAGE analyses were performed at 40 mA by using a Mini-PROTEAN II Cell (8 by 7.3 cm; Bio-Rad). The separated proteins were electroblotted (Pegasus; PHASE) for 2 h at 0.8 mA per cm<sup>2</sup> onto a cellulose nitrate membrane (pore size, 0.2  $\mu$ m; Schleicher & Schuell) using a discontinuous buffer system (35). The membrane was then blocked for 1.5 h in a phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA). The proteins on the nitrocellulose membrane were incubated with antiserum (diluted 1:32,000 in PBS containing 0.05% BSA and 0.025% Tween 20) overnight at room temperature. After two washes with PBS, the proteins were incubated with biotin-conjugated secondary antibodies (Biotrend, Cologne, Germany) diluted 1:30,000 in PBS containing 0.05% BSA–0.025% Tween 20 for 1.5 h at room temperature. The membrane was washed twice with PBS, and the proteins were incubated with a streptavidin-biotinylated alkaline phosphatase complex (diluted 1:3,000 in PBS containing 0.05% BSA and 0.025% Tween 20) for another 1.5 h. After two washes with 10 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 0.02% BSA and 0.05% Tween 20, the cellulose nitrate membrane was incubated with a substrate solution containing 0.005% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP), 0.001% 4-nitroblue tetrazolium, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 0.004 M MgCl<sub>2</sub>. The enzymatic reaction was stopped by adding distilled water. A dense blue color indicated a positive reaction. Each immunoblotting experiment was reproduced at least three times. The membrane was scanned (ScanMagic 9636 S; Mustek), a densitogram of the lanes was performed, and the AmoB was quantified using software program origin 4.0 (Microcal).

**Determination of ammonia oxidation activity.** Exponentially grown cells of *N. eutropha* N904 cultivated in 1-liter Erlenmeyer flasks were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in mineral medium. The ammonia oxidation activity of the cells was reflected by the decrease in ammonia as well as by the increase in nitrite concentration in suspensions of  $5 \times 10^7$  cells per ml. The activities were determined as mean values of three experiments. Ammonia and nitrite levels were measured by high-pressure liquid chromatography (50).

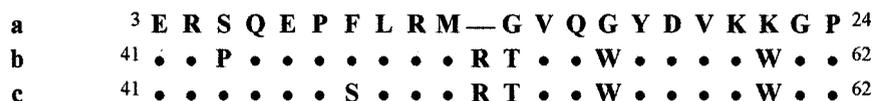


FIG. 1. Comparison of amino acid sequences of the isolated 41-kDa protein of *N. eutropha* N904 (a) and the deduced amino acid sequences of AmoB1 (b) and AmoB2 (c) of *N. eutropha* Nm 57 encoded by the *amoB* genes. (The SwissProt accession numbers for *N. eutropha* Nm 57 *amoB1* and *amoB2* are U51630 and U72670, respectively.) The periods represent an identical match to the sequence of the isolated 41-kDa protein of *N. eutropha* N904. The space represents a gap among the sequences. The isolated 41-kDa protein of *N. eutropha* N904 showed 82% (18 of 22) amino acid sequence identity compared to both AmoB proteins of *N. eutropha* Nm 57.

## RESULTS

**Purification and identification of AmoB protein.** The N terminus of the 41-kDa protein of *N. eutropha* N904, separated by SDS-PAGE, was sequenced by Edman degradation (positions 3 to 24). The derived amino acid sequence was compared with the amino acid sequences deduced from the *amoB* genes of *N. eutropha* Nm 57, since an *amoB* gene sequence of *N. eutropha* N904 is not available yet. The AmoB subunit of *N. eutropha* Nm 57 is encoded by two nearly identical gene copies (*amoB1* and *amoB2*, GenBank accession numbers U51630 and U72670). The N terminus of the isolated 41-kDa protein of *N. eutropha* N904 showed 82% amino acid sequence identity to the deduced AmoB sequences of *N. eutropha* Nm 57 from positions 41 to 62 onwards (Fig. 1). The sequences AmoB1 and AmoB2 from *N. eutropha* Nm 57 differ in positions 43 and 47, respectively, compared to the N-terminal sequence from *N. eutropha* N904 (positions 5 and 9). As a consequence, the AmoB sequence of *N. eutropha* N904 tallied only with one amino acid of AmoB1 or AmoB2 of *N. eutropha* Nm 57, respectively. Mismatches were often represented by the amino acid glycine (positions 14 and 17 of *N. eutropha* N904).

**Specificity of the antibodies.** Polyclonal antibodies were produced against the purified AmoB of *N. eutropha* N904. The reactivity of the antibodies was tested by immunoblotting of crude extracts of numerous ammonia oxidizers, including all described species of the genus *Nitrosomonas*. All tested strains are listed in Materials and Methods. The antibodies were highly specific for the detection of 41-kDa proteins in cell extracts of the four genera of ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria* (*Nitrosomonas*, including *Nitrosococcus mobilis*, which belongs phylogenetically to *Nitrosomonas*; *Nitrospira*; *Nitrosolobus*; and *Nitrosovibrio*). In six strains of ammonia oxidizers isolated from building stones, strains which have been characterized as yet only by their morphology, 41-kDa proteins were recognized as well. The antibodies did not show any unspecific reactions with other proteins of these crude extracts (Fig. 2). No proteins were recognized in crude extracts of *Nitrosococcus oceani* Nc 1 (Fig. 2) and *Nitrosococcus halophilus* Nc 4 (data not shown), which belong to the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria*. Hence, the antiserum could be used to detect AmoB in ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria* including not-yet-described isolates, but not for the detection of AmoB in ammonia oxidizers of the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria*.

In order to prove the specificity of the antiserum, control experiments were performed with pure cultures of the methane-oxidizing bacteria *Methylococcus capsulatus* Bath, *Methylomonas methanica* Oo52006, and *Methylocystis parvus* 4a. The key enzyme in  $\text{CH}_4$  oxidation of these organisms, the pMMO,

was shown to possess high sequence similarities to the AMO. Furthermore, the heterotrophic nitrifier *Paracoccus denitrificans* 001 was analyzed, since this organism also contains an ammonia-oxidizing system. In addition, immunoblot analysis was carried out with several other bacteria, such as nitrite oxidizers and methylotrophic and denitrifying bacteria. The antiserum did not react with any of these organisms.

**Quantitative immunoblot analysis of the AmoB amount.** The AmoB amount of total cellular protein of *N. eutropha* N904 was measured using immunoblot analysis of crude extracts with protein amounts ranging from 0.25 to 16  $\mu\text{g}$  (Fig. 3a and b), which corresponded to  $2.9 \times 10^6$  cells and  $1.9 \times 10^8$  cells, respectively. The protein coloration increased with the protein amount, and a saturation curve was obtained. These data could be used to determine the specific cellular amount of AmoB (Table 1). Purified AmoB ranging from 0.03 to 0.42  $\mu\text{g}$  served as standards (Fig. 3c and d). By using standard growth conditions (mineral medium with 10 mM ammonium), a cellular amount of  $5.9\% \pm 1.8\%$  AmoB was found in the total cell protein of *N. eutropha* N904. As shown in Fig. 4, this cellular AmoB amount depended on the ammonium concentration in the mineral medium. The amount of AmoB increased to  $14\% \pm 1.4\%$  when the substrate was reduced to 1 mM. When cells were grown with 100 mM ammonium, only a low AmoB amount of  $4\% \pm 0.8\%$  was found.

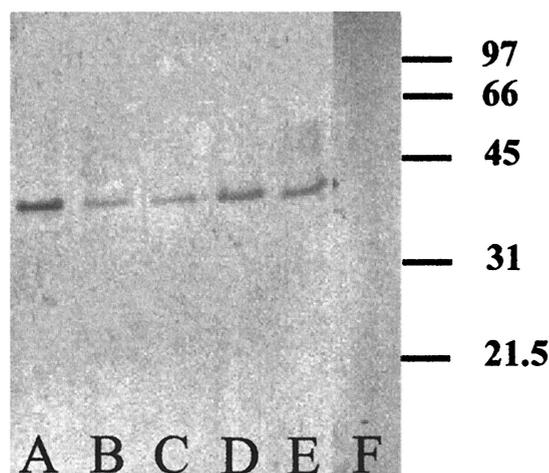


FIG. 2. Immunoblot using antiserum recognizing the AmoB of different ammonia-oxidizing bacteria. Lane A, *N. eutropha* N904; lane B, *Nitrosovibrio* sp. strain K7.1; lane C, *Nitrospira* sp. strain R6.2; lane D, *Nitrosococcus mobilis* Nc 2; lane E, *Nitrosolobus multififormis*, NI 13; lane F, *Nitrosococcus oceani* Nc 4. Standard protein molecular masses are indicated on the right (in kilodaltons). Crude extracts of cells were added to the gel at protein amounts of 10  $\mu\text{g}$  per lane.

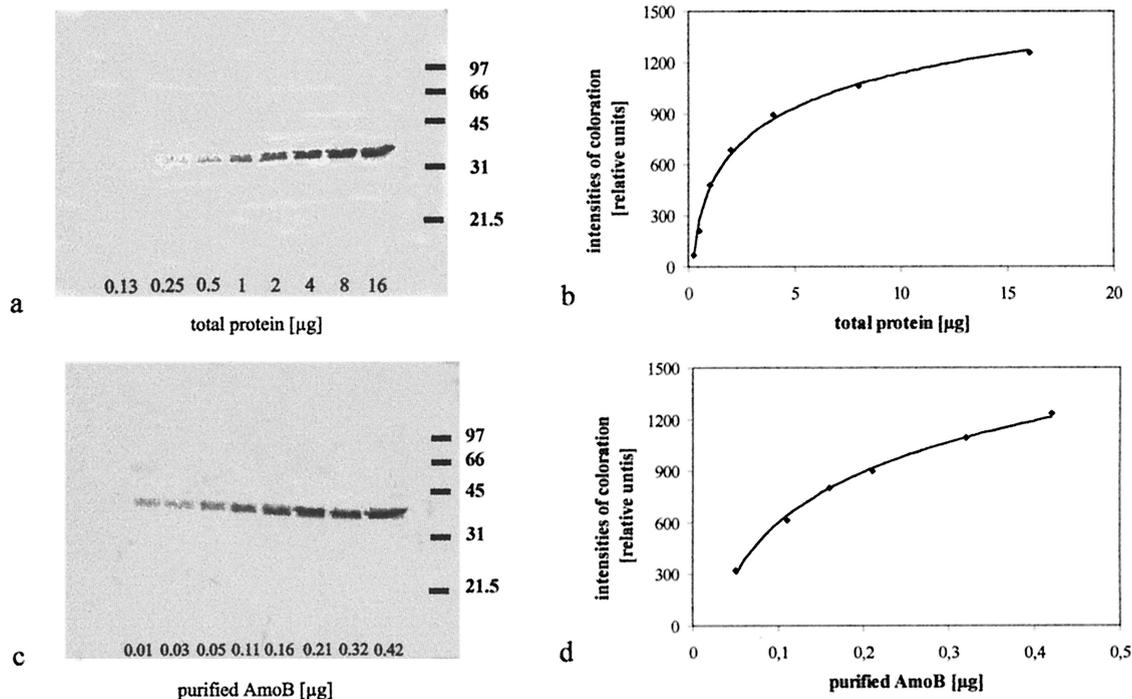


FIG. 3. Coloration intensities of the AmoB after immunostaining in correlation to the amount of total protein in *N. eutropha* N904 grown with 10 mM ammonium (a and b) and in correlation to the amount of purified AmoB (c and d). The coloration intensities obtained by immunoblotting (a and c) are plotted against the amounts of total protein (b) and against the amounts of purified AmoB (d). The values on the right of the immunoblots are molecular masses (in kilodaltons).

The AmoB amount increased when *N. eutropha* N904 was starved of ammonia. Cells, which did not receive ammonium for more than 60 days, contained  $9.7\% \pm 0.9\%$  AmoB (Fig. 5). That is nearly twice the amount compared to that found in active growing cells or cells that had been starved of ammonia for 20 days. The AmoB could even be detected after 1 year of ammonia starvation. These results did not correlate with the ammonia oxidation activity. The highest activity was found within cells in the exponential growth phase using standard cultivation conditions ( $575 \mu\text{mol}$  of  $\text{NH}_4^+$  g of protein $^{-1}$  h $^{-1}$ ). The specific activity was reduced to  $255 \mu\text{mol}$  of  $\text{NH}_4^+$  g of protein $^{-1}$  h $^{-1}$  when cells were starved of ammonia for 1 month, a level which remained nearly constant during further starvation. Experiments with cells of *Nitrosomonas* sp. strain Dave and *N. europaea* Freitag showed similar results (data not shown).

Mixotrophic growth of the bacteria with ammonia and organic N compounds had no influence on the AmoB amount of the cells. Cells of *N. eutropha* N904, which were grown mixotrophically in the presence of pyruvate, yeast extract, and peptone, as well as pyruvate or alanine, showed nearly the same AmoB amount as lithoautotrophically grown cells.

## DISCUSSION

The isolated 41-kDa protein of *N. eutropha* N904 shows high sequence similarity to the sequences AmoB1 and AmoB2 of *N. eutropha* Nm 57. The mismatches in positions 14 and 17 of the partially sequenced AmoB protein of *N. eutropha* N904 (Fig. 1) might be a contamination of glycine used in the trans-

fer buffer for blotting the protein on the membrane. The *amoB* genes of *N. eutropha* Nm 57 encode hydrophobic 37-amino-acid leader sequences (39) that was not present in the isolated AmoB of *N. eutropha* N904. Apparently, this part of the N terminus was removed during protein processing. Nevertheless, the purified 41-kDa protein can be regarded as the AmoB of *N. eutropha* N904. Sequence differences in the AmoB peptides between *N. eutropha* N904 and *N. eutropha* Nm 57 may be due to strain differences.

In this study, an antiserum against the AmoB was developed which recognized the 41-kDa subunit of the AMO in crude

TABLE 1. Specific AmoB amount in cells of *N. eutropha* N904 grown with 10 mM ammonium as measured by using immunoblot analysis<sup>a</sup>

Total protein amt (µg)	Specific AmoB amt <sup>b</sup>	
	µg	% Total protein
16	ND	ND
8	0.3	3.8
4	0.21	5.3
2	0.13	6.5
1	0.08	8.0
0.5	ND	ND
0.25	ND	ND

<sup>a</sup> Cell extracts of different total protein amounts were analyzed to obtain statistically meaningful data. Purified AmoB ranging from 0.01 to 0.42 µg of protein were used as standards. The mean value of the specific AmoB amount was calculated with  $5.9\% \pm 1.8\%$  of the total protein (100%). The standard deviation for three replicated experiments was  $\pm 9\%$ .

<sup>b</sup> ND, not detectable.

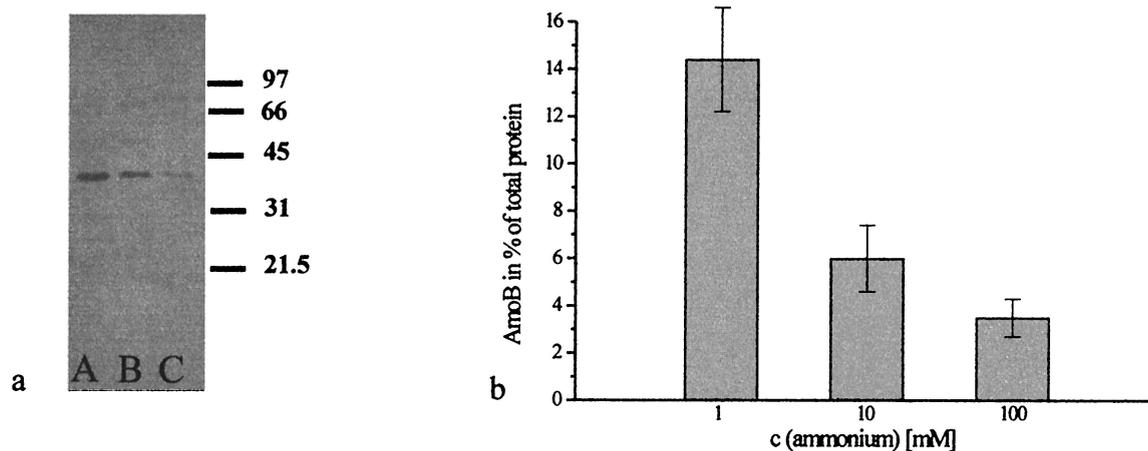


FIG. 4. Quantification of AmoB in crude extract of *N. eutropha* N904 grown with different ammonium concentrations. (a) An immunoblot was performed using crude extracts containing 4  $\mu$ g of total protein. Lane A, cells grown with 1 mM; lane B, cells grown with 10 mM; lane C, cells grown with 100 mM ammonium. The values on the right of the immunoblot are molecular masses (in kilodaltons). (b) Decrease of specific AmoB amount of the total protein by increasing ammonium concentrations in the mineral media. The error bars represent the standard deviations for the average of three replicate experiments.

extracts of *N. eutropha* N904. It could be demonstrated that this antiserum has a broad serological specificity for all tested ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria*. Thus far, only antibodies recognizing specific epitopes of the cell wall of ammonia oxidizers have been described (43, 47, 55), and these were limited in the application to specific serological groups (8, 56). The AMO is a highly conserved enzyme in ammonia oxidizers affiliated with the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria*. Therefore, the broad serological specificity of the antibodies against AmoB may be due to their 73% AmoB sequence similarity (3). Thus, it seems likely that the antibodies can be used for in situ detection of ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass in natural bacterial communities. First, evidence is given as the antibodies reacted with the AmoB in new strains of ammonia oxidizers isolated from building stones. Recent studies also proved in a similar approach that monoclonal

antibodies recognizing the key enzyme of nitrite oxidizers are a useful tool for microbial ecological studies (1, 6).

In contrast, the antiserum did not react with the ammonia oxidizers belonging to the  $\gamma$ -subclass of *Proteobacteria*. This might be due to the low similarities between the AmoB of these bacteria to that of ammonia oxidizers belonging to the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria*. The phylogenetically related pMMO of methanotrophic bacteria also did not react with the antibodies. Indeed, the amino acid sequence of the AmoB of *Nitrosococcus oceanii* ( $\gamma$ -proteobacteria) shows higher similarity (50 to 52%) to the pMMO sequence of *Methylococcus capsulatus* ( $\gamma$ -proteobacteria) than to the AmoB sequence (38 to 39%) of the ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of *Proteobacteria* (3).

The antibodies could be used to determine for the first time the amount of AmoB in cells of *N. eutropha* N904. It was shown

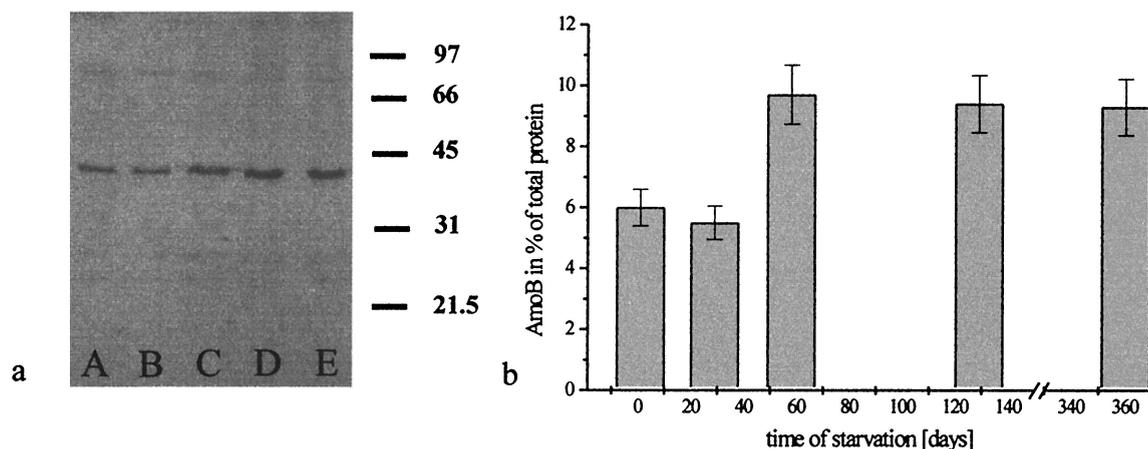


FIG. 5. Quantification of AmoB in crude extract of starved cells of *N. eutropha* N904. (a) Immunoblot was performed with crude extracts containing 4  $\mu$ g of total protein. Lane A, cells ammonia starved for 1 day; lane B, cells ammonia starved for 29 days; lane C, cells ammonia starved for 58 days; lane D, cells ammonia starved for 129 days, and lane E, cells ammonia starved for 360 days. The values on the right of the immunoblot are molecular masses (in kilodaltons). (b) After different times of ammonia starvation the specific AmoB percentage of the total protein amount increased. The error bars represent the standard deviation for the average of three replicate experiments.

that the total cell protein consisted of approximately 6% AmoB when cells were grown using standard substrate conditions (mineral medium containing 10 mM ammonium). During cell growth, the specific cellular amount of the AmoB was regulated by the ammonium concentration in the medium. When ammonium was limited, higher amounts of AmoB could be detected in cells of *N. eutropha* N904 in comparison to cells grown with standard concentrations. At ammonia concentrations below the  $K_m$  value of the AMO (1.8 mM) (46), the low activity of the enzyme seemed to be compensated for by high amounts of the key enzyme. At high substrate concentrations the activity of the enzyme is maximal. Therefore, the cells were able to grow, although the enzyme concentration was reduced.

Organic compounds had no influence on the AmoB amount in cells of *N. eutropha* N904 as it was found for the nitrite oxidizer *Nitrobacter*. In *Nitrobacter* spp. a higher level of the nitrite oxidoreductase was observed in mixotrophically growing cells compared to cells growing in mineral medium (1).

Starved cells contained higher amounts of AmoB than actively growing cells, although they possessed far less ammonia oxidation activity. Previous studies also found considerable amounts of active AMO in starved cells of *N. europaea* (40, 59). Hence, our studies and these investigations indicate that the amount of AMO does not correlate with the activity of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. Although the AmoB was detected in high concentrations in cells of *N. eutropha* N904, *N. europaea* Freitag, and *Nitrosomonas* strain Dave after 1 year of ammonia starvation and their AMO remained active, the AMO seems not to be a constitutive enzyme. Sayavedra-Soto et al. (44) found that the mRNA of the AMO in cells of *N. europaea* was totally degraded a few hours after the depletion of ammonia. Moreover, it was shown that the endogenous respiration of *N. cryotolerans* cells decreased to undetectable levels under starvation conditions (27). Accordingly, the AMO seems to be strongly protected from degradation so that the energy supply is ensured as soon as ammonia is available. The increase of the AmoB amount in the cells during ammonia starvation might be due to the decline of unprotected proteins.

Similar results were also reported for the second key enzyme of the ammonia oxidation, the HAO. Using immunoblot analysis, the HAO level remained constant within 81 days of ammonia starvation in cells of *N. europaea* and a high amount of active HAO was detected (40, 59), while the mRNA was degraded during ammonia starvation (44).

This study demonstrated that the antibodies recognizing the AmoB could be applied successfully for physiological studies. Cytological analyses are in progress that will provide information about the localization of the enzyme by immunogold and immunofluorescence labeling. If the antibodies can be employed for isolation of the enzyme, there is even a good prospect for a detailed biochemical characterization of the AmoB protein.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, PROCOPE) and by the European Union (ENV4-CT98-0707).

We thank H.-P. Koops for contributing pure cultures of ammonia oxidizers, S. Bartosch for technical assistance and comments on the manuscript, and E. Spieck for the initiation of antibody development and for scientific discussions.

#### REFERENCES

- Aamand, J., T. Ahl, and E. Spieck. 1996. Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi*, and *N. vulgaris*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:2352–2355.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**:403–410.
- Alzerreca, J. J., J. M. Norton, and M. G. Klotz. 1999. The *amo* operon in marine, ammonia-oxidizing  $\gamma$ -proteobacteria. FEMS Microbiol. Lett. **180**: 21–29.
- Arciero, D. M., T. Vanneli, M. Logan, and A. B. Hooper. 1989. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **159**:640–643.
- Arciero, D. M., and A. B. Hooper. 1993. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* is a multimer of an octa-heme subunit. J. Biol. Chem. **268**:14645–14654.
- Bartosch, S., I. Wolgast, E. Spieck, and E. Bock. 1999. Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4126–4133.
- Bédard, C., and R. Knowles. 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_4^+$ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. Microbiol. Rev. **53**:68–84.
- Belser, L. W., and E. L. Schmidt. 1978. Serological diversity within a terrestrial ammonia-oxidizing population. Appl. Environ. Microbiol. **36**:589–593.
- Belser, L. W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **16**:309–333.
- Bergmann, D. J., and A. B. Hopper. 1994. Sequence of the gene, *amo B*, for the 43 kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. Biochim. Biophys. Res. Commun. **204**:759–762.
- Bock, E., H. Sundermeyer-Klinger, and E. Stackebrandt. 1983. New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. Arch. Microbiol. **136**:281–284.
- Bock, E., H.-P. Koops, U. C. Möller, and M. Rudert. 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. Arch. Microbiol. **153**:105–110.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**:248–254.
- Colby, J., D. I. Stirling, and H. Dalton. 1977. The soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): its ability to oxygenate *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic, and heterocyclic compounds. Biochem. J. **165**:395–407.
- Ehrich, S., D. Behrens, E. Lebedeva, W. Ludwig, and E. Bock. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Arch. Microbiol. **164**:16–23.
- Ensign, S. A., M. R. Hyman, and D. J. Arp. 1993. In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas* by copper. J. Bacteriol. **175**: 1971–1998.
- Green, P. N., I. J. Bousfield, and D. Hood. 1988. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmani* sp. nov., *M. fuyisawanease* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**:124–127.
- Hollocher, T. C., M. E. Tate, and D. J. D. Nicholas. 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*: definitive  $^{18}\text{O}$ -tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. J. Biol. Chem. **256**:10834–10836.
- Holmes, A. J., A. Costello, M. E. Listrom, J. C. Murrell. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. FEMS Microbiol. Lett. **132**:203–208.
- Hubble, J. H., A. W. Thomson, and J. F. Wilkinson. 1975. Specific inhibitors of methane oxidation in *Methylosinus trichosporium*. Arch. Microbiol. **102**: 199–202.
- Hyman, M. R., and P. M. Wood. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. Biochem. J. **227**:719–725.
- Hyman, M. R., I. B. Murton, and D. J. Arp. 1988. Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. Appl. Environ. Microbiol. **54**:3187–3190.
- Hyman, M. R., C. Y. Kim, and D. J. Arp. 1990. Inhibition of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by carbon disulfide. Biochem. J. **172**:4775–4782.
- Hyman, M. R., and D. J. Arp. 1992.  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and  $^{14}\text{CO}_2$ -labelling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. J. Biol. Chem. **267**:1534–1545.
- Hynes, R. K., and R. Knowles. 1978. Inhibition of acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. FEMS Microbiol. Lett. **4**:319–321.
- Hynes, R. K., and R. Knowles. 1982. Effect of acetylene on autotrophic and heterotrophic nitrification. Can. J. Microbiol. **28**:334–340.
- Johnstone, B. H., and R. D. Jones. 1988. Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonia-oxidizing bacterium. Mar. Ecol. Prog. Ser. **49**:295–303.
- Jones, R. D., and R. Y. Morita. 1983. Methane oxidation by *Nitrosococcus*

- oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **45**:401–410.
29. Klotz, M. G., and J. M. Norton. 1995. Sequence of an ammonia monooxygenase subunit A-encoding gene from *Nitrospira* sp. NpAV. Gene **163**:159–160.
  30. Klotz, M. G., J. Alzerreca, and J. M. Norton. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the amo A/amo B genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon? FEMS Microbiol. Lett. **150**:65–73.
  31. Klotz, M. G., and J. M. Norton. 1998. Multiple copies of ammonia monooxygenase (*amo*) operons have evolved under biased AT/GC mutational pressure in ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **168**:303–311.
  32. Koops, H.-P., H. Harms, and H. Wehrmann. 1976. Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosococcus mobilis* nov. sp. Arch. Microbiol. **107**:277–282.
  33. Koops, H.-P., B. Böttcher, U. C. Möller, A. Pommerening-Röser, and G. Stehr. 1990. Description of a new species of *Nitrosococcus*. Arch. Microbiol. **154**:244–248.
  34. Koops, H.-P., B. Böttcher, U. C. Möller, A. Pommerening-Röser, and G. Stehr. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas europaea* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. J. Gen. Microbiol. **137**:1689–1699.
  35. Kyse-Anderson, J. 1984. Electrophoretic blotting of multiple gels: simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods **10**:203–209.
  36. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680–685.
  37. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electrophoretically onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. **262**:10035–10038.
  38. Matulevich, V. A., P. F. Strom, and M. S. Finstein. 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. Appl. Microbiol. **29**:265–268.
  39. McTavish, H., J. A. Fuchs, and A. B. Hooper. 1993. Sequence of the gene coding for ammonia-monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. **175**:2436–2444.
  40. Nejdat, A., H. Shmueli, and A. Abeliovich. 1997. Effect of ammonia starvation on hydroxylamine oxidoreductase activity of *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. **121**:957–960.
  41. Norton, J. M., J. M. Low, and M. G. Klotz. 1996. The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrospira* sp. NpAV. FEMS Microbiol. Lett. **139**:181–188.
  42. Prior, S. D., and H. Dalton. 1985. Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEMS Microbiol. Lett. **29**:105–109.
  43. Sanden, B., C. Grunditz, Y. Hansson, and G. Dalhammar. 1994. Quantification and characterisation of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. Water Sci. Tech. **29**:1–6.
  44. Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, S. A. Russell, and D. J. Arp. 1996. Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNAs by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. Mol. Microbiol. **20**:541–548.
  45. Sayavedra-Soto, L. A., N. G. Hommes, J. J. Alzerreca, D. J. Arp, J. M. Norton, and M. G. Klotz. 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. FEMS Microbiol. Lett. **167**:81–88.
  46. Schmidt, I., and E. Bock. 1998. Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas europaea*. Antonie Leeuwenhoek **73**:271–278.
  47. Smorzewski, W. T., and E. L. Schmidt. 1991. Numbers, activities, and diversity of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in a freshwater, eutrophic lake sediment. Can. J. Microbiol. **37**:828–833.
  48. Spector, T. 1978. Refinement of Coomassie-blue method of protein quantification. Ann. Biochem. **86**:142–146.
  49. Spieck, E., M. Meincke, and E. Bock. 1992. Taxonomic diversity of *Nitrosovibrio* strains isolated from building sandstones. FEMS Microbiol. Ecol. **102**:21–26.
  50. Stüven, R., M. Vollmer, and E. Bock. 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **158**:439–443.
  51. Suzuki, I., and S.-C. Kwok. 1970. Cell-free ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* extracts: effects of polyamines, Mg<sup>2+</sup> and albumin. Biochem. Biophys. Res. Commun. **39**:950–955.
  52. Suzuki, I., S.-C. Kwok, U. Dular, and D. C. Y. Tsang. 1981. Cell-free ammonia-oxidizing system of *Nitrosomonas europaea*: general conditions and properties. Can. J. Biochem. **59**:477–483.
  53. Terry, K. R., and A. B. Hooper. 1981. Hydroxylamine oxidoreductase: a 20-heme, 200,000 molecular weight cytochrome *c* with unusual denaturation properties which forms a 63,000 molecular weight monomer after heme removal. Biochemistry **20**:7026–7032.
  54. Vanneli, T., M. Logan, D. M. Arciero, and A. B. Hooper. 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1169–1171.
  55. Völsch, A., W. F. Nader, H. K. Geiss, G. Nebe, and C. Birr. 1990. Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **140**:153–158.
  56. Ward, B. B., and A. F. Carlucci. 1985. Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescence in sewage plants by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2430–2435.
  57. Watson, S. W., and J. B. Waterbury. 1971. Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrosococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. Arch. Microbiol. **77**:203–230.
  58. Whittenbury, R., K. C. Phillips, and J. F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. J. Gen. Microbiol. **61**:205–218.
  59. Wilhelm, R., A. Abeliovich, and A. Nejdat. 1998. Effect of long-term ammonia starvation on the oxidation of ammonia and hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. J. Biochem. **124**:811–815.
  60. Wood, P. M. 1986. Nitrification as a bacterial energy source, p. 39–62. In J. I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxford, England.

# LEBENS LAUF

Name		Claudia Pinck
Geburtstag und -ort	24.05.1973	Hamburg
Familienstand		ledig
Schulbildung	1979-1983	Grundschule Hamburg-Fuhlsbüttel
	1983-1992	Gymnasium Hamburg-Fuhlsbüttel
		Abschluss: Abitur
Hochschulstudium	1992-1997	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Botanik, Genetik/Molekularbiologie
	08/97-05/98	Diplomarbeit im Hauptfach Mikrobiologie zum Thema: „Versuche zum Nachweis des heterotrophen Wachstums von <i>Nitrosomonas spec.</i> “
	seit 5/98	Promotion an der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie zum Thema: „Immunologische Untersuchungen am Schlüsselenzym- system der Ammoniakoxidanten“
	5/98-12/99	Häufiger, mehrwöchiger Aufenthalt an der Universität Lyon I in Villeurbanne/Frankreich im Rahmen des DAAD-Austauschprojektes „Nitrifying bacteria: biodiversity, ecology and activity in natural environments“
Berufstätigkeit	12/95-12/97	Studentische Hilfskraft in der Abteilung Mikrobiologie am Institut für Allgemeine Botanik, Hamburg. Mitarbeit im BMBF-Forschungsprojekt „Steinzerfall und Stein- konservierung“
	10/98-4/01	Wissenschaftliche Angestellte der Universität Hamburg im EU-Projekt „Development of an innovative water repellent/biocide surface treatment for mortars: assessment of their performance by using modern analytical tools and surface analysis“
	seit 5/01	Wissenschaftliche Angestellte der Universität Hamburg im DFG-Projekt „Regulation der Ammoniakoxidations- aktivität von <i>Nitrosomonas</i> in Rein- und Mischkulturen“

Hamburg, den 03.10.01

Claudia Pinck

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis September 2001 in der Abteilung des Institutes für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bock durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Bock danke ich für die Themenstellung, für sein großes Interesse an dieser Arbeit, für seine ständige Gesprächsbereitschaft und für die wertvollen Ratschläge.

Herrn Dr. H.-P. Koops möchte ich für die Bereitstellung der vielen Ammoniakoxidantenstämme danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Sabine Bartosch für die fachkompetente Beratung in Sachen Antikörper, CLSM und die Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit. Ähnlicher Dank gebührt Dr. Eva Spieck. Zudem danke ich Dr. Eva Spieck für die Idee zur Herstellung der Antikörper.

Herrn Prof. Dr. P. Potier und Caroline Cœur der Abteilung ökologische Mikrobiologie der Universität Lyon in Frankreich danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor sowie für die Unterstützung bei der Herstellung der Antikörper.

Dr. H. Hohenberg des Heinrich-Pette-Instituts und Irmgard Wachholz danke ich für die große Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen insbesondere den „Tiefentemperatureinbettungen“. Außerdem möchte ich Frau Adami für die Hilfe bei der Entwicklung der Negative danken.

Dr. Reiner Mansch danke für die Hilfe beim EU-Projekt und bei den vielen Fragen bezüglich der „Mörtel und Steine“.

Außerdem danke ich Heike Block, die mir bei der Entwicklung des Aktivitätstests eine große Hilfe war.

Nicht zuletzt ein Dank sei an all die fleißigen Hiwis Sandra, Felix, Nadine, Björn, Alex, Jan, Mashall und Katharina gerichtet.

Natürlich dürfen bei all' dem Dank nicht die „Mit-Doktorandinnen“ Christiane Look und Christine Hartwig und die anderen Kollegen fehlen. Allen danke ich für die nette Zeit in Klein Flottbek.

Zum Schluss danke ich Jochen, meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung außerhalb der Uni.

Ich versichere an Eides statt, dass ich bisher weder an der Universität Hamburg noch an einer anderen Universität einen Versuch zur Promotion unternommen habe.

Weiterhin erkläre ich eidesstattlich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst habe und zur Durchführung und Abfassung keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Hamburg, den 03.10.01

Claudia Pinck