Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen an hydrolytischen extrazellulären Enzymen aus extremophilen marinen Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung von Nucleasen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie und Chemie (FB2) der
Universität Bremen
vorgelegt von

Bianca Sinn-Meyer

2003

Für Amelie
zum 2. Geburtstag

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Fischer

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael G. Lorenz

Tag der Disputation: 10. Dezember 2003

Danksagung

Mein Dank gilt in besonderem Maße Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Michael G. Lorenz für die gute Einführung in die Thematik (wo er mir stets mit Geduld und praktischen Tipps im wahrsten Sinne des Wortes zur Seite stand) und die hilfreichen Hinweise beim Zusammenschreiben der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe Marine Mikrobiologie für ein angenehmes Arbeitsklima. Dabei hervorzuheben sind Dr. Birgit Heyduck-Söller und Anja Heuchert, die mich in der Endphase dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Für die Durchführung einiger praktischer Arbeiten danke ich Dr. Thomas Schräder und Dr. Jan Küver und für die Bereitstellung zweier Proben von Lanzarote Prof. Dr. Karl-Heinz Blotevogel.

Die vorliegende Arbeit wurde dankenswerterweise zum einen Teil im Rahmen des BMBF-Projekts „Neue Enzyme: Gewinnung von neuen Enzymen und Kloniervektoren für die Molekularbiologie aus marinen mikrobiellen Gemeinschaften mit Hilfe mikrobiologischer Methoden und der Klonierung von Standort-DNA“ (Schwerpunktförderung „Marine Naturstoffforschung“, Förderkennzeichen 03F0240A) und zum anderen Teil durch die Zentrale Kommission für Forschungsplanung und wissenschaftlichen Nachwuchs (FNK) (Kennziffer 02/100/9) gefördert.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Mann Björn Meyer, der den Abschluss dieser Arbeit durch Jobsharing, Korrekturlesen und Kindhüten maßgeblich unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Neue Enzyme	10
1.2 Peptidasen	12
1.3 Esterasen	15
1.3.1 Lipasen	15
1.3.2 Nucleasen	15
1.4 Amylasen	17
1.5 Meerwassersalinen	18
1.6 Extremophile	20
1.6.1 Halophile Mikroorganismen und ihre Enzyme	21
1.6.2 Alkaliphile Mikroorganismen	24
1.7 Ziel und Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Probenmaterial	28
2.1.1 Entnahme von Umweltproben auf Lanzarote, Spanien	28
2.1.2 Entnahme von Umweltproben bei La Baule, Frankreich	28
2.1.3 Lebendkeimzahlbestimmung sowie Kultivierung und Hälterung der Organismen	28
2.1.4 Gewinnung und Lagerung von Kulturüberständen	29
2.2 Medien, Lösungen und Puffer	30
2.2.1 Salinenmedium-Lanzarote (SML) (Sehgal & Gibbons, 1960, modifiziert)	30
2.2.2 Halophilenmedium (HM) (Sehgal & Gibbons, 1960)	31
2.2.3 TBY + Ap100	31
2.2.4 Feste Medien für den Nachweis von extrazellulären Enzymen	31
2.2.4.1 DNase-Nachweis auf DNA-Methylgrün-Agar (Smith et al., 1969, modifiziert)	32
2.2.4.2 RNase-Nachweis auf RNA-Agar (Smibert & Krieg, 1981, modifiziert)	32
2.2.4.3 Protease-Nachweis auf Calcium-Caseinat-Agar (Frazier & Rupp, 1928 und Brandt, 1939, modifiziert)	32
2.2.4.4 Esterase-Nachweis auf Tween-20-Agar (Smibert & Krieg, 1981, modifiziert)	33
2.2.4.5 Lipase-Nachweis auf Olivenöl-Rhodamin-B-Agar (Kouker & Jaeger, 1987, modifiziert)	33
2.2.4.6 Amylase-Nachweis auf Stärke-Agar (Smibert & Krieg, 1981)	34
2.2.5 TBE-Puffer	34
2.2.6 TBEE-Puffer	34
2.2.7 TE-Puffer	34

2.2.8 Puffer für die pBluescript-Isolierung (Macherey-Nagel, Nucleobond AX Anwendungsprotokoll, 1998) 34
2.2.9 Tris-Glycin-Laufpuffer 34
2.2.10 Tris-Glycin-Probenpuffer (nativ) 35
2.2.11 NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen) 35
2.2.12 Reduzierender SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) 35
2.2.13 DNase-Puffer 35
2.2.14 Lösungen für die Silbernitrat-Färbung (PAGE) 35
2.2.15 DNA-Agarose für die Polyacrylamidgel-Überschichtung 35
2.2.16 Slotmarker für die Agarosegel-Elektrophorese 36
2.2.17 Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) 36
2.2.18 Lugolsche Lösung 36
2.2.19 Mobile Phase in der Anionenbestimmung mittels HPLC 36
2.2.20 Standard in der Anionenbestimmung mittels HPLC 36
2.2.21 Lösungen für die Gram-Färbung 37
2.3 Methoden 37
2.3.1 Trockenmassebestimmung der Lanzarote-Proben 37
2.3.2 Anionenbestimmung der Lanzarote-Proben durch HPLC (Rethmeier et al., 1997) 37
2.3.3 Lichtmikroskopie 37
2.3.4 Gesamtzellzahlbestimmung 37
2.3.5 Gram-Färbung und Schnelltest auf L-Alanin-Aminopeptidase (Merck) 38
2.3.6 16S-rRNA-Gen-Partialsequenzanalyse 38
2.3.7 *In-vitro*-DNase/RNase-Test und Definition der DNase-Aktivität 39
2.3.7.1 Plasmid-Vermehrung und -Aufreinigung 40
2.3.7.2 Bestimmung der pH-Toleranz der DNase-Aktivität 41
2.3.7.3 Effekt chaotroper Agenzien auf die DNase-Aktivität 42
2.3.7.4 Bestimmung der Cofaktoren der DNasen 42
2.3.7.5 Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die DNase-Aktivität 42
2.3.8 Agarosegel-Elektrophorese und Dokumentierung 42
2.3.9 Proteinbestimmung (Bradford, 1976) 43
2.3.10 Protein-Fällung 43
2.3.11 Ultrafiltration 43
2.3.12 Gelfiltration mit Sephadex G-200 44
2.3.13 Gelfiltration mit Sephadex G-75 44
2.3.14 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der Proteinfraktionen 45
2.3.14.1 Native PAGE 45
2.3.14.2 Denaturierende reduzierende PAGE (Laemmli, 1970) 45
2.3.14.3 Silbernitrat-Färbung der Polyacrylamidgele 45

2.3.15 DNase-Nachweis im Polyacrylamidgel 45
2.4 Chemikalien 46

3. Ergebnisse 47
3.1 Standortbeprobung und -charakterisierung: Lanzarote 47
3.1.1 Abhängigkeit des pH-Werts von der Salinität der Standorte 51
3.1.2 Aufbau einer Bakterien-Stammsammlung 52
3.1.3 Wahl der geeigneten Nährmedien 52
3.1.4 Lebendzellzahlen auf SML 53
3.1.5 Kolonie-morphologische Merkmale 54
3.1.6 Zell-morphologische Merkmale 54
3.1.7 Extrazelluläre Enzymproduktion auf festen Nährböden 55
3.1.7.1 Enzymproduzenten bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate 55
3.1.7.2 Enzymproduzenten innerhalb der Isolationsgruppen 57
3.1.7.3 Extrazelluläre Lipase- und Esterase-Produktion 59
3.1.7.4 Enzymproduktion bezogen auf die Salinität der Probenstandorte 60
3.1.8 Taxonomische Charakterisierung der Enzymproduzenten von Lanzarote 61
3.2 Standortbeprobung und -charakterisierung: La Baule 65
3.2.1 Abhängigkeit des pH-Werts von der Salinität der Standorte 67
3.2.2 Erweiterung der Bakterien-Stammsammlung 67
3.2.3 Lebendzellzahlen auf SML 68
3.2.4 Kolonie-morphologische Merkmale 69
3.2.5 Zell-morphologische Merkmale 69
3.2.6 Extrazelluläre Enzymproduktion auf festen Nährböden 69
3.2.6.1 Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen den Lanzarote- und La Baule-Isolaten 69
3.2.6.2 Enzymproduktion in Abhängigkeit von den Isolationsbedingungen 70
3.2.6.3 Einfluss der Standort-pH-Werte auf die Ausbeute an alkaliphilen und alkalitoleranten Isolaten 74
3.2.6.4 Ausbeute an Enzymproduzenten in Abhängigkeit von der Standortsalinität 74
3.3 *In-vitro*-DNase-Test 76
3.3.1 Versuchsbedingungen und Zuverlässigkeit der Ergebnisse im Messbereich 76
3.3.2 Vorcharakterisierung der extrazellulären DNasen aus Kulturüberständen von neun Isolaten aus Lanzarote 77
3.3.2.1 Auswahlkriterien für die Isolate 77
3.3.2.2 Merkmale der extrazellulären DNase-Aktivitäten 78
3.3.3 Weiterführende Untersuchungen zur extrazellulären DNase-Aktivität der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 82
3.3.3.1 Morphologische und physiologische Merkmale der Stämme 82

3.3.3.2 Enzymbildung in Abhängigkeit von der Kulturzeit 83
3.3.3.3 Einfluss von Salz auf die DNase-Aktivität 84
3.3.3.4 Einfluss chaotroper Agenzien auf die DNase-Aktivität 85
3.3.3.5 Einfluss der Temperatur auf die DNase-Aktivität 88
3.3.3.6 Einfluss des pH-Werts auf die DNase-Aktivität 89
3.3.3.7 Spezifität der Nucleasen 89
3.3.3.8 Nachweis der Endonuclease-Aktivität 90
3.4 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der extrazellulären SJ1/4-DNase 91
3.4.1 Ultrafiltration 91
3.4.2 Proteinfällung 92
3.4.2.1 Ammoniumsulfat als Fällungsmittel 92
3.4.2.2 Ethanol als Fällungsmittel 92
3.4.3 Gelfiltration mit Sephadex G-200 93
3.4.4 Analytische Auftrennung der Proteinfraktionen durch PAGE 94
3.4.5 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration mit Sephadex G-75 95

4. Diskussion 97
4.1 Eignung der Vorgehensweise: hierarchisches Screenen einer Stammsammlung und klassische Isolierung 97
4.2 Eignung der Probenstandorte 99
4.2.1 Physiko-chemische Unterschiede der Standorte 101
4.2.2 Biologische Faktoren 102
4.3 Wahl der Kulturmedien, Lebendzellzahlen und Diversität 104
4.4 Eignung der Plattentests für ein initiales Screenen auf extrazelluläre Hydrolasen und Vergleich der erzielten Ergebnisse 107
4.4.1 Detektion von Proteasen 107
4.4.2 Detektion von Nucleasen 109
4.4.3 Detektion von Lipasen und Esterasen 110
4.4.4 Detektion von Amylasen 111
4.5 Potenzial zur Bildung extrazellulärer Enzyme im hypersalinen Milieu 111
4.5.1 Taxonomie der Enzymproduzenten aus hypersalinem Milieu 115
4.6 Charakterisierung der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 sowie Vergleich ihrer Nuclease-Aktivitäten 117
4.6.1 Systematische Zuordnung von EG2S/2 und SJ1/4 117
4.6.2 *In-vitro*-DNase-Test 119
4.6.3 Vergleich der Nuclease-Eigenschaften 119
4.6.3.1 Sekretionscharakteristika 119
4.6.3.2 Vergleich der EG2S/2- und SJ1/4-Nucleasen mit nichthalophilen Nucleasen 121
4.6.3.3 Vergleich der SJ1/4-Nuclease mit anderen halophilen Nucleasen 124

4.7 Methodische Probleme der Reinigung halophiler Enzyme 126
4.7.1 Theorie zur Wirkung von Ionen auf Proteine 127
4.7.2 Enzymstabilität 127
4.7.3 Enzymfällung 128
4.7.4 Bestimmung des Molekulargewichts 130
4.8 Ausblick 131

5. Zusammenfassung 133

6. Literatur 135

7. Anhang 145

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
Ap	Ampicillin
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4´,6´-Diamidino-2-phenylindol
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
FISH	Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
GuHCl	Guanidin-Hydrochlorid
GuSCN	Guanidin-Thiocyanat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
Lsg.	Lösung
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pB	pBluescript (Plasmid)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure
R.T.	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaureat

Abb.1: Luftaufnahme der Meerwassersalinen bei La Baule, Marais Salants, Pays de la Loire, Frankreich. La Baule mit seinem charakteristischen Küstenverlauf ist im Hintergrund zu sehen. (Quelle: Broschüre des PÔLE TOURISTIQUE DE LA BAULE ET LA PRESQU`ÎLE GUÉRANDAISE, Frankreich.)

1. Einleitung

1.1 Neue Enzyme

Nahezu alle biochemischen Reaktionen werden von einer Klasse bemerkenswerter biologischer Katalysatoren vermittelt: den Enzymen. Von den üblichen chemischen Katalysatoren unterscheiden sich die Enzyme in einigen wichtigen Punkten: Sie haben höhere Reaktionsgeschwindigkeiten, funktionieren unter milderen Reaktionsbedingungen, besitzen eine größere Reaktionsspezifität und die Fähigkeit zur Regulation (Voet & Voet, 1992). Dies macht Enzyme zu umweltfreundlichen, ökonomischen und sauberen Katalysatoren. Sie werden daher in einem zunehmendem Maße in molekularer Biotechnologie, medizinischer Diagnostik und industriellen Prozessen eingesetzt (Wahler & Reymond, 2001). Bereits in den 30er Jahren des 19. Jahrhunderts wurden die ersten Enzyme entdeckt: zum einen die Diastase (Amylase) durch Payen und Persoz und zum anderen Pepsin (Protease) durch Schwann (s. Demirjian et al., 1999). Das erste Patent auf die Nutzung von Bauchspeicheldrüsen-Enzymen stammt von 1913, kurz darauf wurde mit „Burnus“ das erste Waschmittel mit Enzymzusatz auf den Markt gebracht (Godfrey & West, 1996). Bis 1992 konnten über 3.000 Enzyme – zumeist aus mesophilen Organismen – isoliert und charakterisiert werden (Kumar & Takagi, 1999). Viele davon finden kommerzielle Anwendung, wie die Debitrase® aus Milchsäurebakterien für die Verringerung der Bitterkeit von Casein-Hydrolysaten, die Laccase A aus *Agaricus bisporus* bei der organischen Synthese oder die Pectinase L-40 aus *Aspergillus niger* bei der Frucht- und Gemüse-Verarbeitung. Der geschätzte Handelsumsatz mit industriellen Enzymen – hauptsächlich hydrolytische Enzyme – betrug 1999 1,6 Milliarden US-$, von denen ca. 60% auf Proteasen entfielen (s. Abb. 2). Rekombinante therapeutische Enzyme wie Pulmozyme® (bei Mucoviscidose, Genentech, USA), Elitek® (bei Leukämie, Sanofi-Synthelabo, Inc., USA) oder Metalyse® (bei Herzinfarkt, Boehringer Ingelheim, Deutschland) hatten sogar einen Marktwert von 2 Milliarden US-$ (Demain, 2000; Rao et al., 1998).

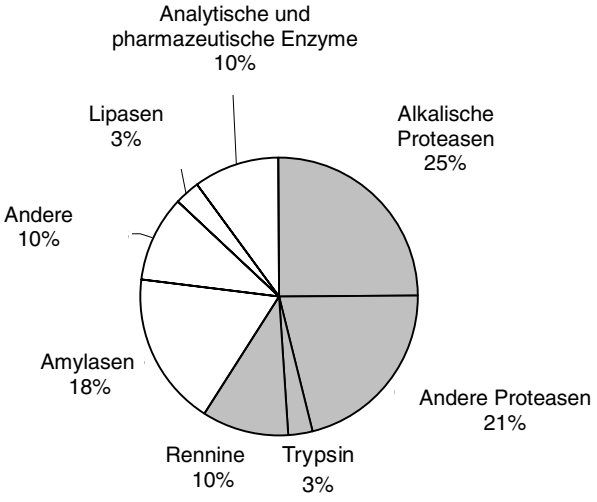

Abb. 2: Verteilung des weltweiten Handelsumsatzes mit Enzymen (Quelle: Rao et al., 1998).

Der Bedarf an Enzymen mit anderen als den bisher bekannten Eigenschaften bezüglich Stabilität, Substratspezifität und Umsatzraten ist groß, da in vielen Fällen die biotechnologischen Prozesse unter Verwendung der bislang gebräuchlichen Enzyme noch nicht optimal durchgeführt werden können. Ein Beispiel ist die Stärkeverflüssigung; hier wird Stärke mit Wasser durch Gelatinisierung in einem Hochtemperatur-Wärmetauscher bei über 100 °C verflüssigt, was zur Bildung einer sehr viskosen Lösung führt, die für die anschließende Saccharifizierung nicht geeignet ist. Die Kettenlänge der Stärke muss daher vor der Hitzebehandlung verringert werden, was durch Zugabe von α-Amylasen erfolgt. Dabei wurde die anfangs verwendete Amylase von *Bacillus amyloliquefaciens* bereits durch die thermostabilen Enzyme von *B. staerothermophilus* und *B. licheniformis* ersetzt, die kurzzeitig noch bei einer Temperatur von 105°C aktiv sind. Dies machte aber eine pH-Anhebung in der Stärke-Suspension und die Zugabe von Ca^{2+} nötig, um die Funktionalität der Enzyme zu gewährleisten. Nach der Stärkeverflüssigung müssen der pH-Wert wieder gesenkt und Calcium-Ionen entfernt werden, was die Kosten des Verfahrens wiederum steigen lässt. Der Einsatz einer thermoacidophilen α-Amylase ohne Ca-Bedarf würde dieses Problem beseitigen (Crabb & Mitchinson, 1997) und zahlreiche Untersuchungen haben sich in letzter Zeit mit der Suche nach einem solchen Enzym befasst (Bertoldo & Antranikian, 2002; Serour & Antranikian, 2002). Einer Optimierung vieler Verfahren stehen jedoch zwei Aspekte im Wege: Zum einen das Problem der Zulassung neuer Enzyme; besonders für mikrobielle Enzyme fehlen häufig ausreichende toxikologische Daten, da ihre Beschaffung sehr zeit- und kostenintensiv ist, was zur Folge hat, dass bereits beschriebene Enzyme nicht zur Anwendung kommen dürfen (Godfrey & West, 1996). Und zum anderen mangelt es einfach an geeigneten alternativen Enzymen mit verbesserten Eigenschaften. So werden besonders im Fall von Proteasen, die den größten Marktanteil ausmachen, bereits erhebliche Anstrengungen auf dem Sektor des Protein-Engineerings unternommen (Änderung der Primärstruktur von Proteinen), um die bisher verwendeten Enzyme zu optimieren. Durch ortsgerichtete und/oder zufallsgesteuerte Mutagenese (Jaeger et al., 2001) wurden neue Protease-Präparate entwickelt. Beispiele sind Durazym® (Novo Nordisc, Dänemark), Maxapem® (Solvay Enzymes GmbH, Deutschland) und Purafect® (Genencor Internation, Inc., USA), die ihren Ursprung in alkaliphilen *Bacillus*-Stämmen haben. Die Veränderungen in den Enzymeigenschaften, die durch diese Verfahren erzielt werden konnten, waren allerdings häufig noch marginal. Die Hoffnung, neue Enzyme – mit noch unbekannten Reaktionsmechanismen – insbesondere aus bisher nicht kultivierten Mikroorganismen zu isolieren, ist hingegen groß (van den Burg, 2003; Meurer & Eck, 2003; Gupta et al., 2002b; Eichler, 2001; Hough & Danson, 1999).

Die Vorteile der Verwendung von Mikroorganismen sind im Vergleich zu Pflanzen und Tieren deutlich. Mikroorganismen zeigen schnelles Wachstum, benötigen wenig Platz zur Kultivierung, bieten einfache Zugriffsmöglichkeiten für genetische Manipulationen und sind daher bevorzugte Forschungsobjekte. Isolierte Organismen können gehältert werden, DNA nichtkultivierter

Organismen kann in Form von Genbanken mithilfe von Mikroorganismen exprimiert werden. Zwei Drittel der weltweiten kommerziellen Protease-Produktion werden heute schon mithilfe von Mikroorganismen getätigt (Kumar & Takagi, 1999) und bereits vor 1994 wurden über 50% der industriell bedeutenden Enzyme von gentechnisch veränderten Mikroorganismen hergestellt, Tendenz steigend (Hodgson, 1994).

Viele der industriellen Anwendungen sind auf Enzyme angewiesen, die unter nicht-physiologischen Bedingungen arbeiten können, z.B. bei extremen pH-Werten unter Verwendung von Detergenzien in der Reinigung von Apparateteilen wie Endoskopen oder Elektroden, bei hohen Salzkonzentrationen (s. Kapitel 1.6.1) oder bei hohen Temperaturen, wie bereits anhand der Stärkeverflüssigung beschrieben. Auf besonderes Interesse stoßen daher Enzyme extremophiler Mikroorganismen, da bereits gezeigt wurde, dass sie den extremen Bedingungen, unter denen sie gebildet werden, angepasst sind und in der Biotechnologie die Lücke zwischen chemischen und den bisherigen biologischen Prozessen füllen können (Schiraldi & De Rosa, 2002; Demirjian et al., 2001). Die Wahrscheinlichkeit ist groß, an extremen Standorten wie heißen Quellen, Salzmarschen oder in Erdöltanks Enzyme mit ganz neuen Reaktionsmechanismen als den bisher bekannten zu entdecken (Moran et al., 2001; Rao et al., 1998; Godfrey & West, 1996). So fördert die Europäische Kommission bereits seit 1982 mit zunehmendem Engagement die Forschung an Extremophilen, da die kommerzielle Bedeutung weiterer Entdeckungen auf diesem Gebiet erkannt wurde. Allein zwischen 1990 und 1994 flossen 4,5 Millionen ECU in den Schwerpunkt Archaea und Bacteria / thermophil, psychrophil, alkaliphil, acidophil und halophil. Ein Beispiel für neue Enzyme sind die DNA-Polymerasen aus *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus furiosus* in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die weltweit in Gerichtsmedizin, Lebensmittelanalyse, klinischer Medizin etc. genutzt werden (Aguilar, 1996).

Die Verwendung von Enzymen ersetzt somit auf der einen Seite langbewährte chemische und physikalische Prozesse, bei denen z.T. erhebliche Mengen an hochbelasteten Abwässern entstanden oder große Energiemengen nötig waren, und auf der andere Seite eröffnet sie ganz neue Anwendungsmöglichkeiten (van den Burg, 2003).

In den folgenden Kapiteln werden einige für diese Arbeit wichtige Enzyme und Organismengruppen sowie deren Lebensräume dargestellt.

1.2 Peptidasen

Proteolytische Enzyme kommen in allen Formen von Organismen vor und beeinflussen die Funktionalität sowohl einzelner Zellen als auch von Organen und von vielzelligen Organismen. Sie katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen, was zu einem vollständigen Abbau eines Proteins zu Aminosäuren führen kann. Im allgemeinen zerlegen extrazelluläre Proteasen Eiweiße in Oligopeptide, damit diese anschließend in die Zelle aufgenommen werden können.

Im Fall von Virulenzfaktoren können sie der Zelle die Invasion in den Wirt ermöglichen. Ein Beispiel ist die Zerstörung von IgA-Antikörpern in Wirt-Schleimhäuten durch extrazelluläre Proteasen von *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae*. Proteasen modifizieren aber auch höchst selektiv Proteine zur Aktivierung oder Inaktivierung von anderen Peptidasen oder Peptiden und sind damit Bestandteil von Signalkaskaden zur Steuerung von Prozessen. Intrazelluläre Proteasen dienen eher der Regulation des Stoffwechsels wie der Aktivierung von Zymogenen, dem Prozessieren und dem Transport von sekretorischen Proteinen durch die Zellmembran oder der Sporulation (Rao et al., 1998; Mims et al., 1998).

Klassifiziert werden die meisten Peptidasen nach der Art der katalysierten Reaktion, ihrem Reaktionszentrum, dem pH-Wert mit optimaler Aktivität und der Entwicklungsgeschichte ihrer Struktur. Bei Rao und Mitarbeiter (1998) werden Proteasen in Exo- und Endopeptidasen unterteilt, während Sterchi und Stöcker (1999) Proteasen (oder auch Proteinasen) als Endopeptidasen bezeichnen, die von den Exopeptidasen unterschieden werden. Exopeptidasen spalten nur nahe des nichtsubstituierten N- oder C-Terminus. Sie werden aufgrund der Art der Reaktion in Amino-, Dipeptidyl-, Tripeptidyl-, Peptidyl-di-, Carboxy- und Omega-Peptidasen unterteilt. Endopeptidasen spalten weiter innerhalb des Substratmoleküls und werden anhand der Merkmale ihrer Reaktionszentren als Serin-, Aspartat-, Cystein- und Metalloproteasen klassifiziert. Diese Einteilung wird ebenfalls für Exopeptidasen vorgenommen. Beispiele für Enzyme dieser Gruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Einige Proteasen passen nicht in das oben genannte Schema und werden gesondert klassifiziert, wie ATP-abhängige Proteasen.

Tab. 1: Enzymgruppen der Endopeptidasen, Kodierung der Familien nach Rawlings und Barrett (1993) und Enzymbeispiele mit Herkunft und EC-Code.

Enzymgruppe (Familie) der Endopeptidasen	Enzymbeispiele (Herkunft, EC-Code)
Serin-Endopeptidase	Trypsin (Pankreas, EC 3.4.21.4)
(S1-44)	Thrombin (Vertebratenserum, EC 3.4.21.5)
	Subtilisin Carlsberg (*Bacillus subtilis*, EC 3.4.21.62)
	Proteinase K (*Tritirachium alba*, EC 3.4.21.64)
Cystein-Endopeptidase	Cathepsin B (Mensch, Ratte, EC 3.4.22.1)
(C1-47)	Papain (*Carica papaya*, EC 3.4.22.2)
Aspartat-Endopeptidase	Pepsin (Mensch, EC 3.4.23.1)
(A1-21)	Pepsin (*Mucor pulsillus*, EC 3.4.23.23)
Metallo-Endopeptidase	Fibroblasten-Collagenase (Mensch, EC 3.4.24.7)
(M1-51)	Elastase (*Pseudomonas aeruginosa*, EC 3.4.24.26)
	Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus*, EC 3.4.24.27)

Tab. 2: Enzymklassen nach der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)-Einteilung (Quelle: NC-IUBMB, http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/)

EC-Nr.	Klasse (Beispiele für Unterklassen)
1	Oxidoreductasen (Dehydrogenasen, Peroxidasen)
2	Transferasen (Phosphorylasen, Transaminasen, Acyltransferasen)
3	Hydrolasen (Esterasen, Amylasen, Proteasen)
4	Lyasen (Decarboxylasen, Aldolasen, Dehydratasen)
5	Isomerasen (Racemasen, Tautomerasen, Mutasen)
6	Ligasen (Carboxylasen, DNA-Ligasen)

1992 wurden Hydrolasen von der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) mit der Erkennung EC 3.- (Enzyme Commission, Gruppe 3; s. Tab. 2) und Peptidasen als Unterklasse mit EC 3.4 versehen. Eine weitere Ziffer (11 – 99) codiert den Peptidase-Typ nach ihrem Reaktionszentrum bzw. nach ihrem Produkt. Die letzte Zahl wird jedem einzelnen Enzym explizit zugeordnet. Zur schnelleren Identifizierung von Peptidasen wurde von Rawlings und Barrett (1993) ein Codierungssystem entwickelt, das sich aus dem Buchstaben für die Enzymfamilie und einer willkürlich zugeordneten Nummer zusammensetzt. Klassifizierungsmerkmale sind dabei die katalytischen Gruppen und die Aminosäuresequenz und damit die evolutionäre Verwandtschaft der Peptidasen (Beispiele: s. Tab. 1, Spalte 1).

Die Ursprünge der Nutzung von Enzymen für die Proteinmodifikation durch den Menschen liegen weit vor der Zeit des wissenschaftlichen Verstehens dieser Prozesse. So wurden Rohextrakte oder Fermentationen zur Lebensmittelherstellung verwendet. Beispiele sind die Herstellung von Fischpasten und -saucen durch Fermentation, die Fleischbereitung durch *Carica papaya*-Extrakt, der Papain enthält und die Tofu-Herstellung durch Fermentationen von Soja. Vogel- und Säugetierfäkalien, die Reste von Verdauungsenzymen enthalten, wurden beim Gerben von Tierfellen genutzt. Heute können Prozesse gezielt durch die Zugabe isolierter Enzyme gesteuert werden, was ihr Einsatzgebiet stark erweitert hat. Die Anwendungsmöglichkeiten sind dabei so vielfältig wie die Eigenschaften der verwendeten Proteasen und umfassen sowohl Degradations- als auch Synthese-Prozesse. Enzyme werden industriell in großem Maßstab zur Modifikation von Substanzen und Gemischen mit pflanzlichem, tierischem oder mikrobiellem Protein eingesetzt. Dazu gehören u.a. die Erhöhung der Löslichkeit im Reinigungsmittel-, Abwasser- und Abfallprotein-Sektor, Enthaarung und Weichen sowie Gerben von Häuten in der Lederverarbeitung, Veränderung der Löslichkeit, der Stabilität, des Geschmacks und der Verarbeitbarkeit von Lebensmitteln oder die bessere Verdaulichkeit von medizinischer und diätischer Kost sowie Tier- und Babynahrung. Ein relativ neuer Bereich ist die Reduktion des Allergiepotenzials verschiedener Nahrungsmittel durch die enzymatische Zerlegung der Allergene. Auch die Synthese von biologisch abbaubaren Kunststoffen in fast wasserfreien organischen Medien ist möglich (Godfrey & West, 1996; Patil et al., 1991).

1.3 Esterasen

Esterasen (EC 3.1.) sind Enzyme, die in wässrigen Lösungen die Bildung und Hydrolyse von Estern katalysieren. Als Hydrolasen spalten sie ihre jeweiligen Substrate unter Einlagerung der Elemente des Wassers, wobei Säure und Alkohol entstehen. Zu den Esterasen gehören z.B. Lipasen, Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Sulfatasen und Nucleasen.

Esterasen finden zunehmend Beachtung wegen ihrer Anwendbarkeit in organischen Lösungsmitteln, wo sie anstelle der Hydrolyse die Transesterifikation katalysieren (Klibanov, 2001). Mit diesem Verfahren können z.B. minderwertige Öle durch Austausch der Fettsäurereste am Triacylglycerin aufgewertet werden (Niehaus et al., 1999; Godfrey & West, 1996). Andere Enzyme der Gruppe der Esterasen wie Phospholipasen (EC 3.1.1.4) finden in der Ölsaat-Verarbeitung Anwendung, wo sie durch den Abbau von Phospholipiden und Phosphatiden die gummiartige Konsistenz der Öle verringern und damit die Verarbeitbarkeit verbessern (Godfrey & West, 1996).

1.3.1 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) katalysieren den Vorgang der Lipolyse, bei dem Triacylglyceride in Glycerin und Fettsäuren (> 10 C-Atome) unter Einlagerung von Wasser gespalten werden. Die umgekehrte Reaktion – die Synthese – ist ebenfalls möglich. Aufgrund ihrer Fähigkeit, enantioselektiv die Bildung optisch reiner Verbindungen zu katalysieren, sind Lipasen die in der Feinchemikalienproduktion am häufigsten eingesetzten Enzyme (Demirjian et al., 2001; Jaeger et al., 2001, 1999). Weiterhin werden Lipasen u.a. als Zusatz in Reinigungsmitteln, besonders Waschmitteln (Jaeger & Reetz, 1998), in der Zellstoffgewinnung zum Abbau der Harze aus Holz oder der Entfernung von Farbe aus Recyclingpapier eingesetzt (Bajpai, 1999; Farrell et al., 1997).

1.3.2 Nucleasen

Nucleasen sind eine Sammelbezeichnung für Enzyme, die Nucleinsäuren an der (5´-3´)-Phosphodiester-Bindung hydrolytisch spalten (s. Abb. 3). Sie werden auch als Phosphodiesterasen bezeichnet. Nucleasen werden nach ihren Substraten in Desoxyribo- (DNasen) und Ribonucleasen (RNasen) unterteilt. Aufgrund ihres Reaktionsortes im Substrat erfolgt eine Einteilung in Exo- und Endonucleasen, wobei erstere endständig Nucleotide ablösen und letztere innerhalb der Nucleinsäure-Kette spalten. Eine Sonderstellung nehmen die Restriktions-Endonucleasen ein, die spezifische Nucleotid-Sequenzen in doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure erkennen und den Strang dort oder an definierten anderen Stellen brechen. Einige Nucleasen zeigen geringe Zuckerspezifität, so dass sie sowohl mit DNA als auch mit RNA reagieren. Im Anhang ist eine Aufzählung der derzeit nummerierten Nucleasen enthalten (Tab. C).

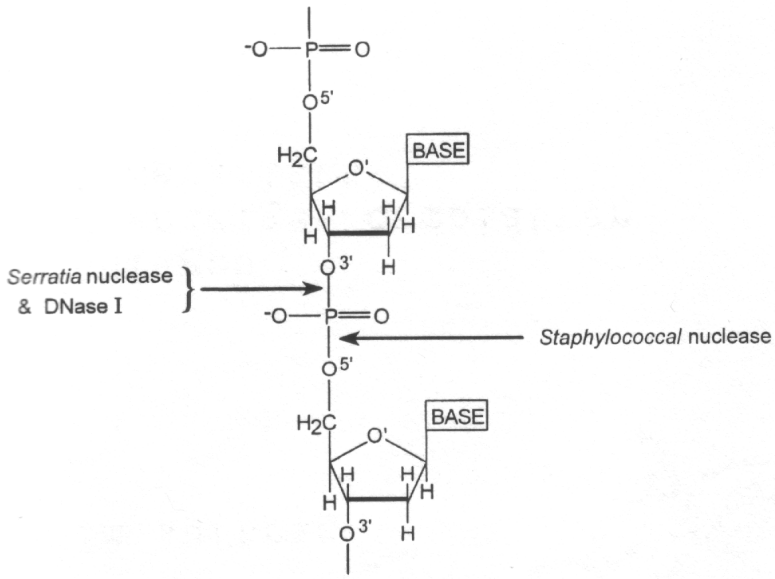

Abb. 3: Die Schnittstellen für DNase I, *Staphylococcus*- (Micrococcal-) und *Serratia*-Nuclease in einem Polynucleotid-Substrat (Quelle: Benedik & Strych, 1998).

Intrazelluläre Nucleasen kommen in allen Organismen vor und sind essentielle Werkzeuge für die Genexpression und damit der Regulation von Vorgängen in der Zelle. Extrazelluläre Nucleasen sind nach Benedik und Strych (1998) weitaus seltener zu finden, und man nimmt an, dass sie bei Bakterien hauptsächlich der Bereitstellung von verwertbaren Nährstoffen für die Zelle dienen. Als Virulenzfaktoren werden sie ebenfalls diskutiert, da sie bei der Invasion in den Wirt durch *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes* und *Vibrio cholerae* mitwirken (Elsner et al., 2000; Focareta & Manning, 1991).

Die 1920 entdeckte RNase-A aus Rinderpankreas (EC 3.1.27.5), die auch als RNase I oder RNase bezeichnet wird, war das erste Enzym, dessen Sequenz vollständig angegeben werden konnte (1950). Die Sekundär- und Tertiärstruktur war durch Kristallstrukturanalyse seit 1967 bekannt (Römpp, 2.0). Sie gilt als das am besten untersuchte Enzym des 20. Jahrhunderts.

Industrielle Anwendungen finden Nucleasen hauptsächlich im downstream processing. Typische Einsatzgebiete sind die Elimination von Nucleinsäure-Kontaminationen aus gereinigten Proteinen oder die Reduktion der durch Nucleinsäuren verursachten Viskosität für weiterführende Verarbeitungsschritte. Um Kosten einzusparen, wurde in der „Bio-Kunststoff"-Herstellung eine elegante Methode entwickelt. Das Nuclease-Gen von *Staphylococcus aureus* wurde in das Genom von Poly(3-Hydroxyalkanoate)(PHA)-produzierenden Bakterienstämmen integriert. Diese gaben daraufhin Nucleasen in das Medium ab, die bei der PHA-Gewinnung die Viskosität des Mediums herabsetzten, die durch beim Aufschluss der Zellen freiwerdende Nucleinsäuren verursacht wird (Boynton et al., 1999). Anwendungen im kleineren Maßstab oder in der Erprobung sind z.B. der Einbau von Nuclease-Genen in gentechnisch veränderten Mikroorganismen. Die Nucleasen sollen unter bestimmten Voraussetzungen die veränderte DNA zerstören und damit eine Vermehrung von in die Umwelt gelangten Mikroorganismen oder die Verbreitung der veränderten DNA verhindern. In diesem Zusammenhang werden die Gene

daher auch als Killer-Gene bezeichnet (Ahrenholtz et al., 1994a). Basierend auf der gezielten Einschleusung in Gewebe oder Zellen mithilfe von modifizierten Viren wird in der Medizin versucht, Nucleasen in der Therapie von DNA- und RNA-Virus-Infektionen oder von Krebs einzusetzen (Schumann et al., 1997; Black et al., 1993; Kurinenko et al., 1977). Für die Behandlung der Symptome der Mucoviscidose ist bereits seit 1994 eine Nuclease (DNase I) als Inhalationsspray auf dem Markt (Pulmozyme®, Genentech, USA).

1.4 Amylasen

Sie gehören zu der Gruppe der Hydrolasen, die Stärke und Glykogen entweder direkt oder über Dextrine zu Maltose und Glucose abzubauen vermögen (EC 3.2.1.1-3). Stärke ist ausschließlich aus α-Glukose-Einheiten aufgebaut, die über α-1,4 oder α-1,6-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind und hochmolekulare Verbindungen bilden: Amylose (15% – 25%), ein lineares Polymer aus α-1,4-verknüpften Glukopyranoseresten, und Amylopectin (75% – 85%), ein zusätzlich über α-1,6-glykosidische Bindungen verzweigtes Polymer. Man unterscheidet zwischen α-, β- und γ-Amylasen. Die beiden letzteren fasst man auch als saccharogene (verzuckernde) Amylasen zusammen, da sie Maltose und Glukose in β-Konfiguration freisetzen. Die α-Amylase schneidet zufällig innerhalb des Stärkemoleküls, wobei Dextrine mit α-Konfiguration am reduzierenden Ende entstehen. Die Verzweigungen im Amylopectin können von Pullulanasen (EC 3.2.1.41; Pullulan = lineares Polymer aus α-1,6-glykosidisch verknüpften Maltotriose-Einheiten) und auch von einigen γ-Amylasen hydrolysiert werden. Einige Pullulanasen können auch α-1,4-glykosidische Bindungen spalten (Niehaus et al., 1999; NC-IUBMB, http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/). Stärkespaltende Enzyme wie die α-Amylasen aus *Bacillus*-Stämmen werden u.a. Waschmitteln zugesetzt und in der Herstellung von Zuckerlösungen aus billigen Stärkequellen verwendet.

Die Zerlegung von Stärke kann auch durch Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTase / EC 2.4.1.19) erfolgen. Sie werden von Bakterien und Archaeen gebildet und sind funktionell mit α-Amylasen verwandt (Wind et al., 1995). Sie zeigen wenig Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, die abgeleitete Sekundärstruktur ist aber sehr ähnlich (Svensson, 1994). Daher waren Reklassifizierungen von Enzymen nötig, die als α-Amylasen bezeichnet wurden, und bei näheren Untersuchungen auch CGTase-Aktivität zeigten (Wind et al., 1995). Durch die transglycosylierenden CGTasen entstehen aus Stärke, Amylose und anderen Polysacchariden lineare Produkte, wie auch bei α-Amylasen, und zusätzlich nichtreduzierende cyclische Dextrine (CD). CD sind beliebte Substanzen in zahlreichen Anwendungsbereichen wie der chemischen und pharmazeutischen Industrie, wo sie als Hülle für lipophile Verbindungen verwendet werden. In der industriellen CD-Produktion werden normalerweise CGTasen von alkaliphilen *Bacillus*-Stämmen verwendet (Biwer et al., 2002).

1.5 Meerwassersalinen

Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit sollten Enzyme halophiler Mikroorganismen sein. Diese Organismen sind bevorzugt in hypersalinen Habitaten zu finden. Während hypersaline Gewässer definitionsgemäß eine Salzkonzentration deutlich über der von Meerwasser mit 3,5% ± 0,2% NaCl (w/v) besitzen, ist die Kategorisierung für Böden weniger eindeutig. Die meisten Böden enthalten sehr geringe Mengen gutlöslicher Salze. Daher kann jeder Boden, der bedeutende Mengen dieser Salze enthält, als hypersalin angesehen werden (Rodríguez-Valera, 1988).

Viele hypersaline Gewässer entstehen durch die Evaporation von Meerwasser (sogenannte thalassohaline Habitate) und stellen daher einen Teilbereich der marinen Biotope dar. Zu ihnen zählen Salinen, Salzwasserquellen unterirdischer Salzvorkommen, natürliche küstennahe Spritzwasserzonen u.a. Ihre Salzzusammensetzung entspricht – zumindest anfangs – der von Meerwasser mit NaCl als vorherrschendem Salz, der pH-Wert ist neutral bis leicht alkalisch. Die Ionenzusammensetzung ändert sich im Laufe der Evaporation. Calcium-Salze wie Gips ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) und Aragonit ($CaCO_3$) beginnen bei einer Gesamtsalzkonzentration von ca. 8 bis 10% auszufallen; nach und nach präzipitieren andere Salze ebenfalls, nachdem ihre Sättigung erreicht wird (Litchfield & Gillevet, 2002; Oren, 2002a). Nach Rodríguez-Valera (1993) können aus Meerwasser über 50 verschiedene Salze durch Evaporation entstehen.

Hypersaline Gewässer nicht-marinen (oder nicht hauptsächlich marinen) Ursprungs werden als athalassohalin bezeichnet. Sie entstehen z.B. in ariden Gebieten durch Verdunstung von Süßwasser oder durch Auflösung von Salzschichten. Ihre Ionenzusammensetzung ist somit stark von der umgebenden Geologie, Topographie und den klimatischen Bedingungen abhängig und unterscheidet sich stark von der des Meerwassers (Horikoshi, 1991a). Ein Beispiel ist das Tote Meer, ein See, in dem die Konzentrationen an divalenten Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} die der monovalenten wie Na^+ und K^+ übersteigen und in dem der pH-Wert mit 6,0 relativ niedrig ist (Oren, 2002a).

Meerwassersalinen sind küstennahe Salzgewinnungsstätten, die auch als Salzgärten bezeichnet werden und Salinitäten repräsentieren, die von Meerwasserkonzentrationen (ca. 3,5% w/v) bis zur Halit(NaCl)-Sättigung (über 35% w/v) reichen. Anhand der Abbildung 4 wird ihre Funktionsweise erklärt. Die Pfeile geben die Flussrichtung des Wassers an.

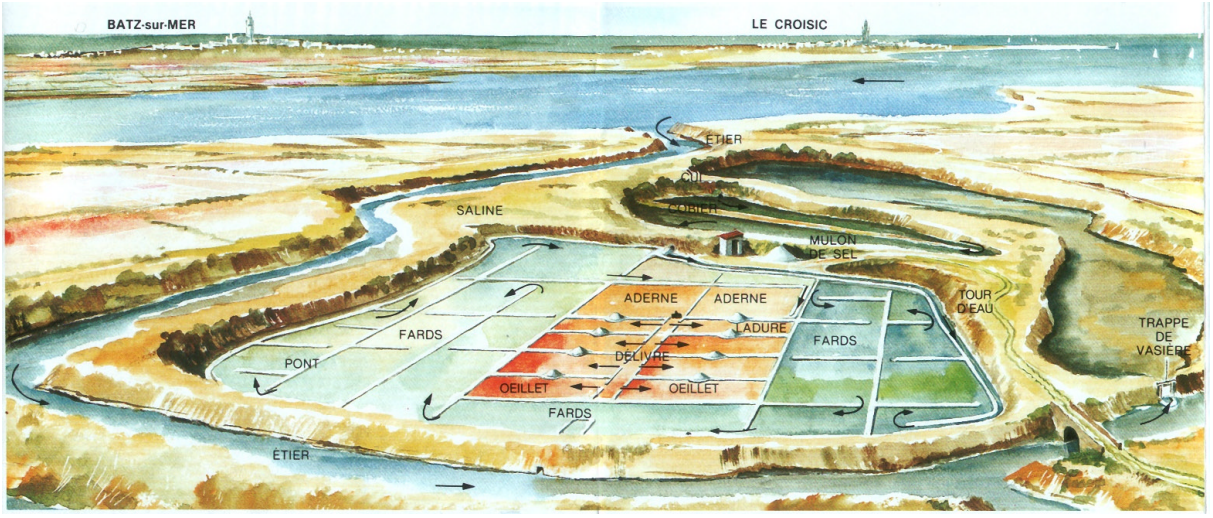

Abb. 4: Flussrichtung des Wassers in einer thalassohalinen Saline bei La Baule, Frankreich. Nach einem Aquarell von R. Chetelat (Musée Des Marais Salants, Batz-sur-Mer, Frankreich). Die Bezeichnungen der Becken sind nur typisch für französische Salzgärten und nicht auf Salinen weltweit anzuwenden.

Thalassohaline Salinen werden im Gezeitenwechsel über einen Kanal (étier) gespeist, der in ein Schlämmbecken (vasière) mündet, welches als Reservoir dient. Unter Ausnutzung des Gefälles oder auch mit Hilfe von Pumpen wird das Wasser durch zahlreiche, flache Lehmbecken (corbiers, fards und adernes, später als Vorbecken bezeichnet) geleitet, deren hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis die Verdunstung des Wassers durch Sonne und Wind fördert. Die Salzkonzentration steigt so stetig an und unerwünschte Salze wie Aragonit und Gips fallen bereits hier aus. In den letzten Becken (oeillets) erfolgt ab einer Salinität von ca. 34% die Kristallisation von Halit. Es kann durch weitere Evaporation eine Salzkonzentration von bis zu 50% w/v erreicht werden (Rodríguez-Valera, 1988), wobei es zum Ausfallen von Pottasche-Mineralien kommen kann, die Na^+, Mg^{2+}, K^+, Cl^- und SO_4^{2-} enthalten und entweder ebenfalls geerntet werden können oder Abfall darstellen (Broschüre des Musée Des Marais Salants, Batz-sur-Mer, Frankreich; Javor, 2002).

An der erfolgreichen Gewinnung von Speisesalz sind die in der Saline enthaltenen Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte beteiligt. So verstärkt beispielsweise die durch Mikroorganismen verursachte Rotfärbung der Kristallisationsbecken die Evaporation und ist essentiell für die Salzgewinnung. Meerwassersalinen werden daher von Javor (2002) auch mit halb-geschlossenen Chemostaten verglichen. Sie zeichnen sich neben der hohen Salinität häufig durch alkalische Bedingungen, starke Sonneneinstrahlung und einen hohen Nährstoffgehalt aus. Ein Salinenbecken ist daher aus physiologischer Sicht immer ein relativ trockener Standort. Salz verursacht aufgrund der Verstärkung von hydrophoben Wechselwirkungen die Aggregation oder den strukturellen Zusammenbruch von Proteinen. Es stört die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen durch Ladungsabschirmung und kann die Verfügbarkeit von freiem Wasser durch die Hydratisierung der Salzionen so weit reduzieren, dass die Aufrechterhaltung von essentiellen biologischen

Prozessen nicht mehr möglich ist (Dennis & Shimmin, 1997). In Organismen, die diese Lebensräume besiedeln, haben sich daher spezielle Anpassungen entwickelt.

1.6 Extremophile

Extremophile sind Organismen, die Habitate mit extremen physikalischen und chemischen Eigenschaften besiedeln und diese Lebensbedingungen – im Gegensatz zu Extremotoleranten – auch zum Überleben brauchen. Die Grundvoraussetzung für Leben ist die Verfügbarkeit von flüssigem Wasser. Extreme Habitate sind daher alle Bereiche, die von der sogenannten „moderaten Umwelt" abweichen und in denen – wenn auch nur zeitweise – Wasser in nutzbarer Form bereitsteht. Die „moderate Umwelt" wird durch folgende Eigenschaften beschrieben: ungefähr neutraler pH-Wert, Temperaturen um 30 bis 37 °C, ein Druck von 1 atm, adäquate Konzentrationen von Nährstoffen und Salzen und Sauerstoff in relativ hohen Konzentrationen (Horikoshi, 1991b; Rodríguez-Valera, 1993). Wasser ist normalerweise zwischen 0 und 100 °C flüssig. Durch Siedepunkterhöhung und Schmelzpunkterniedrigung kann dieser Bereich allerdings erweitert werden, so dass Leben auch außerhalb des oben genannten Temperaturbereichs gefunden wird. Physikalische Gegebenheiten können aber eine absolute Grenze setzen, jenseits derer kein Leben möglich ist. Diese Grenzen werden entweder wie im Fall von hohen Drücken auf der Erde nicht erreicht, oder sie werden noch anhand von Stabilitätsuntersuchungen an Biomolekülen durch die Wissenschaft ausgelotet. Beispielsweise wird die prinzipielle Temperaturobergrenze für 120 °C angenommen, da Moleküle unter dieser Bedingung schneller zerfallen als sie synthetisiert werden können. Chemischer Stress etwa in Form hoher Salzkonzentrationen oder Säuregrade stellt für das Leben kein unüberwindbares Hindernis dar (Groß, 1997).

Zu den extremophilen Organismen gehören Thermophile, Psychrophile, Acidophile, Alkaliphile, Piezophile, Metallophile, Radiophile und Microaerophile (Demirjian et al., 2001). Einige dieser Gruppen sind mit den entsprechenden Lebensbedingungen und typischen Vertretern in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Einige Phänotypen extremophiler Bakterien, ihre Lebensbedingungen und typische Gattungen (Quelle: Hough & Danson, 1999).

Phänotyp	Bedingungen im Habitat	Typische Gattungen
Thermophil	55-80 °C	*Methanobacterium, Thermoplasma, Thermus*, Bacillus**
Hyper-thermophil	80-113 °C	*Aquifex*, Archaeoglobus, Hydrogenobacter*, Methanothermus, Pyrococcus, Pyrodictium, Pyrolobus, Sulfolobus, Thermococcus, Thermoproteus, Thermotoga**
Psychrophil	-2 bis +20 °C	*Alteromonas*, Psychrobacter**
Halophil	2-5 M NaCl	*Haloarcula, Halobacterium, Haloferax, Halorubrum*
Acidophil	pH < 4	*Acidianus, Desulfurolobus, Sulfolobus, Thiobacillus**
Alkaliphil	pH > 9	*Natronobacterium, Natronococcus, Bacillus**

* Gattungen der *Bacteria*; alle anderen sind *Archaea*.

1.6.1 Halophile Mikroorganismen und ihre Enzyme

Mikroorganismen, die an ein Leben in hohen Salzkonzentrationen angepasst sind, gibt es in allen drei Reichen der Lebewesen: Archaea, Bacteria und Eukarya (Oren, 1999). Abbildung 5 zeigt einen allgemeinen phylogenetischen Baum, in dem anhand der dicken Äste das Vorkommen von Mikroorganismen dargestellt ist, die in der Lage sind, bei einer Salzkonzentrationen von über 10% gut zu wachsen.

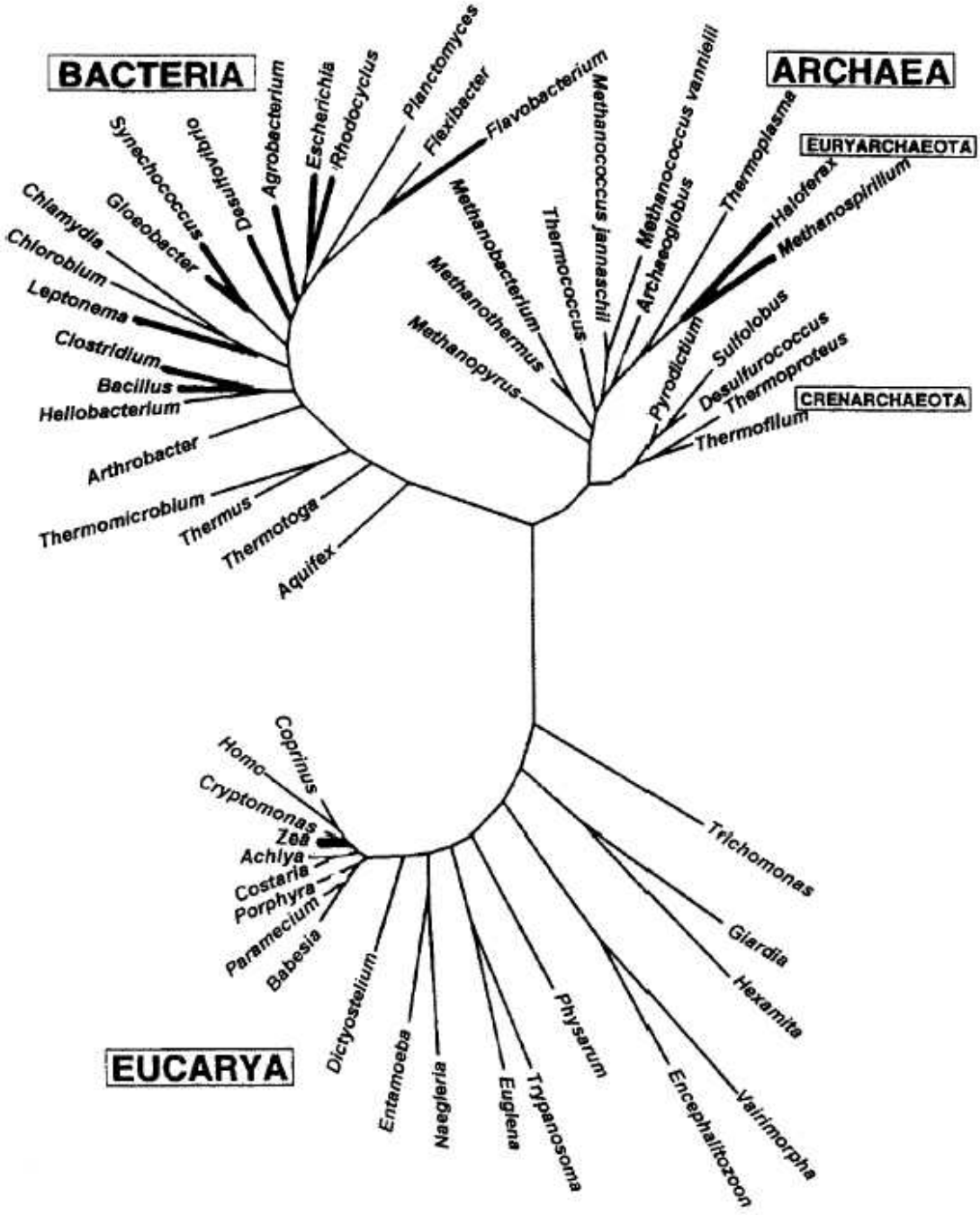

Abb. 5: Phylogenetischer Baum des Lebens, basierend auf kleinen rRNA-Gensequenz-Untereinheiten. Dickmarkierte Äste zeigen Gruppen, die halophile und halotolerante Organismen mit gutem Wachstum bei > 10% Salz enthalten (Quelle: Oren, 2002a).

Neben wenigen höheren Organismen wie beispielsweise dem Salinenkrebs (*Artemia salina*) und der Salzfliege (*Ephydra* sp.) sind Mikroorganismen die dominanten Besiedler hypersaliner Habitate. Das Vorkommen höherer Organismen wird in zunehmend salzhaltigerem Milieu durch erhöhten Energieaufwand für die Osmoregulation, die steigenden Temperaturen des Salzwassers und die Verringerung der Sauerstoffkonzentration eingeschränkt. Mikroorganismen können hingegen aufgrund von fehlenden Räubern und zum Teil hohen Nährstoffgehalten Populationsdichten von 10^7 bis 10^8 Zellen $\cdot$ ml^{-1} und höher erreichen (Oren, 2002b). Typische eukaryotische Mikroorganismen der Salinen sind die Algen *Dunaliella viridis* und *D. salina.* Halophile und halotolerante Vertreter der *Bacteria* sind weit über die Untergruppen des phylogenetischen Baums verstreut, wobei die Anzahl der Gattungen der moderat Halophilen über die der extrem Halophilen dominiert. Salzangepasste Archaeen finden sich unter den Methanogenen und Halobakterien (Javor, 2002; Oren, 2002a; Galinski, 1993).

Die metabolische Verschiedenheit der Organismen, die in hohen Salzkonzentrationen leben, ist ebenso groß wie ihre phylogenetische Diversität. Unter ihnen sind oxygene und anoxygene Phototrophe, aerobe Heterotrophe, Fermentierer, Denitrifizierer, Sulfatreduzierer und Methanogene. Mit zunehmender Salinität nimmt jedoch die Diversität der beteiligten Stoffwechseltypen ab (Oren, 2002a).

Nach der am häufigsten zitierten Definition nach Kushner (1978) erfolgt eine Einteilung der Organismen in folgende Kategorien:

Tab. 4: Organismenkategorien nach ihrer Salztoleranz bzw. -abhängigkeit und Beispiele (Quelle: Kushner, 1978).

Kategorie	Salzabhängigkeit	Beispiele
nicht halophil	Optimales Wachstum bei < 0,2 M Salz	Die meisten Süßwasserorganismen
schwach halophil	Optimales Wachstum bei 0,2 – 0,5 M Salz	Viele marine Organismen
moderat halophil	Optimales Wachstum zwischen 0,5 und 2,5 M Salz; solche, die bei < 0,1 M Salz wachsen können, sind fakultativ halophil	*Vibrio costicola,* *Micrococcus halobius*
Grenzlinien-extrem halophil	Optimales Wachstum bei 1,5 – 4,0 M Salz	*Ectothiorhodospira halophila,* *Actinopolyspora halophila*
extrem halophil	Optimales Wachstum bei > 2,5 M Salz	*Halobacterium* sp., *Halococcus* sp.
halotolerant	Nicht-Halophile, die Salz tolerieren; extrem halotolerante zeigen Wachstum bei > 15% Salz	*Staphylococcus aureus* und andere Staphylococcen; einige Hefen und Pilze

„Salz“ ist in den Angaben der Tabelle 4 im allgemeinen NaCl, es können aber auch andere Salze unter Zugabe geringer Mengen von NaCl verwendet werden (Kushner, 1978). Nach Müller und Oren (2003) sind viele halophile Prokaryonten vermutlich auf Spuren von Cl^- angewiesen. Wie die Autoren zeigen konnten, benötigen allerdings einige Vertreter erhebliche Mengen an Chlorid (in molaren Größenordnungen) für Wachstum, Sporulation, Flagellenproduktion und Fortbewegung. Halophilie ist daher nicht allein über die Toleranz gegenüber geringer Wasseraktivität, sondern auch über das Bedürfnis für hohe Konzentrationen bestimmter Salze definiert (die Verfügbarkeit von Wasser wird als

Wasseraktivität a_w angegeben, die nach Schopfer und Brennicke (1999) definiert ist als die Molfraktion von Wasser N_w multipliziert mit dem Aktivitätskoeffizienten γ_w: $a_w = N_w \gamma_w$).

Eine Zuordnung von Spezies zu den oben genannten Kategorien nach Kushner (1978) ist nicht immer eindeutig, da die Toleranz oder das Bedürfnis für Salz von Faktoren wie Wachstumstemperatur und Art der verfügbaren Nährstoffe stark abhängig sein kann (Kushner, 1993).

Für ein Leben in hohen Salzkonzentrationen gibt es zwei Strategien: Moderat halophile Organismen verfügen über Ionen-Pumpen, um einen niedrigen (physiologischen) Wert an intrazellulären Ionen aufrechtzuerhalten. Dieser Mechanismus wird auch als „salt-out"-Strategie bezeichnet. Dies hätte aber zur Folge, dass intrazellulär ein größeres Wasserpotenzial bestünde als extrazellulär. Da eine Potenzialdifferenz für Wasser wegen seiner freien Permeabilität über die Cytoplasmamembran nicht aufrecht erhalten werden kann – Rückhaltemechanismen durch z.B. zelluläre Wasserpumpen sind nicht bekannt –, erfordert eine Anpassung an extrem saline Standorte immer ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Cytoplasma und umgebendem Medium. Um einen Zell-Turgor aufrecht zu erhalten, ist das Wasserpotenzial der Umgebung etwas höher als das des Cytoplasmas. Die Osmoregulation muss gleichzeitig gewährleisten, dass alle physiologischen Funktionen unbeeinträchtigt bleiben (Galinski, 1993). Viele dieser Organismen produzieren und/oder akkumulieren daher zusätzlich biologische kompatible Solute wie Glycinbetain und Ectoin, um die Differenz zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Ionenkonzentration teilweise auszugleichen. Kompatible Solute werden definiert als organische Osmotica, die in hohen Konzentrationen die Funktionalität von Enzymen bewahren (Galinski, 1993). Diese Strategie ist in Habitaten mit bis zu 1,5 M Salz effektiv und energetisch sinnvoll und wird daher zumeist in moderat halophilen Organismen gefunden.

In höheren Salzkonzentrationen hat sich ein anderes Prinzip entwickelt. Extrem Halophile verfügen über die Fähigkeit, ein osmotisches Gleichgewicht zwischen dem Cytoplasma und ihrem umgebendem Medium herzustellen, indem sie KCl in der Zelle akkumulieren. Dies ist die sogenannte „salt-in"-Strategie. Das bevorzugte Einschleusen von K^+ – während Na^+ heraustransportiert wird – ist für den Organismus wichtig, da das K^+-Ion weniger Wasser als Hydrathülle bindet als Na^+. Der Zelle steht damit mehr freies Wasser zur Verfügung. Die Salzzusammensetzung des Cytoplasmas unterscheidet sich somit allgemein deutlich von der des umgebenden Mediums, das zumeist NaCl als Hauptkomponente enthält. Der Enzymapparat der Zellen mit der letztgenannten Überlebensstrategie muss allerdings im Gegensatz zu dem der moderat Halophilen an eine Funktion in Milieus mit hoher Ionenstärke angepasst sein (Dennis & Shimmin, 1997). Nach Oren (1999) ist anzunehmen, dass einige Organismen parallel beide genannten Strategien in gewissem Umfang verfolgen, ein Beispiel dafür ist *Halomonas elongata* (Kraegeloh & Kunte, 2002).

Halophile Enzyme unterscheiden sich strukturell von anderen Enzymen. Sie enthalten zusätzliche saure Aminosäure(AS)-Reste (Glutamat und Aspartat) auf ihrer Oberfläche, die stärker hydratisiert sind als andere AS-Reste (Frolow et al., 1996). Diese sauren Gruppen können die Organisation der hydratisierten Salzionen auf der Proteinoberfläche koordinieren und reduzieren die Protein-Hydrophobizität, was den strukturellen Zusammenbruch oder die Aggregation (Aussalzen) der Proteine verhindert (Elcock & McCammon, 1998; Eisenberg et al., 1992). Durch einen hohen Anteil an Serin und Threonin anstelle von unpolaren AS-Resten im Enzymkern wird ebenfalls die Hydrophobizität des Proteins herabgesetzt (Oren, 1999). Dies hat eine gewisse „Kälteempfindlichkeit" der Enzyme zur Folge, da die Struktur von Wasser bei niedrigen Temperaturen eine Interaktion mit hydrophoben Bindungen erleichtert und damit das Enzym destabilisiert (Kushner, 1978). Weiterhin können die sauren Reste auf der Proteinoberfläche strategisch günstige Salzbrücken zu basischen Resten bilden und damit dem Enzym eine nötige Starrheit verschaffen (Dym et al., 1995), was sich günstig bei erhöhten Temperaturen auswirkt. In Lösungen mit geringer Ionenstärke denaturieren halophile Enzyme häufig und entfalten sich aufgrund von Ladungsabstoßung (Dennis & Shimmin, 1997).

Potentielle Anwendungen halophiler Extremozyme fanden in der Vergangenheit weniger Beachtung als z.B. die Nutzung der proteinstabilisierenden Eigenschaften der kompatiblen Solute oder der lichtempfindlichen oder „bioelektrischen" Anwendungen des Bacteriorhodopsins (Datensicherung mithilfe permanenter optischer Bildspeicherung oder artifizielle Retinae für schnelle fotoelektrische Detektionen; Hampp, 2000). Beispiele für Extremozyme von Haloarchaeen mit kommerziellem Wert sind nach Eichler (2001) ein Restriktionsenzym mit ungewöhnlicher Spezifität einer Spezies der Gattung *Halococcus* (Obayashi et al., 1988) und eine Chymotrypsinogen-B-ähnliche Protease aus dem haloalkaliphilen *Natronomonas pharaonis* (Stan-Lotter et al., 1999). Eine extrazelluläre Protease von *Halobacterium halobium* (max. Aktivität bei 4 M NaCl) wurde erfolgreich in der Synthese von Glycin-enthaltenden Oligopeptiden eingesetzt, da das Enzym in 33% Dimethylformamid ein extrem hohes Verhältnis von Esterase/Amidase von 80/1 zeigte und damit eine Oligopeptid-Ausbeute von 70% ermöglichte (Ryu et al., 1994). Halophile Enzyme werden sich in Zukunft vermutlich als wichtige Biokatalysatoren in organischen Lösungsmitteln mit reduzierter Wasseraktivität etablieren (Marhuenda-Egea & Bonete, 2002; Sellek & Chaudhuri, 1999).

1.6.2 Alkaliphile Mikroorganismen

Es gibt, wie auch bei den Halophilen, keine präzise Definition für diese Organismen-Gruppe. Unter alkaliphilen Mikroorganismen versteht man allgemein solche, die optimal oder sehr gut bei pH-Werten von > 9, häufig zwischen 10 und 12, aber nicht (obligat alkaliphil) oder nur langsam im neutralen Bereich wachsen (fakultativ alkaliphil). Mikroorganismen, die im neutralen Bereich noch Wachstum zeigen und deren Wachstumsoptimum näher am neutralen Bereich liegt als oben beschrieben, werden als alkalitolerant bezeichnet (Krulwich, 1989, 1986). Man

unterscheidet die Alkaliphilen von den Haloalkaliphilen, da letztere zusätzlich noch einen hohen Salzgehalt in ihrer Umgebung benötigen (Horikoshi, 1999). Nach Kushner (1978) sowie Kitada und Horikoshi (1977) sind aber beide auf Na^+ zum Wachstum angewiesen, wie am Membrantransport bei *Bacillus* spp. und halophilen Organismen gezeigt wurde.

Alkaliphile können sowohl mit neutrophilen Mikroorganismen koexistieren als auch in spezifischen extremen Habitaten vorkommen (s. Kapitel 4.3). Daher zeigen sie eine weite Verbreitung in der Natur. Sie sind außerdem in der Lage, ihre Umgebung zu modulieren, indem sie neutrales Medium alkalisieren oder hochalkalisches Medium ansäuern und damit den pH für ihr Wachstum optimieren (Kumar & Takagi, 1999). Das Schlüsselmerkmal der Alkaliphilen ist ihre Fähigkeit, das neutralere Zellinnere gegen die alkalischere extrazelluläre Umgebung abzugrenzen und diesen Zustand aufrechtzuhalten. Tabelle 5 zeigt beispielhaft die intrazellulären pH-Werte eines alkaliphilen *Bacillus*-Stamms bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten.

Tab. 5: Intrazelluläre pH-Werte von intakten *B. halodurans*-C-125-Zellen bei verschiedenen extrazellulären pH-Werten (Quelle: Horikoshi, 1999).

Mikroorganismus	Extrazellulärer pH-Wert	Intrazellulärer pH-Wert
B. halodurans C-125 (intakte Zelle)	7,0	7,3
	7,5	7,4
	8,0	7,6
	8,5	7,8
	9,0	7,9
	9,5	8,1
	10,0	8,2
	10,5	8,4

Da der Protoplast von alkaliphilen *Bacillus*-Stämmen in alkalischem Milieu seine Stabilität verliert, wird vermutet, dass die Zellwand der Mikroorganismen eine entscheidende Rolle beim Schutz der Zelle vor alkalischer Umgebung spielt und nicht alkali-resistente intrazelluläre Enzyme ein Überleben sichern. Beim Vergleich von *Bacillus subtilis* mit alkaliphilen *Bacillus*-Arten fiel bei letzteren u.a. das Auftreten von sauren Polymeren in der Zellwand auf, die vermutlich Natrium-Kationen und Protonen binden und so Hydroxyd-Anionen „abfangen“ (Horikoshi, 1999).

Extrazelluläre Enzyme dieser Organismen sind im Gegensatz zu den nicht alkali-resistenten intrazellulären Enzymen in Medium mit hohem pH-Wert stabil und aktiv. Strukturelle Daten, die dies erklären, sind nach Hough und Danson (1999) aber bisher noch nicht bekannt.

Die erste Isolierung eines obligat alkaliphilen Organismus (*Bacillus alcalophilus*) aus Fäkalien von Mensch und Tier wurde 1934 von Vedder beschrieben. Mittlerweile sind weitere Isolate (hauptsächlich *Bacillus*-Arten) hinzugekommen, deren Enzyme teilweise erhebliche industrielle Bedeutung besitzen. Insbesondere der Einsatz der alkaliphilen Proteasen in Waschmitteln –

hier geht der Trend zu Enzymen, die auch bei niedrigen Waschtemperaturen noch hohe Aktivität zeigen, wie die Kannase® (Novozymes, Dänemark) bei 10 bis 20 °C (Gupta et al., 2002a) – , Xylanasen in der Zellstoff-Verarbeitung und eine CGTase in der Umwandlung von Stärke in Cyclodextrine sind wichtige Anwendungen (Kumar & Takagi, 1999).

1.7 Ziel und Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bereitstellung und Untersuchung neuer extrazellulärer Enzyme aus halophilen oder halotoleranten Bakterien. Dabei sollte durch das Verfahren des „hierarchischen Screenens“ (Demirjian et al., 1999) von Isolaten aus Meerwassersalinen ein Beitrag zur Entwicklung eines strategischen Konzepts zur Exploration des Meeres in Hinblick auf biotechnologisch wichtige Biomoleküle geleistet werden. Die Methode des hierarchischen Screenens basiert auf drei Ebenen: auf der ersten Ebene erfolgt durch die Verwendung eines möglichst unspezifischen Substrats der Ausschluss von Isolaten, die den gewünschten Enzymtyp nicht bilden. Die zweite Ebene umfasst die semiquantitative Untersuchung von Enzymeigenschaften, wodurch die Anzahl der weiterzubehandelnden Isolate stetig sinkt. Auf der dritten Ebene werden höchst quantitative Testverfahren genutzt, bei denen im Hinblick auf eine gewünschte biotechnologische Anwendung zum Ende hin das passendste Enzym ausgewählt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der ersten Ebene auf verschiedene extrazellulläre Enzyme mithilfe von Plattentests gescreened, um einen allgemeinen Überblick über die Produktion extrazellulärer Enzyme durch Halophile und Halotolerante zu erhalten und somit Informationen über die Ökologie der Standorte zu sammeln. Auf der zweiten Ebene erfolgte mit einer ausreichenden Anzahl an Enzymproduzenten eine Beschränkung der Untersuchungen auf physiologische und molekularbiologische Merkmale der Nucleasen als Schwerpunkt. Für eine vereinfachte labortechnische Aufreinigung von RNA-Präparationen sollte eine DNase mit hoher Toleranz gegenüber chaotropen Agenzien und breitem pH-Spektrum sowie geringer Affinität zu RNA gefunden werden. Vor der dritten Ebene des Screenens musste eine Nuclease durch Anreicherung und Isolierung in reiner Form vorliegen. Dieser Teilbereich wurde hier durch erste Untersuchungen angeschnitten. Reine Enzympräparate könnten dann im biotechnologischen Einsatzgebiet getestet und verglichen werden.

Das Probenmaterial für den Aufbau einer Stammsammlung sollte aus hypersalinen marinen Habitaten entnommen werden, um zwei Aspekten Rechnung zu tragen: Erstens steigt durch die Suche in extremen Lebensräumen die Wahrscheinlichkeit, Enzyme mit außergewöhnlichen Eigenschaften zu finden. Zweitens scheint nach Rodríguez-Valera (1988) allgemein zu gelten, dass hypersaline Böden von halophilen Spezies normaler Bodenbakterien besiedelt werden, während hypersaline Gewässer von halophilen Repräsentanten mariner Bakterien bewohnt werden, wobei thalassohaline Salinen höhere Bakteriendichten mit einer größeren Diversität beherbergen als athalassohaline Gewässer (Kushner, 1988). Marine Mikroorganismen stellen ein enormes Reservoir an kommerziell wertvollen Verbindungen dar; insofern werden diese

Gemeinschaften schon lange als eine wichtige Quelle für interessante neue Biomoleküle wie Enzyme gesehen und genutzt (Austin, 1988). Als Probenstandorte wurden daher überwiegend Meerwassersalinen gewählt.

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

2.1.1 Entnahme von Umweltproben auf Lanzarote, Spanien

Zwischen dem 03. und 05.12.1998 wurden auf Lanzarote (Kanarische Inseln, Spanien) 15 Sediment- und Wasserproben aus zwei Meerwassersalinen (Salinas de Janubio / kurz SJ und Salinas del Rio / kurz SR) und einem küstennahen See (El Golfo / kurz bezeichnet mit EG) in schwarze 25 ml-Kunststoffbehälter gefüllt und luftdicht verschlossen. Die Beprobung erfolgte durch Prof. Dr. M. G. Lorenz. Am Standort wurden die folgenden Parameter bestimmt: Uhrzeit der Probenentnahme, Luft- und Wassertemperatur mithilfe eines Temperaturfühlers sowie optische Merkmale des Probenmaterials. Zusätzlich wurden freundlicherweise zwei Proben aus den Salinas del Rio (bezeichnet mit BF und BP) von Herrn Prof. Dr. K.-H. Blotevogel zur Verfügung gestellt, die im Frühjahr 1998 gesammelt wurden. Alle Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei R.T. gelagert. Im Januar 1999 erfolgte die nachträgliche Bestimmung der pH-Werte und der Salinitäten (Handrefraktometer, Atago S-10, 0-10% NaCl, Japan) ebenfalls bei R.T.

2.1.2 Entnahme von Umweltproben bei La Baule, Frankreich

In den Meerwassersalinen zwischen La Baule und Guérande (Marais Salants, Pays de la Loire, Frankreich) erfolgte am 16. und 17.09.1999 die Entnahme von 12 Proben. Es wurde Sediment und darüber stehendes Wasser in durchsichtige 50 ml-Kunststoffröhrchen gefüllt, luftdicht verschlossen und 4 Tage später nach Lagerung bei R.T. weiterverarbeitet. Als Auswahlkriterium der Probenahmestandorte diente das Auftreten bestimmter Organismen als Hinweis auf unterschiedliche Salinitäten: Cyanobakterienmatten an Standorten mit mittlerer Salinität und eine Rotfärbung durch Mikroorganismen in hochsalinen Habitaten. Am Standort wurden der pH-Wert mit Universalindikator-Papier (pH 1-10, Merck), die Luft- und Wassertemperatur, die Uhrzeit der Probenahmen sowie die optischen Merkmale des Probenmaterials dokumentiert. Im Labor erfolgte die pH-Wert-Messung mittels pH-Meter, die Salinität wurde refraktometrisch bestimmt (s. 2.1.1).

2.1.3 Lebendkeimzahlbestimmung sowie Kultivierung und Hälterung der Organismen

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU $\cdot$ ml^{-1}) wurde durch Ausplattieren des unverdünnten sowie des mit NaCl-Lösung verdünnten Materials auf festen Medien bestimmt (Salinenmedium-Lanzarote, kurz SML und Halophilenmedium, kurz HM). Die NaCl-Konzentration der Verdünnungslösung entsprach dabei der jeweiligen Konzentration im festen Medium (6,12, 20, 25 und 30% w/v). Sedimentproben wurden 2 min kräftig per Hand geschüttelt und überstehendes Porenwasser ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für

5 Tage bis 5 Wochen im Lichtbrutschrank (Dauerlicht durch Warmlichtglühbirnen mit durchschnittlich 300 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$). Eine Kristallisation von Salzen trat häufig zuerst an den Bakterienkulturen auf, die diesen Prozess zu fördern schienen (die Bildung von Calciumcarbonaten oder anderen Kristallen konnte bei zahlreichen halophilen Mikroorganismen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden: Ventosa et al., 1998; Rivadeneyra et al., 1998; Ferrer et al., 1988), was die Entnahme von Zellmaterial von der Platte erschwerte. Die Petrischalen wurden daher während der Inkubation durch Verschließen mit Parafilm vor dem Austrocknen bewahrt, was die Kristallisation an den Kolonien ebenfalls verlangsamte. Kolonien mit unterschiedlicher morphologischer Erscheinung wurden auf Testmedien für den Nachweis von extrazellulären Enzymen (2.2.4) ausgestrichen und danach durch 3- bis 4-maliges Vereinzeln in Reinkultur gebracht. Im Falle der Lanzarote-Isolate wurden nur Enzymbildner vereinzelt. Das Ausstreichen des Zellmaterials erfolgte wie in den Plattentests mit einem Kartonstreifen, der eine feine Strichführung gewährleistete, so dass die Vereinzelung von bis zu 9 Isolaten auf einer Agar-Platte erfolgen konnte. Die Stämme wurden nochmals hinsichtlich der Bildung von extrazellulären Enzymen getestet, aerob in Flüssigkultur herangezogen (2 ml im Reagenzglasroller), dann 0,8 : 1 mit Glycerin (86 – 88%ig) verdünnt und bei -80 °C in zwei Parallelen in Eppendorfcaps eingefroren. Glycerin sollte die Bildung von Zellschäden durch das Einfrieren minimieren. Zur Reaktivierung der Isolate erfolgte das Ausstreichen von gefrorenem Material auf festen Nährböden mit anschließender Inkubation wie oben beschrieben.

Die Bezeichnung der Lanzarote-Isolate erfolgte nach folgendem Schema: Probenstandort (SJ1 bis SJ6, SR1 bis SR7 und EG1 und EG2), Sediment (S) / Überstandswasser (Ü) und Isolat-Nummer. Die Proben von Prof. Dr. Blotevogel, BF und BP, wurden nur mit einer laufenden Nummer versehen. Die Isolate aus La Baule erhielten das Kürzel des Probenstandortes (B1 bis B12) und ebenfalls eine laufende Nummer.

2.1.4 Gewinnung und Lagerung von Kulturüberständen

Die Konzentration von extrazellulären Enzymen ist in Flüssigkulturen aufgrund der Verdünnungseffekte meist geringer als in festen Medien. Um für eine Vorcharakterisierung der DNase-Aktivitäten mithilfe des *In-vitro*-DNase-Tests Lösungen mit hoher Enzym-Konzentration zu erhalten, wurden Kulturüberstände aus festen Nährböden gewonnen. Dazu wurden von den Flüssigvorkulturen der Isolate 5 µl-Tropfen auf verfestigtes SML pipettiert und nach dem Trocknen solange bei 30 °C inkubiert, bis auf entsprechenden Vergleichsplatten mit DNA-Methylgrün-Agar eine Enzymproduktion sichtbar wurde. Hierbei war zu beachten, dass das Wachstum vieler Stämme auf DNA-Methylgrün-Agar langsamer erfolgte als auf SML. Ausschlaggebend war also nicht die Inkubationszeit, sondern die Dichte der entstandenen Wuchsflecke. Die Wuchsflecke wurden dann mitsamt dem Nährboden mit einem Durchmesser von 1 cm ausgestochen. Durch Stufenzentrifugation (5 min bei 2.000 · g; 5 min bei 5.000 · g;

5 min bei 10.000 · g) wurde der flüssige Anteil vom Agar und den Zellen abgetrennt. Diese Überstände konnten bei -20°C ohne Zusätze mehrere Wochen gelagert werden, ohne ihre gesamte Enzym-Aktivität zu verlieren. Dies wurde getestet, indem die Kulturüberstände für einige Tage eingefroren, wieder aufgetaut, auf DNase-Aktivität hin getestet und wieder eingefroren wurden. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt und die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass der Vorgang des Auftauens und Wiedereinfrierens keine nennenswerten Aktivitätsverluste mit sich brachte, sofern keine Verdünnung der Kulturüberstände vor dem erneuten Einfrieren erfolgte. Erst durch eine Lagerung bei -20 °C über drei Monate konnte im Kulturüberstand der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 eine Aktivitätsabnahme um ca. 50% festgestellt werden. Für die Charakterisierung der extrazellulären Nucleasen der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 konnten daher – außer bei der Bestimmung der Enzymbildung in Abhängigkeit von der Kulturzeit – eingefrorene Kulturüberstände verwendet werden. Das Gefriergut war dabei nie älter als einen Monat.

Bei der Gewinnung von Kulturüberständen aus Flüssigkulturen war für die Versuche in Kapitel 3.3.3 lediglich die Abtrennung der Bakterienzellen vom Medium durch einfache Zentrifugation (5 min bei 5.000 · g) nötig.

Verdünnungen der Kulturüberstände wurden direkt vor dem *In-vitro*-DNase-/RNase-Test mit DNase-Puffer B (2.2.13) hergestellt. Diese Verdünnungen wurden nicht wieder eingefroren, sondern nach Gebrauch verworfen.

Für die Isolierung der extrazellulären DNase aus Stamm SJ1/4 wurde SML-Flüssigmedium (20% NaCl, pH 8,0) mit Zellmaterial des Stamms SJ1/4 von festen Nährböden beimpft, die bei 5 °C gelagert wurden. Die Inkubation des Mediums erfolgte in Erlenmeyerkolben, die zu max. 30% des Gefäßvolumens mit Flüssigkeit gefüllt wurden, für 4 bis 5 Tage bei 30°C im Wasserbad bei 90 bis 110 rpm. Die Inkubationszeit wurde anhand von Vorversuchen zur Enzymbildung in Abhängigkeit von der Zeit und der Zellbiomasse gewählt. Die „reife“ Flüssigkultur wurde bei 20.000 · g für 30 min bei 20 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend mithilfe von Celluloseacetat-Filtern sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm).

Für die Herstellung sehr großer Kulturüberstandsvolumina des Stamms SJ1/4 wurden 8 l Flüssigmedium in einem 10 l-Fermenter mit 100 ml Vorkultur beimpft, mithilfe eines Scheibenblattrührers gemischt (100 rpm) und mit 1 l Luft · min^{-1} begast. Die Sterilfiltration erfolgte wie in Kapitel 2.3.11 angegeben.

2.2 Medien, Lösungen und Puffer

2.2.1 Salinenmedium-Lanzarote (SML) (Sehgal & Gibbons, 1960, modifiziert)

Die Bestandteile des Mediums waren 7,5 g · l^{-1} Casaminosäuren (Difco), 10 g · l^{-1} Hefeextrakt (Difco), 11,6 mM tri-Natrium-Citrat, 0,13 mM $MgSO_4$, 0,05 mM $CaCl_2$, 28 mM KCl, 0,18 mM

$FeCl_2$, 10 mM Na_2HPO_4, 15 g · l^{-1} Bacto-agar (Difco; nur für feste Nährböden) und handelsübliches Speisesalz (6, 12, 20 oder 30%, w/v). Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH auf 8,0 eingestellt. Die Konzentrationen einiger Salze wurden an die Salzzusammensetzung eines Salinenbeckens – bestimmt durch Claes (1989) – angenähert und weichen daher vom Medium von Sehgal und Gibbons (2.2.2) ab. Für die Isolierung von Mikroorganismen bei pH 9,5 wurde das Medium zusätzlich mit 75 mM Glycin gepuffert. Um ein Ausfallen der Salze beim Autoklavieren zu vermeiden, wurde das Speisesalz trocken für 2 h bei 180 °C sterilisiert und $MgSO_4$, $CaCl_2$, KCl und $FeCl_2$ separat in Aqua bidest. gelöst, autoklaviert und erst dann mit den anderen sterilen Komponenten vereinigt. Die Lagerung von festen Medien erfolgte bei 4 °C, von Flüssigmedien bei R.T.

2.2.2 Halophilenmedium (HM) (Sehgal & Gibbons, 1960)

Die Bestandteile des Mediums sind 7,5 g · l^{-1} Casaminosäuren (Difco), 10 g · l^{-1} Hefeextrakt (Difco), 3 g · l^{-1} tri-Natrium-Citrat, 20 g · l^{-1} $MgSO_4$ · $7H_2O$, 2 g · l^{-1} KCl, 0,023 g · l^{-1} $FeCl_2$, 15 g · l^{-1} Bacto-agar (Difco) (nur für feste Nährböden) und 250 g · l^{-1} NaCl. Der pH-Wert wurde mit 2 M NaOH auf 7,4 eingestellt. NaCl wurde trocken für 2 h bei 180 °C sterilisiert und $FeCl_2$ separat in Aqua bidest. gelöst, autoklaviert und erst dann mit den anderen sterilen Komponenten vereinigt.

2.2.3 TBY + Ap100

TBY-Medium setzt sich wie folgt zusammen: 10 g · l^{-1} Trypton (Difco), 5 g · l^{-1} Hefeextrakt (Difco), 5 g · l^{-1} NaCl, 15 g · l^{-1} Bacto-agar (Difco). Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf 7,5 mit 2 M NaOH eingestellt. Ampicillin wird als 100fach konzentrierte wässrige Stammlösung nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben, so dass die Endkonzentration 100 µg · ml^{-1} beträgt (Ap100).

2.2.4 Feste Medien für den Nachweis von extrazellulären Enzymen

Die folgende Abbildung 6 zeigt Testplatten der verschiedenen Medien, auf denen die Lanzarote-Stämme – parallel zur Isolation – hinsichtlich der Produktion von extrazellulären Enzymen getestet wurden. Dazu wurde Material von einer Bakterienkolonie mit einem Kartonstreifen (1 x 15 cm) seriell auf den Medien in folgender Abfolge ausgestrichen: für die Lanzarote-Isolate DNA-Methylgrün-Agar, RNA-Agar, Calcium-Caseinat-Agar und Stammplatte (Kontrolle, ob auf die vorangegangenen Platten genügend Zellmaterial aufgebracht wurde) und – für die La Baule-Isolate – DNA-Methylgrün-Agar, RNA-Agar, Calcium-Caseinat-Agar, Tween-20-Agar, Stärke-Agar und Stammplatte. Pro Platte, und damit pro Testreihe, wurden 47 Stämme gleichzeitig getestet.

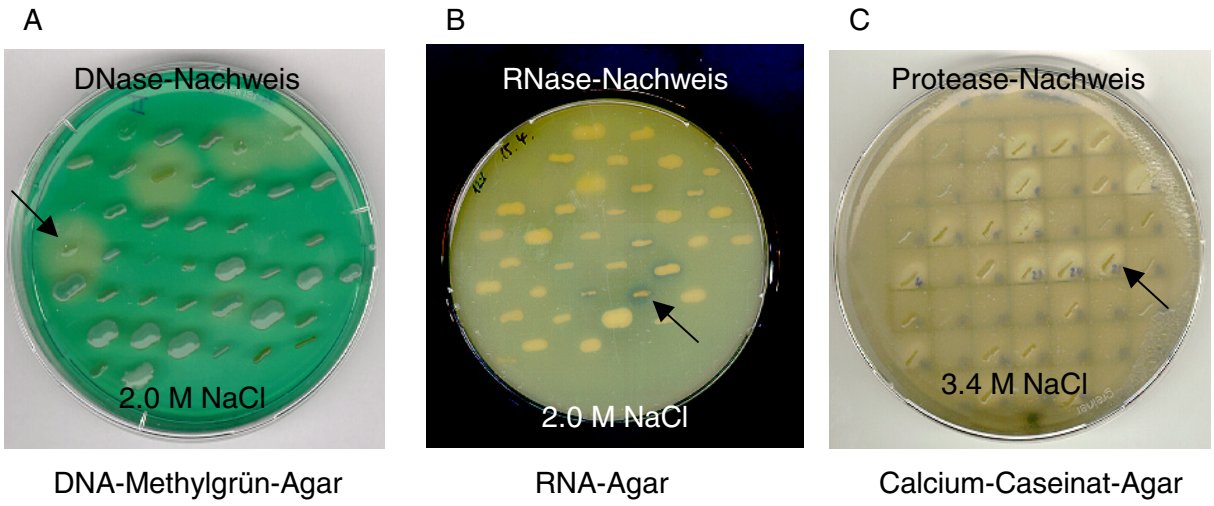

Abb. 6: Beispielplatten für drei Plattentests zum Nachweis der Produktion von extrazellulären Enzymen. A: DNA-Methylgrün-Medium (hier mit 12% NaCl); positive Stämme konnten anhand der Bildung eines hellgelblichen Hofs identifiziert werden. B: RNA-Agar (ebenfalls mit 12% NaCl) wurde nach ausreichendem Wachstum der Stämme mit 10%iger HCl-Lsg. überschichtet, wodurch die RNA-Hydrolyse-Höfe als klare Zonen sichtbar wurden. C: Calcium-Caseinat-Agar (hier mit 20% NaCl); bereits während des Wachstums wurden Hydrolyse-Höfe erkennbar. Beispiele für Isolate mit Enzymaktivität wurden mit einem Pfeil markiert.

2.2.4.1 DNase-Nachweis auf DNA-Methylgrün-Agar (Smith et al., 1969, modifiziert)

Zusätzlich zu den Komponenten des SML enthielt dieses Medium 0,5 g · l^{-1} Lachsspermien-DNA (ICN Biochemicals), 50 mg · l^{-1} Methylgrün (ICN Biochemicals) und 0,1 M Tris Base. Die DNA wurde dazu über Nacht in Aqua bidest. (10% des Ausgangsvolumens) mit einem Tropfen Chloroform zur Konservierung bei 4 °C gelöst und danach in das auf ca. 50 °C abgekühlte autoklavierte SML gegeben. Methylgrün wurde anschließend als 100fach konzentrierte Lösung in 70% Ethanol dem Medium zugesetzt. Eine DNase-Produktion lässt sich anhand der Bildung einer durchsichtig-gelben Halo um die bewachsenen Stellen erkennen.

2.2.4.2 RNase-Nachweis auf RNA-Agar (Smibert & Krieg, 1981, modifiziert)

Das SML enthielt hier zusätzlich 2,5 g · l^{-1} RNA (TYP VI, Torula Yeast, Sigma). Die RNA wurde zusammen mit den anderen C-Quellen des Mediums autoklaviert. Eine Enzymaktivität wird nach dem Überschichten der bewachsenen Agar-Platte mit 10%iger HCl-Lösung ermittelt. Stellen mit hydrolysierter RNA erscheinen als klare Zonen.

2.2.4.3 Protease-Nachweis auf Calcium-Caseinat-Agar (Frazier & Rupp, 1928 und Brandt, 1939, modifiziert)

Es wurden 3 g · l^{-1} Fleischextrakt, 5 g · l^{-1} Pepton aus Fleisch, 2,5 g · l^{-1} Casein und 0,15 g · l^{-1} $Ca(OH)_2$ in Aqua bidest. suspendiert, 30 min darin eingeweicht und im anfangs kalten Wasserbad (R.T.) langsam zum Kochen gebracht. Die Lösung wurde durch ein Papierfilter (Faltenfilter, 185 mm Durchmesser, Spezialpapier FILTRAK GmbH) filtriert. Es wurde mit 2 M NaOH ein pH-Wert von 8 bzw. 9,5 eingestellt. Nach der Zugabe von 13,5 g · l^{-1} Bacto-agar (Difco) wurde das Medium nochmals aufgekocht. Vor dem Erstarren erfolgte die Zugabe der separat sterilisierten Salze: $MgSO_4$, KCl, Na_2HPO_4 sowie Speisesalz, jeweils mit den

Konzentrationen wie im SML. Casein-Hydrolyse kann anhand von klaren Zonen um die bewachsenen Stellen festgestellt werden.

2.2.4.4 Esterase-Nachweis auf Tween-20-Agar (Smibert & Krieg, 1981, modifiziert)

Das SML enthielt zusätzlich zum schon vorhandenen Calcium 100 mg · l^{-1} $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ und 1% (v/v) Polyethoxysorbitanlaureat (Tween 20), das separat autoklaviert wurde und nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben und gut gemischt wurde. Esterase-Aktivität wird anhand der Synthese von Ca-Seifen erkennbar, die als kristalline Höfe um die bewachsenen Stellen sichtbar werden.

2.2.4.5 Lipase-Nachweis auf Olivenöl-Rhodamin-B-Agar (Kouker & Jaeger, 1987, modifiziert)

Dem SML wurden nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C 2,5% (w/v) unsteriles Olivenöl (handelsübliches Speiseöl) und 0,001% (w/v) Rhodamin B (als wässrige Stammlösung mit 1 mg · ml^{-1}) zugesetzt. Das Medium wurde 1 min mit einem Ultra-Turrax Homogenisator (Janke & Kunkel KG, Staufen, Deutschland) vermischt, 10 min ruhen gelassen und dann in Petri-Schalen gegossen. Lipase-Aktivität kann anhand der Bildung von Ca-Seifen wie im Esterase-Test in Kapitel 2.2.4.4 beobachtet werden. Ein weiterer Nachweis ist bei einer Anregung mit UV-Strahlung der Wellenlänge 366 nm anhand der Fluoreszenz des freiwerdenden und sich im Wasser lösenden Rhodamin B möglich (s. Abb. 7).

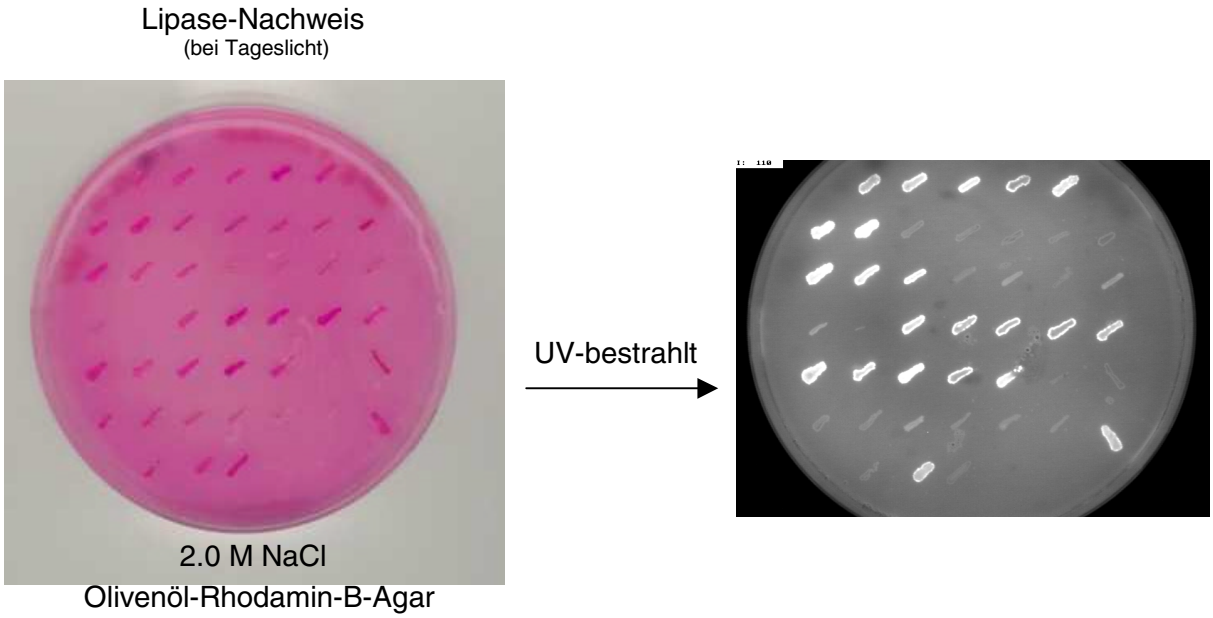

Abb. 7: Beispiel einer Olivenöl-Rhodamin-B-Agar-Testplatte mit 12% NaCl bei Tageslicht (links) und bei UV-Bestrahlung (rechts). Stämme mit extrazellulärer Lipase zeigen unter UV-Bestrahlung fluoreszierende Höfe.

2.2.4.6 Amylase-Nachweis auf Stärke-Agar (Smibert & Krieg, 1981)

Dem SML wurden vor dem Autoklavieren 0,2% (w/v) lösliche Stärke zugesetzt. Stärke-Hydrolyse kann nach dem Überschichten des festen Mediums mit Lugolscher-Lösung (2.2.18) nachgewiesen werden. Stärke färbt sich dunkel violett, stärkefreie Bereiche bleiben ungefärbt durchsichtig.

2.2.5 TBE-Puffer

Der Puffer enthält 90 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Base, 90 mM Borsäure und 4 mM Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA). Es stellt sich ein pH-Wert von 8,3 ein. Der Puffer ist als 10fach konzentrierte Stammlösung mehrere Monate bei R.T. lagerfähig.

2.2.6 TBEE-Puffer

Bei diesem Puffer handelt es sich um TBE-Puffer, dem 0,25 mg · l^{-1} Ethidiumbromid zur Anfärbung von Nucleinsäuren zugesetzt wurden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln für max. 2 Monate.

2.2.7 TE-Puffer

Der Puffer enthält 10 mM Tris/HCl und 1 mM EDTA. Der pH-Wert beträgt 8,0. Autoklaviert kann der Puffer mehrere Monate bei R.T. gelagert werden.

2.2.8 Puffer für die pBluescript(pB)-Isolierung (Macherey-Nagel, Nucleobond AX Anwendungsprotokoll, 1998)

Die folgenden Puffer wurden anfangs original vom Hersteller verwendet und später selbst hergestellt.

Tab. 6: Bezeichnungen der für die pB-Isolierung verwendeten Puffer, ihre Zusammensetzung und pH-Werte sowie ihre Lagerung.

Puffer-bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert	Lagerung
S1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A · ml^{-1}	8,0	4 °C
S2	200 mM NaOH, 1% SDS	n.e.	R.T.
S3	2,8 M K-Acetat (KAc)	5,1	R.T.
N2	100 mM Tris/H_3PO_4, 15% EtOH, 900 mM KCl	6,3	R.T.
N3	100 mM Tris/ H_3PO_4, 15% EtOH, 1150 mM KCl	6,3	R.T.
N5	100 mM Tris/ H_3PO_4, 15% EtOH, 1000 mM KCl	8,5	R.T.

n.e. = nicht eingestellt

2.2.9 Tris-Glycin-Laufpuffer

Der Puffer setzt sich aus 25 mM Tris Base und 192 mM Glycin zusammen. Er wurde in 10fach konzentrierter Form hergestellt und bei R.T. gelagert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit rauchender HCl auf 8,3 eingestellt.

2.2.10 Tris-Glycin-Probenpuffer (nativ)

Durch diesen Puffer soll eine Endkonzentration in den Proben von 100 mM Tris/HCl (pH 8,6), 10% Glycerin und 0,0025% Bromphenolblau erreicht werden. Um ein möglichst großes Probenvolumen auf das Gel laden zu können, wurde der Probenpuffer 6fach konzentriert angesetzt (statt 2fach wie von Invitrogen vorgeschlagen, Katalog 2001, Seite 337). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.11 NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen)

Dieser Puffer wurde in 20fach konzentrierter Form erworben und setzt sich wie folgt zusammen: 1 M 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 1 M Tris Base, 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) und 20 mM EDTA. Der pH-Wert beträgt 7,7. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.12 Reduzierender SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970)

100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau und 20% Glycerin werden angesetzt und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch werden 200 mM threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (Dithiothreitol, DTT) auf Eis zugegeben. Drei Teile aufzutrennende Probe wurde mit einem Teil dieses Puffers (entgegen der Angaben bei Laemmli, wo gleiche Teile gemischt werden) vor der Elektrophorese verdünnt. Der Pufferanteil wurde wegen der geringen Proteinkonzentration der Proben so gering gewählt.

2.2.13 DNase-Puffer

Der Puffer A enthielt 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 40 mM $CaCl_2$ und 40 mM $MgCl_2$ und NaCl (im Einzelnen angegeben). Puffer B enthielt 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 15 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ sowie NaCl wie angegeben. Beide Puffer wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.14 Lösungen für die Silbernitrat-Färbung (PAGE)

Fixierer A: Eisessig, Methanol und Aqua bidest. im Volumen-Verhältnis 1 : 5 : 4

Fixierer B: Eisessig, Methanol und Aqua bidest. im Volumen-Verhältnis 5 : 7 : 88

Fixierer C: 10%ige wässrige Glutardialdehyd-Lsg.

Entwickler: 3% Na_2CO_3 und 0,0185% Formaldehyd in wässriger Lsg.

Alle Lösungen für die Färbung wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.15 DNA-Agarose für die Polyacrylamidgel-Überschichtung

Es wurden 0,5 M NaCl, 0,02 M $CaCl_2$, 0,02 M $MgCl_2$, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) und 1 M KCl in Aqua bidest. gelöst. In 10% des Puffers wurden 5 mg Lachsspermien-DNA · ml^{-1} Puffer unter Zugabe eines Tropfens Chloroform über mehrere Stunden gelöst. Der restliche Puffer wurde mit 0,8% Agarose aufgekocht, auf 50 °C abgekühlt und die DNA-Lösung zugegeben. Es wurde

vorsichtig gemischt, um Blasenbildung zu vermeiden. Dann wurde das Polyacrylamidgel mit der DNA-Agarose 1-2 mm dick überschichtet.

Bei dem Zusatz von Methylgrün (50 mg · l^{-1}) wurde wie in Kapitel 2.2.4.1 verfahren. Toluidinblau O (Sigma-Aldrich, 100 mg · l^{-1}) wurde zusammen mit der Agarose aufgekocht.

2.2.16 Slotmarker für die Agarosegel-Elektrophorese

Für eine 6fach konzentrierte Lsg. wurden 2,5 mg · ml^{-1} Bromphenolblau, 100 mM Tris-Base, 100 mM EDTA, 120 mM NaCl und 50% Glycerin in Aqua bidest. gelöst und mit 2 M HCl auf pH 8,0 eingestellt. Der Marker war mehrere Monate bei 4 °C haltbar.

2.2.17 Bradford-Reagenz (Bradford, 1976)

Das Bradford-Reagenz setzt sich wie folgt zusammen: 40 mg Serva-Blau G-250, 50 ml EtOH (absolut) und 100 ml ortho-Phosphorsäure (85%) werden mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und 3 mal durch Papierfilter (Faltenfilter, 185 mm Durchmesser, Spezialpapier FILTRAK GmbH) filtriert. Die Haltbarkeit beträgt im Dunkeln bei 4 °C bis zu 6 Monate.

2.2.18 Lugolsche Lösung

Dies ist eine wässrige 1%ige Iod-Kaliumiodid-Lösung (I:KI 1:2, pH ~ 3,5) mit tiefrotbrauner Farbe. Die Lösung ist lichtgeschützt bei R.T. ca. ein Jahr haltbar. Durch Anlagerung der Iodmoleküle an die Iodanionen bilden sich Triiodid und höhere Polyiodide als lockere Additionsverbindungen. Aus den Polyiodiden wird das Iod leicht wieder abgegeben und lagert sich bei Anwesenheit von Stärke als lineare Polyiodidketten in die kanalartigen Hohlräume der schraubenförmig aufgewickelten Polysaccharidketten ein. Diese Einschlussverbindung führt zu einer blau-schwarzen Färbung des Gemisches (Bast, 2001).

2.2.19 Mobile Phase in der Anionenbestimmung mittels HPLC

Das Laufmittel setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 1,5 mM Phthalsäure, 1,38 mM Tris Base und 0,3 M Borsäure. Die Lösung hat einen pH-Wert von 4,0 und wird durch Cellulose-Nitrat-Filter sterilfiltriert (Porengröße 0,1 µm).

2.2.20 Standard in der Anionenbestimmung mittels HPLC

Für den Standard wurden folgende Salze eingewogen und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt (jeweilige Anionenkonzentration: 100 mg · l^{-1}): 165 mg NaCl, 148 mg Na_2SO_4, 137 mg $NaNO_3$, 177 mg Na_2CO_3 und 150 mg $NaNO_2$. Diese Stammlösung wurde 1:10 und 1:100 verdünnt und, wie unter 2.3.2 angegeben, injiziert. Die gemittelten Flächen unter den Peaks (Area) der Standards im Chromatogramm wurden mit denen aus den Salinenproben verglichen und die Anionenkonzentrationen berechnet. Die Retentionszeiten waren unter den gegebenen Bedingungen folgende: Cl^- 3,17 min, NO_2^- 4,02 min, NO_3^- 5,91 min, SO_4^{2-} 8,55 min, CO_3^{2-} 25,80 min.

2.2.21 Lösungen für die Gram-Färbung

Es wurden in 96%igem EtOH gesättigte Farbstofflösungen von Kristallviolett C.I. 42555 (Serva, 15 g · 100 ml^{-1}) und Safranin T (Fluka, 4 g · 100 ml^{-1}) angesetzt und letztere vor Gebrauch 1:10 mit A. dest. verdünnt.

2.3 Methoden

2.3.1 Trockenmassebestimmung der Lanzarote-Proben

Die Trockenmasse wurde durch Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Das Volumen der frischen Proben betrug durchschnittlich 1,5 ml. Die Trocknung wurde in Kunststoffreaktionsgefäßen vorgenommen. Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung erfolgte das Abkühlen der Proben auf R.T. vor den Wägungen in einem Exsiccator mit Silicagel.

2.3.2 Anionenbestimmung der Lanzarote-Proben durch HPLC (Rethmeier et al., 1997)

Die Proben wurden 1:2.000 mit Aqua bidest. verdünnt und 10 min bei 10.000 · g zentrifugiert, um ein Verstopfen der Säule durch Partikel zu verhindern. Es wurden jeweils 50 µl in die HPLC injiziert (Rheodyne valve), wobei das Probenschlaufenvolumen 25 µl betrug. Die Probenbestandteile wurden auf einer Polypher-IC-AN-1-Anionenaustauscher-Säule (Merck, mit entsprechender Vorsäule) aufgetrennt und über einen Merck-Hitachi-L-4250-UV-Vis-Detektor bei 254 nm (indirekt) nachgewiesen. Die Säule wurde dazu durch einen L-7350-LaChrom-Säulen-Ofen (Merck) auf 35 °C erwärmt und die mobile Phase (2.2.19) mit einer Flussrate von 1,3 ml · min^{-1} mithilfe einer L-6220-Intelligent-Pump (Merck) durch die Apparatur geleitet. Die Auswertung der Daten erfolgte über einen Chromato-Integrator-D-2500 (Merck).

2.3.3 Lichtmikroskopie

Reinkulturen der Isolate wurden mit einem Zeiss-Lichtmikroskop (Axiolab, Zeiss) im positiven Phasenkontrast mikroskopiert. Gram-Färbungen wurden im Hellfeld ausgewertet.

2.3.4 Gesamtzellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahl von Flüssigkulturen wurde in einer Thoma-Zählkammer (0,02 mm Tiefe, Kleinquadrat = 0,0025 mm^2) bestimmt. Die Kulturen wurden mit NaCl-Lösung angepasster Konzentration so verdünnt, dass 30 bis 60 Zellen pro Großquadrat gezählt werden konnten. Es wurde der Mittelwert aus 10 ausgezählten Großquadraten für die anschließende Berechnung der Zellzahl pro ml gebildet, die nach folgender Formel erfolgte:

$$N \cdot ml^{-1} = \text{Zellen im Großquadrat} \cdot 0{,}125 \cdot 10^7$$

Bewegliche Zellen wurden vor der Auszählung mit Formaldehyd (Endkonzentration 2%, v/v) fixiert.

2.3.5 Gram-Färbung und Schnelltest auf L-Alanin-Aminopeptidase (Merck)

Für die Gram-Färbung nach Bast (2001) wurden Bakterien auf einem Objektträger hitzefixiert und mit dem kationischen Farbstoff Kristallviolett (2.2.21) für 1 min angefärbt. Die Kristallviolettlösung wurde mit Lugolscher-Lösung (2.2.18) abgespült und das Zellmaterial mit frischer Lugolscher-Lösung ebenfalls 1 min überschichtet. Mit 96%igem EtOH wurde der Objektträger solange zügig tropfenweise gespült bis keine Farbwolken mehr entstanden. Danach wurde für wenige Sekunden mit A. dest. gespült und anschließend für 1 min mit Safraninlösung (2.2.21) gegengefärbt. Überschüssiges Safranin wurde mit A. dest. entfernt. Die Objekte wurden bei 1.000facher Vergrößerung im Hellfeld mikroskopiert (Öl, Deckglas, Öl).

Da einige Isolate nach der Gram-Färbung keine intakten Zellen mehr aufwiesen, wurde der Schnelltest auf L-Alanin-Aminopeptidase durchgeführt. Dieser Test erfolgte nach Angaben des Herstellers mithilfe von Teststreifen (Bactident Aminopeptidase 13301), die L-Alanin-4-nitroanilid enthalten. Dieses Substrat wird von der L-Alanin-Aminopeptidase in Alanin und das gelb gefärbte 4-Nitroanilin gespalten. Ein positives Ergebnis weist auf ein Gram-negatives Bakterium hin (Süßmuth et al., 1999).

2.3.6 16S-rRNA-Gen-Partialsequenzanalyse

Die Extraktion der genomischen DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN® Genomic-tip 100/G (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Handbuchs (September 1997) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Es wurde der Titer der Bakterienkulturen, bestimmt durch Zählung in einer Thoma-Kammer (Kapitel 2.3.4), auf etwa $2 \cdot 10^{10}$ Zellen $\cdot$ ml^{-1} eingestellt. Die Kulturen wurden bei 5.000 $\cdot$ g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Zellsediment bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in 3,5 ml Puffer B1 und 70 µl einer RNase-A-Stammlösung (10 mg RNase-A, Serva, mit 88 U $\cdot$ mg^{-1}, wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst, 10 min bei 100°C gekocht und in 50% Glycerin bei -18°C gelagert). Nach Zugabe von 80 µl Lysozym-Lösung (100 mg $\cdot$ ml^{-1}; Fluka) und 100 µl Proteinase-K-Lösung (33,3 U $\cdot$ mg^{-1}; Amresco, Ohio, USA) wurde der Ansatz kurz geschüttelt und bei 37°C für wenigstens 30 min inkubiert. Die Denaturierung der Proteine mit Puffer B2, die Reinigung der DNA über die DEAE-Säule (Qiagen, Hilden) sowie deren vorherige Äquilibrierung erfolgten nach Herstellerangaben (Handbuch September 1997, Qiagen). Das DNA-enthaltene Eluat wurde in einem Reagenzglas aufgefangen und die DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und gutem Mischen präzipitiert. Die fädige DNA wurde mithilfe eines Glashakens aus der Lösung herausgezogen und in eiskaltem 70%igen Ethanol zur Entsalzung und Entfernung des Isopropanols sowie zu ihrer vollständigen Dehydrierung gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die DNA in 0,5 ml Puffer gelöst (0,015 M NaCl und 0,0015 M Natriumcitrat) und bei 18°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Für die Amplifikation der 16S rDNA wurden etwa 25-30 ng genomische DNA mit je 0,4 µM PCR-Primer (s.u.), 200 µM dNTP-Mix, 4 µl BSA (2 mg · ml^{-1}), 2 mM $MgCl_2$, 5 µl 10fach REDTaq PCR Reaktionspuffer (Sigma-Aldrich) und Aqua bidest. ad 50 µl Endvolumen versetzt. Für die Anfangssequenz wurde der Primer Rn1 (GCTCAGATTGAACGCTGGCG) und für die Endsequenz der Primer U2 (ACATTTCACAACACGAGCTG) entsprechend der Positionen 22 bis 41 bzw. 1085 bis 1066 im *E. coli* 16S-rRNA-Gen verwendet (Position: Brosius et al., 1978; Sequenz: Tichy & Simon, 1994). Der Ansatz wurde durch Überschichtung mit Paraffinöl vor dem Verdunsten geschützt und erst nach dem Hot-Start (95°C für 5 min und einer Abkühlung auf 85 °C) erfolgte die Zugaben von 2 U Taq-Polymerase (REDTaq™, Sigma-Aldrich). Als Blindprobe wurde eine Negativkontrolle ohne DNA eingesetzt. Die PCR erfolgte in 30 gleichartigen Temperaturzyklen in einem Biometra Personal Cycler™. Ein Zyklus bestand aus Denaturierung (93 °C für 30 sec), einer Primer-Anlagerung (Annealing, bei 52 °C für 30 sec) und einer Kettenverlängerung (72 °C für 60 sec). Nach Beendigung der 30 Zyklen folgte eine Schlusspolymerisierung für 5 min bei 72°C mit anschließender Abkühlung auf R.T.

Die Kontrolle der Ergebnisse der PCR erfolgte durch optischen Vergleich von 5 µl Amplifikat mit 5 µl GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix (0,1 mg DNA · ml^{-1}; MBI Fermentas) in einer Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.3.8; das 16S-rRNA-Gen-Amplifikat sollte bei ca. 1 kb eine kräftige Bande aufweisen).

Die Sequenzierung wurde von Dr. J. Küver durchgeführt. Der Datenvergleich erfolgte mithilfe der über NCBI/megablast zugänglichen Datenbanken (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.3.7 *In-vitro*-DNase/RNase-Test und Definition der DNase-Unit

Eine präzisere und empfindlichere Methode zum Nachweis von DNA/RNA-Abbau als der oben beschriebene Plattentest mit DNA-Methylgrün- bzw. RNA-Agar ist die Quantifizierung des Abbaus von DNA oder RNA im Kulturüberstand von Flüssigkulturen. Dieser Test wird im Folgenden als *In-vitro*-DNase- bzw. -RNase-Test bezeichnet. Wenn nicht anders angegeben, waren die Testbedingungen wie folgt: Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und enthielt:

- 70 ng linearisiertes pB (2.3.7.1) für den DNase-Test bzw. 3,6 µg RNA (Typ VI, Torula Yeast, Sigma) für den RNase-Test
- 20 mM Tris/HCl (pH 8,0), 15 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$
- NaCl bzw. KCl nach Bedarf (max. 4,9 bzw. 4,1 M)
- 200 µg · ml^{-1} BSA (acetyliert, Promega)
- 2 µl Kulturüberstand bzw. Verdünnungen davon.

Die Ansätze wurden für den DNase-Nachweis 30 min und für den RNase-Nachweis 300 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Spot-Marker (2.2.16) gestoppt und die Ansätze bis zur Auftragung auf die Agarosegele bei -40 °C eingefroren.

Eine DNase-Unit wurde als die Enzymmenge definiert, die 10^9 Plasmide (pB, linearisiert) innerhalb von 30 min bei 30 °C abbaut. Diese Unitdefinition lehnt sich an Ahrenholtz und Mitarbeiter (1994b) an. Der DNA-Abbau wurde durch das Verschwinden der entsprechenden Bande im Agarosegel verfolgt.

Beim Vergleich der DNase-Aktivität in verdünnten Kulturüberständen wurde festgestellt, dass die Aktivität bei Verwendung von gleichmolarer NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel höher war als bei Verwendung von Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM $CaCl_2$, 15 mM $MgCl_2$); abhängig von der Höhe der Verdünnungen wurde wenigstens vergleichbare Aktivität erreicht. Wie sich im Laufe der weiteren Untersuchungen herausstellte, lässt sich dieser Umstand dadurch erklären, dass die Stabilität einiger Enzyme vom Vorhandensein von NaCl oder KCl abhing. Bei sehr starker Verdünnung mit Reaktionspuffer, der weder NaCl noch KCl enthielt, kam es daher vermutlich zu einem Verlust der Stabilität und/oder Aktivität der Enzyme. Deshalb wurde in den Vorversuchen noch NaCl-Lsg. für Verdünnungsschritte verwendet, da hier aufgrund der Gewinnung der Kulturüberstände aus festen Medien höhere Enzymkonzentrationen erreicht wurden und höhere Verdünnungen angesetzt werden mussten. Erst in den Hauptversuchen (s. Kapitel 3.3.3) wurde auf Pufferlösung umgestiegen. Wenn nicht anders angegeben, wurden Enzym-Konzentrationen von 5 bis 80 U pro Ansatz eingesetzt.

2.3.7.1 Plasmid-Vermehrung und -Reinigung

pB wurde aus dem Stamm *E. coli* XL10 pBII SK+ gewonnen (der Stamm wurde freundlicherweise von der Abteilung Molekularbiologie und Bioanalytik [Prof. Hildebrandt], UFT und FB2 der Universität Bremen zur Verfügung gestellt). Der Stamm wurde bei -80 °C gelagert und vor Gebrauch auf TBY + Ap100 (2.2.3) reaktiviert. Das Ap stellt sicher, dass nur die Bakterien aufwachsen, die noch ein Plasmid besitzen, da die Ap-Resistenz auf diesem lokalisiert ist. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers für die Nucleobond® AX100-Säulen (Anionen-Austauscher, Macherey-Nagel). Es wurde die Methode der modifizierten alkalischen SDS-Lyse nach Birnboim und Doly (1979) für die Aufreinigung der Plasmide verwendet, die folgende Arbeitsschritte enthielt: eine Säule wurde für zwei aufeinanderfolgende Aufreinigungen verwendet, wozu 2 mal 30 ml Bakterien-Übernachtkultur (aerob bei 30 °C in TBY + Ap100-Flüssigmedium, 120 rpm) hergestellt wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5.000 · g, 5 min, 4 °C) geerntet, in 4 ml S1-Puffer resuspendiert (Puffer s. Kapitel 2.2.8) und durch Zugabe von 4 ml S2-Puffer, leichtes Vermischen und Inkubation für 5 min bei R.T. aufgeschlossen. Die chromosomale DNA wurde durch Zugabe von 4 ml S3-Puffer präzipitiert. Dazu musste die Lösung sofort vorsichtig bis zur Homogenität gemischt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert werden. Ausgefallene Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15.000 · g, 30 min, 4 °C) abgetrennt und der Überstand auf eine mit 2 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule geladen. Die Säule wurde mit 2 mal 4 ml N3-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 4 ml N5-Puffer eluiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Vereinigung

der beiden Parallelansätze. Durch Zugabe von 5,6 ml Isopropanol (R.T.) wurde die DNA gefällt, durch Zentrifugation (15.000 · g, 30 min, 4 °C) vom Überstand abgetrennt und durch Zugabe von 2 ml Ethanol (70%ig, 4 °C) und nochmaliges Zentrifugieren für 30 min bei 15.000 · g und 4 °C gewaschen. Die DNA wurde in 200 µl TE-Puffer gelöst und nach Angaben der jeweiligen Hersteller (MBI Fermentas, Promega) mit *EcoR*I über Nacht restringiert. Dabei wurde von einer maximalen DNA-Ausbeute von 100 µg pro 30 ml Kulturvolumen ausgegangen. Nach der gelelektrophoretischen Konzentrationsbestimmung und Fragmentgrößenkontrolle gegen einen λ-*Hind*III-Standard wurde die DNA-Lösung bei 4 °C gelagert (Standard s. Tab. 7: 145 ng · 12 μl^{-1} mit *Hind*III restringierte DNA des Phagen λ, TaKaRa, Japan.) Zur Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene Verdünnungen der DNA-Probe neben dem Standard im Agarosegel aufgetrennt und die Leuchtintensität der Proben-Banden mit denen der λ-DNA-Fragmente verglichen (s. Abb. 8). Pro *In-vitro*-DNase-Testansatz wurden 70 ng pB eingesetzt, entsprechend 2,4 · 10^{10} Plasmide. pB besitzt eine Größe von 2.961 bp.

Tab. 7: DNA-Menge der Fragmente des λ-*Hind*III-Standards bei Einsatz von 145 ng · 12 μl^{-1} in Bezug zur Fragmentgröße (Produktinformation, TaKaRa, Japan).

λ-*Hind*III-Fragmente im Standard (145 ng) (λ-Genomgröße 48.377 bp)	
Fragmentgröße [bp]	[DNA] in ng
23.130	69
9.416	28
6.557	20
4.361	13
2.322	7
2.027	6
564	1,7

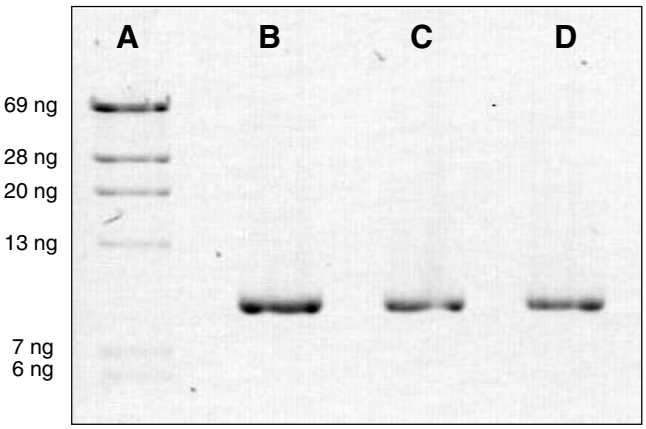

Abb. 8: DNA-Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines λ-*Hind*III-Standards (A) im Agarosegel (Negativ-Darstellung). Auf den Spuren B bis D wurden 1, 0,5 und 0,25 µl einer DNA-Lösung aufgetragen, deren Leuchtintensitäten mit dem Standard verglichen und damit die Konzentration der Ausgangslösung abgeschätzt. Diese DNA-Lösung enthielt ca. 100 ng DNA · μl^{-1}.

2.3.7.2 Bestimmung der pH-Toleranz der DNase-Aktivität

Es wurden im *In-vitro*-DNase-Test folgende Puffersysteme eingesetzt: Na_3-Citrat/HCl/NaOH (pH 3,8; 4,6; 8), NaAc/Essigsäure (pH 4,8; 5,1), Na_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 4,7; 5,1; 5,7; 6,7), Tris/HCl (pH 7,2; 8; 8,8); Glycin/NaOH (pH 8,6; 9,6; 10), Na-Borat/NaOH (pH 10), KCl/NaOH (pH 8,8; 12,1). Dazu wurden 10fach konzentrierte Stammpuffer hergestellt, indem von den Puffersubstanzen jeweils 0,5 M Lösungen angesetzt und in einem Verhältnis gemischt wurden, bis sich der gewünschte pH-Wert einstellte. Die Testansätze enthielten 50 mM Puffer. Die in Klammern angegebenen pH-Werte entsprachen den Bedingungen im Reaktionsansatz.

2.3.7.3 Effekt chaotroper Agenzien auf die DNase-Aktivität

Getestet wurde der Einfluss der Salze Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl) und Guanidin-Thiocyanat (GuSCN) und der Detergenzien SDS, Tween 20 und Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton X-100). Wie sich in Vorversuchen zeigte, bewirkte die Salzzugabe von GuHCl und GuSCN im Test eine Hemmung der Enzyme durch pH-Verschiebung. Daher wurden die Stammlösungen (7 M) auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Der pH-Wert der Reaktionsansätze mit den Detergenzien SDS, Tween 20 und Triton X-100 wurde nicht zusätzlich kontrolliert.

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität unter SDS-Einfluss wurde die Benzonase von Merck ebenfalls getestet, da über die Toleranz der Benzonase gegenüber SDS keine Firmendaten vorlagen. Dazu wurde eine Enzymlösung mit ≥ 90%iger Reinheit und einer Aktivität von ≥ 25 U · μl^{-1} eingesetzt. Eine Unit wurde in diesem Fall definiert als die Menge Enzym, die innerhalb von 30 min und bei 37 °C eine Absorptionsdifferenz von ΔA_{260} = 1,0 hervorruft. Die Bedingungen waren dabei: 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM $MgCl_2$, 100 µg · ml^{-1} BSA und 1 mg · ml^{-1} ultrabeschallte Lachsspermien-DNA. Die Absorption wurde nach Fällung mit Perchlorsäure bestimmt. Für den *In-vitro*-DNase-Test wurde die Benzonase 1:20.000 mit Lagerungs-Puffer (laut Hersteller) verdünnt und 2 µl pro Ansatz wurden eingesetzt (entsprechend ca. 16 U · μl^{-1} nach eigener Definition, Kapitel 2.3.7).

2.3.7.4 Bestimmung der Cofaktoren der DNasen

Um zu testen, ob Calcium oder Magnesium für die Degradation der DNA notwendig ist, wurde den *In-vitro*-DNase-Testansätzen 0,5 mM EDTA (zur Komplexierung von im Test nicht erwünschten zweiwertigen Kationen aus den Kulturüberständen) und ein Überschuss an $MgCl_2$ (15 mM) bzw. $CaCl_2$ (2 mM) zugesetzt.

2.3.7.5 Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die DNase-Aktivität

Die *In-vitro*-DNase-Testansätze wurden bei 5 °C pipettiert und dann bei verschiedenen Temperaturen (13 bis 60 °C) im Wasserbad für 30 min inkubiert.

2.3.8 Agarosegel-Elektrophorese und Dokumentierung

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen 0,8%igen Agarosegelen in TBE-Puffer bei 8 bis 10 V · cm^{-1} und R.T. Je mehr Salz die aufzutrennenden Proben enthielten, desto geringer wurde die anzulegende Spannung gewählt, um den sogenannten „Smile“ zu minimieren. Die Gele wurden in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg · l^{-1}) für 30 min nachgefärbt und nach Bestrahlung bei einer Wellenlänge von 366 nm auf einem UV-Transilluminator (Chroma 42, Vetter, Wiesloch) fotografiert. Die RNA-Auftrennung erfolgte wegen seiner geringeren Leuchtintensität bei 4 °C in TBEE-Puffer, da dies eine bessere Färbung gewährleistete (stärker gefärbte RNA bei geringerem Hintergrundleuchten der Gele). Das Nachfärben entfiel daher. Die Quantifizierung der Leuchtintensitäten der

Nucleinsäurebanden wurde durch die Auswertung mit der PC-Software E.A.S.Y. Win 32 (Herolab, Deutschland) unterstützt. Das Programm wandelt die Helligkeitswerte der Banden in relative Zahlenwerte als mittlere Intensitätshöhe (MIH) um.

2.3.9 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Die rote Anionenform des Triphenylfarbstoffs Serva-Blau G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) wechselt nach spezifischem Binden seiner SO_3-Gruppen an Proteine in einen blauen Farbstoff-Proteinkomplex; dieser Komplex kann photometrisch bei 595 nm bestimmt werden (Bradford, 1976). Diese Proteinbestimmung ist im Vergleich zu anderen Proteinbestimmungsmethoden ein sehr sensitives Verfahren, das auch geringe Proteinkonzentrationen erfasst.

Für die Gesamtzellprotein-Bestimmung wurden 200 µl Flüssigkultur – bzw. von festen Nährböden die Bakterienkolonie oder der Wuchsfleck – mit 1 ml NaOH (1 M) für 5 min bei 90 °C erhitzt, danach sofort auf Eis abgekühlt und das Lysat für 5 min bei 11.000 · g und R.T. zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (2.2.17) versetzt und nach 90 sec die Extinktion bei 595 nm in Quarzküvetten gegen 1 M NaOH gemessen. Zur Erstellung einer Proteineichgeraden mit 4 Messpunkten diente Rinderserumalbumin (10, 20, 50 und 100 µg BSA · ml^{-1}). Es ergab sich folgende Gleichung:

$$y\ [nm] = 0{,}0032 \times [\mu g \cdot ml^{-1}] + 0{,}0133 \qquad (R^2 = 0{,}9967)$$

Für die Proteinbestimmung in den Kulturüberständen wurde auf einen Aufschluss verzichtet und die zellfreie Probe lediglich auf eine NaOH-Konzentration von 1 M eingestellt (90 µl Probe + 10 µl 10 M NaOH). Für dieses Verfahren wurde ebenfalls eine Eichreihe mit 10, 30, 50 und 70 µg BSA · ml^{-1} aufgenommen, das auf 20% NaCl eingestellt wurde. Es ergab sich folgende Gleichung:

$$y\ [nm] = 0{,}0027 \times [\mu g \cdot ml^{-1}] + 0{,}0365 \qquad (R^2 = 0{,}9998).$$

2.3.10 Protein-Fällung

Es wurden Proteinfällungen mit den folgenden Substanzen durchgeführt: Ammoniumsulfat, Guanidin-HCl und Ethanol. Die Fällungen mit $(NH_4)_2SO_4$ und GuHCl erfolgten unter Rühren bei R.T. unter Vermeidung von Schaumbildung. Zwischen den Fällungsschritten wurde mit 20.000 · g für 20 min bei 20 °C zentrifugiert und die Pellets wurden, wenn nicht anders angegeben, in 100 bis 200 µl DNase-Puffer A (0,5 M NaCl) aufgenommen. Die Fällung mit EtOH erfolgte auf Eis und die Zentrifugation bei 4 °C.

2.3.11 Ultrafiltration

Kulturüberstände und Produkte der Enzymaufreinigung wurden mithilfe der Ultrafiltration eingeengt, um das Probenvolumen für die anschließende Weiterverarbeitung zu verringern. Dazu wurde für kleine Volumina eine 50 ml fassende Magnetrührzelle (Amicon) mit einer

Polyethersulfonmembran mit einer Ausschlussgröße von 10.000 Da (PM10, Diaflo, Amicon) bzw. 30.000 Da (PM30, Diaflo, Amicon) verwendet. Die Einengung der Lösungen, die mehrere Stunden dauerte, wurde bei 5 °C durchgeführt und die Rührzelle dabei mit einem Überdruck von 0,5-1 bar N_2 begast. Die Filtration von hochsalinen Lösungen ist allgemein sehr zeitaufwendig, da das Salz die Filter verstopft.

Für große Probenvolumina wurde eine Sartocon Slice Ultrafiltrationsanlage (Sartorius) mit 624S Schlauchpumpe (Watson Marlow) und Sartocon Slice Cassette (Sartorius) sowohl für die Sterilfiltration (0,45 µm Hydrosart) als auch für die Aufkonzentrierung (30 kDa Hydrosart) verwendet. 8 l Kulturüberstand wurden innerhalb von 1 h bei einem Maximaldruck von 2 bar bei R.T. auf ein Volumen von 200 ml eingeengt, was dem Totvolumen der Anlage entspricht und anschließend mit 1 l DNase-Puffer A (0,3 M NaCl) gewaschen. Dabei entstand eine sehr trübe Lösung, die vor der weiteren Verwendung des Retentats bei 20.000 · g für 30 min und 20 °C zentrifugiert wurde, um durch das Waschen ausgefallene Proteine und Salze zu entfernen.

2.3.12 Gelfiltration mit Sephadex G-200

Sephadex G-200 (Superfine, Pharmacia) wurde 3 Tage bei R.T. bzw. 5 h bei 90 °C in DNase-Puffer A (0,5 M NaCl) quellen gelassen, bevor es in einer LKB-Säule (Bromma, 1,6 x 66 cm) bei 5 °C gepackt wurde. Eluiert wurde ebenfalls mit DNase-Puffer A (0,5 M NaCl) bei 5 °C mithilfe der Schwerkraft. Nach einem Lauf wurde auf eine Regeneration der stationären Phase wegen der langen Laufzeiten verzichtet. Statt dessen wurde eine neue Säule mit frischem Ausgangsmaterial gepackt. Der relative Proteingehalt des Eluats wurde anschließend über die Extinktion bei 280 nm bestimmt.

2.3.13 Gelfiltration mit Sephadex G-75

Sephadex G-75 (Superfine, Pharmacia, Schweden) wurde über Nacht bei R.T. in DNase-Puffer A (0,3 M NaCl) quellen gelassen, bevor es in einer 1,6 x 50 cm Glassäule bei 5 °C gepackt wurde. Eluiert wurde ebenfalls mit DNase-Puffer A (0,3 M NaCl, 1 ml · 10 min^{-1}) bei 5 °C mithilfe der Schwerkraft. Der relative Proteingehalt des Eluats wurde anschließend über die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Eichung der Säule erfolgte mit Gelfiltrations-Molekulargewicht-Markern von Sigma-Aldrich mit den in der Tabelle 8 dargestellten Proteinmengen:

Tab. 8: Zur Eichung der Sephadex G-75-Säule verwendete Proteine, deren ungefähres Molekulargewicht und die eingesetzten Mengen.

Substanz	Ungefähres Molekulargewicht [kDa]	Eingesetzte Mengen
Aprotinin (Rinderlunge)	6,5	4,5 mg · 1,5 ml^{-1}
Cytochrom C (Pferdeherz)	12,4	2,4 mg · 1,5 ml^{-1}
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	29	3 mg · 1,5 ml^{-1}
Albumin (Rinderserum)	66	7,5 mg · 1,5 ml^{-1}
Blue Dextran	2000	1,5 mg · 1,5 ml^{-1}

Die Proteinstandards enthielten zum Beschweren 5% Glycerin.

2.3.14 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der Proteinfraktionen

2.3.14.1 Native PAGE

Es wurden Novex 12% Tris-Glycin-pre-cast-Gele (1,0 mm x 15 wells, Invitrogen) mit Tris-Glycin-Laufpuffer (2.2.9) verwendet. 10 µl Probe (unverdünnt oder mit Puffer verdünnt) wurden mit 2 µl Tris-Glycin-Probenpuffer (nativ, 6 x, 2.2.10) versetzt und auf das Gel geladen. Als Marker diente der SDS-beladene Mark 12® Unstained Standard von Invitrogen (2,5 bzw. 6 bis 200 kDa). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 14 $V \cdot cm^{-1}$ für ca. 2 h.

2.3.14.2 Denaturierende reduzierende PAGE (Laemmli, 1970)

Es wurden NuPAGE® 12% Bis-Tris-high-performance-pre-cast-Gele (1,0 mm x 15 wells) mit NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer von Invitrogen (2.2.11) verwendet. 9 µl Probe (unverdünnt oder mit H_2O verdünnt) wurden mit 3 µl Probenpuffer (2.2.12) versetzt und auf das Gel geladen. Als Marker diente ein SDS-PAGE Molecular Weight Standard für Silberfärbung, Low Range, Bio-Rad Laboratories (14,4 bis 97,4 kDa). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 10 $V \cdot cm^{-1}$ für ca. 1 ¾ h.

2.3.14.3 Silbernitrat-Färbung der Polyacrylamidgele

Da sich in Vorversuchen eine Coomasie-Blau-Färbung als zu wenig sensitiv erwies, wurde die Silbernitrat-Färbung (0,1%) nach Wiechmann (1999) durchgeführt. Alle Einzelschritte der Färbung erfolgten unter leichtem Schütteln (50 rpm) des mit den verschiedenen Lösungen (2.2.14) überschichteten Gels bei R.T.

Das Gel wurde nacheinander für 30 min in Fixierer A, 20 min in Fixierer B und 20 min in Fixierer C inkubiert (Vernetzung der Proteine untereinander) und anschließend für mindestens 30 min in 100 ml Aqua bidest. gewaschen. In diese Wasch-Lösung wurden dann 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ DTT gegeben (Reduktion der Proteine), das Gel wiederum für 20 min darin inkubiert und die DTT-Lösung durch 0,1%ige Silbernitrat-Lösung ausgetauscht. Nach 20-minütiger Anlagerung der Silberionen an die Proteine wurde das Gel mit wenig Aqua bidest. gespült und 2 mal mit Entwickler überschichtet. Dabei fand der Entwickler-Austausch statt, sobald eine leichte Braunfärbung des Gels einsetzte. Nach gewünschter Färbung der Proteinbanden wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,3 M Zitronensäure gestoppt (Gasentwicklung wird sichtbar), das Gel mit Aqua bidest. gewaschen und für 10 min mit 0,03%iger Na_2CO_3-Lsg. konserviert.

2.3.15 DNase-Nachweis im Polyacrylamidgel

Tris-Glycin-Gele wurden über Nacht in aufgesalzenem Puffer vorbehandelt (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3, 0,3 M NaCl, 0,04 M $CaCl_2$, 0,04 M $MgCl_2$). Es wurden jeweils 10 µl Probe (mit PM30 3fach konzentrierter Kulturüberstand) mit 2 µl Tris-Glycin-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde ebenfalls in aufgesalzenem Puffer durchgeführt. Durch

den hohen Salzgehalt kam es in der Elektrophoresekammer häufiger zu einem Kurzschluss und das Gerät musste erneut gestartet werden (Einstellungen am Gerät: 150 V, 70 mA, 6 W). Die Laufzeit der Proben verlängert sich durch die geringere realisierbare Spannung auf 8 bis 10 h, während der der Puffer 2 mal ausgetauscht wurde. Die Gele wurden danach halbiert, die eine Hälfte silbernitratgefärbt und die andere mit DNA-Agarose überschichtet und bis zu 23 h inkubiert. Die Färbung mit Ethidiumbromid-Lösung und die Dokumentation erfolgte wie unter Kapitel 2.3.8 beschrieben. Getestet wurden außerdem die Farbstoffe Methylgrün (50 mg $\cdot$ l^{-1}) und Toluidinblau O (100 mg $\cdot$ ml^{-1}) (modifiziert nach Chaudhuri & Singh, 1992).

Es wurden außerdem ungekochte Proben auf native und SDS-Gele aufgetragen.

2.4 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck, Sigma, Fluka und Riedel-de Haën (Deutschland) sowie von Acros Organics (USA), Janssen Chimica (Belgien) und Pharmacia Biotech (Schweden) bezogen. Die Chemikalien wurden überwiegend in p.a.-Qualität verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Standortbeprobung und -charakterisierung: Lanzarote

Die folgende Karte in Abbildung 9 zeigt die Insel Lanzarote (Kanarische Inseln, Spanien) mit den drei Standorten, an denen die Beprobung im Dezember 1998 durch Prof. Dr. M. G. Lorenz erfolgte.

Abb. 9: Geografische Karte der Kanarischen Inseln Lanzarote und Graciosa, Spanien. Im Norden von Lanzarote befinden sich die Salinas del Rio mit einem Salinitätsspektrum der Proben von 18-34%. Im Westen liegen die Salinas del Janubio (Probensalinitätsspektrum: 12-34%) und der küstennahe See La Laguna de los Ciclos bei dem Ort El Golfo mit einer Salinität von 4,8%.

Lanzarote ist die nördlichste der Kanarischen Inseln und vulkanischen Ursprungs. Sie liegt auf gleicher geografischer Breite wie die Sahara und ist ebenfalls wie die Wüste mit 135 mm Niederschlag im Jahr (hauptsächlich im Dezember und Januar) regenarm. Mit einer Tagesdurchschnittstemperatur von 17 bis 24 °C weist Lanzarote aufgrund der ständigen Passatwinde niedrigere Temperaturen auf als für ihren Breitengrad typisch.

Die Salinas del Janubio ist eine der größten Salinen Spaniens. Sie entstand nach einer Eruption, die zwischen 1730 und 1736 einen vorher an gleicher Stelle gelegenen Hafen vernichtete. Ihre Salzfördermengen sind mittlerweile eher gering. Bei den Salinas del Rio handelt es sich um die ältesten Salzgewinnungsflächen des Archipels, die bereits seit der Römerzeit genutzt wurden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben stammten aus stillgelegten Salzgärten.

El Golfo ist, neben dem nahegelegenen Ort, der Name des vulkanischen Kraters, der durch küstennahen Vulkanismus entstanden ist. In seinem Zentrum hat Untergrundmeerwasser einen See gebildet, der La Laguna de los Ciclos genannt wird. Durch Verdunstung liegt die Salinität

des Sees mit 4,8% über der des Meerwassers und das massenhafte Auftreten des Pfeifenentengrases *Ruppia maritima* verleiht dem Wasser eine grüne Farbe.

In den Tabellen 9A – C sind die wichtigsten physiko-chemischen Merkmale der Standorte zusammengefasst, an denen sowohl Sediment- als auch Wasserproben entnommen wurden. Die Tabellen enthalten außerdem die Lebendzellzahlen der Proben, bestimmt als koloniebildende Einheiten (CFU · ml^{-1}). Weitere Informationen über die Salinen von Janubio, Lanzarote, wurden 1987 und in darauf folgenden Jahren im Rahmen eines DFG-Projekts – *In-situ*-Bildung biogener Carbonate in Mikrobenmatten – durch die AG Geomikrobiologie (Prof. Dr. Dr. h.c. W. E. Krummbein), ICBM, Universität Oldenburg, zusammengetragen (hier nicht dargestellt).

Tab. 9A – C: Physiko-chemische Charakteristika der Probenahmestandorte auf Lanzarote, Kanarische Inseln, Spanien, und des Probenmaterials einschließlich der Lebendzellzahlen der Proben (CFU · ml^{-1}). **A**: Salinas del Janubio; **B**: Salinas del Rio; **C**: El Golfo und Salinas del Rio.

***** Die Angaben in () in der Zeile CFU · ml^{-1} stellen die NaCl-Konzentration [%] und den pH-Wert des Mediums dar. Bei fehlender Medien- und pH-Angabe = SML mit pH 8,0.
n.d. = nicht untersucht
n.n. = nicht nachweisbar
# = Beprobung der Salinas del Rio durch Prof. Dr. K.-H. Blotevogel (s. Kapitel 2.1.1)

A

Parameter	Probenstandorte (Abkürzung)					
	Salinas de Janubio 1 (SJ1)	Salinas de Janubio 2 (SJ2)	Salinas de Janubio 3 (SJ3)	Salinas de Janubio 4 (SJ4)	Salinas de Janubio 5 (SJ5)	Salinas de Janubio 6 (SJ6)
Standort-beschreibung	Vorfluter: oberste Salzschicht zerstoßen, aufgewirbelt: Überstand (grün) und Sediment (grau) entnommen	Vorfluter: harte Salzkruste über schwarzem Sediment	Vorfluter wie SJ1: klare Wasserprobe	Kristallisationsbecken: salzhaltiges Sediment vom Rand des Beckens (weiße Salzschicht im Becken am Grund); Überstand farblos, etwas trüb, Sediment braun-schwarz	Vorfluter: Kalkkruste mit Cyanobakterien darunter; Überstand grün, Salzkruste schwarz	Wie SJ5
Probenahme-datum	3.12.98	3.12.98	3.12.98	3.12.98	5.12.98	5.12.98
Temp. [°C] Luft	22,9 (Sonne, windig)	22,9 (Sonne, windig)	22,9 (Sonne, windig)	22,9 (Sonne, windig)	n.d. (heftiger Regen bis Nachmittag, bewölkt bei Probenahme)	n.d. (s. SJ5)
Temp. [°C] Wasser	24,8	27,5	24,8	n.d.	n.d.	n.d.
pH-Wert	7,31	7,61	8,10	7,35	8,24	8,12
Salinität [%]	18	24	17	34	12	14
Trockenmasse [%]	32,3	50	n.b.	70	28,3	39,7
Chlorid-Anteil [g/l]	n.d.	127,485	98,968	184,57	69,07	74,196
Nitrit-Anteil [g/l]	n.d.	0,253	n.n.	0,666	n.n.	n.n.
Nitrat-Anteil [g/l]	n.d.	0,139	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Sulfat-Anteil [g/l]	n.d.	12,782	10,323	18,040	10,43	10,128
Lebendzellzahl (CFU · ml^{-1}) im Überstand*	10^6 (20% HM) $6{,}4x10^3$ (25% HM) $2x10^4$ (20%) $2x10^4$ (20%, pH 9,5)	n.d.	$3{,}6x10^4$ (20%) $8x10^4$ (25% HM) 0 (20%, pH 9.5)	$3{,}4x10^3$ (30%) $5{,}6x10^3$ (25% HM) 0 (20%, pH 9,5)	$1x10^4$ (12%) $5x10^2$ (25% HM) $1{,}2x10^4$ (12%, pH 9,5)	$4{,}3x10^3$ (12%) $2x10^5$ (12% HM) $4x10^3$ (25% HM) $3{,}9x10^4$ (12%, pH 9,5)
Lebendzellzahl (CFU · ml^{-1}) im Sediment*	$1{,}5x10^5$ (20%) $7{,}9x10^3$ (20%, pH 9,5)	$2{,}3x10^4$ (20%)	n.d.	$2{,}5x10^4$ (30%) $4{,}5x10^5$ (25% HM) 0 (20%, pH 9,5)	$1x10^5$ (12%) $5{,}4x10^4$ (12%, pH 9,5)	$1{,}4x10^4$ (12%) $4{,}2x10^3$ (12%, pH 9,5)

B

Parameter	Probenstandorte (Abkürzung)						
	Salinas del Rio 1 (SR1)	Salinas del Rio 2 (SR2)	Salinas del Rio 3 (SR3)	Salinas del Rio 4 (SR4)	Salinas del Rio 5 (SR5)	Salinas del Rio 6 (SR6)	Salinas del Rio 7 (SR7)
Standort-beschreibung	Kristallisa-tionsbecken: rote Salzkruste mit schwarzem Schlamm	Kristallisations-becken: roter Schlamm mit dünner Salz-kruste, wenige Meter vor SR1; Sediment darunter braun	Kristallisations-becken: starke Salzkruste, inneres Becken, mit aufgewirbeltem Schlamm, Überstand braun, Salzkruste schwarz	Kristallisations-becken: roter Salztümpel, Überstand orange-braun, Salzkruste grau-braun	Vorfluter: Cyano-bakterienmatte über schwarzem Sediment (aufgebläht), Überstand grau-grün	wie SR5, nochmalige Probe	Vorfluter: trockene beige-braune Salzkruste (ausgetrockneter Tümpel mit grüner Schicht an Oberfläche)
Probenahme-datum	4.12.98	4.12.98	4.12.98	4.12.98	4.12.98	4.12.98	4.12.98
Lufttemp. [°C]	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)	20,1 (bewölkt, windig)
Wassertemp. [°C]	22,6	24,2	22,9	23,6	22,5	22,5	n.d.
pH-Wert	7,28	7,48	7,33	7,62	7,94	8,00	n.d.
Salinität [%]	n.d.	n.d.	34	32	18	n.d.	n.d.
Trockenmasse [%]	56,7	62,8	54,6	54,1	38,6	38	48,6
Chlorid [g/l]	191,583	184,178	135,788	163,019	85,3	96,122	144,058
Nitrit [g/l]	0,535	0,049	0,456	0,495	0,26	0,17	0,537
Nitrat [g/l]	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Sulfat [g/l]	15,733	16,728	48,634	15,282	13,789	5,119	6,462
Lebendzellzahl (CFU · ml^{-1}) im Überstand*	n.d.	n.d.	$1x10^5$ (25% HM) $1,5x10^4$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$1x10^5$ (25%HM) $1,3x10^4$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$2x10^5$ (20%) $1,5x10^5$ (25% HM) 300 (20%, pH 9,5)	n.d.	n.d.
Lebendzellzahl (CFU · ml^{-1}) im Sediment*	$2x10^4$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$4x10^4$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$1x10^6$ (25% HM) $1x10^5$ (30%) 100 (20%, pH 9,5)	$2,5x10^5$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$4,2x10^4$ (20%) 700 (20%, pH 9,5)	$6,4x10^4$ (20%) 10^6 (20% HM) $8,5x10^3$ (20%, pH 9,5)	$1,4x10^3$ (30%) $1,8x10^5$ (25% HM) $3,7x10^4$ (20%, pH 9,5)

C

Parameter	Probenstandorte (Abkürzung)			
	El Golfo 1 (EG1)	El Golfo 2 (EG2)	Salinas del Rio (BF) #	Salinas del Rio (BP) #
Standort-beschreibung	Klares grünliches Wasser mit steinigem schwarz-braunem Sediment	Wie EG1	Kristallisationsbecken: Überstand rosa, Sediment schwarz	Kristallisationsbecken: Grau-braune Salzkruste
Probenahmedatum	5.12.98	5.12.98	Frühjahr 1998	Frühjahr 1998
Lufttemp. [°C]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Wassertemp. [°C]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pH-Wert	8,20	7,97	n.d.	n.d.
Salinität [%]	4,8	4,8	31	32
Trockenmasse [%]	n.d.	n.d.	39	54,9
Chlorid [g/l]	24,194	23,042	195,249	195,868
Nitrit [g/l]	0,387	n.n.	0,038	ca. 0,5
Nitrat [g/l]	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Sulfat [g/l]	2,932	2,814	13,407	13,305
Lebendzellzahlen (CFU · ml^{-1}) im Überstand*	$7x10^4$ (6%) $5x10^4$ (12%, pH 9,5)	600 (6%) $2,8x10^3$ (12%, pH 9,5)	$1,5x10^4$ (25% HM) $1,5x10^3$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	
Lebendzellzahlen (CFU · ml^{-1}) im Sediment*	$7x10^4$ (6%) $4,6x10^4$ (12%, pH 9,5)	$1,6x10^4$ (12%) $1x10^5$ (12% HM) $1,7x10^4$ (12%, pH 9,5)	$1x10^6$ (30%) 0 (20%, pH 9,5)	$2,4x10^4$ (30%) 600 (20%, pH 9,5)

Es wurden 6 Proben in den Salinas del Janubio, 7 in den Salinas del Rio und 2 aus dem See bei El Golfo zwischen dem 3. und 5.12.1998 entnommen. Zwei weitere Proben (BF / BP) stammten ebenfalls aus den Salinas del Rio, wurden aber bereits im Frühjahr 1998 von Prof. Dr. K.-H. Blotevogel gesammelt. Für diese beiden Proben waren keine Standortinformationen erhältlich.

Zum Zeitpunkt der Probenahme im Dezember 1998 herrschten wechselhafte Wetterbedingungen bei 20 bis 23 °C. Die Wassertemperaturen in den Salinenbecken lagen durch die Insolation meist leicht über der Lufttemperatur und betrugen max. 27,5 °C. Aufgrund der Verwilderung der Salinenbecken durch die Einstellung der Bewirtschaftung waren einige Vorfluter ausgetrocknet und allgemein die Einteilung in Vorfluter und Kristallisationsbecken schwierig. Die Proben wiesen im Labor pH-Werte zwischen 7,28 und 8,24 und Salinitäten zwischen 4,8 und 34% auf (s. a. Kapitel 3.1.1). Die Lebendzellzahlen wurden soweit möglich im Probenüberstand und -sediment separat ermittelt und betrugen durchschnittlich $3,4 \cdot 10^5$ für HM und $6,5 \cdot 10^4$ CFU $\cdot$ ml^{-1} für SML. Die Anionenkonzentrationsbestimmung ergab zur Salinität proportionale Chlorid- und Sulfat-Konzentrationen von 23,04 bis 195,87 g Chlorid $\cdot$ l^{-1} und 2,81 bis 48,63 g Sulfat $\cdot$ l^{-1}. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben aus der Literatur (s. Tab. 25 und Giani et al., 1989). Während Nitrat nur in einer Probe in detektierbaren Mengen enthalten war (SJ2 mit 0,139 g $\cdot$ l^{-1}), wurde Nitrit in 12 Proben nachgewiesen (mit bis zu 0,67 g $\cdot$ l^{-1} in SJ4). Eine direkte Korrelation zur Salinität wie für Cl^- und SO_4^{2-} war nicht eindeutig erkennbar. Abbildung 10 zeigt die Nitrit-Konzentrationen und die Trockenmasseanteile der Proben bezogen auf die Salinität der Standorte. Die grafische Darstellung erfolgte unter der Annahme, dass die Probenstandorte SR1 und SR2 ca. 30% Salinität und der Standort SR7 20% Salinität aufwiesen. Diese Werte ergeben sich aus der Betrachtung der weiteren Merkmale der Proben. Die Wasserproben (SJ3, EG1, EG2) wurden wegen ihrer geringen Trockenmasse diesbezüglich nicht untersucht.

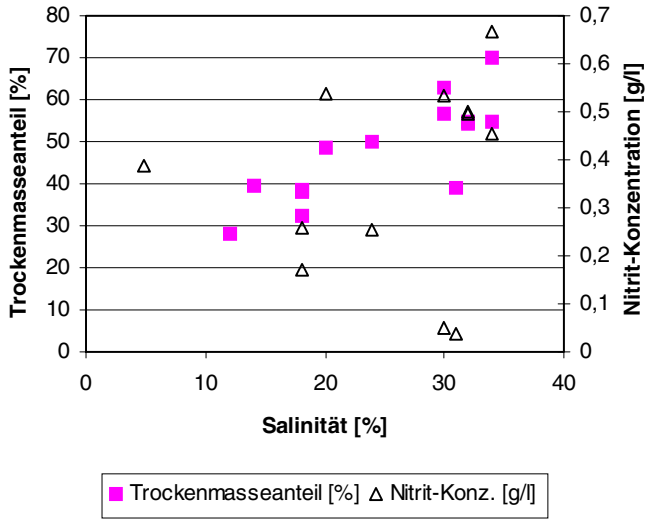

Abb. 10: Trockenmasseanteil und Nitrit-Konzentration der Lanzarote-Proben in Abhängigkeit von der Salinität.

Die Trockenmasseanteile der restlichen Proben zeigten erwartungsgemäß eine positive Korrelation zur Salinität. Beim Vorgang der Trocknung kristallisieren die gelösten Salze aus und Schwankungen zur Trendlinie kommen hauptsächlich durch Unterschiede in der Probenahme zustande, ob z.B. mehr Überstands-wasser oder mehr Sediment gesammelt wurde. Die Nitrit-Konzentration schien

durch die Salinität und den Trockenmasseanteil der Proben beeinflusst zu sein. In Proben mit hohem Trockenmasseanteil und hoher Salinität konnte zumeist mehr Nitrit nachgewiesen werden als in solchen mit niedrigem Anteil. Allerdings sind die Abweichungen von einem linearen Verlauf sehr groß, was darauf hindeutet, dass andere Parameter, die hier nicht ermittelt werden konnten, ebenfalls Einfluss auf die Nitrit-Konzentration haben.

3.1.1 Abhängigkeit des pH-Werts von der Salinität der Standorte

Um eine möglichst große Auswahl verschiedener Isolate für die Einrichtung einer Stammsammlung zu erhalten, sollten Standorte mit breiter pH-Wert- und Salinitäts-Variabilität beprobt werden, da davon auszugehen war, dass die Diversität der vorkommenden Bakterien mit diesen Faktoren korreliert. Daher wurden die Proben sowohl aus Vorflutern als auch aus Kristallisationsbecken entnommen.

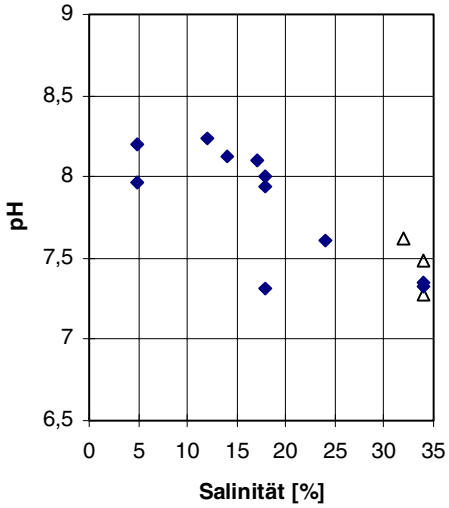

Abb. 11: pH-Werte der beprobten Standorte in Abhängigkeit von der Salinität bei Unterscheidung der Standorte nach Farbe.
Δ Standorte mit Rotfärbung
♦ anders gefärbte Standorte

Die Abbildung 11 zeigt die pH-Werte der beprobten Standorte in Abhängigkeit von den gemessenen Salinitäten (beide Parameter wurden nachträglich im Labor bestimmt, die Wahl der Probenstandorte erfolgte nur aufgrund der unterschiedlichen Erscheinung).

Die pH-Werte der Proben aus den Salinen lagen im alkalischen Bereich zwischen 7,3 und 8,2. Durch die Darstellungsweise wird ein Zusammenhang zwischen pH-Wert und Salinität deutlich, wie er auch in der Literatur beschrieben wird. Standorte mit Salinitäten ≤ 18% zeigten pH-Werte im Bereich von 8 (Ausnahme SJ1 mit 18% Salinität und pH 7,31). Eine NaCl-Konzentration von ≥ 18% korrelierte mit einem pH-Wert ≤ 7,6 und in einigen Fällen mit einem Wechsel von überwiegendem Vorkommen von grünen, vermutlich halotoleranten bis halophilen (♦), zu roten, vermutlich halophilen bis extrem halophilen Organismen (Δ; s. Tab. 9: Standortbeschreibung). Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration sinkt allgemein der pH-Wert. Kristallisationsbecken weisen daher zumeist einen pH-Wert von ca. 7 auf, während Seewasser einen pH-Wert von ca. 8,2 besitzt. Durch die veränderten Bedingungen in den Salinenbecken können die Vorfluter mit Salinitäten bis 25% durch die Zusammensetzung ihrer Organismen von den Kristallisationsbecken mit Salinitäten über 25% unterschieden werden, erstere weisen zumeist Cyanobakterienmatten auf und letztere zeigen besonders in bewirtschafteten Salinen eine ausgeprägte Rotfärbung (s. Kapitel 4.2).

3.1.2 Aufbau einer Bakterien-Stammsammlung

Für das bevorstehende Screening von Bakterien hinsichtlich der Produktion von extrazellulären Enzymen wurden die auf festen Nährmedien vereinzelten Stämme als Flüssigkultur herangezogen und in 18% Glycerin bei -80 °C in 2 Parallelen in Eppendorfcaps eingefroren. Wie stichprobenartig an der Anzahl der reaktivierbaren Stämme ermittelt wurde, eignet sich dieses Verfahren sehr gut für die Hälterung von Bakterien aus Salinen. Ein Verlust von Stammeigenschaften durch häufiges Überimpfen konnte so minimiert werden. Für die Dauer von 2 ½ Jahren wurde auf die Stammsammlung zurückgegriffen, ohne stammsammlungserhaltende Maßnahmen ergreifen zu müssen.

671 Lanzarote-Isolate wurden hinsichtlich der Bildung der extrazellulären Enzyme DNase, RNase und Protease getestet. Bis auf wenige Ausnahmen wurden nur die Isolate in die Stammsammlung aufgenommen, die Enzym-positiv waren. Es handelte sich dabei um 396 Stämme (59% der getesteten Isolate).

3.1.3 Wahl der geeigneten Nährmedien

Es wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU · ml^{-1}) in den Proben und die Diversität anhand verschiedener Koloniemorphologien bestimmt. Dafür wurden zwei Medien verwendet: Zum einen das Halophilenmedium (HM) nach Sehgal und Gibbons (1960) und zum anderen ein an das HM angelehntes Medium (Salinenmedium-Lanzarote, SML), das an die Ionenkonzentrationen angepasst wurde, die durch Claes (1989) in der Saline von Janubio bestimmt worden waren (s. Kapitel 2.2.2 und 2.2.1). Es wurden Medien mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen und pH-Werten hergestellt:

Tab. 10: Salinitäten und pH-Werte der Kulturmedien

Medium	Salinität [%]	pH-Wert
HM	12	7,4
	20	7,4
	25	7,4
SML	6	8,0
	12	8,0 und 9,5
	20	8,0 und 9,5
	30	8,0

Im SML wurde ein höherer pH-Wert eingestellt als im HM, um evt. auch alkaliphile Bakterien zu isolieren. Die Proben wurden im Allgemeinen auf dem Medium ausgestrichen, dessen Salinität der des Standortes am nächsten lag (s. Kapitel 3.1.4). Die Ergebnisse der Bestimmung der Lebendkeimzahlen · ml^{-1} sind in Tabelle 9 und für SML in Abbildung 12 dargestellt

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Lebendzellzahlen auf dem HM im Vergleich zum SML größer waren, auf SML aber eine größere Diversität an Morphotypen beobachtet werden konnte. Daher wurde SML gegenüber HM der Vorzug für die weiteren Arbeiten gegeben.

3.1.4 Lebendzellzahlen auf SML

Die Keimzahlbestimmung erfolgte auf SML mit ähnlicher Salzkonzentration wie in den Proben, d.h. dass Material mit einer Salinität von 4,8 bis 14% auf Medium mit 12% NaCl, Proben mit der Salinität von 17 bis 24% auf Medium mit 20% NaCl und Proben mit 30 bis 34% Salinität auf Medium mit 30% NaCl ausplattiert wurden. In einigen Fällen wurden die Proben zusätzlich auch auf Medium mit von der Probensalinität stärker abweichenden Salzkonzentration ausplattiert. Die pH-Werte der Medien sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung sind in Abbildung 12 zusammengefasst.

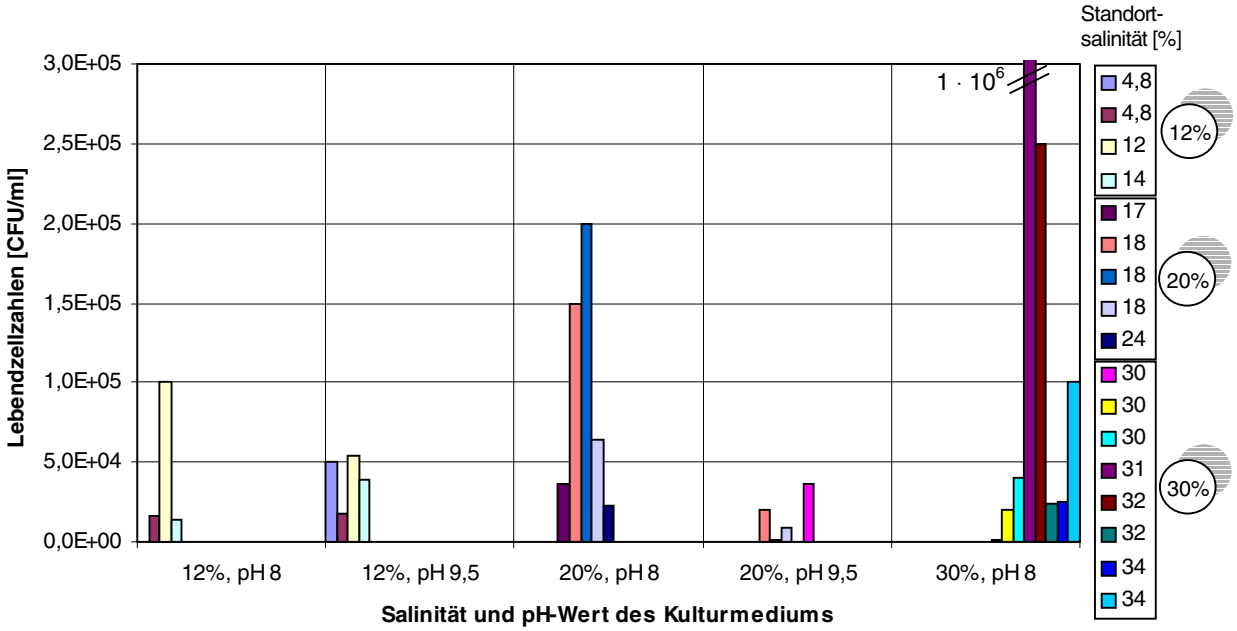

Abb. 12: Lebendzellzahlen (CFU · ml^{-1}) der Proben aus Lanzarote in Abhängigkeit von der Salinität und dem pH-Wert des Kulturmediums (SML). (12%, pH 8 steht beispielsweise für SML mit einer NaCl-Konzentration von 12% und einem pH-Wert von 8,0.) Die Säulen stellen von links nach rechts die Standorte mit aufsteigender Salinität dar. Proben mit einer Salinität von 4,8 bis 14% wurden auf SML mit 12% NaCl (pH 8,0 und 9,5), Proben mit 17 bis 24% Salinität auf SML mit 20% NaCl (pH 8,0 und 9,5) und Proben mit 30 bis 34% Salinität auf SML mit 30% NaCl (pH 8,0) ausplattiert. Diese Standortgruppen sind in der Legende dargestellt.

Die Lanzarote-Proben wiesen auf SML Lebendkeimzahlen bis max. $1 \cdot 10^6$ CFU · ml^{-1} auf. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Lebendkeimzahlen in Standortgruppen mit höherer Salinität größer waren als in solchen mit niedrigem NaCl-Gehalt. So wurden in der 20% NaCl-Gruppe mit durchschnittlich $9,5 \cdot 10^4$ CFU · ml^{-1} nahezu doppelt so viele Keime nachgewiesen wie in der 12% NaCl-Standortgruppe ($4,3 \cdot 10^4$ CFU · ml^{-1}). In der 30%-Gruppe ($1,8 \cdot 10^5$ CFU · ml^{-1}) konnten wiederum doppelt so viele nachgewiesen werden wie auf 20% NaCl.

Auf 12% NaCl wurden bei pH 8,0 ähnlich hohe Keimzahlen ermittelt wie bei pH 9,5 (4,3 bzw. $4 \cdot 10^4$ CFU · ml^{-1}). Auf SML mit 20% NaCl fiel die durchschnittliche Lebendzellzahl auf pH 9,5 sehr viel geringer aus als auf pH 8,0 ($5,6 \cdot 10^3$ gegenüber $9,5 \cdot 10^4$ CFU · ml^{-1}). In vielen Proben (sowohl in Vorflutern als auch in Kristallisationsbecken, s. Tab. 9) konnten auf 20% NaCl, pH 9,5 keine Lebendkeime nachgewiesen werden. Der direkte Vergleich von Proben, die bei

gleicher Salzkonzentration sowohl auf pH 8 als auch auf 9,5 ausplattiert wurden, ergab eine durchschnittlich 4 mal höhere Keimzahl auf pH 8 als auf pH 9,5.

Weiterhin lässt sich anhand der Darstellung – besonders im Fall von 20 und 30% NaCl pH 8,0 – erkennen, dass häufig die nachgewiesenen Lebendzellzahlen um so höher waren, je geringer der Unterschied der Salz-Konzentration des Mediums zur Salinität des Standortes war. Die höchsten Keimzahlen innerhalb der Salinitätsgruppen wurden in Proben mit 12, 18 und 31% Salinität ermittelt (SJ5, SJ1 und BF). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Litchfield und Gillevet (2002, s. Kapitel 4.3)

Bei einer Erhöhung der pH-Werte – besonders im hochsalinen Bereich – und einer Veränderung der Salzkonzentrationen im Kulturmedium im Vergleich zu den Standort-bedingungen nahm allgemein die Anzahl kultivierbarer Organismen ab.

3.1.5 Kolonie-morphologische Merkmale

Die Isolate wurden aufgrund ihrer morphologischen Verschiedenheit für die bevorstehenden Tests auf die Bildung extrazellulärer Enzyme ausgewählt. Dabei war darauf zu achten, dass nicht zu früh mit der Auswahl der Isolate begonnen wurde, da sich viele Kolonien erst nach einer gewissen Alterung voneinander im Aussehen unterschieden (was sowohl eine farbliche als auch eine Oberflächen-Veränderung sein konnte). Aufgrund ihrer Unterschiede wurden 671 Lanzarote-Isolate den weiteren Plattentests zugeführt. 396 Enzymproduzenten wurden in die Stammsammlung aufgenommen und näher beschrieben (genaue Koloniebeschreibungen fast aller gelagerter Isolate befinden sich im Anhang in Tab. A). Während orange, weiß oder beige als Koloniefarbe unter allen Isolationsbedingungen auftraten, konnten rote Kolonien erst bei einer NaCl-Konzentration von 30% isoliert werden.

3.1.6 Zell-morphologische Merkmale

Alle Stämme der Sammlung wurden als Flüssigkultur im Phasenkontrast bei 1.000facher Vergrößerung mikroskopiert und verschiedene Morphotypen fotografiert. Es konnten Stäbchen unterschiedlicher Größe (von 0,25 – 2 x 0,5 – > 20 µm) einzeln, gehäuft oder in Ketten, kantig oder abgerundet, zu Vibrionen gekrümmt, wie Spirillen gewunden, aufgebläht zu Sphäroblasten (∅ bis 5,5 µm), Keulen und anderen Formen, mit und ohne fleckartigen Anfärbungen und Kokken (∅ 0,5 – 2 µm) beobachtet werden. Auffällig war in vielen Fällen der Gestaltenreichtum bei Zellen eines Stammes, wobei der Salzgehalt des Mediums und das Alter der Zellen einen bedeutenden Einfluss zu haben schienen. Stämme, die in der Lage waren, unterschiedliche Salinitäten zu tolerieren, zeigten bei Anzucht in SML-Flüssigmedium mit zunehmender NaCl-Konzentration eine steigende Tendenz zur Pleomorphie. Ein Beispiel für die Variabilität der Zell-Morphologie ist den Fotografien in Abbildung 13 zu entnehmen. Im Vergleich zur Kultur von EG2S/2 mit 12% NaCl traten bei 20% NaCl vermehrt Zellen mit aufgeblähten Enden oder Deformierungen auf, was bis zur Bildung von Sphäroblasten reichen konnte (daher die

Unschärfe in Abb. 13B, Sphäroblasten mit Pfeilen markiert). Weiterhin lagerten sich die Zellen unter diesen Bedingungen vermehrt zusammen. Das erschwerte die Kontrolle der Reinheit der Isolate und die Beschreibung der Zellmorphologie. In einigen Fällen konnten z.B. verformte Vibrionen, die dann als Sphäroblasten auftraten, kaum noch von echten Kokken unterschieden werden (hier nicht dargestellt). Alle weiteren Zellmorphologien der Isolate sind im Anhang aufgeführt (Tab. A).

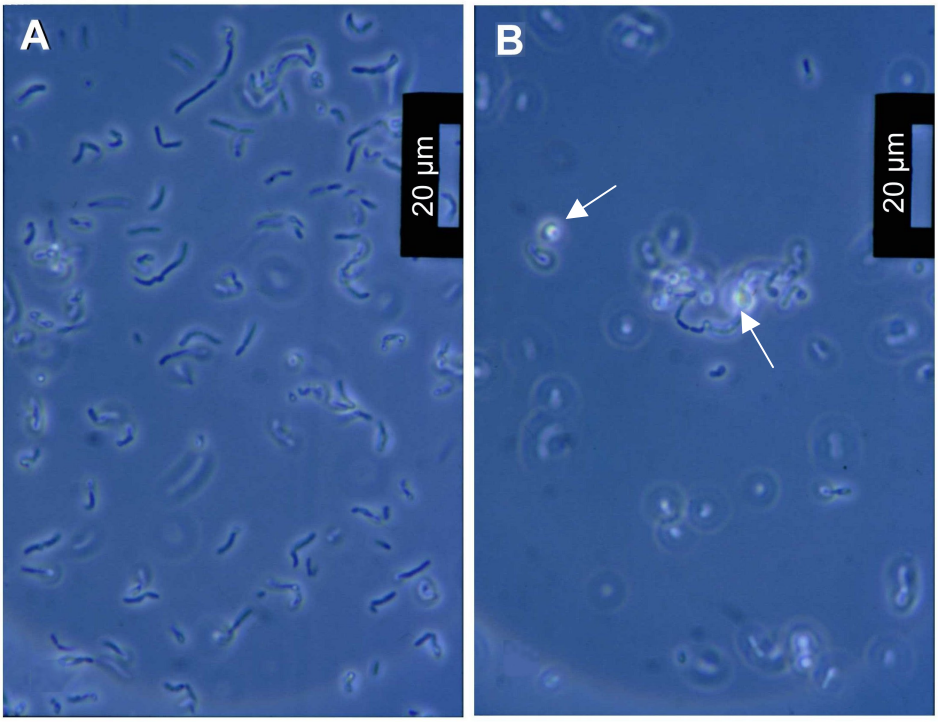

Abb. 13: Lichtmikroskopisches Bild von 9 Tage alten Flüssigkulturen des Stamms EG2S/2 (Phasenkontrast, 1.000-fache Vergrößerung).
A: In SML mit 12% NaCl, pH 8,0.
B: In SML mit 20% NaCl, pH 8,0 (Sphäroblasten wurden mit Pfeilen markiert.)

3.1.7 Extrazelluläre Enzymproduktion auf festen Nährböden

Die Isolate von Lanzarote wurden mit Hilfe von Plattentests hinsichtlich der Produktion von extrazellulären Enzymen getestet (Abb. 6 zeigt Beispiele der Testplatten). Die folgenden Tabellen 11 bis 13 und die Abbildungen 14 bis 18 geben eine Übersicht über die Verteilung der im Test positiven Stämme.

3.1.7.1 Enzymproduzenten bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate

Tabelle 11 gibt allgemein die Anzahl der Enzymproduzenten bezogen auf die Gesamtzahl der getesteten Isolate wieder, Tabelle 12 schlüsselt die positiven Isolate nach der Art des gebildeten Enzyms auf und Tabelle 13 umfasst nur die Anzahl der Nucleaseproduzenten und ihre Nucleinsäurespezifität (DNase/RNase) auf den jeweiligen Medien.

Tab. 11: Anzahl der Lanzarote-Isolate, die über Plattentests hinsichtlich extrazellulärer Enzymproduktion (DNase, RNase, Protease) getestet wurden sowie Anzahl und Anteil der Isolate, die eines oder mehrere der Enzyme produzierten, in Abhängigkeit von den Isolations- und Testbedingungen (pH-Wert und NaCl-Konzentration).

pH und Salinität im SML		Anzahl der getesteten Isolate	Anzahl und Anteil [%] der positiven Isolate
pH	NaCl-Konz. [%]		
8,0	12	219	118 (53.9%)
	20	206	94 (45.6%)
	30	106	94 (55.6%)
		Σ: 594	Σ: 306 (51.5%)
9,5	12	55	22 (40%)
	20	22	15 (68%)
		Σ: 77	Σ: 37 (48%)

Im Mittel konnte bei 51,5% der auf SML mit pH 8,0 isolierten und bei 48% der bei pH 9,5 isolierten Stämme mindestens ein extrazelluläres Enzym mit Hilfe der drei Testverfahren nachgewiesen werden. Die jeweiligen Medien weisen somit keine gravierenden Unterschiede in der Enzymproduzenten-Ausbeute auf. 55% der 343 positiven Isolate zeigten lediglich eine Aktivität, 26% zwei verschiedene Enzymaktivitäten und 19% drei verschiedene Aktivitäten (Werte in der Tab. 11 nicht dargestellt). Bei allen getesteten NaCl-Konzentrationen konnten Isolate mit extrazellulärer Enzymproduktion nachgewiesen werden. Der höchste Anteil an Enzymproduzenten wurde mit 68% auf 20% NaCl, pH 9,5 erfasst, wobei auf diesem Medium mit 22 Isolaten die geringste Anzahl getestet wurde. Der niedrigste Anteil an Enzymproduzenten betrug 40% der getesteten Isolate auf 12% NaCl bei pH 9,5, wo mit 55 Isolaten die zweit-niedrigste Anzahl getestet wurde.

Tab. 12: Anzahl der Lanzarote-Isolate mit extrazellulärer Enzymproduktion (und prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtzahl der getesteten Isolate = 671 Stämme) in Abhängigkeit vom pH-Wert und der NaCl-Konzentration bei der Isolation bzw. im Test.

Enzym	NaCl-Konz. [%]	Anzahl der pos. Isolate bei pH 8,0 (Anteil)	Anzahl der pos. Isolate bei pH 9,5 (Anteil)
DNase	12	42 (6,3%)	18 (2,7%)
	20	17 (2,5%)	13 (1,9%)
	30	28 (4,2%)	n.u.
		Σ: 87 (13%)	Σ: 31 (4,6%)
RNase	12	95 (14,2%)	19 (2,8%)
	20	38 (5,7%)	15 (2,2%)
	30	56 (8,3%)	n.u.
		Σ: 189 (28%)	Σ: 34 (5,1%)
Protease	12	69 (10,3%)	17 (2,5%)
	20	61 (9,1%)	0
	30	71 (10,6%)	n.u.
		Σ: 201 (30%)	Σ: 17 (2,5%)

n.u.: nicht untersucht

Auf allen getesteten SML-Varianten konnten die drei Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, mit Ausnahme der extrazellulären Protease auf SML mit 20% NaCl und einem pH von 9,5.

DNase-Aktivität war am seltensten zu finden. Nur ca. 18% der Isolate waren in der Lage, DNA zu hydrolysieren, wovon ca. ¾ auf pH 8,0 und ¼ auf pH 9,5 entfallen. Das Methylgrün im Testmedium wirkte auf einige Organismen wachstumshemmend, so dass eventuell manche DNase-Produzenten durch diesen Test nicht erfasst wurden. 28% aller Isolate zeigten bei pH 8,0 RNase-Aktivität. Bei pH 9,5 waren nur noch 5,1% der Isolate zum RNA-Abbau in der Lage. Proteolytische Aktivität war bei 32,5% aller Isolate auf SML mit einem pH-Wert von 8,0 zu beobachten, auf 12% NaCl pH 9,5 bauten nur noch 2,5% Casein ab. Auf SML mit 20% NaCl, pH 9,5 war, wie oben bereits erwähnt, kein Protease-Produzent nachzuweisen.

Tab. 13: Anzahl der Lanzarote-Isolate mit spezifischer DNase- oder RNase-Aktivität, in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration bei der Isolation bzw. im Test.

Nucleolytische Aktivität	NaCl-Konz. [%]	Anzahl der Isolate
nur DNase	12	5
	20	4
	30	6
		Σ: 15
nur RNase	12	68
	20	24
	30	14
		Σ: 106

Von 118 Isolaten mit DNase-Aktivität (s. Tab. 12) zeigten lediglich ca. 13% (15 Isolate) ausschließlich DNase-Aktivität (also keine RNase-Aktivität). Aufgrund der geringen Fallzahl kann über die Verteilung innerhalb der Isolationsgruppen keine Aussage gemacht werden. Von 223 RNase-Produzenten (Tab. 12) spalteten ca. 48% (106 Isolate) nur RNA und keine DNA. Die Anzahl der Produzentenstämme sank dabei mit zunehmender Salzkonzentration im Isolationsmedium von 68 bei 12% NaCl auf 14 bei 30% NaCl. Substratspezifische Nucleasen könnten daher mit zunehmender Salzabhängigkeit der Isolate seltener vorkommen.

3.1.7.2 Enzymproduzenten innerhalb der Isolationsgruppen

In den folgenden Abbildungen 14 bis 16 werden die Anteile der Enzymproduzenten bezogen auf die Anzahl der unter den angegebenen Bedingungen getesteten Isolate (hier als Isolationsgruppen bezeichnet) dargestellt. Diese Datendarstellung wurde zusätzlich zu der in Tabelle 12 gewählt, da die Verteilung der Produzenten innerhalb der Gruppen von der Gesamtverteilung stark abweicht.

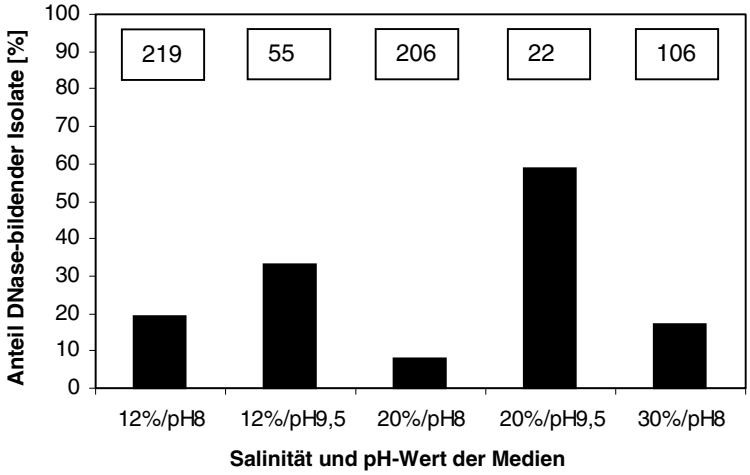

Abb. 14: Anteil [%] der Lanzarote-Isolate mit extrazellulärer DNase-Produktion bezogen auf die Anzahl der bei den angegebenen Isolations- und Testbedingungen getesteten Isolate (in Kästchen über den Balken). Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Die Anteile an DNase-Produzenten betrugen je nach Testbedingungen zwischen 8 und 59%. Auffällig ist der Vergleich der DNase-Produzenten auf SML, pH 9,5 innerhalb der Isolationsgruppen mit den Ergebnissen aus Tabelle 12, also den DNase-Produzenten bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate. Während bei der ersten Betrachtungsweise auf 12% NaCl und pH 9,5 nur 2,7% der Gesamtisolate DNasen produzierten, betrug der Anteil innerhalb der Gruppe der Organismen, die auf diesem Medium isoliert wurden, 33%. Noch deutlicher ist der Unterschied auf 20% NaCl und pH 9,5, wo der Anteil 1,9% bzw. 68% ausmachte. Die geringe Anzahl der DNase-Produzenten, die auf pH 9,5 gefunden wurden, ist also nicht auf den geringen Anteil dieser Organismen in der Gruppe der Alkaliphilen, sondern auf die geringe Anzahl der isolierbaren Alkaliphilen überhaupt zurückzuführen. Alkaliphile und -tolerante scheinen daher sogar häufiger DNasen zu bilden als Neutrophile.

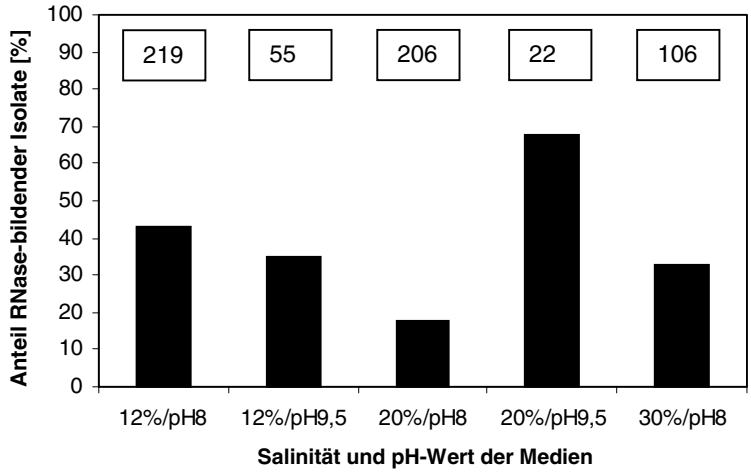

Abb. 15: Anteil [%] der Lanzarote-Isolate mit extrazellulärer RNase-Produktion bezogen auf die Anzahl der bei den angegebenen Isolations- und Testbedingungen getesteten Isolate (in Kästchen über den Balken). Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Für die RNase-Produzenten gilt bezüglich der Isolate auf pH 9,5 die gleiche Verteilung wie für die in der vorangegangenen Abbildung dargestellten DNase-Produzenten. Während z.B. bezogen auf die Gesamtzahl der Isolate nur 2,2% auf SML mit 20% NaCl und pH 9,5 RNasen bildeten, betrug der Anteil, bezogen auf die Isolate, die auf diesem Medientyp gewachsen waren, fast 70%. Es konnten hier somit nur wenige Alkaliphile isoliert werden, unter denen sich aber überwiegend Enzymproduzenten befanden. Wie auch bei der DNase-Produktion fand sich

unter den Isolaten auf SML mit 20% NaCl, pH 8,0 mit 18% der geringste und auf 20% NaCl, pH 9,5 mit ca. 70% der höchste Anteil an positiven Stämmen.

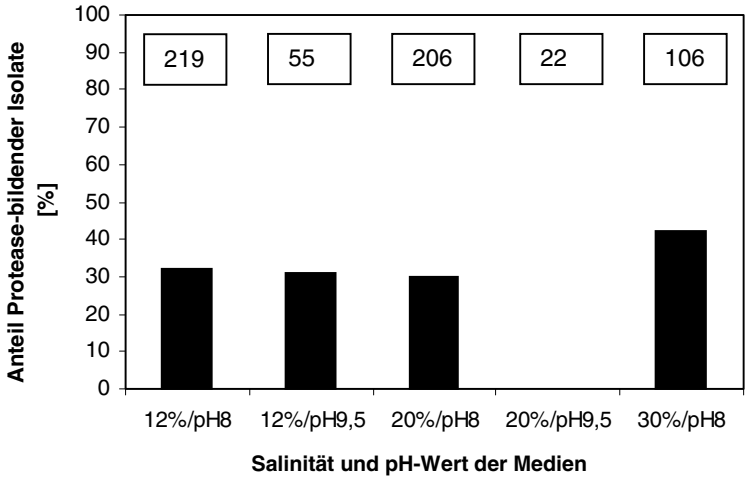

Abb. 16: Anteil [%] der Lanzarote-Isolate mit extrazellulärer Protease-Produktion bezogen auf die Anzahl der bei den angegebenen Isolations- und Testbedingungen getesteten Isolate (in Kästchen über den Balken). Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Der Anteil der Protease-Produzenten innerhalb der Isolationsgruppen war trotz der verschiedenen Wachstumsbedingungen ähnlich und betrug 30 bis 42%. Eine Ausnahme bildete die Gruppe auf SML mit 20% NaCl und pH 9,5, in der – wie oben beschrieben – keine Protease-Produzenten nachgewiesen werden konnten.

3.1.7.3 Extrazelluläre Lipase- und Esterase-Produktion

Für die Einführung eines weiteren Plattentests zum Nachweis von Lipase- bzw. Esterase-Aktivität wurden zwei verschiedene Substrate (Tween 20 und Olivenöl) an 42 Stämmen mit DNase-Aktivität getestet. Abbildung 17 zeigt die Verteilung der Aktivitäten.

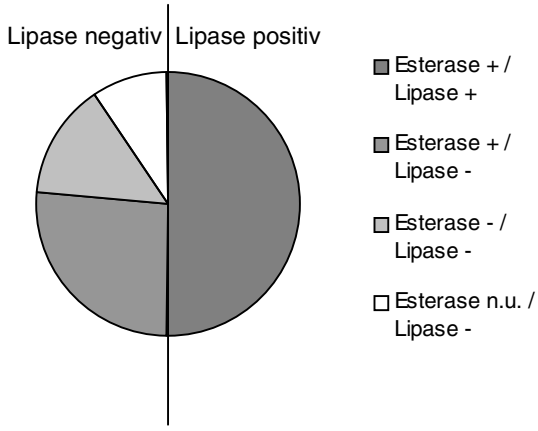

Abb. 17: Verteilung der Enzymaktivitäten auf den Substraten Tween 20 (Esterase) und Olivenöl (Lipase) von 42 Lanzarote-Stämmen mit DNase-Aktivität.

Es wiesen 21 Stämme (50%) sowohl auf Tween 20 (hier als Esterase-Aktivität bezeichnet) als auch auf Olivenöl (Lipase-Aktivität) extrazelluläre Enzymaktivität auf. Von 21 Stämmen, denen keine Lipase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, waren 11 in der Lage, Tween 20 umzusetzen, 6 konnten auch dieses Substrat nicht verwerten und 4 Stämme wurden nicht auf Tween 20 getestet. In mehr als ⅓ der Fälle wurden somit Esterase-Produzenten nicht durch den Olivenöl-Rhodamin-B-Test erfasst. Daher wurde Tween 20 für das initiale Screenen von La Baule-Stämmen verwendet.

3.1.7.4 Enzymproduktion bezogen auf die Salinität der Probenstandorte

Für eine weitere Suche nach Stämmen mit halophilen extrazellulären Enzymen ist die Abschätzung der Eignung bestimmter Standorte, die zur Isolierung entsprechender Organismen gewählt werden, von Interesse. Viele Charakteristika wie der pH-Wert und die Konzentration anderer Ionen sind von der Salinität abhängig oder werden teilweise durch sie repräsentiert. So wurde in Abbildung 18 die Anzahl der enzymproduzierenden Stämme gegen die Salinität der ursprünglichen Proben grafisch aufgetragen, aus denen die Isolate gewonnen wurden. Für die Standorte SR1, SR2 und SR7, deren Salinität nicht untersucht wurde, wurde anhand der übrigen Merkmale Salinitäten von 30, 30 und 20% angenommen. Diese Werte verändern die unten beschriebene Tendenz des Auftretens von enzymproduzierenden Stämmen nicht, sondern passen sich in das übrige Bild der Produzenten-Verteilung ein.

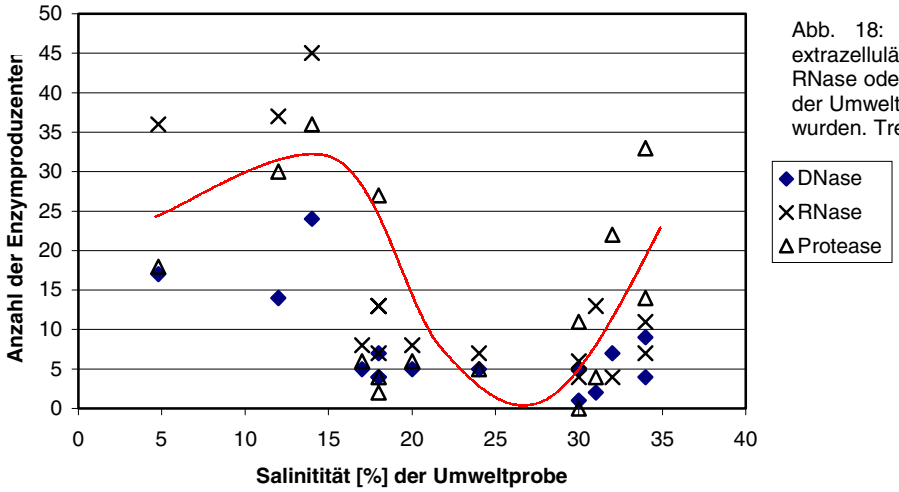

Abb. 18: Anzahl der Lanzarote-Isolate mit extrazellulärer Enzymproduktion (DNase, RNase oder Protease) bezogen auf die Salinität der Umweltprobe, aus der die Isolate gewonnen wurden. Trendlinie rot markiert.

Mit steigendem Salzgehalt der Umweltproben konnte bis 14% Salinität ein Anstieg und dann bis 24% Salinität eine Abnahme der Anzahl enzymproduzierender Isolate festgestellt werden. Von 30 bis 34% Salinität erfolgte wiederum ein Anstieg, so dass durch die Wellenform der gemittelten Kurve zwischen 24 und 30% eine „Produzenten-Lücke“ bestand. Unter Berücksichtigung der hier verwendeten Isolations- und Testbedingungen könnten Standorte mit diesen Salinitäten daher für die Auffindung von DNasen, RNasen und Proteasen weniger geeignet sein.

Während im Vorfluterbereich (bis 24% Salinität) das Vorkommen von RNasen über dem Mittelwert lag, konnte dieses im Kristallisationsbeckenbereich bei den Proteasen festgestellt werden. DNasen lagen zumeist unter dem Mittelwert und zeigten eine geringere Amplitude im anzunehmenden Kurvenverlauf als die anderen beiden Enzyme. Dies kann auf das bevorzugte Vorkommen der Enzyme in Bakterien-Gruppen zurückgeführt werden (s. Kapitel 3.1.8).

3.1.8 Taxonomische Charakterisierung der Enzymproduzenten von Lanzarote

Eine Auswahl von 223 Enzym-positiven Lanzarote-Stämmen wurde durch Vogt (2000) mithilfe der ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) in 26 Bacteria-Gruppen und einer Gruppe von Archaea (12 Isolate) eingeteilt. Von jeweils einem bis sechs Vertretern aus jeder Bacteria-Gruppe (abhängig von der Größe der Gruppe) wurde eine Teilsequenz des 16S-rRNA-Gens mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen verglichen (megablast über NCBI). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Aufgrund der 16S-rRNA-Gen-Teilsequenz-Ergebnisse und die der ARDRA wurden die Enzym-positiven Stämme – unterteilt nach den untersuchten Enzymtypen DNase, RNase und Protease – den jeweiligen Familien der Bacteria bzw. den Archaea zugeordnet (Tab. 15). Des weiteren enthält Tabelle 16 die Anteile der Enzym-positiven Organismen-Gruppen in den Vorflutern und in den Kristallisationsbecken.

Tab. 14: Größtmögliche Verwandtschaft zufällig ausgewählter Vertreter der ARDRA-Gruppen der Lanzarote-Stämme mit Stämmen aus der Literatur anhand des Vergleichs von 16S-rRNA-Gen-Partialsequenzen (prozentuale Übereinstimmung der Basensequenz, BLAST-Analyse, Stand Oktober 2003).

Stamm-Nr.	ARDRA-Gruppe	Größte Übereinstimmung mit	Basen identisch / Basen im Alignment	Sequenzidentität [%]
155	1	Halophiles Bakterium 2HS38b	128/128	100
		Pseudomonas halophila	124/128	96,9
223	1	*Halomonas salicampi*	129/131	98,5
108	1	*Halomonas salicampi*	123/125	98,4
137	1	*Halomonas pacifica*	129/130	99,2
64	1	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2	512/515	99,4
		Salinivibrio costicola	507/516	98,3
138	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	511/515	99,6
		Salinivibrio costicola	506/514	98,4
150	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	343/363	94,5
39	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	269/297	90
80	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	513/517	99,2
		Salinivibrio costicola	508/518	98,1
86	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	513/516	99,4
		Salinivibrio costicola	507/517	98,1
98	2	Nichtidentifiziertes Bakterium Klon K2-30-15	406/438	92,7
12	2	*Salinivibrio costicola*	327/327	100
96	3	Halophiles Bakterium 2HS38b	128/128	100
72	3	Halophiles Bakterium 2HS38b	128/128	100
		Pseudomonas halophila	124/128	96,9
4	4	*Halomonas halophila und salina*	127/128	99,2
85	5	*Halomonas variabilis und glaciei*	126/128	98,4
238	6	Nichtidentifiziertes γ-Proteobakterium	486/488	99,6

Fortsetzung auf Seite 62

Fortsetzung von Tab. 14

Stamm-Nr.	ARDRA-Gruppe	Größte Übereinstimmung mit	Basen identisch / Basen im Alignment	Sequenzidentität [%]
38	7	*Halomonas variabilis*	126/127	99,2
245	8	Nichtkultiviertes Bakterium 3-3	127/129	98,5
		Marinobacter sp.	125/130	96,2
90	9	*Halobacillus trueperi*	490/494	99,2
50	9	*Halobacillus litoralis*	527/531	99,6
178	10	*Halomonas variabilis*	128/128	100
220	11	*Halomonas pacifica*	125/130	96
69	12	*Halomonas* sp. Esulfide1.N2P und *Chromohalobacter salinarium*	122/128	95,3
152	13	*Salinivibrio costicola*	508/513	99
79	13	*Salinivibrio vallismortis*	496/502	98,8
89	14	*Halobacillus* sp. YIM-kkny15	498/521	95,6
100	16	*Pseudoalteromonas ruthenica* KMM300	470/485	96,9
234	17	*Halomonas pacifica*	119/124	96
196	17	*Halomonas* sp. Esulfide1.N2P und *Chromohalobacter salinarium*	122/128	95,3
246	18	*Halomonas variabilis* SWO4 und *glaciei*	128/130	98,5
191	21	*Pseudomonas halophila*	129/129	100
239	22	*Idiomarina loihiensis*	294/302	97,4
67	n.u.	Bacterium ´A310-UMH 31% pond´	129/130	99,2
		Halomonas halmophila	127/130	97,7
7	n.u.	*Salinivibrio vallismortis*	496/503	98,6
198	23	Bacterium ´A310-UMH 31% pond´	127/128	99,2
		Halomonas halmophila	125/128	97,7
224	25	*Halomonas salina* und *ventosae*	124/128	96,9
2	26	*Halomonas pacifica*	123/128	96,1
1	26	*Halomonas pacifica*	123/128	96,1

Soweit eine taxonomische Zuordnung anhand des Vergleichs der 16S-rRNA-Gen-Teilsequenzen möglich war, konnte stets die Verwandtschaft zu halophilen und halotoleranten Bakterien festgestellt werden.

Die engste Verwandtschaft der 39 Lanzarote-Stämme bestand zu insgesamt 5 Familien. Demnach können die ARDRA-Gruppen 1, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 17, 18, 23, 25 und 26 mit 69 Stämmen den Halomonadaceae, die ARDRA-Gruppen 3 und 21 mit 50 Stämmen den Pseudomonadaceae und die ARDRA-Gruppen 2 und 13 mit 47 Stämmen den Vibrionaceae zugeordnet werden. Die Gruppen 9 und 14 mit 27 Stämmen gehören den Bacillaceae und die Gruppen 8, 16 und 22 mit 6 Stämmen den Alteromonadaceae an. Stamm-Nr. 238 (ARDRA-Gruppe 6 mit 4 Isolaten) zeigte eine 99,6%ige Übereinstimmung der Teilsequenz mit einem nichtidentifizierten γ-Proteobakterium. Eine taxonomische Zuordnung konnte aufgrund fehlender

Charakterisierung dieses als auch anderer verwandter Vergleichsstämme nicht erfolgen. Die Stämme 64 und 98 (Gruppe 1 bzw. 2) konnten nicht den Familien zugeordnet werden, die sich aus der Übereinstimmung der Teilsequenz anderer Stämme ihrer ARDRA-Gruppen ergaben. Für Stamm 64 wurde die engste Verwandtschaft statt zu den Halomonadaceae zu den Vibrionaceae ermittelt und Stamm 98 konnte keiner Familie zugeordnet werden. Die ARDRA-Gruppen 15, 19, 20 und 24 wurden nicht untersucht.

Tab. 15: Anteil der Enzym-produzierenden Stämme unterteilt nach Enzymtyp (DNase mit 74 untersuchten Stämmen, RNase mit 74 Stämmen und Protease mit 126 Stämmen) bezogen auf die zugeordneten Familien der Bacteria bzw. auf Archaea.

Organismen-Gruppe	Anteil der Enzym-positiven Stämme [%]		
	DNase (74 Stämme)	RNase (74 Stämme)	Protease (126 Stämme)
Halomonadaceae	27	51	9
Pseudomonadaceae	14	3	37
Vibrionaceae	39	14	36
Bacillaceae	20	11	10
Alteromonadaceae	0	7	2
Archaea	0	15	6

Die Enzymproduzenten verteilen sich in sehr unterschiedlichem Maße auf die identifizierten Familien der Bacteria bzw. auf die Archaea. DNasen wurden in 4 der 6 Gruppen nachgewiesen, hauptsächlich in der Familie der Vibrionaceae (39%). Unter den Alteromonadaceae sowie unter den Archaea befanden sich keine DNase-Produzenten. RNasen wurden mit 51% der durch ARDRA untersuchten Stämme innerhalb nur einer Familie, den Halomonadaceae, gebildet. Die restlichen RNase-Produzenten verteilen sich relativ gleichmäßig über die anderen 5 Gruppen. Proteasen wurden mit 37 und 36% vermehrt durch Vertreter der Familie der Pseudomonadaceae und der Vibrionaceae produziert. Vertreter der Familie der Bacillaceae, sonst dominierend bei der Produktion von extrazellulären Enzymen, waren in der vorliegenden Arbeit somit nicht die zahlenmäßig überwiegenden Enzymproduzenten.

Tab. 16: Anteile der Enzym-positiven Isolate unterteilt in Organismen-Gruppen aus den Vorflutern (bzw. dem küstennahen See bei El Golfo) und den Kristallisationsbecken der Salinen auf Lanzarote.

Organismen-Gruppe	Anteil der Enzym-positiven Isolate	
	Vorfluter (4,8 – 24% Salinität)	Kristallisationsbecken (30 – 34% Salinität)
Halomonadaceae	97	3
Pseudomonadaceae	52	48
Vibrionaceae	100	0
Bacillaceae	85	15
Alteromonadaceae	100	0
Archaea	0	100

Der Bezug der Enzymproduzenten auf ihren Beprobungsstandort zeigte im Fall der Halomonadaceae, der Vibrionaceae, der Alteromonadaceae und in etwas geringerem Maße

auch der Bacillaceae einen Schwerpunkt des bzw. ausschließliches Vorkommen in den Vorflutern mit Salinitäten bis 24%. Enzym-positive Archaea wurden nur in den Kristallisationsbecken nachgewiesen und Pseudomonadaceae konnten in beiden Habitattypen mit nahezu gleichen Anteilen erfasst werden. Der Anteil der Enzym-positiven Archaea gegenüber den Bacteria aus den Kristallisationsbecken betrug 35 zu 65%. Die Anzahl der Organismen-Gruppen war in den Kristallisationsbecken reduziert.

Aus den Ergebnissen in den Tabellen 15 und 16 ergibt sich der in Abbildung 18 dargestellte Verlauf der Enzymproduzenten bezogen auf die Salinität der Probenstandorte. Die Bildung von DNasen war über alle Bakterien-Gruppen relativ gleichmäßig verteilt und daher ergab sich auch keine erhebliche Amplitude im anzunehmenden Kurvenverlauf der DNase-Produzenten in Abbildung 18. Die Verteilung von RNasen und Proteasen zeigte hingegen einen Schwerpunkt auf bestimmte Gruppen. RNasen konnten vermehrt den Halomonadaceae zugeordnet werden, die bevorzugt aus Vorflutern isoliert wurden. Dies erklärt den überdurchschnittlichen Anteil an RNase-Produzenten zwischen 4,8 und 24% Salinität. Proteasen wurden vermehrt von Vertretern der Familie der Pseudomonadaceae und der Vibrionaceae gebildet. Der überdurchschnittliche Anteil an Protease-Produzenten aus Kristallisationsbecken wurde daher durch Vertreter der Pseudomonadaceae verursacht, da Vibrionaceae ausschließlich aus Vorflutern stammten.

3.2 Standortbeprobung und -charakterisierung: La Baule

Die geografische Übersichtskarte in Abbildung 19 zeigt die Lage der Salinen zwischen La Baule und Guérande, Pays de la Loire, Frankreich. Die Abbildung 1 zu Beginn dieser Arbeit ist eine Luftaufnahme der Salinenfelder. Im Hintergrund ist dort der Ort La Baule mit seinem charakteristischen Küstenverlauf zu sehen.

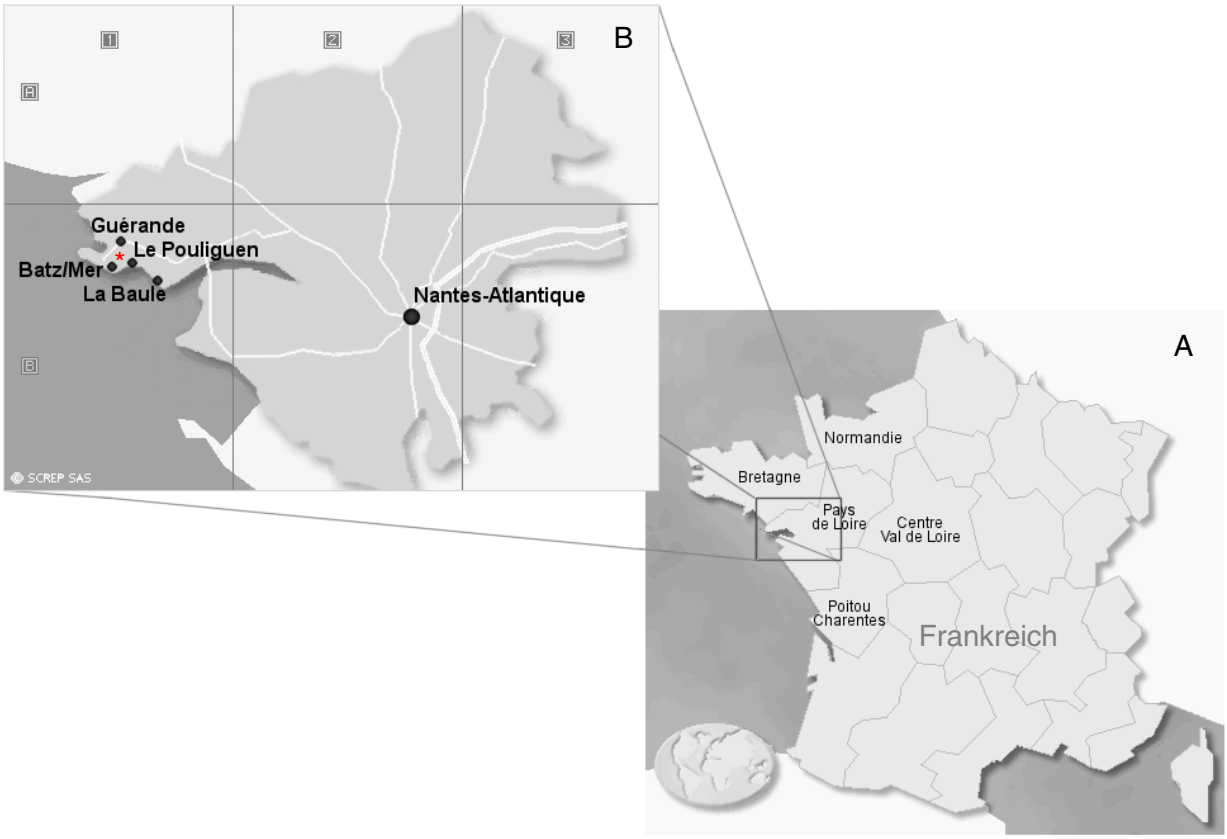

Abb. 19: Geografische Karten Frankreichs. A: Gesamtes Frankreich mit den fünf nordwestlichsten Regionen. B: Ausschnitt aus der Region Pays de la Loire mit der Hauptstadt Nantes-Atlantique und den Städten bzw. Orten, die an den beprobten Salinenfeldern (mit * markiert) gelegen sind.

Bei den Meerwassersalinen bei La Baule („Marais Salants“) handelt es sich um die am nördlichsten gelegenen Meerwassersalinen Europas (Stand: 1989). Im Vergleich zu vielen anderen Salinen liegen die Marais Salants nicht in einem ariden Gebiet mit hohen Temperaturen und intensiver Insolation, sondern in gemäßigten Breiten mit einer Durchschnittstemperatur von 11 bis 12 °C und einem jährlichen Niederschlag von 800 bis 900 mm. Die Salzernte beschränkt sich daher auf 3 Monate im Jahr (Juni bis August). In den Wintermonaten wird das Salzwasser der Salinenbecken durch Niederschläge stark verdünnt und die Becken durch die Salinenarbeiter von Mikrobenmatten und Schlick gereinigt. Die Salinen sind somit durch diurnale Veränderungen vieler Parameter charakterisiert (Giani et al., 1989).

Die Entnahme von insgesamt 12 Sedimentproben mit darüberstehendem Wasser erfolgte am 16. und 17.09.1999. Die Zeit der Salzernte war bereits vorbei, die Becken waren aber noch nicht gereinigt worden. In der Tabelle 17 sind die wichtigsten physiko-chemischen Merkmale

der Standorte zusammengefasst und die Lebendzellzahlen in den verschiedenen Proben angegeben.

Tab. 17A-B: Physiko-chemische Charakteristika der Standorte und der Sedimentproben aus den Salinenfeldern bei La Baule (Frankreich) und Lebendzellzahlen der Proben.

* die Angaben in () geben die NaCl-Konzentration [%] und den pH-Wert des Mediums an. Bei fehlenden Angaben über den pH-Wert betrug dieser pH 8,0.

A

Parameter	Probenstandorte (Abkürzung)					
	Kristallisations-becken (B1)	äußeres Vorbecken (B2)	äußeres Vorbecken (B3)	äußeres Vorbecken (B4)	Kristallisations-becken (B5)	äußeres Vorbecken (B6)
Datum	16.09.1999	16.09.1999	16.09.1999	16.09.1999	16.09.1999	17.09.1999
Standort-beschreibung	Sedimentoberfläche rot-orange, darunter grau-beige bis dunkelgrau, sehr weicher feiner Schlick, 4 cm Wasser über dem Sediment, leicht schaumige Oberfläche	Sedimentoberfläche grau-grün-beige, 1 mm darunter tief schwarz, 2 cm Wasser über dem Sediment, sehr schaumige Oberfläche	braun-beige-blaues, leicht schaumiges Sediment, darunter schwarze, feste Substanz mit großen Biomasse-Stückchen und Fasern	lehmig, Sedimentoberfläche hellgrau bis anthrazit, je tiefer desto dunkler, 10 cm Wasser über dem Sediment	Auskristallisier-tes Salz auf orange-rosa Sediment, 1 mm darunter grau, 4 cm Wasser über feinem Sediment	0,5 cm Wasser über dem Sediment (Schichtung rot, ocker, hell- dann dunkelgrau, tiefer im Sediment grün, darunter schwarz), H_2S-Geruch
Lufttemp. [°C]	20,2	20,3	20,7	20,7	20,7	21,1
Wassertemp. [°C]	20,5	18,8	19,6	18,6	21,3	20,8
pH bei Probe-nahme (Papier)	7	8,5	8	8	7	8
pH (Elektrode)	6,92	8,18	7,68	7,57	6,84	7,98
Salinität [%]	30	8,5	9,5	8	35,5	11
Lebend-zellzahlen [CFU · ml^{-1}] auf SML*	$2 \cdot 10^6$ (20%) $2 \cdot 10^5$ (20%, pH 9,5) $4 \cdot 10^4$ (30%)	$5 \cdot 10^6$ (12%) $5 \cdot 10^5$ (12%, pH 9,5) 10^6 (20%) 10^4 (20%, pH 9,5)	$5 \cdot 10^6$ (12%) 10^5 (12%, pH 9,5) 10^6 (20%) $6 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5)	$2 \cdot 10^6$ (12%) $4 \cdot 10^4$ (12%, pH 9,5) $7 \cdot 10^5$ (20%) $5 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5)	$3 \cdot 10^4$ (20%) $7 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5) $2 \cdot 10^4$ (30%)	$5 \cdot 10^6$ (12%) 10^5 (12%, pH 9,5) $7 \cdot 10^5$ (20%) $4 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5)

B

Parameter	Probenstandorte (Abkürzung)					
	Kristallisations-becken (B7)	äußeres Vorbecken (B8)	Kristallisations-becken (B9)	äußeres Vorbecken (B10)	Kristallisations-becken (B11)	äußeres Vorbecken (B12)
Datum	17.09.99	17.09.99	17.09.99	17.09.99	17.09.99	17.09.99
Bemerkungen	10 cm Wasser (orange, trüb) über dem Sediment (beige, darunter grau-schwarz) auskristallisiertes Salz	Sehr lockerer Untergrund, kurz unter der Sediment-oberfläche schwarz, klares Wasser	Wasser orange-beige, Sediment beige, 1 mm unter der Sediment-oberfläche grau bis schwarz	feste Cyanobakterien-matten, Schichtung gut zu erkennen, 3 cm klares Wasser über braun-beige-grün-gelbem Sediment, darunter schwarz, Sedimentoberfläche zeigt fädige Organis-menstrukturen	5 cm Wasser (orange-rosa und trüb) über beige-hellgrauem Sediment (teilweise sehr flockig)	3 cm Wasser (klar, leicht schaumig) über Sediment (locker, grün, beige, braun, darunter schwarz) Wachstumsringe in Cyanobakterien-matten zu erkennen
Lufttemp. [°C]	21,1	22,3	22,4	19,6	19,9	20,5
Wassertemp. [°C]	22,8	24,9	26,4	22,8	25,8	22,7
pH bei Probe-nahme (Papier)	7	8	7	8	7	8,5
pH (Elektrode)	6,63	8,19	6,99	8,65	6,72	8,15
Salinität [%]	30	8	30,5	6,5	30	6
Lebend-zellzahlen [CFU · ml^{-1}] auf SML*	$5 \cdot 10^5$ (20%) 10^4 (20%, pH 9,5) 10^4 (30%)	$8 \cdot 10^5$ (12%) $3 \cdot 10^5$ (12%, pH 9,5) $5 \cdot 10^5$ (20%) $5 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5)	10^5 (20%) $8 \cdot 10^3$ (20%, pH 9,5) $2 \cdot 10^5$ (30%)	$8 \cdot 10^5$ (12%) $2 \cdot 10^5$ (12%, pH 9,5) 10^5 (20%) 10^4 (20%, pH 9,5)	$3 \cdot 10^5$ (20%) $8 \cdot 10^4$ (20%, pH 9,5) $2 \cdot 10^5$ (30%)	10^6 (12%) 10^5 (12%, pH 9,5) $6 \cdot 10^4$ (20%) $5 \cdot 10^2$ (20%, pH 9,5)

Die Proben wurden aus 5 Beckensystemen entnommen, die zur Salzgewinnung genutzt worden waren: B1 – 2, B3 – 5, B6 – 7, B8 – 9 und B10 – 12. Die Wetterbedingungen waren zu der Zeit wechselhaft mit Temperaturen zwischen 20 und 22 °C. Die Wassertemperaturen in den beprobten Salinenbecken reichten von 18,6 bis 26,4 °C. Die im Labor gemessenen pH-Werte zwischen 6,63 und 8,65 wichen von den Bestimmungen im Feld meist leicht nach unten ab, wobei wegen der Ungenauigkeit der Bestimmung im Feld nicht zu beurteilen ist, ob eine pH-Verschiebung der Proben während der Standzeit von Entnahme bis zur Weiterverarbeitung stattgefunden hat. Die Salinität der Proben reichte von 6 bis 35,5% (s. Abb. 20).

Auf SML konnten Lebendzellzahlen zwischen $5 \cdot 10^2$ und $5 \cdot 10^6$ CFU $\cdot$ ml^{-1} nachgewiesen werden (s. Abb. 21). Im Durchschnitt war die Keimzahl 10 mal höher als in den Lanzarote-Proben (vergl. Abb. 12).

3.2.1 Abhängigkeit des pH-Werts von der Salinität der Standorte

Wie für die Standorte auf Lanzarote konnte auch in den Salinen bei La Baule ein Zusammenhang zwischen der Salinität und dem pH-Wert herausgestellt werden. Beide Parameter sind in Abbildung 20 dargestellt und die Standorte in zwei verschiedene Habitattypen eingeteilt worden.

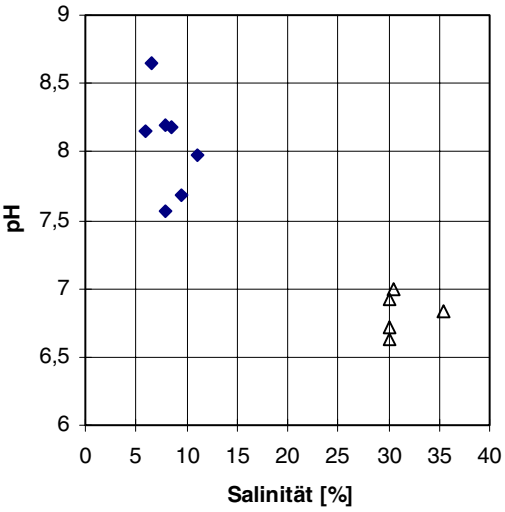

Abb. 20: pH-Werte der beprobten Standorte (La Baule) in Abhängigkeit von der Salinität bei Unterscheidung der Standorte nach Farbe.
Δ Standorte mit Rotfärbung
♦ Standorte mit Grün-braun-Färbung

Aus der Abbildung 20 ist für La Baule eine stärkere Separierung in zwei Habitattypen zu erkennen als für die Lanzarote-Probenstandorte (Abb. 11). Grün-braun-gefärbte Vorbecken mit niedriger bis mittlerer Salinität (6 – 11%) und alkalischem Milieu (pH 7,57 – 8,65) konnten von rot-orange oder rosa gefärbten Kristallisationsbecken mit hohem Salzgehalt (30 – 36%) und saurem bis neutralem Milieu (pH 6,63 – 6,99) unterschieden werden. In den Proben aus den Kristallisationsbecken der Salinen bei La Baule war im Vergleich zu Proben mit hoher Salinität aus Lanzarote ein niedrigerer pH-Wert vorzufinden (pH 6,63 – 6,99 im Vergleich zu 7,28 – 7,62). Die beprobten Vorbecken der Salinen bei La Baule zeigten einen breiteren pH-Bereich auf als vergleichbare Probenstandorte auf Lanzarote (pH 7,57 – 8,65 im Vergleich zu 7,94 – 8,24). Ein Standort mit mittlerer Salinität zwischen 11 und 30% befand sich nicht unter den Beprobungen aus La Baule.

3.2.2 Erweiterung der Bakterien-Stammsammlung

Die Isolate wurden hinsichtlich 5 verschiedener extrazellulärer Enzyme getestet. Zusätzlich zu den schon bei den Lanzarote-Isolaten durchgeführten Tests auf Nucleasen und Proteasen wurde die Bildung von Amylasen und Esterasen geprüft. Es wurden im Unterschied zu den Lanzarote-Proben (s. Kapitel 3.1.2) alle Isolate mit unterschiedlicher Morphologie in die Stammsammlung aufgenommen, mit der Möglichkeit, diese Stämme – unabhängig davon, ob die bis dahin untersuchten Enzyme gebildet wurden oder nicht – später noch auf die Sekretion anderer noch nicht getesteter Enzyme hin zu prüfen. Die Inkubationszeit der Organismen auf verfestigten Medien betrug wie auch bei den Lanzarote-Proben 5 Tage bis 5 Wochen. Insgesamt wurden 626 Stämme aus La Baule in die Stammsammlung aufgenommen.

3.2.3 Lebendzellzahlen auf SML

Die Proben aus den Salinen bei La Baule wurden ebenfalls auf Medien mit im Vergleich zum Standort ähnlicher Salzkonzentration ausplattiert. Material mit einer Salinität von 6 bis 11% wurde SML mit 12% NaCl und Material mit 30 bis 35,5% Salinität wurde SML mit 30% NaCl zugeordnet. Obwohl Salinitäten im mittleren Bereich zwischen 11 und 30% fehlten, wurden alle Proben zusätzlich auf 20% NaCl (pH 8,0 und 9,5) ausplattiert. Die Lebendzellzahlen der Proben (CFU · ml^{-1}) sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Standortsalinitäten sind der Legende zu entnehmen.

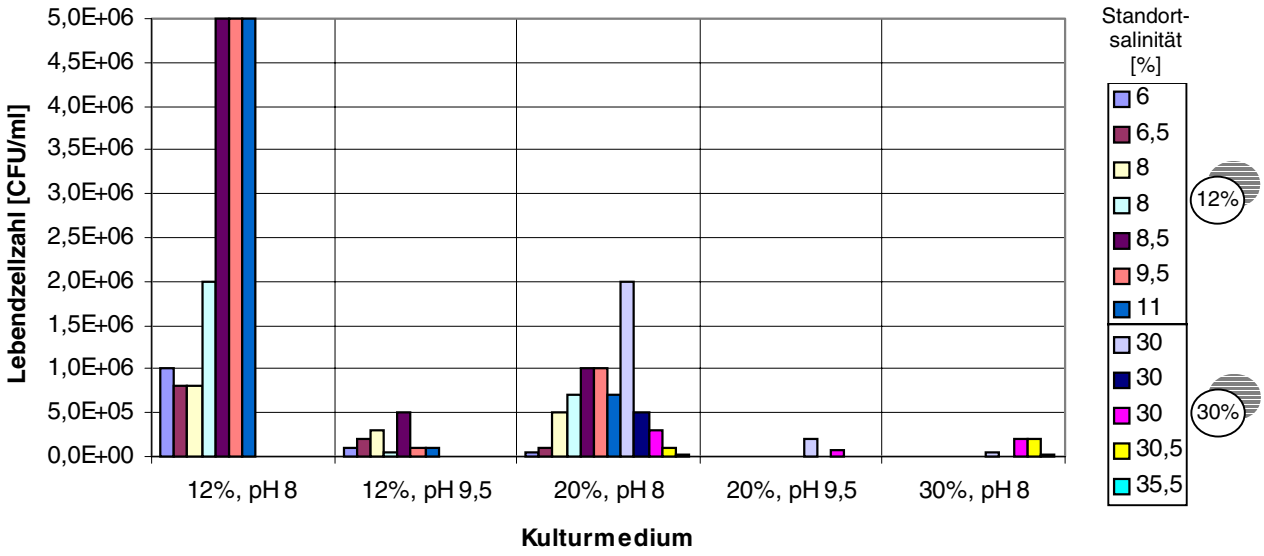

Abb. 21: Lebendzellzahlen (CFU · ml^{-1}) der La Baule-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert und der NaCl-Konz. des SML (12%, pH 8 steht für SML mit einer NaCl-Konzentration von 12% und einem pH-Wert von 8,0). Die Säulen stellen von links nach rechts die Standorte mit aufsteigender Salinität dar. Proben mit einer Salinität von 6 bis 11% wurden auf SML mit 12% NaCl (pH 8,0 und 9,5) und Proben mit 30 bis 35,5% Salinität auf SML mit 30% NaCl (pH 8,0) ausplattiert. Weiterhin wurde die Lebendkeimzahl aller Proben auf 20% NaCl bestimmt. Die Standortgruppen sind in der Legende dargestellt.

Insgesamt konnten Lebendkeimzahlen bis max. $5 \cdot 10^6$ pro ml festgestellt werden. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnte die Tendenz beobachtet werden, dass die Keimzahlen in Standortgruppen mit niedriger Salinität größer waren als in solchen mit hohem NaCl-Gehalt und dass in gleichem Probenmaterial auf SML mit niedrigerem Salzgehalt mehr Keime zum Wachstum angeregt wurden als mit hohem Salzgehalt. So wurden in der Gruppe mit niedrigem Salzgehalt auf 12% NaCl durchschnittlich $2,8 \cdot 10^6$ CFU · ml^{-1}, auf 20% NaCl in der gleichen Probe aber nur noch $5,8 \cdot 10^5$ CFU · ml^{-1} nachgewiesen. Und in der hochsalinen Gruppe konnten auf 20% NaCl mit durchschnittlich $5,9 \cdot 10^5$ CFU · ml^{-1} mehr Keime zum Wachstum gebracht werden als auf 30% NaCl mit nur $9,4 \cdot 10^4$ CFU · ml^{-1}.

Auf Medium mit einem pH-Wert von 9,5 wurde nur ein Bruchteil der Keimzahlen ermittelt wie auf solchem mit pH 8,0. Proben, die bei gleicher Salzkonzentration sowohl auf pH 8 als auch auf pH 9,5 ausplattiert wurden, ergaben durchschnittlich 16 mal höhere Keimzahlen auf pH 8 als auf pH 9,5.

Weiterhin wurde, wie auch bei den Proben von Lanzarote (Abb.12), deutlich, dass die nachgewiesenen Lebendzellzahlen um so höher waren, je geringer der Unterschied der Salz-Konzentration des Mediums zur Salinität des Standortes war. Höhere pH-Werte und Salzkonzentrationen im Kulturmedium im Vergleich zu den Standortbedingungen wirkten sich wachstumshemmend aus.

3.2.4 Kolonie-morphologische Merkmale

Wie die Lanzarote-Isolate wurden auch die weiterzuverarbeitenden La Baule-Kolonien nach dem ersten Ausplattieren aufgrund ihrer unterschiedlichen Erscheinungsformen ausgewählt, hinsichtlich extrazellulärer Enzyme getestet, vereinzelt, erneut auf Enzymproduktion getestet und dann in Flüssigmedium nach Zugabe von Glycerin bei -80 °C gelagert. Die Anzahl der Stämme, die bei den gewählten NaCl-Konzentrationen und pH-Werten isoliert und in der Stammsammlung hinterlegt wurden, ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab. 18: Anzahl der in die Stammsammlung aufgenommenen Isolate aus La Baule in Abhängigkeit von den Isolationsbedingungen (SML mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen [%] und pH-Werten).

Parameter	Salinität und pH-Wert des SML				
	12% / pH 8	12% / pH 9,5	20% / pH 8	20% / pH 9,5	30% / pH 8
Anzahl der Isolate	135	95	220	109	67

3.2.5 Zell-morphologische Merkmale

Im Vergleich zu den Lanzarote-Isolaten traten bei allen Salzgehalten vermehrt die Koloniefarben orange und rosa auf, was mit der Färbung der Kristallisationsbecken der beprobten Salzgärten korreliert. Es waren wie auch bei den Lanzarote-Stämmen keine rotgefärbten Kolonien auf 12 oder 20% NaCl zu beobachten, sondern nur auf 30% NaCl. Eine Ausnahme bildete der rote Stamm B1/29 (Nr. 951), der auf 20% NaCl, pH 9,5 herangezogen wurde. Der gleiche sehr charakteristische Morphotyp konnte ebenfalls auf 30% NaCl pH 8,0 isoliert werden (B5/61, Nr. 977). Die Beschreibungen der einzelnen Stämme sind im Anhang in Tabelle B zu finden.

3.2.6 Extrazelluläre Enzymproduktion auf festen Nährböden

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Plattentests hinsichtlich der Bildung extrazellulärer Enzyme innerhalb der Isolationsgruppen der La Baule-Proben und vergleichend zu den Lanzarote-Ergebnissen dargestellt.

3.2.6.1 Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen den Lanzarote- und La Baule-Isolaten

In der folgenden Tabelle 19 sind die prozentualen Anteile der extrazellulären Enzym-produzenten gegenübergestellt. Die Anzahl der getesteten Isolate aus La Baule (651) weicht um die Anzahl der während der Isolation nicht wieder angewachsenen Stämme von der Anzahl der letztendlich eingefrorenen Isolate (626) ab. Die Ergebnisse der extrazellulären

Enzymproduzenten beziehen sich im Fall von La Baule nur auf diese eingefrorenen Stämme (grau hinterlegt), während in die Statistik der Lanzarote-Proben alle getesteten Stämme einbezogen wurden (ebenfalls grau hinterlegt). Die Tabelle 20 enthält die Anzahl und den Anteil an Enzym-positiven Isolaten in Abhängigkeit zur Anzahl der Enzymaktivitäten.

Parameter	Anteil bzw. Anzahl der Stämme	
	aus Lanzarote	aus La Baule
DNase-Aktivität	18%	19%
RNase-Aktivität	33%	64%
Protease-Aktivität	33%	21%
Esterase-Aktivität	n.u.	41%
Amylase-Aktivität	n.u.	39%
mind. eine der untersuchten Enzymaktivitäten	51%	83%
keine der untersuchten Enzymaktivitäten	49%	17%
Anzahl getesteter Isolate	671	651
Anzahl eingefrorener Isolate	396	626

Tab. 19: Vergleich der Anteile an Enzym-Produzenten von Lanzarote mit denen aus den Salinen bei La Baule. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Anzahl der getesteten Isolate aus Lanzarote bzw. auf die Anzahl der eingefrorenen Isolate aus La Baule (grau hinterlegt).

n.u.: nicht untersucht

DNase-Produzenten konnten mit 18 bzw. 19% zu annähernd gleichen Anteilen in dem Probenmaterial von Lanzarote und La Baule nachgewiesen werden. Die Anteile der Protease-Produzenten unterscheidet sich in beiden Standorten mit 33 bzw. 21% wesentlich stärker. Auffälliger ist aber der Unterschied bei der Bildung der extrazellulären RNase. In den La Baule-Proben war der Anteil mit 64% fast doppelt so hoch wie in den Lanzarote-Proben (33%). Stämme mit mindestens einem der getesteten extrazellulären Enzyme waren mit 83% im Fall der La Baule-Proben häufiger nachzuweisen als im Fall der Lanzarote-Proben (51%), da die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von extrazellulären Enzymen mit der Anzahl der verschiedenen untersuchten Aktivitäten steigt.

Tab. 20: Vergleich der Anzahl bzw. Anteile der Enzym-positiven Isolate aus Lanzarote und La Baule in Abhängigkeit zur Anzahl der Enzymaktivitäten ermittelt durch Plattentests (DNase, RNase, Protease, Esterase, Amylase).

Anzahl der Enzym-Aktivitäten	Enzym-positive Lanzarote-Isolate		Enzym-positive La Baule-Isolate	
	Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
1 Aktivität	188	55%	171	33%
2 Aktivitäten	89	26%	180	35%
3 Aktivitäten	66	19%	72	14%
4 Aktivitäten	n.u.	n.u.	62	12%
5 Aktivitäten	n.u.	n.u.	30	6%
Σ	343	100%	515	100%

n.u. = nicht untersucht

Von 343 Isolaten aus Lanzarote mit extrazellulärer Enzymaktivität zeigten 55% nur eine Aktivität, 26% zwei und 19% alle drei getesteten Aktivitäten (DNase, RNase und Protease). Durch die höhere Anzahl der verschiedenen Enzymtypen bei den La Baule-Proben verteilen sich die Anteile der Enzym-positiven Isolate auf 5 statt 3 Posten und zeigen für 1 und 2 sowie 3 und 4 Aktivitäten mit 33 und 35% bzw. 14 und 12% annähernd gleich hohe Anteile. Bei 6% der positiven Stämme konnten alle getesteten Enzyme nachgewiesen werden.

3.2.6.2 Enzymproduktion in Abhängigkeit von den Isolationsbedingungen

Wie in den Abbildungen 14 bis 16 (Lanzarote-Proben) wird in den Abbildungen 22 bis 26 für die La Baule-Proben ebenfalls die Häufigkeit der extrazellulären Enzymproduktion auf die Anzahl der unter den verschiedenen Isolationsbedingungen getesteten Isolate dargestellt (Anzahl der getesteten Isolate pro Isolationsgruppe s. Tabelle 18). Zusätzlich zur Nuclease- und Protease-Aktivität ist auch die Verteilung der Esterase- und Amylase-Aktivität aufgeführt (Abb. 25 und 26).

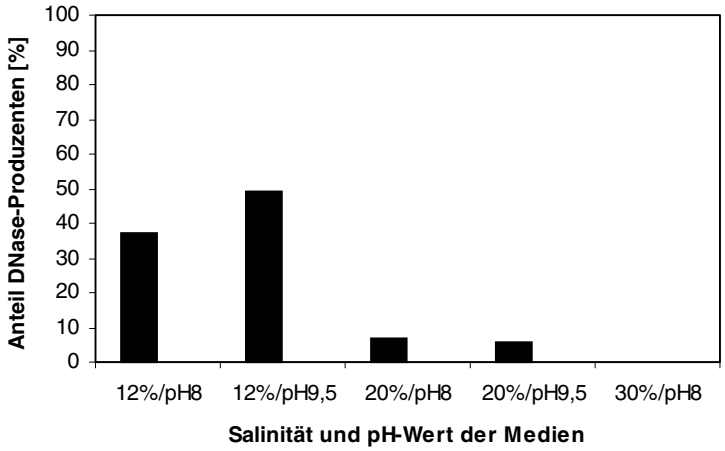

Abb. 22: Anteil [%] der La Baule-Isolate mit extrazellulärer DNase-Aktivität bezogen auf die Anzahl der Isolate, die bei den angegebenen Salz- und pH-Bedingungen isoliert und getestet wurden. Isolations-gruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Die Verteilung der DNase-produzierenden Stämme aus den La Baule-Proben unterscheidet sich sehr von der der Lanzarote-Proben (Abb. 14). Die DNase-Aktivität beschränkt sich bei den La Baule-Isolaten weitgehend auf Vertreter mit Wachstum bei niedrigen Salzkonzentrationen (12%). Der höchste Produzenten-Anteil konnte mit 49% in der 12% NaCl-Isolierungsgruppe bei einem pH-Wert von 9,5 nachgewiesen werden. Aufgrund der höheren Isolatezahlen auf 12% NaCl pH 8,0 war die Anzahl der Enzymproduzenten auf diesem Medium zwar höher, der Anteil betrug aber nur 37%. Unter den Stämmen, die auf 20% NaCl isoliert wurden, fanden sich nur noch wenige Vertreter mit DNase-Aktivität, wobei der pH-Wert des Mediums eine untergeordnete Rolle zu spielen schien, da zwischen pH 8 und 9,5 nur geringe Anteils-Unterschiede herrschten (6 bzw. 7%). Auf 30% NaCl konnten keine DNase-Produzenten nachgewiesen werden.

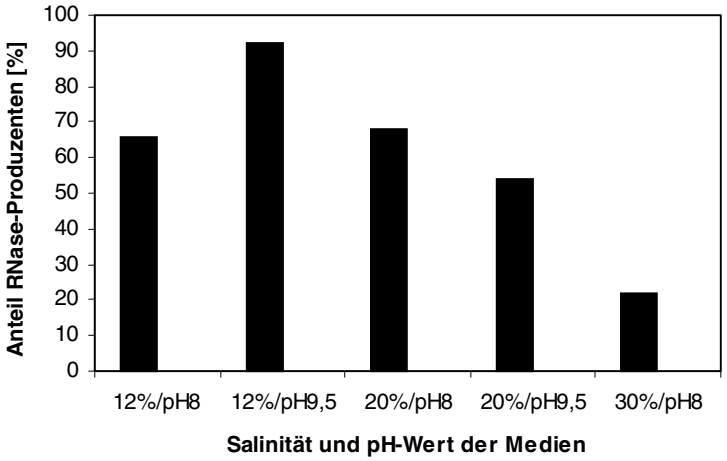

Abb. 23: Anteil [%] der La Baule-Isolate mit extrazellulärer RNase-Aktivität bezogen auf die Anzahl der Isolate, die bei den angegebenen Salz- und pH-Bedingungen isoliert und getestet wurden. Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

RNase-Produzenten waren in den Salinen von La Baule am häufigsten zu finden (insgesamt 64% der isolierten Stämme, s. Tab. 19). Innerhalb der Gruppen mit verschiedenen Salz- und pH-Bedingungen reichten die Anteile der Produzenten von 22% auf hochsalinem Medium bis 92% auf 12% NaCl bei pH 9,5. Auf 12 und 20% NaCl bei einem pH-Wert von 8,0 konnten vergleichbare Anteile von 66 bzw. 68% beobachtet werden. Der zweitniedrigste Produzenten-Anteil wurde auf 20% NaCl pH 9,5 nachgewiesen.

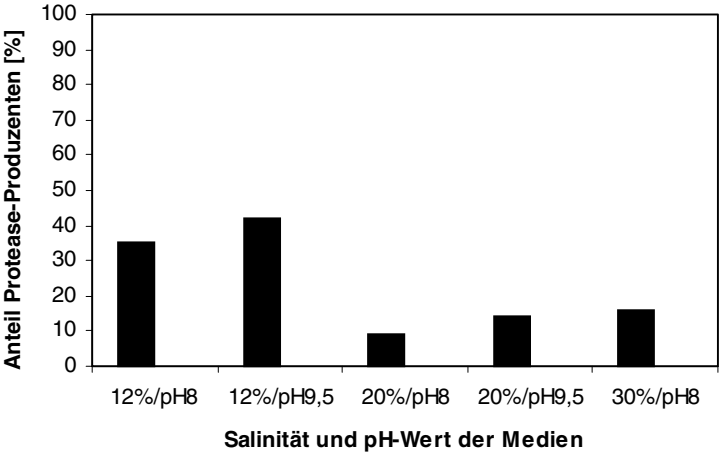

Abb. 24: Anteil [%] der La Baule-Isolate mit extrazellulärer Protease-Aktivität bezogen auf die Anzahl der Isolate, die bei den angegebenen Salz- und pH-Bedingungen isoliert und getestet wurden. Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Der größte Anteil an Protease-produzierenden Isolaten konnte mit 35 bzw. 42% in der Gruppe auf 12% NaCl (pH 8 bzw. 9,5) nachgewiesen werden. Bei höheren Salzkonzentrationen wurden nahezu gleichniedrige Anteile ermittelt mit 9 und 14% auf 20% NaCl, pH 8 bzw. 9,5 und 16% auf hochsalinem Medium. Ein höherer pH-Wert des Mediums von 9,5 im Vergleich zu 8,0 hatte wie auch bei den anderen Tests auf extrazelluläre Enzyme einen positiven Einfluss auf die Fähigkeit zur Enzymbildung (Ausnahme: RNase, DNase und Amylase bei jeweils 20% NaCl).

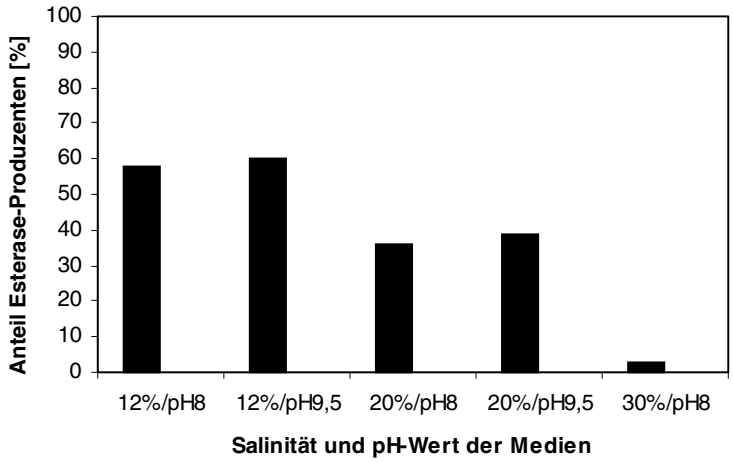

Abb. 25: Anteil [%] der La Baule-Isolate mit extrazellulärer Esterase-Aktivität bezogen auf die Anzahl der Isolate, die bei den angegebenen Salz- und pH-Bedingungen isoliert und getestet wurden. Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Die Esterase-Produzenten waren bevorzugt unter niedrigen bis mittleren Salzkonzentrationen zu finden. Die Produzenten-Verteilung war vergleichbar mit der der DNase-Produzenten, wobei der Anteil der Isolate mit Esterase-Aktivität im Allgemeinen höher war. Während auf 12% NaCl noch über die Hälfte der Stämme Tween zersetzen konnte, waren auf 20% NaCl nur ca. 40% dazu in der Lage und auf 30% NaCl konnten dies nur 2 von 67 Isolaten (3%). Der pH-Wert des Testmediums hatte auf die Ergebnisse wenig Einfluss.

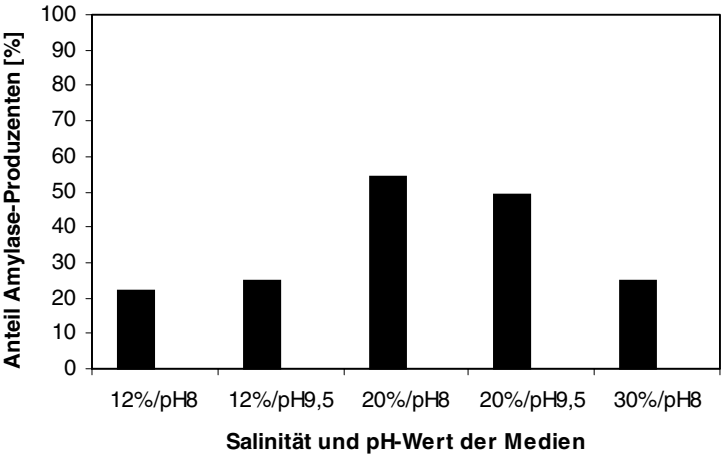

Abb. 26: Anteil [%] der La Baule-Isolate mit extrazellulärer Amylase-Aktivität bezogen auf die Anzahl der Isolate, die bei den angegebenen Salz- und pH-Bedingungen isoliert und getestet wurden. Isolationsgruppen-Beispiel: 12%/pH8 steht für SML mit 12% NaCl und einem pH-Wert von 8,0.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen getesteten Enzymtypen, bei denen die höchsten Anteile an Produzenten bei niedriger Salzkonzentration von 12% zu finden waren, ist der Anteil der Amylase-Produzenten auf 12% NaCl mit 22 und 25% niedriger als auf SML mit 20% NaCl (54 und 49%) und vergleichbar hoch wie auf 30% NaCl (25%). Der Einfluss der pH-Werte wurde bereits im Zusammenhang mit den Proteasen dargestellt.

3.2.6.3 Einfluss der Standort-pH-Werte auf die Ausbeute an alkaliphilen und alkalitoleranten Isolaten

Während in den Lanzarote-Proben Enzymproduzenten auf pH 9,5 nur an 7 Probenstandorten – in Vorflutern mit pH-Werten zwischen 7,31 und 8,24 – gefunden werden konnten, war dies in den Proben aller Standorte aus den Salinen bei La Baule möglich. Die Abbildung 27 zeigt die Enzymproduzenten aus La Baule bezogen auf die pH-Werte der Umweltproben.

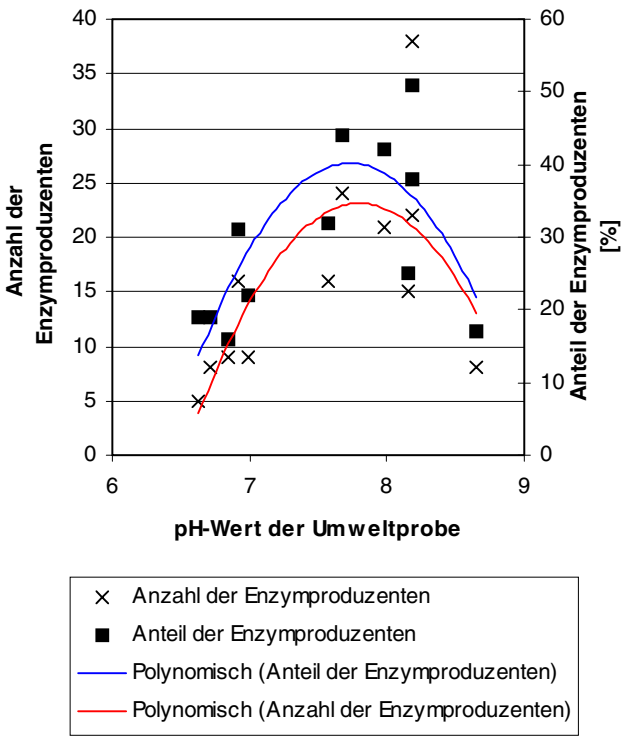

Abb. 27: Anzahl der alkaliphilien und alkalitoleranten Enzymproduzenten auf SML (pH 9,5) und Anteil dieser Stämme bezogen auf die Gesamtproduzentenzahlen von einem Standort in Abhängigkeit vom pH-Wert der ursprünglichen Umweltproben aus den Salinen bei La Baule. Die Trendlinie wurde angegeben.

Aus der Darstellung ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl und dem Anteil an Enzymproduzenten mit den Standort-pH-Werten. Für pH-Werte unter 8 konnte allgemein festgestellt werden, dass sowohl die absolute Anzahl als auch der Anteil an alkaliphilen und -toleranten Enzym-produzenten im Vergleich zu den Produzenten auf pH 8,0 mit dem pH-Wert der Umweltprobe stieg. Aus Umweltproben mit pH-Werten über 8 war hingegen eher eine Abnahme an isolierbaren Alkaliphilen und -toleranten zu verzeichnen, wobei der Anteil unter allen Isolaten überproportional zur Anzahl sank. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Angaben aus der Literatur, wonach der Anteil an Alkaliphilen und -toleranten mit dem pH-Wert der Umweltprobe steigt (s. Kapitel 4.3). Ein solcher Zusammenhang wie bei den La Baule-Proben konnte anhand der Isolate aus Lanzarote nicht beobachtet werden.

3.2.6.4 Ausbeute an Enzymproduzenten in Abhängigkeit von der Standortsalinität

Die folgende Abbildung 28 zeigt, wie auch die Abbildung 18 für die Lanzarote-Standorte, unter welchen Standortsalinitätsbedingungen besonders gute Ausbeuten an Enzymproduzenten erzielt wurden. Dazu wurde die Anzahl der jeweiligen Enzymproduzenten (DNase, RNase, Protease, Esterase und Amylase) gegen die Salinität der Ursprungsprobe aufgetragen, aus der die Isolate gewonnen wurden. 79 RNase-Produzenten aus Standort B8 mit einer Salinität von 8% wurden in die Abbildung nicht einbezogen, um die Darstellbarkeit der anderen Werte zu gewährleisten.

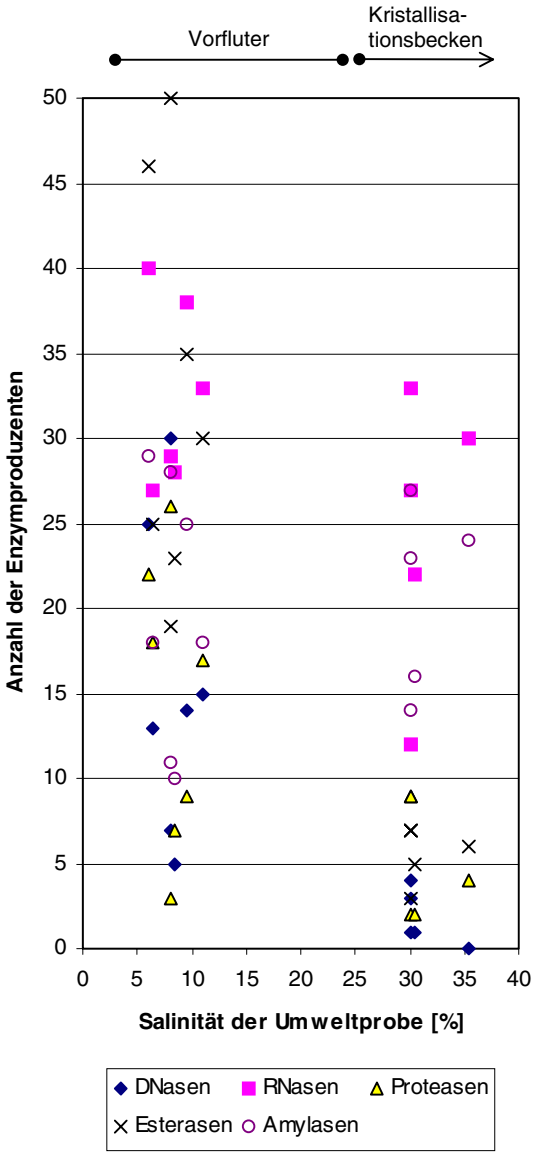

Abb. 28: Anzahl der Enzymproduzenten aus den jeweiligen La Baule-Proben (Probenahmestandorte s. Tab. 17) unterteilt in DNasen, RNasen, Proteasen, Esterasen und Amylasen in Abhängigkeit von der Standort-Salinität.

Während Isolate mit DNase-, RNase-, Protease- und Esterase-Aktivität in Kristallisationsbecken seltener vorkamen als in Vorflutern, war die Anzahl isolierbarer Amylase-Produzenten an Standorten beider Habitate nahezu gleich. Die Anzahl der DNase-Produzenten lag wie auch im Fall von Lanzarote unterhalb des Durchschnitts. Während in Kristallisationsbecken von Lanzarote Protease-Produzenten dominierten, konnten in denen von La Baule vermehrt RNase- und Amylase-Produzenten gefunden werden. Esterase-Produzenten zeigten den größten Unterschied in der Anzahl zwischen Vorflutern und Kristallisationsbecken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Lanzarote-Isolate kann hier aufgrund der Polarität der Standortsalinitäten der La Baule-Proben kein Verlauf der Anzahl an Enzymproduzenten dargestellt werden. Das Vorhandensein einer „Produzenten-Lücke“ an La Baule-Standorten mit Salinitäten zwischen 24 und 30% erscheint aber möglich.

3.3 *In-vitro*-DNase-Test

Während in den Kapiteln 3.1 und 3.2 die Ergebnisse des Screenens auf die verschiedenen Enzyme im Plattentest zusammen mit weiteren ökologischen Parametern dargestellt wurden, zeigen die folgenden Kapitel 3.3 und 3.4 die Ergebnisse der physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen an ausgewählten Nucleasen.

3.3.1 Versuchsbedingungen und Zuverlässigkeit der Ergebnisse im Messbereich

Erstes Ziel war es, eine günstige Substratmenge in einem gut zu handhabbaren Ansatzvolumen bei angepasster Testdauer für den Nachweis der DNase-Aktivität in Kulturüberständen zu finden. Bei einer großen Anzahl an Testansätzen ist es von Vorteil, die Substrat- und Probenmengen gering zu halten, was zum einen kostengünstig, zum anderen aber auch einfacher zu handhaben ist, da die Tests z.B., wie hier geschehen, in Mikrotiterplatten angesetzt werden können. Als Substrat für den DNase-Aktivitäts-Nachweis wurde ein Plasmid verwendet.

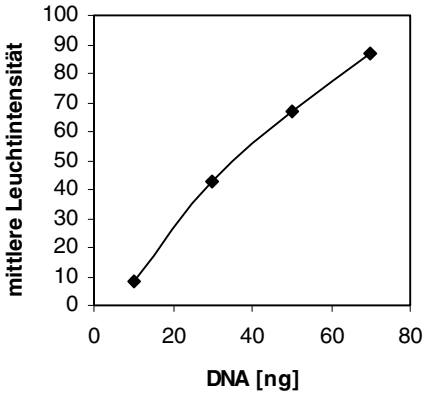

Abb. 29: DNA-Eichreihe mit 4 Messpunkten. Leuchtintensität von pBluescript im Agarosegel, ausgewertet mit E.A.S.Y. Win 32, Integrationswert bei der Datenspeicherung = 90. Das Hintergrundleuchten konnte beim Einsatz von Plasmid-DNA (ohne Kulturüberstand) vernachlässigt werden.

Um festzustellen, ob die Abnahme der Leuchtintensität der gefärbten DNA bei den eingesetzten Mengen (Ausgangsmenge 70 ng pBluescript) im Agarosegel linear verläuft, wurden 4 Messpunkte mit Plasmid-DNA unterschiedlicher Mengen aufgenommen (Abb. 29). Das PC-Auswertungsprogramm E.A.S.Y. Win 32 gibt die Helligkeitswerte der Banden als „mittlere Intensitätshöhe“ an. Außerdem wurden Zeitversuche im Bereich von 3 bis 60 min mit Kulturüberständen von EG2S/2 angelegt, mit denen eine günstige Testdauer ermittelt wurde (hier nicht dargestellt). Die Leuchtintensität der in dem *In-vitro*-DNase-Test zum Einsatz kommenden DNA-Mengen verhielt sich sowohl bei rein visueller Auswertung als auch durch die Auswertung mit dem E.A.S.Y. Win 32 (bei gleichbleibendem Integrationswert von 90) nahezu linear. Der Bereich eignete sich daher für die Quantifizierung der DNase-Aktivität in Kulturüberständen. Weiterhin zeigte sich, dass eine Versuchsdauer von 30 min in einem Ansatzvolumen von 20 µl günstig war (Daten nicht dargestellt), da die Verwendung geringer DNA-Mengen und damit DNA-Lösungsvolumina den Einsatz von höheren Salzkonzentrationen ermöglichte.

Oberhalb von 70 ng DNA pro Ansatz wurde die Bestimmung der Substratmenge ungenau, da die Leuchtintensität im Gel nicht mehr linear verlief. Zusätzlich musste bei gleichbleibender Versuchsdauer die Menge an Kulturüberstand erhöht werden, um auswertbare

Abbauergebnisse zu erhalten, was zu einem vermehrten Hintergrundleuchten im Agarosegel führte (Eigenleuchten des Kulturüberstands). Eine Verlängerung der Testdauer war nicht erstrebenswert. Bei Einsatz geringerer Substratmengen als die oben angegebenen war der Messbereich zwischen maximalem Leuchten und der Nachweisgrenze zu gering, so dass keine Abstufungen in der Aktivitätsleistung ermittelt werden konnten.

3.3.2 Vorcharakterisierung der extrazellulären DNasen aus Kulturüberständen von neun Lanzarote-Isolaten

3.3.2.1 Auswahlkriterien für die Isolate

Um möglichst verschiedene DNase-Produzenten zu erfassen, erfolgte die Auswahl der Stämme, deren DNase-Aktivität mit Hilfe des *In-vitro*-DNase-Tests vorcharakterisiert werden sollte, nach folgenden Kriterien:

- Es wurden halophile Stämme mit gutem Wachstum auf 12% NaCl ausgewählt, um eine schnelle Gewinnung von Probenmaterial zu gewährleisten (~10^9 Zellen · ml^{-1} nach max. 5 Tagen).
- Die Stämme gehörten verschiedenen ARDRA-Gruppen[1] an, so dass eine große Wahrscheinlichkeit bestand, Vertreter eventuell unterschiedlicher Gattungen zu testen. Eine Ausnahme bildeten zwei Stämme mit relativ ähnlichen Eigenschaften und auch der gleichen ARDRA-Gruppenzugehörigkeit (ARDRA-Gruppe 1, Stamm-Nr. 135 und 137). Diese wurden ausgewählt, um festzustellen, ob ihre DNase-Aktivität trotz der anderen Ähnlichkeiten Unterschiede aufwies.
- Es wurden sowohl Isolate mit ausschließlich DNase-Aktivität als auch mit DNase- und RNase-Aktivität im Plattentest ausgewählt.

Die ausgewählten Stämme sind in Tabelle 21 aufgeführt. Es ist nur ein Stamm mit einem Wachstumsoptimum von 20% NaCl enthalten, da andere Stämme mit gleichem oder höherem Salzoptimum und passenden weiteren Anforderungen zu langsames Wachstum zeigten. Aus der in Tabelle 21 dargestellten Gruppe wurden nach der Vorcharakterisierung nochmals zwei Stämme mit den geeignetesten Merkmalen bezüglich einer biotechnologischen Anwendung für weiterführende Untersuchungen herausgegriffen (s. Kapitel 3.3.3).

[1] Taxonomische Untersuchungen der Lanzarote-Stämme durch Vogt (2000). Es wurden 232 der hier isolierten 396 Stämme (217 Enzym-positiv, 15 Enzym-negativ) anhand von Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), Floureszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und Gram-Färbung in 26 ARDRA-Gruppen (212 Bacteria) und eine Archaea-Gruppe (20 Stämme) eingeteilt. Tabelle A im Anhang enthält die Ergebnisse der Untersuchungen.

Tab. 21: Stammbezeichnung und Charakteristika der neun Stämme, die für Voruntersuchungen ihrer extrazellulären DNase-Aktivität ausgewählt wurden. Die Ergebnisse der Spalten 3 bis 5 stammen aus Untersuchungen durch Vogt (2000).

Stamm-bezeichnung (laufende Nr.)	Auswahlkriterien						
	Isolations-bedingungen NaCl [%] / pH	Wachstums-bereich [% NaCl] [1]	Wachstums-optimum [% NaCl]	ARDRA-Gruppe [2]	DNase-Aktivität	RNase-Aktivität	Protease-Aktivität
SJ5Ü/4 (12)	12/8	2,9 – 12	2,9 – 12	2	+	+	+
SJ5S/6 (14)	12/8	0,5 – 20	12	n.b.	+	+	+
EG2S/2 (50)	12/8	0,5 – 20	2,9	9	+	+	+
SJ1/4 (67)	12/8	12 – 20	20	n.b.	+	-	-
SJ6/2 (77)	12/8	2,9 – 12	2,9	5	+	+	-
EG2S/11 (135)	12/9,5	2,9 – 20	12	1	+	-	-
EG2S/14 (137)	12/9,5	2,9 – 20	12	1	+	-	-
SJ6S/18 (152)	12/9,5	2,9 – 20	2,9 – 12	13	+	+	+
SJ6Ü/21 (249)	12/8	2,9 – 20	12	6	+	+	+

[1] Bei den Angaben von z.B. „Wachstumsbereich 2,9 – 20%“ bedeutet dies ein erkennbares Wachstum der Organismen innerhalb von 4 Wochen auf verfestigtem SML mit der angegebenen NaCl-Konzentration. Getestet wurden die Konzentrationen 0,5%, 2,9%, 12%, 20% und 30% NaCl.

[2] Die verschiedenen ARDRA-Gruppen der Lanzarote-Isolate wurden von 1 bis 26 durchnummeriert (Vogt, 2000).

3.3.2.2 Merkmale der extrazellulären DNase-Aktivitäten

Um Proben mit konzentrierterer DNase-Aktivität zu erhalten als dies mit Flüssigkulturen möglich war, wurden in den Vorversuchen Kulturüberstände aus festen Medien gewonnen. Die Inkubationszeit der Kulturen betrug zuvor drei Tage.

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung, Charakteristika bezüglich der Salztoleranz (getestet wurden 0, 0,75, 1,75, 2,75, 3,75 und 4,75 M NaCl), der pH-Toleranz (Testbereich: pH 3,8 – 12,1) sowie die mögliche Notwendigkeit der Anwesenheit von Cofaktoren (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) für die Aktivität angegeben. Die Abbildungen 30 und 31 zeigen exemplarisch die Detaildaten der Salztoleranz und der pH-Abhängigkeit vom Stamm SJ6Ü/21. Ebenfalls aufgeführt ist der Radius des Hydrolyse-Hofes im Verhältnis zum Radius des Wuchsflecks als mögliches relatives Maß für die Aktivität eines Stammes auf DNA-Methylgrün-Agar. Abbildung 32 zeigt die dazugehörige Test-Platte. In Abbildung 33 erfolgt durch grafische Darstellung der Vergleich der Ergebnisse des Plattentests mit denen aus dem *In-vitro*-DNase-Test.

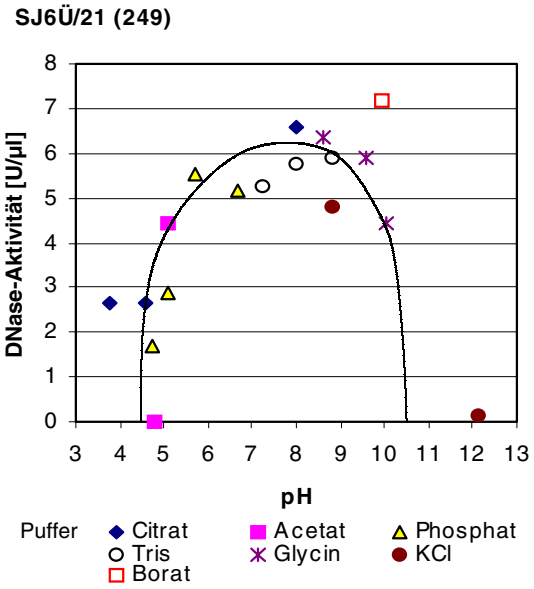

Abb. 30: DNase-Aktivität des SJ6Ü/21-Kulturüberstands im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit vom pH-Wert im Testansatz unter Verwendung verschiedener Puffersysteme (hier mit Kurzbezeichnungen, s. 2.3.7.2). Der Ansatz enthielt 12% NaCl. [—] Trendlinie.

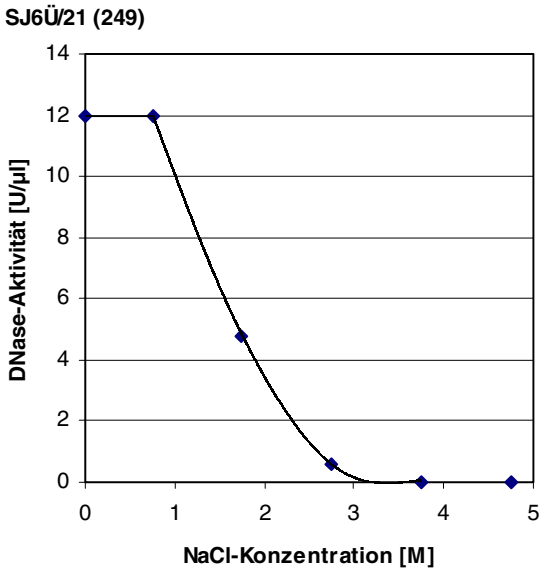

Abb. 31: DNase-Aktivität des SJ6Ü/21-Kulturüberstands im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Testansatz bei pH 8,0.

Tab. 22: Ergebnisse der Vorcharakterisierung der extrazellulären DNase-Aktivität ausgewählter Stämme durch den *In-vitro*-DNase-Test in Kulturüberständen aus festen Medien. Bestimmt wurden die pH- und NaCl-Toleranz der DNase und das Bedürfnis für die beiden möglichen Cofaktoren Magnesium und Calcium für die Enzymaktivität. Standardbedingungen waren: 12% NaCl, pH 8,0, 15 mM $MgCl_2$ und 1 mM $CaCl_2$. Zusätzlich ist die Hofgröße im DNA-Methylgrün-Plattentest aufgeführt (Verhältnis von Hofradius zum Radius des Wuchsflecks, s. a. Abb. 32).

Stamm-bezeichnung (laufende Nr.)	Merkmale der extrazellulären DNase-Aktivität					
	Aktivität [U·µl^{-1}]	Hofgröße[A]	pH-Toleranz	pH-Optimum	NaCl-Toleranz	Mögliche Cofaktoren
SJ6Ü/21 (249)	140	2,5	4,5 – 10	7 – 8	Zunehmende Hemmung mit steigender NaCl-Konz.	Mg
SJ5Ü/4 (12)	100	1,6	5,5 – 9,5	7 – 8	– „ –	Mg
SJ5S/6 (14)	100	1,4	4,5 – 9,5	7 – 8	– „ –	Mg
SJ6S/18 (152)	80	1,2	4 – 10	7 – 8	– „ –	Mg
EG2S/14 (137)	50	1,2	4,5 – 10	n.e.	– „ –	weder Mg noch Ca
SJ6/2 (77)	10	~1	n.e.	n.e.	– „ –	weder Mg noch Ca
EG2S/11 (135)	80	1,4	n.e.	n.e.	2 Maxima und evt. 2 Enzyme	weder Mg noch Ca
SJ1/4 (67)	80	1,5	3 – 11	7	Zunehmende Aktivität mit steigender NaCl-Konz.	Mg
EG2S/2 (50)	240	2,8	5 – 10	7	Keine Hemmung, evtl. 2 Maxima und 2 Enzyme	Ca (Mg)

n.e. = kein eindeutiges Ergebnis

[A] Hofgröße = Verhältnis von Hofradius zu Wuchsfleckradius

Auf der in Abbildung 32 dargestellten DNA-Methylgrün-Agarplatte wurden alle Stämme (mit ihrer laufenden Nummer bezeichnet) aufgetragen, die in die Vorcharakterisierung ihrer extrazellulären Nuclease einbezogen wurden. Zu erkennen sind die Wuchsflecken der Bakterien und die sie umgebenden gelben Hydrolyse-Höfe nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C. Der Stamm Nr. 72 wurde in die Tests nicht einbezogen, da sein Wachstum – wie hier auch zu sehen ist – im Vergleich zu dem der anderen Stämme zu langsam verlief.

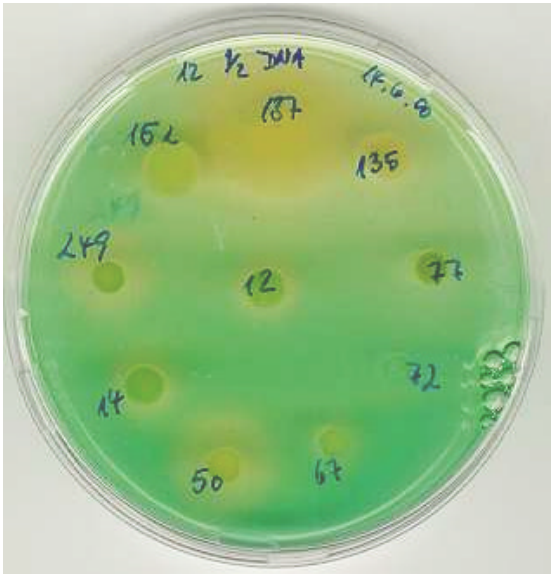

Abb. 32: DNA-Methylgrün-Agarplatte (12% NaCl, pH 8) mit den Stämmen, die für eine Vorcharakterisierung mittels *In-vitro*-DNase-Test ausgewählt wurden. Die Bakterien wurden als Flüssigkultur auf die Platte aufgetropft (5 µl) und drei Tage bei 30 °C inkubiert. DNase-Aktivität ist anhand der gelben Hydrolyse-Höfe zu erkennen.

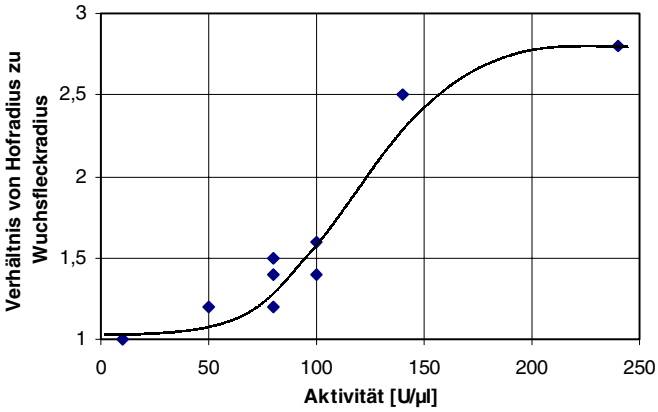

Abb. 33: Extrazelluläre DNase-Aktivität von 9 Stämmen aus Lanzarote: Verhältnis des Hofradius zum Wuchsfleckradius auf DNA-Methylgrün-Agar in Abhängigkeit von der Aktivität der Kulturüberstände im *In-vitro*-DNase-Test.

EG2S/14 (Nr. 137) zeigte im Verlauf der Vereinzelung zunehmendes Schwärmverhalten, wodurch er sich deutlich vom sonst ähnlichen Stamm EG2S/11 (Nr. 135; Übereinstimmung in Bezug auf Isolationsbedingungen, Produktion extrazellulärer Enzyme, Zellmorphologie, ARDRA-Gruppierung und Salztoleranz) unterschied. Die schnellste und auch größte Hofbildung im Vergleich zum Wuchsfleck konnte bei EG2S/2 (Nr. 50) beobachtet werden.

Die Kulturüberstände der verschiedenen Stämme aus festen Medien zeigten im *In-vitro*-DNase-Test Aktivitäten zwischen 10 (SJ6/2, Nr. 77) und 240 U/µl (EG2S/2, Nr. 50). Es ist auffällig, dass die Größe der Quotienten aus Hofradius und Wuchsfleckradius mit den Ergebnissen aus dem *In-vitro*-DNase-Test korrelierten (Abb. 33) – je größer der Quotient war, um so höher war die DNase-Aktivität im *In-vitro*-Test. Der Bereich linearer Korrelation lag zwischen 80 und 140 U · μl^{-1} Aktivität bzw. zwischen 1,3 und 2,3 cm Hofradius. In diesem Bereich war der Plattentest somit nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ aussagekräftig.

Die pH-Bereiche, in denen die DNasen Aktivität zeigten (hier definiert als mindestens 10% Restaktivität vom Optimum), reichten bei den untersuchten Kulturüberständen meist von ca. pH 4 bis pH 10 mit Aktivitätsoptima im neutralen bis schwach-alkalischen Milieu (Tab. 22).

Lediglich die DNase aus Stamm SJ1/4 (Nr.67) schien eine breitere pH-Toleranz von 3 bis 11 zu besitzen. Das Optimum lag aber ebenfalls im neutralen Bereich. Ein alkaliphiles Enzym war somit nicht in der Auswahl vertreten. Die Bestimmung der pH-Toleranzen und -Optima für die Stämme SJ6/2 (Nr. 77), EG2S/11 (Nr. 135) und EG2S/14 (Nr. 137) war nicht möglich, da die Ergebnisse der verschiedenen Puffersysteme keinen einheitlichen Kurvenverlauf zeigten. Denkbar ist die Anwesenheit mehrer Nucleasen mit unterschiedlichen pH-Toleranzen in einem Kulturüberstand.

Die Bestimmung der NaCl-Toleranz bzw. -Abhängigkeit ergab in den meisten Kulturüberständen eine Hemmung der Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration. Bei Stamm EG2S/2 (Nr. 50) und EG2S/11 (Nr. 135) war in diesem Test das Verhalten gegenüber NaCl nicht eindeutig zu ermitteln, da zwei Aktivitätsmaxima auszumachen waren; ein Maximum in Ansätzen ohne Salzzugabe und eines bei Salzkonzentrationen von 4,75 bzw. 3,75 M NaCl. Dies könnte bedeuten, dass sich mehr als nur eine Nuclease mit unterschiedlichen Salztoleranzen bzw. -abhängigkeiten in dem jeweiligen Kulturüberstand befanden. Die Aktivität des Stamms SJ1/4 (Nr. 67) konnte mit zunehmender NaCl-Konzentration gesteigert werden. Dieses Enzym schien somit eine salzabhängige Aktivität zu besitzen. Auffällig war die Korrelation dieser Ergebnisse mit den Salztoleranzen bzw. -optima des Wachstums der Stämme. Der einzige Grenzlinien-extrem-halophile Stamm der Auswahl (SJ1/4, Nr. 67) zeigte auf 12% NaCl eine salzabhängige DNase-Aktivität. Die restlichen schwach bis moderat halophilen Stämme mit Toleranz gegenüber niedrigen Salzkonzentrationen, produzierten salzempfindliche DNasen oder sekretierten, so ist zu vermuten, sowohl salzempfindliche als auch salzabhängige Nucleasen.

Möglicher Cofaktor – getestet wurden Calcium und Magnesium, die bei bisher bekannten Nucleasen am häufigsten als Cofaktoren wirken – schien in den meisten Fällen Mg^{2+} zu sein. In drei Fällen konnte keine eindeutige Aussage über eine Ca- oder Mg-abhängige Aktivität gemacht werden: für SJ6/2 (Nr. 77), EG2S/11 (Nr. 135) und EG2S/14 (Nr. 137). Nur in einem Fall, im Kulturüberstand von EG2S/2 (Nr. 50), konnte eine Ca-abhängige DNase-Aktivität ermittelt werden. So zeigte das Enzym nur noch ca. 25% der Ausgangsaktivität (15 von 60 U), wenn in den Reaktionsansatz kein zusätzliches Ca^{2+} gegeben wurde. Mg^{2+} hatte aber ebenfalls einen positiven, wenn auch geringeren, Effekt auf die Aktivität. Ein nicht aussagekräftiges Ergebnis im Fall der oben genannten Stämme kann darin begründet sein, dass entweder die Enzymaktivität nicht von diesen Elementen abhängig war oder dass Spuren der Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen bereits ausreichten, um einen normalen Substratumsatz zu gewährleisten. Diese Spuren stammten aus den im Test eingesetzten Kulturüberständen, da kein gereinigtes Enzym eingesetzt wurde. Bei einem Einsatz von 2 µl unverdünntem Kulturüberstand betrug die Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Konzentration mindestens 5 bzw. 13 µM. Dazu kamen vermutlich noch weitaus größere Mengen dieser Elemente aus den Casamino Acids, dem Hefeextrakt und dem Speisesalz.

Die auffälligsten Ergebnisse dieser Vorcharakterisierung (in der Tabelle grau hinterlegt) konnten bei den Stämmen EG2S/2 (hohe Enzymaktivität und Ca-Abhängigkeit) und SJ1/4 (breiter pH-Toleranzbereich und Salzabhängigkeit) gefunden werden. Hohe DNase-Aktivität ist ein Hinweis auf entweder hohe Umsatzraten des Enzyms oder auf hohe Produktionsraten durch den Stamm EG2S/2, beides wünschenswerte Eigenschaften, die die Produktions- bzw. Anwendungskosten eines Enzyms mindern. Die Ca-Abhängigkeit der EG2S/2-Nuclease ist ein Hinweis darauf, dass es sich um ein Enzym mit besonderem Reaktionsmechanismus handeln könnte, da die meisten Nucleasen auf Mg^{2+} als Cofaktor angewiesen sind. Ein breiter pH-Toleranzbereich und eine Salzabhängigkeit der SJ1/4-Nuclease sind Eigenschaften wie sie im Anwendungsziel benötigt werden (s. Kapitel 4.6.3.2). Aufgrund dieser Merkmale wurden beide Vertreter für weiterführende Untersuchungen ihrer extrazellulären Nucleasen ausgewählt.

3.3.3 Weiterführende Untersuchungen zur extrazellulären DNase-Aktivität der Stämme EG2S/2 und SJ1/4

3.3.3.1 Morphologische und physiologische Merkmale der Stämme

Zur Charakterisierung der beiden Stämme wurden zusätzlich zur morphologischen Beschreibung und den Tests auf extrazelluläre Enzyme einige allgemeine Analysen zu physiologischen Merkmalen der Organismen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 23 dargestellt sind. Die Abbildungen 34 und 35 zeigen die mikroskopischen Aufnahmen der Isolate im Phasenkontrast.

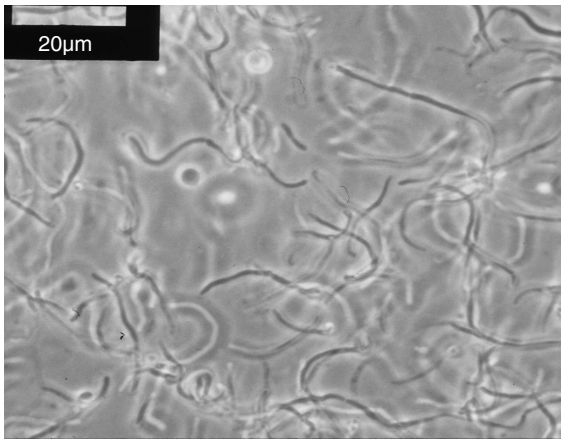

Abb. 34: Lichtmikroskopisches Bild der Flüssigkultur von EG2S/2 in SML mit 12% NaCl, pH 8,0. (Phasenkontrast, 1.000fache Vergrößerung)

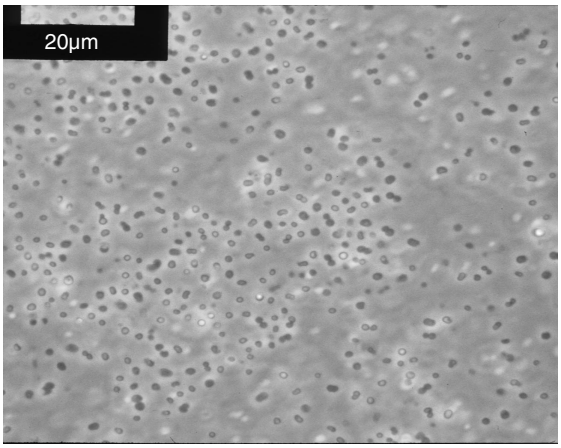

Abb. 35: Lichtmikroskopisches Bild der Flüssigkultur von SJ1/4 in SML mit 12% NaCl, pH 8,0. (Phasenkontrast, 1.000fache Vergrößerung)

Tab. 23: Morphologische und physiologische Merkmale der Stämme EG2S/2 und SJ1/4.

Getestete Merkmale	Stamm	
	EG2S/2 (Nr. 50)	SJ1/4 (Nr. 67)
Koloniemorphologie	Weiß, flach, am Rand aufgewölbt, glatt, glänzend, glatter Rand	Gelb-beige, glatt, glatter Rand, glänzend
Zellmorphologie	Stäbchen unterschiedlicher Größe, teilweise in Ketten und mit terminalen Aufblähungen (mögl. Sporen)	Kokken, Diplokokken oder sehr kurze Stäbchen, Ø ~ 1 µm
Gram-Färbung	+	–
L-Alanin-Aminopeptidase[a]	–	(+)
Salzabhängigkeit des Wachstums [% NaCl] (Optimum)[b]	0,5 – 20 (2,9)	12 – 20 (20)
DNase[c]	+	+
RNase[c]	+	–
Protease[c]	+	–
Esterase[c]	+	+
Lipase[c]	–	n.d.
Cytochrom-Oxidase[d]	+	–
Katalase[e]	+	+
Minimale Verdoppelungszeit	Ca. 1,5 h (in SML, 12% NaCl)	Ca. 6 h (in SML, 20% NaCl)
16S-rRNA-Gen-Teilsequenz-Identität[f]	99,6% zu *Halobacillus litoralis*	97,7% zu *Halomonas halmophila*

[a] Bactident® Aminopeptidase 113301, Diagnostica Merck.

[b] Untersuchung durch Vogt (2000), Test auf Wachstum innerhalb von 4 Wochen auf verfestigtem SML mit 0,5%, 2,9%, 12%, 20% und 30% NaCl.

[c] ermittelt durch Plattentest

[d] Bactident® Oxidase 113300, Diagnostica Merck

[e] Zugabe von 3%iger H_2O_2-Lösung

[f] bestimmt durch Teilsequenzierung des 16S-rRNA-Gens und anschließendem Alignment (BLAST). 527 von 531 identische Basen bei EG2S/2 und 127 von 130 Basenidentität bei SJ1/4 (s. Kapitel 3.1.8).

Da eine Gram-Färbung bei einigen Stämmen zur Lyse der Zellen geführt hatte, sollte zur Bestätigung des Gram-negativen Verhaltens des Stamms SJ1/4 zusätzlich der Merck-Schnelltest auf die Aktivität der L-Alanin-Aminopeptidase durchgeführt werden. Entgegen der Angaben vom Hersteller wurde der Test statt nach 30 min nochmals nach 5 h ausgewertet, wo sich bei Stamm SJ1/4 ein positives Ergebnis zeigte. Das Testergebnis von EG2S/2 war zu diesem Zeitpunkt immer noch negativ.

3.3.3.2 Enzymbildung in Abhängigkeit von der Kulturzeit

Es sollte der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die Überstände der beiden Kulturen die höchste DNase-Aktivität aufwiesen, um für spätere Versuche die maximal mögliche Enzymmenge ernten zu können. Um die Proben untereinander vergleichen zu können, wurde die Spezifische Aktivität mit Hilfe der Bestimmung des Gesamtzellproteins ermittelt. Die Ergebnisse der DNase-Aktivitätsmessung in Abhängigkeit von der Kulturzeit und der Biomasseproduktion sind in den folgenden Graphen in Abbildung 36 dargestellt.

Die Kulturen wurden wegen der einfacheren Prozedur mit Zellmaterial von festen Nährböden beimpft, die bei 5 °C bis zu 4 Monate gelagert werden konnten. Dies hatte eine um 2 Tage verlängerte lag-Phase im Vergleich zu Ansätzen zur Folge, die mit einer bei 30 °C gezogenen Flüssigvorkultur in log-Phase beimpft wurden.

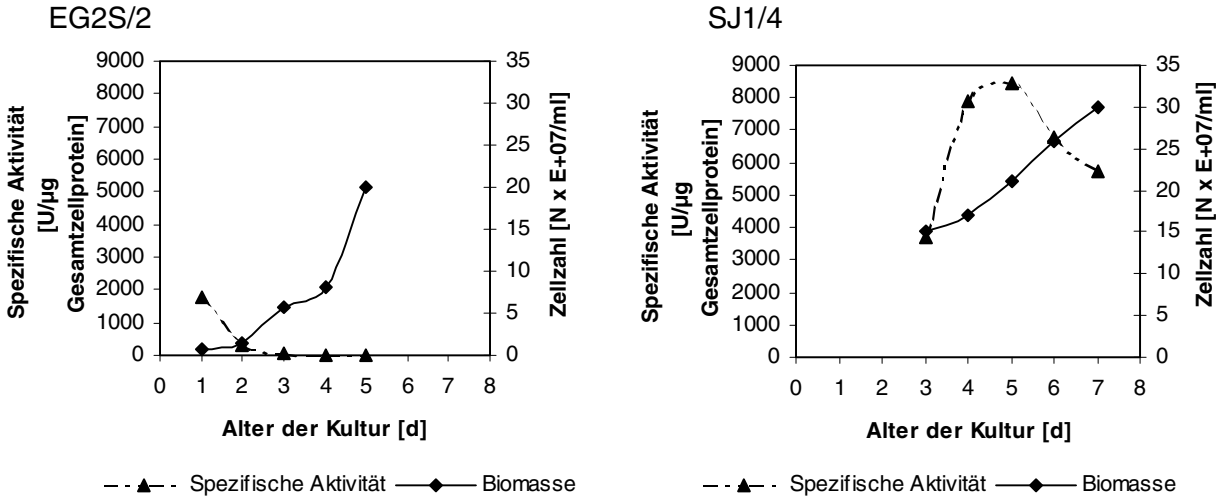

Abb. 36: Spezifische Aktivität (bezogen auf das Gesamtzellprotein) der Kulturüberstände aus Flüssigkulturen von Stamm EG2S/2 (mit 12% NaCl) und SJ1/4 (mit 20% NaCl) im *In-vitro*-DNase-Test im Vergleich zur Biomasse, dargestellt als Gesamtzellzahl der Kulturen in Abhängigkeit von der Kulturzeit.

Der zeitliche Verlauf der DNase-Aktivität ergab, dass beide Stämme in verschiedenen Wachstumsphasen die extrazellulären Enzyme ausschieden. Stamm EG2S/2 zeigte bereits in der lag-Phase eine höhere spezifische Aktivität als in anderen Wachstumsphasen. Bis zum 5. Versuchstag nahm die Aktivität dann kontinuierlich ab. Die Enzymsekretion bei Stamm SJ1/4 setzte erst später ein, so dass das Aktivitätsmaximum erst am 5. Tag erreicht wurde und bis zum 7. Tag unverändert blieb (Werte nicht dargestellt). Die spezifische Aktivität war daher zwischen dem 4. und 5. Tag in der exponentiellen Phase am höchsten. Die Aktivität im Kulturüberstand von Stamm EG2S/2 war geringer, wenn diese aus einer Flüssigkultur gewonnen wurde (ca. 24 U · μl^{-1}) statt aus festen Medien (ca. 240 U · μl^{-1}) (hier nicht dargestellt). SJ1/4 sekretierte hingegen im Vergleich zu ca. 80 U · μl^{-1} auf festen Medien in Flüssigmedium mehr Enzym (ca. 200 U · μl^{-1}). Allerdings zeigte sich im Laufe dieser Arbeit, dass die Enzymproduktion durch Stamm SJ1/4 rückläufig war. So betrug die durchschnittliche Aktivität in Kulturüberständen nach zwei Jahren Verwendung der eingefrorenen Charge aus der Stammsammlung nur noch 48 U · μl^{-1}.

3.3.3.3 Einfluss von Salz auf die DNase-Aktivität

Die Vorcharakterisierung hatte ergeben, dass die DNase-Aktivität der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 durch NaCl unterschiedlich beeinflusst wurde. Daher wurden die Versuchsbedingungen optimiert (Parallelansätze mit verschiedenen Verdünnungen der Kulturüberstände, um eine Erweiterung des Messbereichs zu erzielen) und die Enzymaktivität alternativ zu NaCl auch mit KCl getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 37 zusammengefasst.

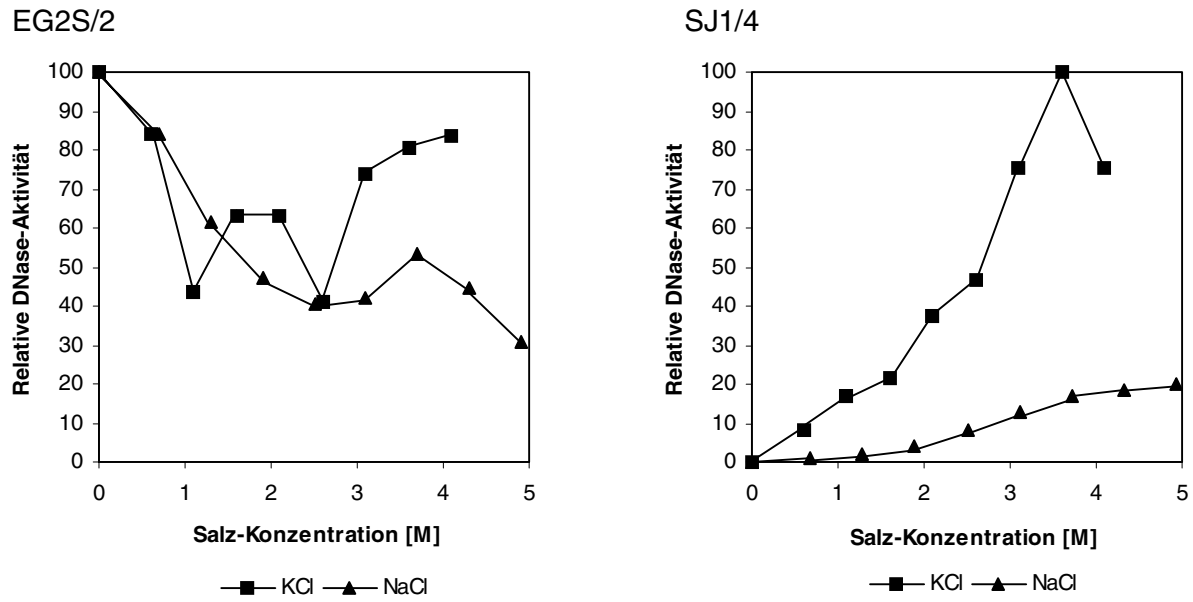

Abb. 37: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit von der eingesetzten Salzkonzentration (NaCl bzw. KCl). Die Ergebnisse setzen sich aus Versuchen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Kulturüberstände zusammen (15 – 80 U pro Ansatz).

Die Bestimmung der DNase-Aktivität bei verschiedenen NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen ergab für EG2S/2 zwei Optima für NaCl bei ca. 0 und 4 M und für KCl drei Optima bei ca. 0,2 und 4 M. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass mehr als nur eine Nuclease in den Kulturüberstand sekretiert wurde.

Für Stamm SJ1/4 kann anhand der Ergebnisse die Bildung einer salzabhängigen Nuclease angenommen werden, deren Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration in Form einer Sättigungskurve zunimmt. Die höchste Aktivität wurde daher bei Salzsättigung ermittelt. Das Aktivitätsmaximum in Anwesenheit von KCl konnte bei ca. 3,5 M festgestellt werden, wobei unter diesen Bedingungen ca. das 6fache der maximalen Aktivität wie unter NaCl-Einfluss messbar war. Bei Verwendung von KCl konnte somit eine höhere Aktivität der Nuclease von Stamm SJ1/4 erzielt werden als mit NaCl.

3.3.3.4 Einfluss chaotroper Agenzien auf die DNase-Aktivität

Salze wie NaCl und KCl wirken chaotrop und können Proteine denaturieren. Für eine spätere Anwendung der gesuchten Enzyme im Laborbetrieb kann der Einfluss von weiteren chaotropen Substanzen von Bedeutung sein. Zusätzlich getestet wurde daher der Einfluss der Salze Guanidin-Hydrochlorid und Guanidin-Thiocyanat (Abb. 38), die alternativ zu NaCl oder KCl eingesetzt wurden, sowie der Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS, Abb. 39), Triton X-100 und Tween 20 (Abb. 40) auf die DNase-Aktivität im *In-vitro*-DNase-Test. Die Tests mit den genannten Detergenzien wurden auf die Salzkonzentrationen von 12 bzw. 20% NaCl für EG2S/2 und SJ1/4 eingestellt. Im Fall des Tests mit SDS wurde die Benzonase® von Merck, Darmstadt, ebenfalls getestet (mit entsprechend niedriger Salzkonzentration nach Angaben des

Herstellers), da für das Verhalten der Benzonase in Anwesenheit von SDS keine vergleichbaren Daten vorlagen.

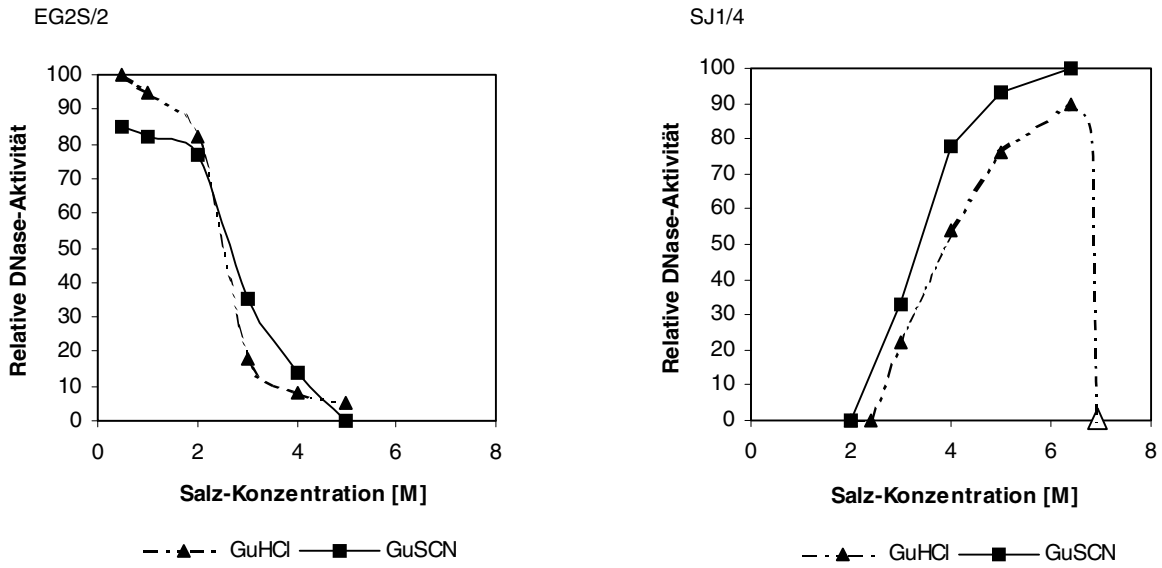

Abb. 38: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit von der Salz-Konzentration (Guanidin-Hydrochlorid/GuHCl und Guanidin-Thiocyanat/GuSCN). Die Testansätze wurden nicht zusätzlich mit NaCl oder KCl versetzt.

Δ ist das Ergebnis einer Protein-Fällung mit GuHCl (s. 3.4.3).

Die alternative Verwendung von GuHCl und GuSCN hatte im Vergleich zu NaCl oder KCl eine allgemein niedrigere Aktivität der Kulturüberstände zur Folge. Der maximale Abbau betrug bei beiden Stämmen nur ca. 65% der eingesetzten DNA, was auch durch Steigerung der Enzymmenge nicht überschritten wurde (eingesetzt wurden 10 bis 38 U pro Ansatz). Das Enzym von EG2S/2 tolerierte Guanidin-Salzkonzentrationen von bis zu 2 M mit eingeschränkter Aktivität (Aktivitätsminderung um bis zu 20% der Ausgangsaktivität bei 0,5 M Salz, Abb. 38). Bei weiter steigenden Konzentrationen sank die Aktivität stark ab, so dass bei 5 M Salz kaum noch bzw. keine Aktivität nachweisbar war. Die Nuclease von SJ1/4 zeigte wie auch bei NaCl und KCl eine Salzabhängigkeit. Unterhalb von 2 M fand kein nachweisbarer Substratumsatz statt. Das Aktivitätsmaximum wurde bei ca. 6 M GuHCl bzw. GuSCN erreicht. Bei Versuchen zur Aussalzung der DNase (s. Kapitel 3.4.3) konnte zudem festgestellt werden, dass ab 7 M GuHCl – dies ist die Konzentration, bei der die ersten Präzipitate im Kulturüberstand sichtbar wurden – weder im Pellet noch im Überstand Aktivität nachzuweisen war (Δ in Abb. 38; die Pellets wurden in 15% KCl, 1 mM $CaCl_2$, 15 mM $MgCl_2$, 20 mMTris/HCl, pH 8,0 gelöst). Auch eine Dialyse der Fraktionen über Nacht gegen den angegebenen Puffer brachte kein anderes Ergebnis. Es schien also eine Konzentrationsschwelle bezüglich der GuHCl- und vermutlich auch der GuSCN-Konzentration überschritten worden zu sein, ab der das Enzym irreversibel geschädigt wurde.

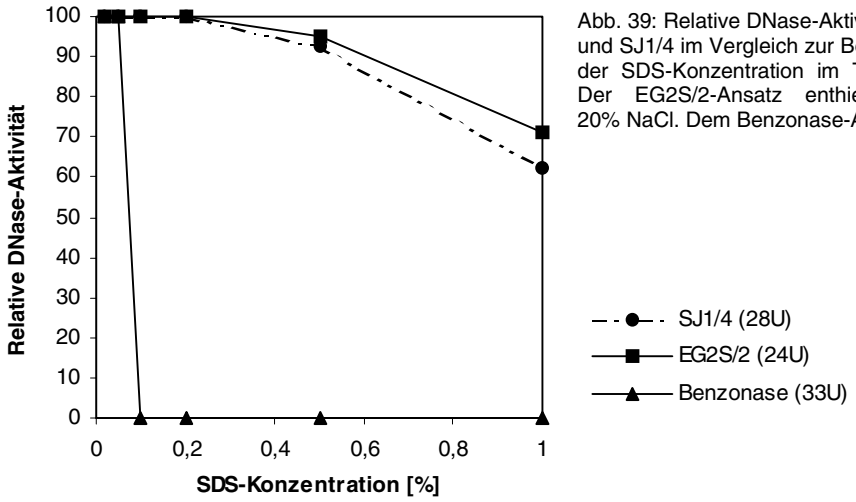

Abb. 39: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände von EG2S/2 und SJ1/4 im Vergleich zur Benzonase (Merck) in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration im Testansatz des *In-vitro*-DNase-Tests. Der EG2S/2-Ansatz enthielt 12% NaCl, der SJ1/4-Ansatz 20% NaCl. Dem Benzonase-Ansatz wurde kein NaCl zugesetzt.

Beide Nucleasen aus den getesteten Kulturüberständen zeigten wesentlich höhere Restaktivitäten in Anwesenheit von SDS als die Benzonase (Abb. 39). Bei Anwesenheit von 1% SDS wurde bei beiden neuen Enzymen noch ca. 65 bis 70% der Ausgangsaktivität nachgewiesen. Die Benzonase zeigte bereits bei 0,1% SDS keine messbare Aktivität mehr.

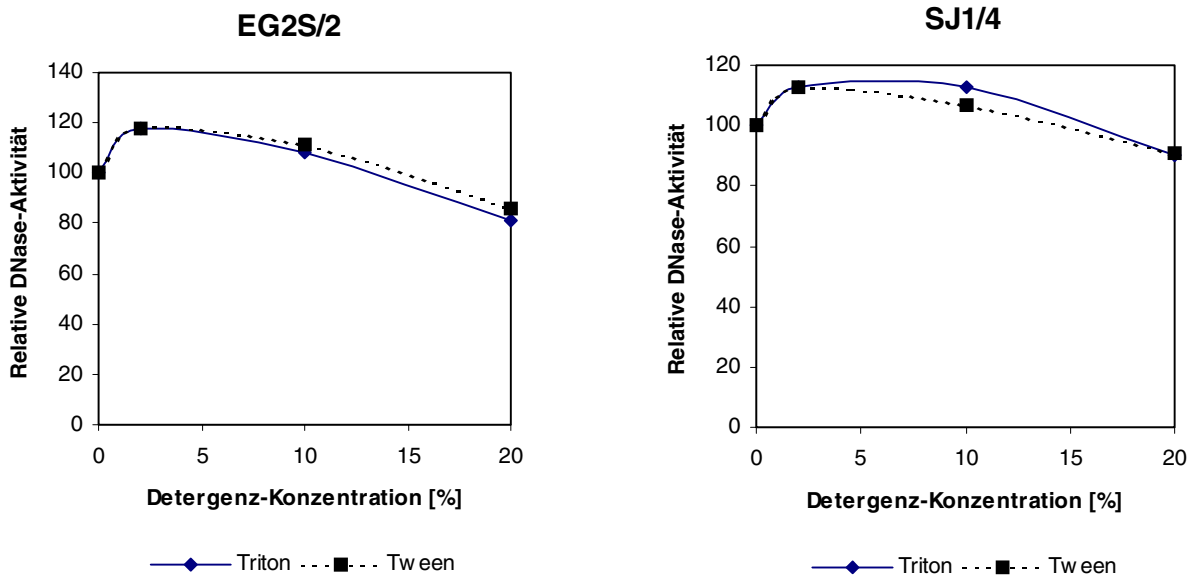

Abb. 40: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände von EG2S/2 und SJ1/4 im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit von der Detergens-Konzentration (Tween-20 bzw. Triton X-100) im Testansatz. Der EG2S/2-Ansatz enthielt 12% NaCl und 24 U, der SJ1/4-Ansatz 20% NaCl und 23 U.

In dem hier untersuchten Konzentrationsbereich von 0 bis 20% Triton X-100 bzw. Tween 20 (Abb. 40) waren kaum Unterschiede im Einfluss der verschiedenen Detergenzien auf die DNase-Aktivität zu verzeichnen. Bei Zugabe von bis zu 10% Detergens zum DNA-Verdau konnte festgestellt werden, dass daraus eine leichte Steigerung der Aktivität resultierte. Wurde die Detergens-Konzentration auf 20% erhöht, lag die erzielte Aktivität mit ca. 84% bei EG2S/2 und ca. 91% bei SJ1/4 nur wenig unterhalb der Ausgangsaktivität.

3.3.3.5 Einfluss der Temperatur auf die DNase-Aktivität

Für diese Bestimmung wurden ebenfalls mehrere Verdünnungsstufen der Kulturüberstände bei verschiedenen Temperaturen getestet. So wurden 20, 10 und 5U der Enzyme eingesetzt. Die nachstehende Abbildung 41 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse, die sich aus den maximalen Differenzen der Aktivitäten bei den getesteten Temperaturen (13, 22, 30, 40, 50, 60 °C) ergaben, im Vergleich zur Temperaturtoleranz der Benzonase, Merck.

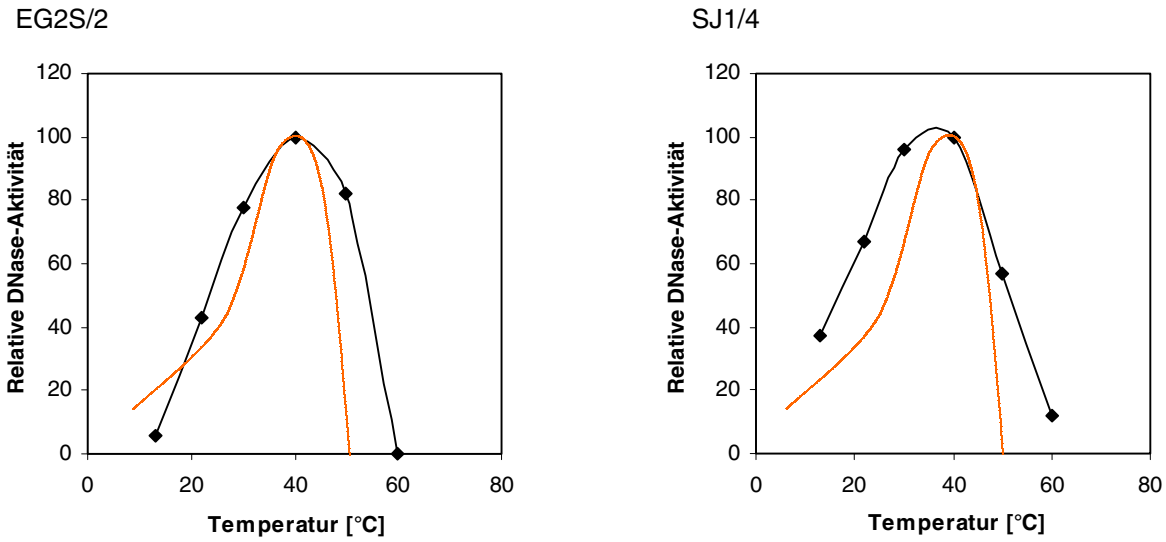

Abb. 41: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände von EG2S/2 und SJ1/4 im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit von der Temperatur im Testansatz. Die Ergebnisse wurden aus Messungen mit 5, 10 und 20 U zusammengesetzt, indem die maximale Differenz zwischen den Messpunkten bestimmt wurde. Der EG2S/2-Ansatz enthielt 12% NaCl und der SJ1/4-Ansatz 20% NaCl. Die Temperaturtoleranz der Benzonase (Produktinformation Merck, 1999; Eaves & Jeffries, 1963) wurde rot markiert.

Beide getesteten Enzyme zeigten Aktivität bei gemäßigten Temperaturen. Die Nuclease-Aktivität von EG2S/2 konnte zwischen 13 und 50 °C mit 6 und 82% der maximalen Aktivität, die bei ca. 40 °C lag, nachgewiesen werden (bei 60 °C konnte unter Einsatz von 20 U noch 15% Aktivität gemessen werden. Die Toleranzgrenze liegt daher wahrscheinlich etwas über 60 °C).

Das Enzym von SJ1/4 tolerierte ein breiteres Temperaturspektrum und zeigte sowohl bei 13 als auch bei 60 °C noch 37 bzw. 12% relative Aktivität. Das Aktivitätsoptimum lag zwischen ca. 35 und 40 °C.

SJ1/4 besaß eine höhere Rest-Aktivität bei niedrigen Temperaturen als die Benzonase, während die Nuclease von EG2S/2 kälteempfindlicher zu sein schien.

Für die obere Temperaturgrenze wird für die *Serratia marcescens*-Nuclease nach Eaves und Jeffries (1963) eine vollständige Inaktivierung innerhalb von 15 min bei 50 °C angegeben. Die EG2S/2-Nuclease zeigte demgegenüber bei einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C noch Aktivität. Die SJ1/4-Nuclease tolerierte mit einer Temperaturobergrenze von > 60 °C ein breiteres Temperaturspektrum als die Benzonase mit höheren Restaktivitäten bei nichtoptimalen Temperaturen.

3.3.3.6 Einfluss des pH-Werts auf die DNase-Aktivität

In diesem Test wurden verschiedene Puffersysteme in einer Endkonzentration von 50 mM eingesetzt, mit denen ein pH-Bereich von pH 3,8 bis pH 12,1 realisiert werden konnte. Die Puffersysteme werden hier mit Kurzbezeichnungen benannt (s. Kapitel 2.3.7.2). Die Ergebnisse in Abbildung 42 wurden vergleichend zur pH-Toleranz der Benzonase, Merck, dargestellt.

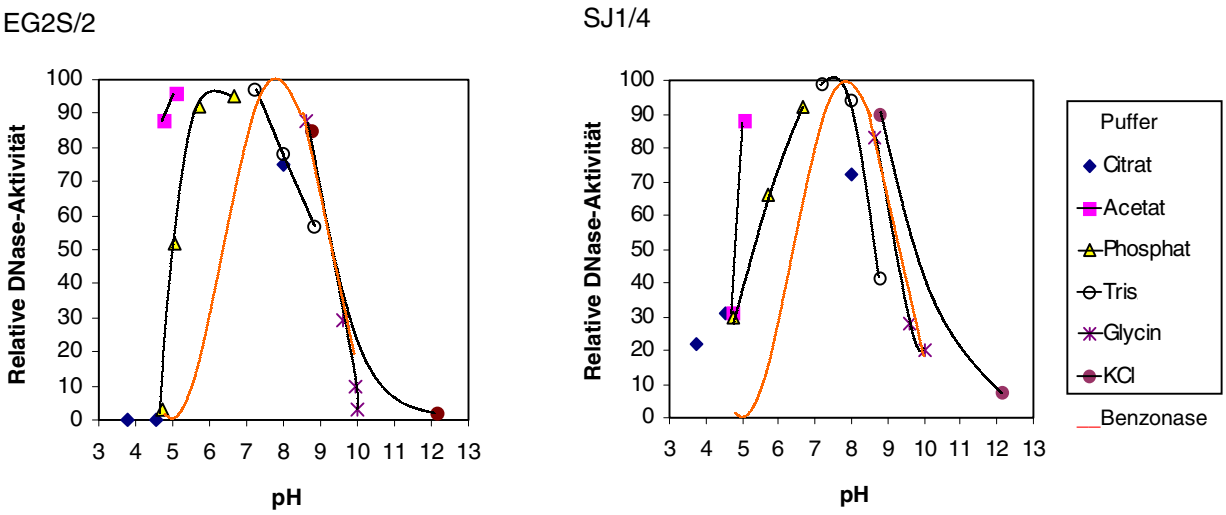

Abb. 42: Relative DNase-Aktivität der Kulturüberstände von EG2S/2 und SJ1/4 im *In-vitro*-DNase-Test in Abhängigkeit vom pH-Wert im Testansatz unter Verwendung verschiedener Puffersysteme (hier mit Kurzbezeichnungen, s. 2.3.7.2). Der EG2S/2-Ansatz enthielt 12% NaCl und der SJ1/4-Ansatz 20% NaCl. Die Ergebnisse wurden aus Messungen mit 5, 10 und 20 U/Testansatz zusammengefasst. Die pH-Toleranz der Benzonase (Produktinformation Merck, 1999) wurde rot markiert.

Die Kulturüberstände beider Stämme zeigten einen breiten pH-Bereich von pH 5 bis 9 mit hoher Restaktivität, der hier als Optimumbereich bezeichnet wird (mind. 90% relative DNase-Aktivität). Die Benzonase besitzt demgegenüber einen engeren Aktivitätsbereich (mind. 90% Restaktivität bei pH 7,5 bis 8,5). Die Nuclease(n) von EG2S/2 zeigten bei pH-Werten oberhalb von ca. pH 4,7 Substratumsatz. Lag der pH-Wert nur leicht darunter, fiel die Aktivität stark ab. Die pH-Obergrenze zeichnete sich nicht ganz so scharf ab, pH-Werte über 10 schienen aber eine Aktivität zu unterbinden. Das Aktivitätsmaximum der Nuclease lag zwischen ca. pH 6 und 7. Das Enzym von SJ1/4 wies fließendere Übergänge zwischen Hemmung und Aktivität auf. In den extremeren pH-Bereichen von pH 3,8 und 12,1 wurde noch Substratumsatz festgestellt. Das Maximum lag bei ca. pH 8. Während also der pH-Toleranzbereich der EG2S/2-Nuclease(n) mit der der Benzonase vergleichbar war – mit höheren Restaktivitäten bei nicht-optimalen Bedingungen im sauren Bereich – wies die SJ1/4-Nuclease ein breiteres Aktivitätsspektrum als die Benzonase sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich auf.

3.3.3.7 Spezifität der Nucleasen

Die Plattentests hatten einen Hinweis darauf gegeben, dass der Stamm EG2S/2 sowohl desoxyribonucleolytische als auch ribonucleolytische Aktivität besaß, während beim Stamm SJ1/4 nur DNase-Aktivität nachzuweisen war. Um RNase-Aktivität im Kulturüberstand im *In-vitro*-DNase-Test nachzuweisen, wurde dieser mit 3,6 µg Hefen-RNA bzw. 1 µg einer RNA-

Ladder (High Range, 200 – 6.000 kb, MBI Fermentas) durchgeführt. Die Leuchtkraft von mit Ethidiumbromid angefärbter RNA war schwächer als von DNA, daher musste mehr Substrat eingesetzt werden, um eine Auswertung über Fluoreszenz zu ermöglichen. Die Inkubationszeit wurde wegen der größeren Substratmenge als im DNase-Test auf 300 min verlängert. In der folgenden Abbildung 43 sind die Ergebnisse des RNA-Abbaus im Vergleich zum DNA-Abbau durch die Kulturüberstände der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 auf einem Agarosegel dargestellt.

Die Auftrennung der Reaktionsansätze (Abb. 43) ergab, dass im EG2S/2-Kulturüberstand sowohl die RNA (Spur B) als auch die DNA (Spur E) verdaut wurde. Dies kann ein Anhaltspunkt für die Produktion einer zuckerunspezifischen Nuclease sein. Im SJ1/4-Kulturüberstand war nur ein Abbau von DNA nachzuweisen (Spur F), die RNA blieb unverdaut (Spur C). SJ1/4 produzierte somit offenbar eine extrazelluläre DNase. Was aus der Spur F zudem ersichtlich wurde und auch in anderen Versuchen zu beobachten war (Dr. Thomas Schräder, mündliche Mitteilung), ist ein vermutlich nicht vollständiger Abbau der DNA, so dass als Produkt Oligonucleotide nachzuweisen waren (durch Pfeil markierter Bereich in Abb. 43 mit gleicher Laufgeschwindigkeit wie RNA).

RNase-Assay | DNase-Assay

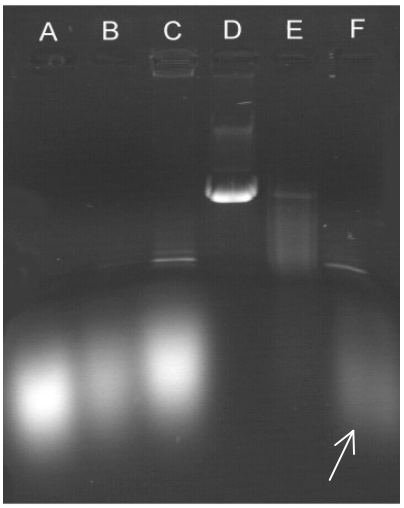

Abb. 43: Agarose-Gel-Aufnahme des Nucleinsäureabbaus durch die unverdünnten Kulturüberstände der Stämme EG2S/2 und SJ1/4.
A: Kontrolle (3,6 µg Hefe-RNA)
B: RNA-Ansatz mit EG2S/2-Kulturüberstand
C: RNA-Ansatz mit SJ1/4-Kulturüberstand
D: Kontrolle (70 ng pBluescript)
E: DNA-Ansatz mit EG2S/2-Kulturüberstand
F: DNA-Ansatz mit SJ1/4-Kulturüberstand

Die Ergebnisse des Hefe-RNA-Verdaus in Abb. 43 stimmten mit denen des RNA-Ladder-Abbaus (nicht gezeigt) insofern überein, als dass auch hier ein vollständiger Abbau durch die EG2S/2-Nuclease(n) nachgewiesen werden konnte.

3.3.3.8 Nachweis der Endonuclease-Aktivität

Die bis zu diesem Zeitpunkt verwendete linearisierte Plasmid-DNA hatte zum Zweck, unspezifisch die Aktivität einer möglichst großen Anzahl verschiedener Nucleasen nachzuweisen, inklusive Exonucleasen. Um zu klären, welche Aktivität bei den Enzymen der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 vorlag, wurde superhelikale Plasmid-DNA im *In-vitro*-Test als Substrat eingesetzt. Das Ergebnis war, dass beide Kulturüberstände das Substrat umsetzten. Daraus kann geschlossen werden, dass Endonucleasen vorlagen. Zusätzliche exonucleolytische Aktivität kann durch diesen Test aber nicht ausgeschlossen werden.

3.4 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der extrazellulären SJ1/4-DNase

Die Beschreibung der Merkmale der Nucleasen aus den Kulturüberständen von Stamm EG2S/2 und SJ1/4 machte deutlich, dass die zu Beginn des Projektes formulierten Eigenschaften, die ein neues Enzym für eine technische Anwendung aufzeigen sollte, eher durch das Enzym des Stamms SJ1/4 repräsentiert wurden als durch EG2S/2. SJ1/4 zeigte im Vergleich zu EG2S/2 eine höhere Aktivität im Submersverfahren, eine Salzabhängigkeit und hohe Toleranz gegenüber allen getesteten chaotropen Agenzien, Aktivität in einem breiteren Temperatur- und pH-Bereich und spezifische Nuclease-Aktivität, die RNA als Substrat ausschließt. Daher wurde im weiteren die SJ1/4-Nuclease biochemisch charakterisiert.

3.4.1 Ultrafiltration

Mit Hilfe der Ultrafiltration sollte eine Aufkonzentrierung der Proteine und eine erste Reinigung erzielt werden. Durch die Verwendung einer sehr niedrigen Ausschlussgröße von 10 kDa konnte die gesamte Enzymaktivität im Retentat zurückgehalten werden. Das Filtrat enthielt keine nachweisbare Aktivität. Unter diesen Bedingungen war die Ultrafiltration allerdings sehr zeitaufwändig (die Filtration von 50 ml Kulturüberstand dauerte in der Magnetrührzelle bei einem Druck von 0,5 bar ca. 3 – 4 h) und der Reinigungseffekt von unerwünschten Proteinen minimal (nachgewiesen durch PAGE und Proteinbestimmung, hier nicht dargestellt). Insbesondere gelb-braun gefärbte Substanzen mit geringem Molekulargewicht, die vermutlich aus dem Hefeextrakt stammten, wurden ebenfalls zurückgehalten, reicherten sich an und störten die Weiterverarbeitung (s. a. gelbe Fraktion in der Gelfiltration mit Sephadex G-200 in Kapitel 3.4.3 und der anschließenden PAGE in Kapitel 3.4.4). Es wurde daraufhin eine Ausschlussgröße von 30 kDa gewählt, wodurch bei einer Volumenreduktion von 90% ca. 50% der Proteine zurückgehalten wurden. Dabei verblieben durchschnittlich 70% der Nuclease-Aktivität im Retentat und 30% gingen über das Filtrat verloren. Die Filtrationszeit von 50 ml Kulturüberstand in der Magnetrührzelle verkürzte sich auf ca. 1 h. Diese Angaben beziehen sich auf einen Druck in der Filtrationskammer von 0,5 bar. Bei Verringerung des Drucks war es möglich, die Enzymausbeute bei Verlängerung der Filtrationszeit zu erhöhen.

Zu einem späteren Zeitpunkt bot sich die Möglichkeit, ein größeres Kulturüberstandsvolumen mithilfe einer Sartocon Slice Ultrafiltrationsanlage (Sartorius) einzuengen. Bei Verwendung einer 30 kDa Ausschlussgröße ergaben sich ähnliche Enzym-Verluste wie oben beschrieben. So wurden 8 l Kulturüberstand (48 U · μl^{-1}) 40fach eingeengt, wobei ca. 63% der Aktivität im Retentat verblieben (1.200 U · μl^{-1}). Um den Salzgehalt dieser Probe und den Gehalt an niedermolekularen Substanzen für anschließende Verfahren zu verringern, wurde des Retentat mit 1 l DNase-Puffer A (0,3 M NaCl) gewaschen und zentrifugiert (20.000 · g, 30 min, 20 °C), wobei sich weitere erhebliche Aktivitätsverluste ergaben. Das gewaschene Retentat enthielt 400 U · μl^{-1} und nach Zentrifugation 240 U · μl^{-1}.

3.4.2 Proteinfällung

3.4.2.1 Ammoniumsulfat als Fällungsmittel

Ammoniumsulfat wurde bis zur Sättigung zu den Kulturüberständen zugegeben, was 3 M Ammoniumsulfat entsprach. Bei ultrafiltrierten Kulturüberständen verringerte sich die benötigte Ammoniumsulfat-Menge aufgrund der höheren Dichte der gelösten Substanzen. Die Fraktionen wurden auf Nuclease-Aktivität hin untersucht (Tab. 24).

Tab. 24: Proteingehalt (bestimmt nach Bradford, 1976) und DNase-Aktivität (im *In-vitro*-DNase-Test) der Fraktionen vor und nach einer Ammoniumsulfat-Fällung (bis zur Sättigung) von 5 ml SJ1/4-Kulturüberstand.

Fraktion	Parameter					
	Volumen	Gesamt-Protein	Protein-konzentration	Gesamtaktivität der Fraktion	Aktivität	Spezifische Aktivität
PM30 Retentat (9,5-fach konz.)	5 ml	633 µg	127 µg · ml^{-1}	1,33 · 10^{6} U	266 U · µl^{-1}	2.094 U · µg^{-1} Protein
Fällungspellet (mit 0,2 ml DNase-Puffer A versetzt)	0,3 ml	65 µg	217 µg · ml^{-1}	3,6 · 10^{3} U	12 U · µl^{-1}	55 U · µg^{-1} Protein
Fällungs-überstand	6 ml	336 µg	56 µg · ml^{-1}	1,5 · 10^{6} U	250 U · µl^{-1}	4.464 U · µg^{-1} Protein

Über 100% der DNase-Aktivität konnten im Fällungsüberstand nachgewiesen werden. Das Präzipitat enthielt lediglich 12 U · µl^{-1}, was vermutlich auf Reste des Überstands im Pellet zurückzuführen ist. Das Enzym wurde bei der Ammoniumsulfat-Fällung somit vermutlich nicht präzipitiert. Ammoniumsulfat, ein im Vergleich zu NaCl oder KCl wenig chaotropes Salz, schien einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität zu besitzen, so dass nach der Fällung eine höhere Gesamtaktivität als im unbehandelten Retentat zu verzeichnen war. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab bei einer Proteinkonzentration des Kulturüberstandes (durch Ultrafiltration 9,5fach aufkonzentriert) vor der Fällung von 127 µg · ml^{-1} eine Steigerung im Fällungs-Überstand um den Faktor 2,1 von ca. 2.094 auf 4.464 U · µg^{-1} Protein. Die geringere Summe an messbarem Protein in den Fällungsfraktionen von 401 µg gegenüber dem Ausgangsretentat mit 633 µg ist vermutlich auf nicht mehr zu lösendes Protein im Fällungspellet zurückzuführen, das durch die Proteinbestimmung nicht erfasst wurde.

3.4.2.2 Ethanol als Fällungsmittel

Nach einer fraktionierten EtOH-Fällung (50, 66, 75, 80% EtOH) konnte im 3. Präzipitat geringe DNase-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings ergab die Aktivitätsbestimmung im *In-vitro*-DNase-Test aus parallelen Fällungen unterschiedlich hohe Werte. Die parallelen Ansätze unterschieden sich lediglich in der Einwirkzeit des Ethanols auf die Proben. Daher ist anzunehmen, dass mit zunehmender Einwirkung von EtOH die Enzym-Aktivität abnimmt. Im Präzipitat von Einschritt-Fällungen in 80% EtOH war keine Aktivität nachzuweisen. Das bei

dieser Art der Fällung gebildete Präzipitat war schwerer wieder zu lösen als in den fraktionierten Fällungen. Fehlende Aktivität kann daher auch auf nichtgelöstes Enzym zurückzuführen sein.

3.4.3 Gelfiltration mit Sephadex G-200

Durch Ultrafiltration (PM30) aufkonzentrierter SJ1/4-Kulturüberstand (9,5 ml entsprechend 61 ml Ausgangsmaterial) wurde durch Gelfiltration mit Sephadex G-200 fraktioniert. Die auf die Säule gegebene Gesamtaktivität betrug 950 kU. Die Laufzeit der Filtration betrug ca. eine Woche, während der 60 Fraktionen à 30 Tropfen gesammelt wurden. Die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung des relativen Proteingehalts der Fraktionen (Extinktion bei 280 nm) und des *In-vitro*-DNase-Tests sind in Abbildung 44 dargestellt.

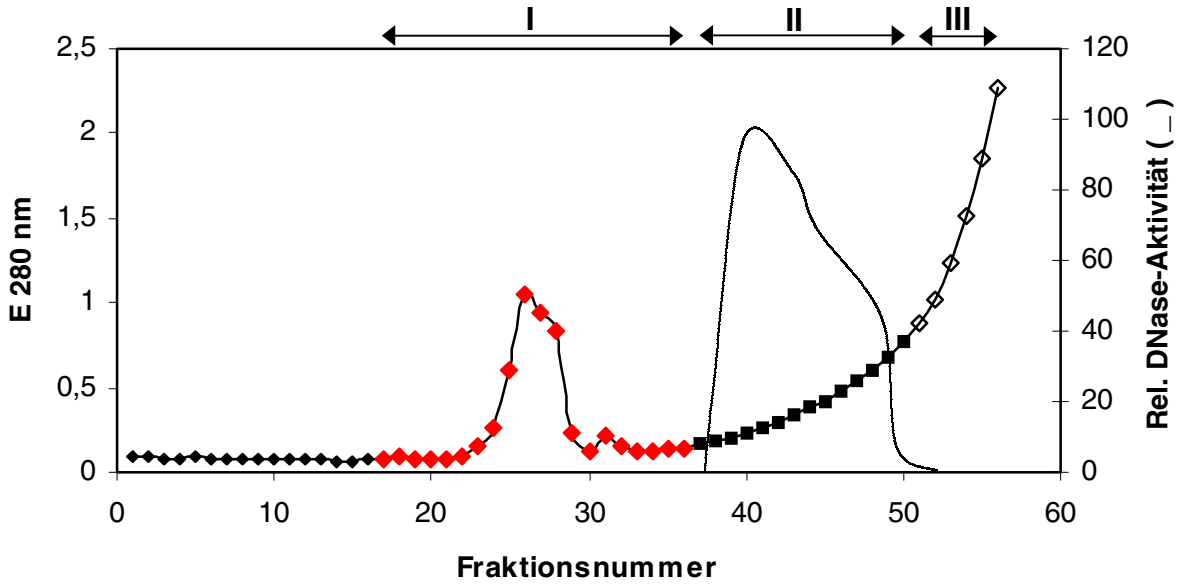

Abb. 44: Proteinverteilungsdiagramm ($E_{280\ nm}$) des SJ1/4-Kulturüberstands nach Gelfiltration mittels Sephadex G-200. Das Fraktionsvolumen betrug 30 Tropfen. DNase-Aktivität konnte in den Fraktionen 37 bis 50 nachgewiesen werden (II), die rel. DNase-Aktivität im *In-vitro*-DNase-Test (—) ist parallel zur Extinktion aufgetragen. Das Eluat bis Fraktion 50 erschien farblos, das darüber hinaus gelb (III). Die markierten Fraktionen (I - III) wurden jeweils für die anschließende PAGE vereinigt.

Die Extinktionsmessung ergab ein Proteinmaximum zwischen der 22. und 30. Fraktion (ein weiteres kleineres Maximum wurde zwischen den Fraktionen 30 und 33 ermittelt). DNase-Aktivität wurde in den Fraktionen 37 bis 50 nachgewiesen. Durch die Gelfiltration mittels Sephadex G-200 konnte somit eine Separierung der Nuclease von größeren Proteinen erzielt werden. Ab der Fraktion 37 konnte ein stetiger Anstieg der Extinktion festgestellt werden, der vermutlich sowohl auf Protein zurückgeführt werden kann als auch auf das Vorhandensein von niedermolekularen Substanzen aus dem Hefeextrakt, die die Fraktionen gelb färbten (s. Kapitel 3.4.1). Eine vollständige Trennung der Nucleasen von diesen niedermolekularen Substanzen erfolgte daher nicht. Die Gesamtaktivität in den Elutionsfraktionen betrug nach 2facher Aufkonzentrierung der vereinigten Fraktionen durch Ultrafiltration (PM10) nur noch ca. 8% (80 kU) der Ausgangsaktivität. Die hohen Verluste könnten durch die lange Laufzeit der Filtration und Zerfall des Enzyms oder durch unvollständige Elution der Nuclease zurückzuführen sein.

3.4.4 Analytische Auftrennung der Proteinfraktionen durch PAGE

Anhand der Ergebnisse aus der Extinktionsmessung bei 280 nm der Fraktionen der Sephadex G-200 Gelfiltration wurden die Fraktionen 17 bis 36 (I; hoher Proteingehalt, keine DNase-Aktivität), 37 bis 50 (II; DNase-Aktivität) und 54 bis 56 (III; gelbes Eluat, keine DNase-Aktivität) jeweils vereinigt und alle drei „Poole“ durch native und SDS-PAGE aufgetrennt. Weiterhin wurden die Fraktionen aus der Ammoniumsulfat- und Ethanol-Fällung und das Ausgangsmaterial (SML, Kulturüberstand unbehandelt und aufkonzentriert) aufgetragen (die fotografierten Gele sind im Anhang in Abb. A-C enthalten).

Es zeigte sich, dass der Marker für die native PAGE (Mark 12, Invitrogen, 200 bis 6 kDa, SDS-beladen) für die Verwendung in den angegebenen Gelen trotz anderslautender Angaben vom Hersteller nicht geeignet war. Die schlechte Auftrennung erlaubte lediglich eine Vermutung über das Molekulargewicht der erzielten Banden. Der Marker für die SDS-PAGE wurde gut aufgetrennt mit klaren Banden über ein Spektrum von 14,4 bis 97,4 kDa.

Außer sehr kleiner Proteine oder Oligopeptide, die bereits im Kulturmedium enthalten waren und vermutlich aus dem Hefeextrakt stammten, wurden alle Proteine aus dem Kulturüberstand durch den Stamm SJ1/4 gebildet. Im nativen Gel waren an die 30 Banden zu erkennen. Im SDS-Gel konnten durch die Reduktion in der Probenaufbereitung und der Spaltung der Proteine in Untereinheiten über 50 Banden ausgemacht werden.

Das Ultrafiltrat enthielt lediglich niedermolekulare Substanzen in relevanten Mengen, die aus dem Kulturmedium stammten. Diese wurden durch die PM30-Membran nicht zurückgehalten, und es besteht die Möglichkeit, das Retentat durch Spülen mit geeignetem Puffer von diesen Verbindungen zu separieren, die durch Gelfiltration mit Sephadex G-200 nicht von der DNase-Aktivität getrennt werden konnten.

Die vereinigten Eluate aus der Gelfiltration mittels Sephadex G-200, die auf die verschiedenen Gele der PAGE aufgetragen wurden, stammten aus zwei verschiedenen Filtrationsläufen mit unterschiedlichen Fraktionsgrößen und unterschieden sich daher leicht im Proteinspektrum. Beim Vergleich der Proteinbanden der Fraktionen fielen die Banden bei ca. 5 und 30 kDa auf, die nur in den vereinigten Fraktionen mit DNase-Aktivität auftraten. Auch in den anderen auf die Gele aufgetragenen Proben mit DNase-Aktivität aus den Proteinfällungen ist das Vorhandensein dieser Banden charakteristisch. Die Auswertung der „Poole“ der Sephadex-G-200-Gelfiltration auf dem SDS-Gel (Abb. C im Anhang) war nicht möglich, da die Proteinkonzentrationen zu gering waren.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der 30 kDa-Bande um die Nuclease handelte, sollte die Aktivität direkt im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Es wurden dazu Kulturüberstände auf native Tris-Glycin-Gele, SDS-Gele und aufgesalzene Tris-Glycin-Gele aufgetragen und mit DNA-Agarose überschichtet. Nach 5-stündiger Inkubation konnte Aktivität im aufgesalzenen Gel

ermittelt werden. Mit zunehmender Zeit breitete sich die Nuclease über das Gel aus, so dass nach 5 h Inkubationszeit eine relativ schmale Bande und nach 23 h schon fast das gesamte Gel entfärbt war (s. Anhang Abb. D). Die Gelfiltration mit Sephadex G-200 (s. Kapitel 3.4.3) hatte gezeigt, dass DNase-Aktivität in Puffer mit 0,3 M NaCl bei 5 °C auch nach längerer Zeit noch messbar war. Daher wurde anfangs diese Salzkonzentration für die Aufsalzung der Gele gewählt. Bei Verwendung von 0,2 M NaCl oder weniger gelang der *in-situ*-Nachweis nicht. Höhere Salzkonzentrationen konnten in der Gelelektrophorese nicht eingesetzt werden, da sich das Gel zersetzte und auch kaum noch Spannung angelegt werden konnte. Die Auftrennung der Proteine – insbesondere des Markers – war unter Anwesenheit von 0,3 M NaCl im Gel allerdings nur ungenügend. Eine Zuordnung von Molekulargewichten war daher nicht möglich. Weiterhin erwiesen sich Alternativfarbstoffe zu Ethidiumbromid, die eine kontinuierliche Beobachtung des DNA-Abbaus im Gel erlauben sollten, als ungeeignet (zu geringe Empfindlichkeit von Methylgrün und Markierung aller Proteinbanden durch Toluidinblau O). Ein Nachweis der Aktivität auf SDS-Gelen wurde nicht erzielt.

3.4.5 Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration mit Sephadex G-75

Die PAGE hatte – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Ultrafiltration – Hinweise darauf gegeben, dass das Molekulargewicht der DNase im Bereich von 30 kDa liegen könnte. Zur genaueren Bestimmung wurde daher eine Gelfiltration über Sephadex G-75 (Superfine, optimaler Fraktionierungsbereich zwischen 3 und 70 kDa) durchgeführt und die Elutionsfraktionen im *In-vitro*-DNase-Test hinsichtlich Aktivität getestet.

Dazu wurde 1 ml eines Ultrafiltrationsretentats (40fache Einengung mit 30 kDa Ausschlussgröße und Waschen des Retentats mit DNase-Puffer, 0,3 M NaCl, Aktivität = 240.000 U) vom SJ1/4-Kulturüberstand auf die Säule gegeben und 58 Fraktionen à 1 ml · 10 min^{-1} aufgefangen. 24% der aufgetragenen Aktivität konnten im Eluat wiedergefunden werden. Abbildung 45 zeigt eine Vierpunkt-Eichgerade für das Verhältnis von Elutionsvolumen zu Molekulargewicht. Abbildung 46 gibt die Ergebnisse der Extinktionsbestimmung bei 280 nm und des *In-vitro*-DNase-Tests wieder.

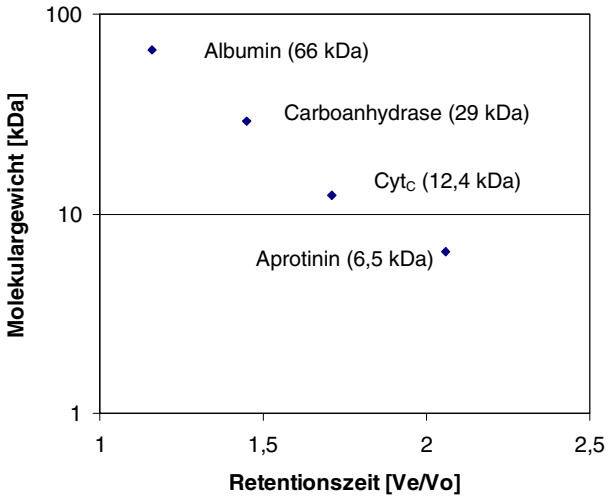

Abb. 45: Vierpunkt-Eichgerade für die Sephadex-G-75-Säule (1,6 x 50 cm). Ve = Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins, Vo = Todvolumen = Elutionsvolumen von Blue-Dextran (MW 2.000 kDa).

$y = 1.288{,}5e^{-2{,}6173x}$ $(R^2 = 0{,}986)$

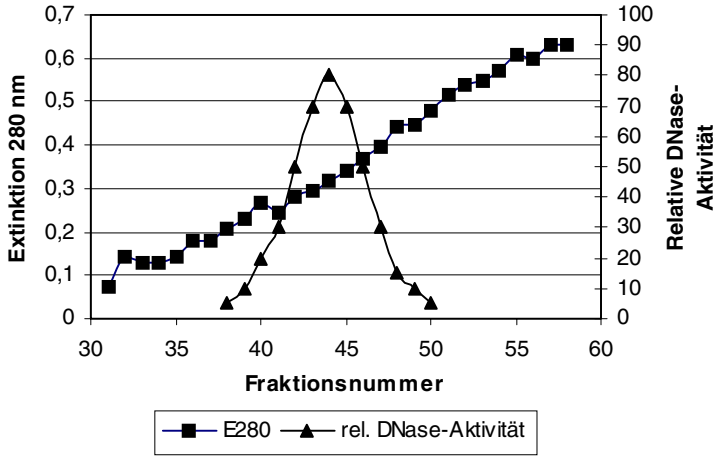

Abb. 46: Relativer Proteingehalt (Extinktion bei 280 nm) und relative DNase-Aktivität (im *In-vitro*-DNase-Test, ein Wert von 100 entspricht 24 U · µl^{-1}) der Elutionsfraktionen aus der Sephadex-G-75-Gelfiltration des aufkonzentrierten SJ1/4-Kulturüberstands (ca. 24.000 U Gesamtaktivität).

Der *In-vitro*-DNase-Test der Elutionsfraktionen aus der Gelfiltration ergab ein Aktivitätsmaximum in der 44. Fraktion, was einem Verhältnis von Elutionsvolumen zu Todvolumen (Ve/Vo) von 1,42 entsprach. Mithilfe der Eichgerade ergibt sich daraus ein ungefähres Molekulargewicht der DNase von 31 kDa (nativ).

Die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen ergab einen stetigen Anstieg des relativen Proteingehalts ohne das typische Vorkommen von Maxima, was ein Hinweis auf schlechtes Trennverhalten sein kann.

Die Ergebnisse wurden auf einer Superdex-75-Säule (1 x 30 cm, Amersham-Pharmacia; Flussrate 0,5 ml · min^{-1}) mit den Proteinstandards Rinderserumalbumin (63,7 kDa), Ovalbumin (48,6 kDa), Chymotrypsinogen A (20 kDa) und Ribonuclease A (15,7 kDa) durch Dr. Thomas Schräder (GL Biotech) bestätigt (der *In-vitro*-DNase-Test erfolgte dabei durch die Autorin). Auf dieser Säule konnten ca. 75% der aufgetragenen Aktivität im Eluat wiedergefunden werden (54.000 von 72.000 U in 300 µl Kulturüberstand; Laufzeit der Gelfiltration ca. 1,5 h). Der Verlauf der Extinktion bei 280 nm war vergleichbar mit dem oben genannten.

4. Diskussion

4.1 Eignung der Vorgehensweise: hierarchisches Screenen einer Stammsammlung und klassische Isolierung

Um Enzyme für ein geplantes Biokatalyseverfahren zu finden, können Methoden unterschiedlicher Priorität zur Anwendung kommen. Abbildung 47 zeigt einen Arbeitsplan für die Auffindung eines geeigneten Biokatalysators nach Demirjian und Mitarbeiter (1999).

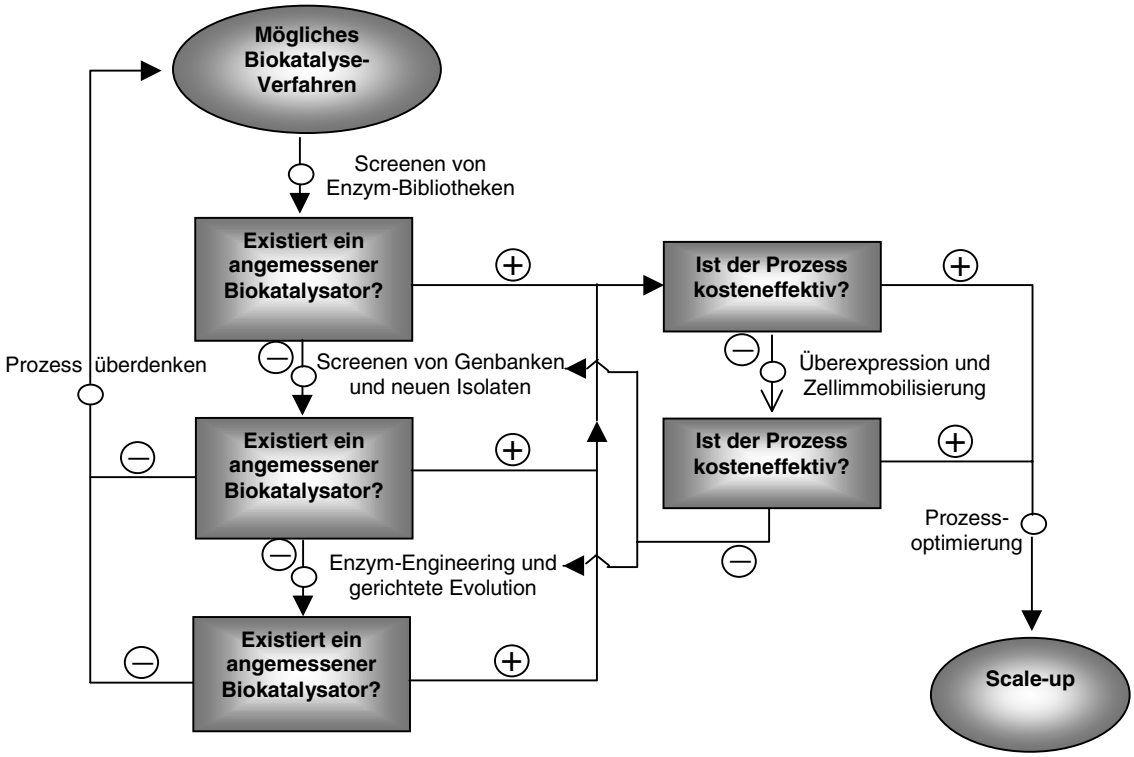

Abb. 47: Arbeitsplan für die Auffindung eines geeigneten Biokatalysators (Quelle: Demirjian et al., 1999).

Die erste und einfachste Möglichkeit, ein passendes Enzym für eine geplante biotechnologische Anwendung zu finden, ist das Screenen von bereits existierenden Enzym-Bibliotheken. Ist dies mit negativem Ergebnis verlaufen, muss die Suche auf noch nicht beschriebene Enzyme ausgeweitet werden. Das Durchsuchen von bestehenden Stammsammlungen kann von entsprechend großen Firmen schnell durchgeführt werden, da diese die nötigen Apparaturen und Verfahren aufbringen können. Neue Stammsammlungen aufzubauen ist aber immer noch sehr zeitintensiv und damit nicht kosteneffizient. Dieses Verfahren wird daher erst in Betracht gezogen, wenn vorangegangene Methoden fehlgeschlagen sind (Demirjian et al., 1999). Als zur Zeit noch aufwändigste Alternative kommt schließlich das Enzym-Engineering bekannter Enzyme in Betracht. Wie in der Einleitung bereits erläutert wurde, ist diese Methode jedoch noch wenig erfolgversprechend.

Um Enzyme extremophiler Mikroorganismen zu isolieren, wurde bisher der klassische Weg der Enzymproduktion begangen, bestehend aus Isolierung des Zielorganismus als Reinkultur und

anschließender Gewinnung und Reinigung des Enzyms aus seinem natürlichen Wirt. Die erste Isolierung eines sekretorischen Proteins aus einem extrem halophilen Mikroorganismus wurde 1983 durch Izotova und Mitarbeiter veröffentlicht, einer Serin-Protease aus *Halobacterium halobium*. Weitere Veröffentlichungen zur Isolierung oder Beschreibung halophiler extrazellulärer Enzyme sind allgemein selten (Sánchez-Porro et al., 2003a) und behandeln eher Proteasen oder Amylasen als Nucleasen. Beispiele für Proteasen finden sich bei Sánchez-Porro et al. (2003b), Ryu et al. (1994) und Van Qua et al. (1981). Amylasen werden von Coronado et al. (2000) und Onishi & Hidaka (1978) und Nucleasen von Onishi et al. (1983) sowie Kamekura & Onishi (1978a/1974) aufgeführt. Lipasen aus halophilen Bakterien wurden bisher noch nicht beschrieben (Sánchez-Porro et al., 2003a).

Ein weiterer Versuch, halophile Enzyme zu gewinnen, ist die Klonierung und Expression des entsprechenden Gens in einem Fremdorganismus. Ein Beispiel hierfür ist das Halolysin R4, eine halophile Serin-Protease von *Haloferax mediterranei* Stamm R4, das in einem ebenfalls halophilen Verwandten *Haloferax volcanii* WFD11 exprimiert wurde (Kamekura et al., 1996). Die Expression der Gene für halophile Enzyme in nichthalophilen Wirten stellte sich als weitaus komplexeres Problem dar als bei Genen thermophiler Enzyme (Sellek & Chaudhuri, 1999). Hough und Danson (1999) führen einige Beispiele für halophile intrazelluläre Enzyme an, deren Expression in mesophilen Wirten zu inaktiven oder unlöslichen Produkten führte. Ein Beispiel für eine geglückte Klonierung ist die halophile α-Amylase aus *Halothermothrix orenii*, deren Expression im mesophilen *Escherichia coli* nachgewiesen werden konnte (Mijts & Patel, 2002). Obwohl bisher noch nicht in der Literatur berichtet, sei für extrazelluläre alkaliphile Enzyme vermutlich ebenfalls mit vermehrten Schwierigkeiten bei der Expression in mesophilen Wirten zu rechnen (Hough & Danson, 1999). Die Gewinnung dieser Enzyme durch Klonierung von Gesamt-DNA aus der Umwelt in mesophilen Standard-Organismen stößt somit auf die gleichen Probleme wie oben beschrieben. Soweit bekannt, gibt es keinen Hinweis, dass ein Screenen extremer Standorte auf diese Art und Weise erfolgreich durchgeführt wurde. Dass das Verfahren der Erstellung von Genbanken für die Suche nach neuen Enzymen im Vergleich zur Kultivierung von Bakterien zum jetzigen Zeitpunkt nicht unbedingt Vorteile bietet, wird auch durch die Arbeit von Cottrell und Mitarbeiter (1999) deutlich. Sie isolierten DNA aus Küsten- und Ästuarwasser und erstellten daraus eine Genbank im Phagen Lambda. Am Beispiel der Hydrolyse eines fluoreszierenden Analogons von Chitin konnte gezeigt werden, dass auch mit dieser Methode keine bedeutend höhere Anzahl an Enzymproduzenten nachgewiesen werden konnte als mit dem herkömmlichen Verfahren der Kultivierung und dem Screenen mariner Mikroorganismen.

Die aufwändige Kultivierung extremophiler Mikroorganismen kann somit als erster Schritt bei der Suche nach neuen Enzymen noch nicht umgangen werden. Der in dieser Arbeit beschrittene Weg der Isolierung und Anzucht von Bakterien, dem Screenen auf die gewünschten Enzyme und der anschließenden Gewinnung der Zielverbindung ist daher zwar

ein sehr zeitaufwändiges Verfahren, aber die vielversprechendste Methode – auch im Hinblick auf die hier begrenzten Möglichkeiten des Durchsatzes – neue Enzyme zu erhalten. In der Arbeit von Martins und Mitarbeiter (2001) wird auf der Suche nach Stärke-hydrolysierenden alkaliphilen Bakterien aus äthiopischen Salzseen ähnlich vorgegangen. Sánchez-Porro und Mitarbeiter (2003a; 2003b) untersuchten ebenfalls moderat halophile Isolate aus Salinen auf die Produktion von extrazellulären hydrolytischen Enzymen, um diese zu isolieren und zu charakterisieren. Die Autoren betonen die Produktion von potenziell wichtigen Enzymen für die Biotechnologie durch die Umweltisolate, während Stämme aus Stammsammlungen zumeist nicht in der Lage seien, diese Verbindungen zu synthetisieren. Bei Sudge und Mitarbeitern (1998) konnten aus 1.000 halophilen und -toleranten Isolaten aus Meerwasser elf mit der gesuchten D-Hydantoinase-Aktivität nachgewiesen werden. Über Enzym-Engineering bei halophilen Enzymen ist, soweit recherchiert, bisher nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit umfasst die erste Stufe des hierarchischen Screenens daher die Isolierung und den gleichzeitigen Plattentest auf 3 bis 5 extrazelluläre Enzyme von 671 Bakterien dreier Standorte auf Lanzarote (2 Salinen und ein küstennaher See), Kanarische Inseln, Spanien, und 651 Isolaten aus den Salinenfeldern bei La Baule, Frankreich. Die Hälterung von morphologisch charakterisierten zumeist Enzym-positiven Stämmen erfolgte bei -20 °C (Lanzarote: 396 Isolate; La Baule: 626 Isolate). Die Ergebnisse dieser ersten Stufe liefern ökologische Daten über die allgemeine Verteilung von Enzymproduzenten in den beprobten Habitaten und damit über die Eignung dieser Standorte für die Suche nach neuen Enzymen. Ein weiterführendes Ziel war die Analyse einer dieser Enzymgruppen im Hinblick auf die mögliche Bereitstellung eines neuen Enzyms für eine biotechnologische Anwendung – hier eine DNase für die Anwendung in RNA-Aufreinigungskits. Die zweite Stufe des Screenens beinhaltete daher die Auswahl von neun DNase-positiven Stämmen von Lanzarote und die Vorcharakterisierung ihrer DNase-Aktivität im *In-vitro*-DNase-Test. Des Weiteren folgte eine detailliertere Untersuchung der Nuclease-Aktivität von zwei Isolaten aus dieser Gruppe (EG2S/2 und SJ1/4) mit für die Anwendung in RNA-Aufreinigungskits geeigneten Enzym-Eigenschaften im *In-vitro*-DNase/RNase-Test. Es wurde versucht, die extrazelluläre DNase von einem dieser Stämme (SJ1/4) zu isolieren und eine molekularbiologische Charakterisierung vorzunehmen.

4.2 Eignung der Probenstandorte

Oberflächlich gesehen ähneln sich Meerwassersalinen weltweit. Bis vor wenigen Jahren wurde noch aufgrund von Kultivierungsergebnissen angenommen, dass die Struktur dieses Ökosystems relativ simpel sei. Je extremer ein Standort sei, um so geringer sei die Diversität seiner Bewohner (Rodríguez-Valera, 1993). Nach Kushner (1985) würden hypersaline Habitate nur von einer relativ kleinen Anzahl von eng verwandten mikrobiellen Spezies erobert. Zusätzlich waren verschiedene Autoren anhand von *in-situ*-Aktivitätsmessungen und der

Verwendung spezieller Inhibitoren (Oren, 1990) zu dem Schluss gekommen, dass in NaCl-gesättigten Habitaten das Vorkommen von Eubakterien im Vergleich zu anderen Ökosystemen stark reduziert sei und lediglich Archaeen proliferierten (Kushner & Kamekura, 1988). Benlloch und Mitarbeiter (1996) sowie Martínez-Murcia und Mitarbeiter (1995), die 16S-rRNA-Gene aus Salinenproben amplifiziert haben, konnten neben Archaea-DNA nur geringe Bacteria-DNA-Anteile in Kristallisationsbecken nachweisen und vermuteten, dass der Nachweis nur auf ein Verschleppen der nicht-aktiven Bakterien oder deren DNA aus vorherigen Becken mit geringerer Salinität zurückzuführen sei.

Neue molekularbiologische Techniken bewiesen aber eine weitaus höhere Komplexität hypersaliner Habitate. Allgemein zeigten zahlreiche Untersuchungen an der Gesamt-DNA aus der Umwelt, dass lediglich 0,1 – 1 % der Organismen mithilfe der bisher verwendeten Methoden in Kultur gebracht werden konnte, ein Ergebnis, das sich sowohl auf mesophile als auch auf extremophile Organismen bezieht (Hough & Danson, 1999). Auch hypersaline Habitate können von Organismen dominiert werden, die bis jetzt nicht kultivierbar sind (Oren, 2002b; v. Wintzigerode et al., 1997; Martínez-Murcia et al., 1995). Ochsenreiter und Mitarbeiter (2002) konnten durch Kultivierungsversuche und parallel durchgeführte 16S-rRNA-Gen-Sequenzierungen der Umweltproben zeigen, dass die Kultivierbarkeit von halophilen Archaeen stark vom gewählten Probenstandort abhängig ist. Antón und Mitarbeiter (2000) konnten in Kristallisationsbecken verschiedener Salinen 5 bis 25% der gesamten prokaryotischen Gemeinschaft einer bisher nichtkultivierten Bakteriengattung zuordnen („*Candidatus Salinibacter* gen. nov.“). Wiederholt kultivierte Spezies würden in diesem Lebensraum nur einen geringen Anteil der gesamten prokaryotischen Population ausmachen (Antón et al., 1999). Durch Benlloch und Mitarbeiter (2002) wurde weiterhin gezeigt, dass die Anzahl der Cluster sowohl für Bacteria als auch für Archaea mit steigender Salzkonzentration rückläufig ist, was durch eigene taxonomische Untersuchungen anhand von Lanzarote-Isolaten bestätigt werden konnte (Kapitel 4.5.1), die Mikrodiversität innerhalb der noch auftretenden Gruppen diesem Trend aber nicht folgt. Diese Tatsachen rechtfertigen die hohen Isolate-Zahlen, die in dieser Arbeit hinsichtlich extrazellulärer Enzymaktivität getestet (1.322 Isolate) und in die Stammsammlung aufgenommen wurden (1.022 Isolate). Trotz häufig gleicher oder ähnlicher Kolonie- oder Zellmorphologie ist mit einer hohen Mikrodiversität innerhalb der isolierten Organismen zu rechnen. Nach Demirjian und Mitarbeiter (1999) ist es sinnvoll, „doppelte“ Stämme nicht zu schnell zu verwerfen, da bereits geringe Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der Enzyme die Aktivitätseigenschaften immens verändern können. Eine hohe Diversität unter den Bakterien der Stammsammlung war sowohl für eine möglichst umfassende Beschreibung des beprobten Lebensraums als auch für das Auffinden des für eine biotechnologische Anwendung geeignetesten Enzyms wichtig.

Um eine möglichst große Auswahl verschiedener Isolate für die Einrichtung einer Stammsammlung zu erhalten, sollten Standorte mit breiter pH-Wert- und Salinitäts-Variabilität

beprobt werden, da davon auszugehen war, dass die Diversität der vorkommenden Bakterien mit diesen Faktoren korreliert. Meerwassersalinen bieten aufgrund ihrer zahlreichen Evaporationsbecken mit jeweils unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften eine auf relativ engem Raum begrenzte Quelle verschiedenster Habitate hoher Salzkonzentration (Giani et al., 1989). Sie waren daher besonders geeignet, das Probenmaterial für diese Arbeit zu liefern. Da, wie sich herausstellte, DNase-Produzenten unter den 671 getesteten Mikroorganismen aus Lanzarote mit einem Anteil von 18% eher selten waren (insbesondere zuckerspezifische Enzyme ohne RNase-Aktivität wurden nur in 16 Isolaten nachgewiesen), wurde die Stammsammlung um 626 Isolate aus den Salinen bei La Baule erweitert.

Salinen unterscheiden sich in ihrem Nährstoffgehalt und der Verweildauer des Salzwassers in den einzelnen Becken abhängig von den klimatischen Gegebenheiten (Oren, 2002b). Litchfield und Gillevet (2002) konnten anhand von BIOLOG und der Analyse der Amplicon-Längen-Heterogenität der 16S rDNA (ALH) eine zeitliche und ortsbezogene Diversität in hypersalinen Habitaten nachweisen. Bedeutende geografische Unterschiede in der Organismen-Zusammensetzung von Salinen wurden ebenfalls durch Oren und Rodríguez-Valera (2001) sowie durch Litchfield und Mitarbeiter (2000) aufgezeigt, die die Zusammensetzung der aus den Kristallisationsbecken extrahierten Pigmente und polaren Lipide untersuchten. Aufgrund der Verschiedenheit der beiden Beprobungsgebiete war anzunehmen, dass mit der Beprobung der Salinen bei La Baule weitere Stämme kultiviert werden könnten, die sich von den bereits in der Stammsammlung hinterlegten Isolaten von Lanzarote unterschieden.

4.2.1 Physiko-chemische Unterschiede der Standorte

Während Lanzarote vor der nordwest-afrikanischen Küste liegt und damit der subtropischen Klimazone zugeordnet wird, wurden mit den Marais Salants bei La Baule Salinen in gemäßigten Breiten beprobt (die nördlichsten Salinen Europas). Die Proben aus Lanzarote wurden an Standorten gesammelt, die keiner menschlichen Bewirtschaftung mehr unterlagen. In den Salinen bei La Baule wird hingegen noch Salz gewonnen, was die damit verbundenen jährlichen Eingriffe in dieses Ökosystem mit sich bringt. Diese Unterschiede in den äußeren Einwirkungen auf die Habitate spiegelten sich in den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit bestimmten „internen“ Parameter wider.

Die hypersalinen Standorte auf Lanzarote wiesen mit pH-Werten um 7,5 im Vergleich zu denen bei La Baule (pH 6,6 – 7) höhere pH-Werte auf, was ein Hinweis auf unterschiedliche Nährstoffbedingungen sein kann. Allgemein kommt mit einer Salinitätserhöhung eine Konzentrationserhöhung der einzelnen Ionen und somit eine Erhöhung der Ionenstärke zustande. Eine hohe Ionenstärke hat gleichzeitig einen kleinen Aktivitätskoeffizienten (Verhältnis der Konzentration des wirksamen Salzes zur tatsächlichen Salzkonzentration) zur Folge, da der Aktivitätskoeffizient eines Salzes durch die Anwesenheit von anderen Salzen verringert wird

(die Löslichkeit eines Salzes wird durch die Zugabe anderer Salze verbessert). Aus der Beziehung Aktivitätskoeffizient zu pH ergibt sich: je kleiner der Aktivitätskoeffizient, desto kleiner auch der pH (Claes, 1989; Römpp, 2000). Daher sinkt der pH-Wert von ca. 8,2 im Seewasser um eine Einheit auf ca. pH 7 in NaCl-gesättigter Lösung (Rodríguez-Valera, 1988). Ein saures Milieu in den Kristallisationsbecken weist auf einen hohen Umsatz von organischen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen hin, bei dem Säuren entstehen können. Im Allgemeinen steigt die Konzentration an gelösten organischen Verbindungen parallel zur Salzkonzentration, was auf die Verdunstung des Wassers zurückzuführen ist. Die Kristallisationsbecken sind daher zumeist sehr nährstoffreich (Javor, 2002).

Alkalische Bedingungen entstehen dagegen durch die Aktivität von phototrophen Primärproduzenten wie Cyanobakterien und Algen, in hypersalinen Bereichen insbesondere *Spirulina subsalsa* und *Aphanothece halophytica* sowie *Asteromonas gracilis* und *Dunaliella* Spezies (Rodríguez-Valera, 1993). Diese sind im Gegensatz zu den Heterotrophen nicht auf organische Verbindungen angewiesen. In den Salinen von Lanzarote ist anzunehmen, dass aufgrund des vulkanischen Untergrunds ausgeprägte Mikrobenmatten gebildet wurden, die einen großen Anteil des organischen Materials aus dem Salzwasser binden. Ähnliches wurde von Javor (1983) über eine Saline in Baja California berichtet. Das Salzwasser, das die Kristallisationsbecken erreichte, enthielt daher wahrscheinlich geringere Konzentrationen dieser Stoffe, was das Wachstum von Heterotrophen im Vergleich zu Autotrophen erschwerte. Starke Mikrobenmatten sind in den La Baule-Salinen durch die jährliche Reinigung nicht zu erwarten und wurden auch nicht beobachtet.

Die höheren pH-Werte der hypersalinen Standorte auf Lanzarote sind daher vermutlich auf ein größeres Verhältnis von autotrophen zu heterotrophen Organismen im Vergleich zu den La Baule-Salinen zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die ermittelten Lebendzellzahlen der Heterotrophen auf SML unterstützt. In den Proben aus La Baule konnten mit durchschnittlich $1 \cdot 10^6$ CFU $\cdot$ ml^{-1} zehnmal mehr koloniebildende Einheiten erfasst werden als mit durchschnittlich $1 \cdot 10^5$ CFU $\cdot$ ml^{-1} aus Lanzarote. Auch die Färbung der beprobten Becken auf Lanzarote wies im Gegensatz zu denen bei La Baule in nicht allen Fällen die klassische Verteilung auf – hauptsächlich grün in den Vorbecken, mit zunehmender Salzkonzentration allmählich in rot-orange übergehend (Rodríguez-Valera, 1988). Dies ist ebenfalls nach Javor (2002) ein Hinweis auf oligotrophe Bedingungen in den Kristallisationsbecken. Im allgemeinen wird in bewirtschafteten Salinen darauf geachtet, dass die Kristallisationsbecken zur effektiveren Salzgewinnung eine Rotfärbung aufweisen. In einigen Fällen wurde dazu sogar eine Düngung der Salinen vorgenommen.

4.2.2 Biologische Faktoren

Ein weiterer Unterschied, der bei der Ermittlung der Lebendzellzahlen auffällig war, ist die Anzahl der keimungsfähigen Zellen bei zunehmender Salzkonzentration. Während in den

Lanzarote-Proben auf SML mit steigender Salzkonzentration zunehmend mehr koloniebildende Einheiten nachweisbar waren, war die Tendenz in den La Baule-Proben genau umgekehrt. Hier konnten auf SML mit nur 12% NaCl die höchsten Lebendzellzahlen ermittelt werden. Aufgrund der jährlichen Eingriffe und der höheren Niederschlagsmenge in den Salinen bei La Baule herrschen hier diskontinuierlichere Bedingungen, insbesondere die Salinität betreffend, als in denen auf Lanzarote. Daher ist zu vermuten, dass in den Salinen auf Lanzarote bevorzugt Halophile und in denen bei La Baule vermehrt Halotolerante bzw. Organismen mit breiterem Salztoleranzspektrum anzutreffen sind und entsprechend isoliert wurden. Ein Beispiel, das diese Vermutung untermauert, sind saline Böden. Die dominierenden Bakterien in Böden unterscheiden sich von denen in aquatischen Habitaten. Während in Böden sowohl räumlich sehr inhomogene Verhältnisse vorherrschen, als auch zeitlich sich die Bedingungen schnell ändern können – z.B. durch Niederschläge, wodurch lokal die Salzkonzentration rapide sinken kann –, sind die Bedingungen in aquatischem Milieu allgemein wesentlich gleichbleibender. Nach Ventosa und Mitarbeiter (1998) scheinen in Böden eher halotolerante als halophile Organismen vorzukommen, was eine Anpassung an wiederkehrende Bedingungen mit relativ hohen Verdünnungsraten reflektiert. Ähnliches, allerdings in weniger ausgeprägter Form, ist daher vermutlich auch für die Salinen bei La Baule anzunehmen, da ihr geringer Wasserkörper die relativ hohen Niederschlagsmengen nicht abpuffern kann.

Die Bestimmung der Lipid- und Pigment-Profile zweier Salinen durch Litchfield und Mitarbeiter (2000) ergab ebenfalls eine komplexere Organismendiversität (sowohl in Bezug auf die Organismenzahl als auch auf die Vielfalt) in der Saline in Newark, Kalifornien, USA, die höhere Nährstoffkonzentrationen, mildere Temperaturen und höhere Niederschlagsmengen aufweist als die Saline in Eilat, Israel. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse decken sich somit mit den Angaben in der Literatur.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die in der vorliegenden Arbeit beprobten Salinen von Lanzarote erheblich von denen bei La Baule unterscheiden, was sich vermutlich auch in der Zusammensetzung der in ihnen lebenden Organismen widerspiegelt. Durch die Erweiterung der Lanzarote-Stammsammlung um die Isolate aus den Salinen bei La Baule ist daher mit einer signifikanten Erhöhung der Diversität innerhalb der gehälterten Organismen zu rechnen. Weiterhin kann, auch im Hinblick auf die Tatsache, dass Enzymproduzenten bevorzugt unter den Halotoleranten und schwach Halophilen gefunden wurden (mit Ausnahme der Amylasen in den La Baule-Proben, Kapitel 3.1.7.4 und 3.2.6.4), aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Salinen bei La Baule geeigneter sein müssten, allgemein hohe Anzahlen an Enzymproduzenten zu isolieren. Dieser Aspekt ist im Hinblick auf die Suche nach neuen Enzymen mit den für eine biotechnologische Anwendung optimal angepassten Eigenschaften von Bedeutung.

4.3 Wahl der Kulturmedien, Lebendzellzahlen und Diversität

Es hatte sich anhand der Lanzarote-Proben gezeigt, dass bei Anzucht von Salinen-Material auf SML, das den Ionenkonzentrationen in der Salinas del Janubio (Lanzarote) angepasst wurde, eine höhere morphologische Bakteriendiversität – bei verminderter Lebendkeimzahl – erzielt werden konnte als auf HM, dem Standardmedium für die Anzucht halophiler Bakterien ($6{,}5 \cdot 10^4$ CFU $\cdot$ ml^{-1} auf SML bzw. $3{,}4 \cdot 10^5$ CFU $\cdot$ ml^{-1} auf HM). Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten daraufhin auf SML. Aus den La Baule-Proben konnten auf SML mit durchschnittlich $6{,}7 \cdot 10^5$ CFU $\cdot$ ml^{-1} zehnmal mehr Lebendkeime herangezogen werden als aus den Lanzarote-Proben. Die Größenordnungen der erzielten Kultivierungserfolge decken sich mit den Angaben aus der Literatur. Durch Antón und Mitarbeiter (2000) konnten in Kristallisationsbecken der Saline Braç del Port bei Alicante, Spanien, durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und 4´,6´-Diamindino-2-phenylindol(DAPI)-Zählung Gesamtzellzahlen von ca. 1,5 bis $7 \cdot 10^7 \cdot$ ml^{-1} erfasst werden. Wie oben bereits beschrieben, wären davon vermutlich wiederum nur ca. 0,1 bis 1% der Organismen kultivierbar, also ca. 10^4 bis 10^6 Zellen $\cdot$ ml^{-1}. Lebendzellzahlbestimmungen auf verschiedenen festen Medien durch Litchfield und Gillevet (2002) ergaben für Salinen-Material aus Eilat, Israel, max. $2 \cdot 10^4$ bis $7 \cdot 10^7$ CFU $\cdot$ ml^{-1}, wobei ebenfalls, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die erfassten Zellzahlen auf Medien mit Salzgehalten nahe dem natürlichen Wert am höchsten waren. Dazu parallel durchgeführte exemplarische DAPI-Zählungen nach Zweifel und Hägstrom (1995) ergaben zwischen $1 \cdot 10^6$ und $1{,}3 \cdot 10^8$ Zellen $\cdot$ ml^{-1}. Auch die bereits 1981 von Post angegebenen Gesamtzellzahlen hypersaliner Habitate von 10^7 bis $10^8 \cdot$ ml^{-1} zeichnen sich durch vergleichbare Größenordnungen aus.

Die Salzzusammensetzung der Medien für halophile Bakterien ähneln sich zumeist. Die höchste Variabilität ist aber neben der NaCl-Konzentration, die zum Einstellen der gewünschten Salinität genutzt wird, in der Magnesium-Konzentration zu finden, die in der Literatur zwischen 4 und 560 mM (Mojica et al., 1997 bzw. Rodríguez-Valera, 1988) schwankt. Die Calcium-Konzentration beträgt zumeist, wenn überhaupt zugesetzt, ca. 1/10 der Magnesium-Konzentration. Das HM nach Sehgal und Gibbons (1960) enthält ca. 81 mM Magnesium und nimmt damit eine mittlere Position in den verwendeten Konzentrationen ein. Calcium wurde dem HM nicht zugesetzt. Die Messungen von Claes (1989), die als Grundlage für die Magnesium- und Calcium-Konzentration im SML verwendet wurden, ergaben in den Salinas del Janubio (Lanzarote) Magnesium-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Salinität von 0,04 bis 0,35 mM und Calcium-Konzentrationen von bis zu 0,05 mM. Das in dieser Arbeit entwickelte SML enthielt neben 0,13 mM $MgSO_4$ und 0,05 mM $CaCl_2$, was eine Mindestkonzentration dieser Salze sicherstellen sollte, Haushaltssalz und C-Quellen, die ebenfalls Magnesium und Calcium in unterschiedlichen Mengen enthielten. Im Vergleich zu den oben genannten sonst üblichen Magnesium-Konzentrationen ist der damit vermutlich realisierte Gehalt im SML sehr niedrig. Extrem halophile Archaea sind auf hohe Magnesium-Konzentrationen angewiesen. Durch die

Verwendung Magnesium-armer Medien kann das Wachstum der extrem halophilen, die sonst in hypersalinen Bereichen dominieren, unterdrückt werden, was für die Isolierung moderat halophiler Bakterien von Vorteil ist (Rodríguez-Valera, 1988). FISH der Lanzarote-Isolate mit Wachstum auf hypersalinen Medien bei Vogt (2000) wies auf das Vorhandensein zahlreicher Archaeen in der hier genutzten Stammsammlung hin. Eine vollständige Unterdrückung des Wachstums von Archaea durch den geringen Magnesium-Gehalt des Mediums und damit Vernachlässigung dieser Bakteriengruppe in der Stammsammlung ist daher unwahrscheinlich. Die geringe Mg^{2+}-Konzentration im SML ermöglichte weiterhin den Einsatz dieses Mediums für die La Baule-Proben, da sich die Marais Salants durch geringe Mg^{2+} und K^{+}-Konzentrationen in den Kristallisationsbecken auszeichnen. Diese Salze akkumulieren dort im Gegensatz zu anderen Salinen nicht, da sie durch die jährliche Reinigung der Becken entfernt werden (Giani et al., 1989).

Tab. 25: Gelöste Hauptkomponenten in Seewasser mit einer Chlorinität von 1,9% und einer Salinität von 3,432% (Quelle: modifiziert nach Rodríguez-Valera, 1988).

Gelöste Substanz	Konzentration [g/kg]	Gewichts-prozent
Cl^-	18,980	55,04
Na^+	10,556	30,61
SO_4^{2-}	2,649	7,68
Mg^{2+}	1,272	3,69
Ca^{2+}	0,400	1,16
K^+	0,380	1,10
HCO_3^-	0,140	0,41
Br^-	0,065	0,19
H_3BO_3	0,026	0,07
Sr^{2+}	0,013	0,04
Fl^-	0,001	0,00

Für die Herstellung des SML wurde Haushaltssalz dem NaCl in p.a.-Qualität vorgezogen, da ersteres höhere Anteile an mineralischen „Verunreinigungen“ enthält, die das natürliche Habitat der Salinen-Organismen besser imitieren und daher für die Herstellung eines Komplexmediums besser geeignet ist. So enthält z.B. Seewasser mit einer Salinität von 3,432% nach Rodríguez-Valera (1988) hauptsächlich die in Tabelle 25 aufgeführten Substanzen, die bei der Halit-Kristallisation eingeschlossen werden können. Im HM, das mit NaCl angesetzt wird, ist keine Zugabe von marinen Spurenelementen vorgesehen. Dies könnte ein Grund für die geringere Diversität auf diesem Medium im Vergleich zum SML sein.

Die Isolierung und die anschließenden Tests erfolgten auf Medien mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen, um zum einen eine hohe Organismendiversität zu gewährleisten. Zum anderen wurden dadurch Bakterien einer Spezies (evt. auch eines Stammes), die ein breites Wachstumsspektrum bezüglich der Salinität besitzen, bei unterschiedlich hohen Salzkonzentrationen parallel herangezogen und bei diesen Konzentrationen auf die Produktion von extrazellulären Enzymen getestet. Spezies der Gattung *Halomonas* und *Haloferax* gehören zu den Organismen mit dem breitesten Wachstumsspektrum in Bezug auf Salz. *Halomonas elongata* ist in der Lage, von 0,1% NaCl bis zur Halit-Sättigung zu wachsen, und *Haloferax volcanii* zeigt immerhin noch im Bereich von 8% NaCl bis zur Sättigung Wachstum (Mojica et al., 1997). Um unter derart unterschiedlichen Bedingungen leben zu können, muss eine Anpassung des Enzymapparates erfolgen. So konnte an beiden Organismen durch PCR willkürlich geprimter RNA bzw. Vergleich der Proteome gezeigt werden, dass verschiedene Proteinsets in

Abhängigkeit von der Mediensalinität exprimiert werden (Bidle, 2003; Mojica et al., 1997; Ferrer et al., 1996). Es kann daher vermutet werden, dass die Bildung und Sekretion von extrazellulären Enzymen ebenfalls von der Salzkonzentration abhängig ist.

Auf SML mit einem pH von 8,0 konnten höhere Lebendkeimzahlen ermittelt werden als auf Medium mit pH 9,5. Lediglich auf SML mit 12% Salz und einem pH-Wert von 9,5 waren in den Lanzarote-Proben in vielen Fällen ähnlich hohe Zellzahlen nachweisbar wie auf pH 8,0. Daher ergaben sich für La Baule 16 mal mehr Isolate auf pH 8,0 als auf pH 9,5 und für Lanzarote nur 4 mal mehr Isolate. Im Allgemeinen beträgt der Anteil der Alkaliphilen in neutralem Boden ca. 1/10 bis 1/100 der Zellzahl neutrophiler Mikroorganismen (Horikoshi, 1991a), wobei der Anteil um so größer ausfällt, je alkalischer der Boden ist. Abbildung 48 zeigt den Zusammenhang zwischen der Zellzahl aerober alkaliphiler Mikroorganismen und dem pH-Wert der Bodenproben. In der Annahme, dass diese Verteilung auf aquatische Habitate übertragbar ist, kann vermutet werden, dass statistisch gesehen die Vorfluter von Salinen einen höheren Anteil alkaliphiler Organismen beherbergen müssten als die Kristallisationsbecken mit den durch die erhöhten Salzkonzentrationen hervorgerufenen verminderten pH-Werten. Dies könnte die Tatsache erklären, dass sowohl in den Lanzarote- als auch in den La Baule-Proben höhere Lebendkeimzahlen auf 12% NaCl, pH 9,5 als auf 20% NaCl, pH 9,5 ermittelt werden konnten. Allgemein war – die oben dargestellte Verteilung der Alkaliphilen bestätigend – zu beobachten, dass Enzymproduzenten auf pH 9,5 in Lanzarote-Proben nur aus Vorflutern und dem küstennahen See bei El Golfo mit erhöhten pH-Werten und nicht in Kristallisationsbecken gefunden wurden. Bezüglich La Baule wurden aus allen Proben Enzym-positive Isolate auf pH 9,5 gewonnen, und sowohl ihre Anzahl als auch ihr Anteil der Gesamtproduzenten nahm mit steigenden pH-Werten des Ausgangsmaterials bis ca. pH 8 zu. In La Baule-Proben mit pH-Werten über 8 wichen die erzielten Produzentenzahlen allerdings von diesem Trend ab und waren mit steigenden pH-Werten der Umweltproben rückläufig, während die Gesamtzahl der Enzymproduzenten stagnierte. Die Ursache für diese Entwicklung bleibt zu untersuchen.

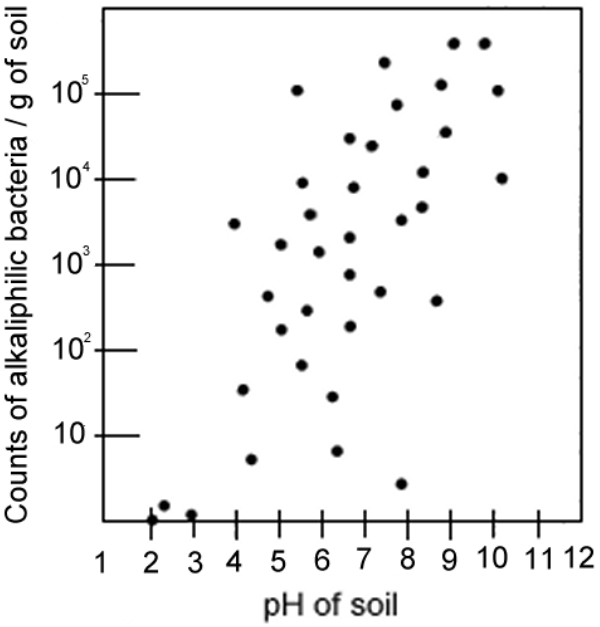

Abb. 48: Vorkommen von aeroben alkaliphilen Mikroorganismen in Böden mit verschiedenen pH-Werten. (Quelle: Horikoshi, 1999)

4.4 Eignung der Plattentests für ein initiales Screenen auf extrazelluläre Hydrolasen und Vergleich der erzielten Ergebnisse

Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit gesetzten Ziels, die halophilen Isolate hinsichtlich verschiedener Enzymaktivitäten zu testen, erfolgte das Screenen auf Enzymproduzenten durch Detektion anstelle eines Selektionsverfahrens. Die Detektion umfasst die Isolierung eines Organismus und den Test auf die gesuchten Aktivitäten. Dieses Verfahren hat im Gegensatz zur Selektion, bei der nur die Organismen heranwachsen, die das gewünschte Enzym produzieren, den Vorteil, dass die Hälterung zusätzlich „doppelter" Isolate mit mehr als nur einem extrazellulären Enzym vermieden wird und zum Teil bereits quantitative Aussagen über den Substratabbau gemacht werden können (Demirjian et al., 1999).

Eine Engstelle beim Finden von neuen Enzymen ist häufig das Testverfahren beim Screenen und nicht die Bereitstellung von zu screenendem Material aus z.B. Genbanken oder Stammsammlungen (Wahler & Reymond, 2001). So ist die Wahl des Mediums und des Substrats entscheidend bei der Enzymbildung (Demirjian et al., 1999). Eine Zelle schüttet seine extrazellulären Enzyme nur unter bestimmten Bedingungen aus. So konnte gezeigt werden, dass die Kulturbedingungen, die das Zellwachstum von *Bacillus firmus* bzw. *Pseudoalteromonas* sp. begünstigen, von den Bedingungen abwichen, die sich günstig auf die Protease-Produktion auswirkten (Sánchez-Porro et al., 2003b; Moon & Parulekar, 1991). So ist häufig zu beobachten, dass ein Enzym nur in einer bestimmten Wachstumsphase gebildet und sekretiert wird. Bierbaum und Mitarbeiter (1991) schlossen durch Analyse der intrazellulären Nucleotid-Gehalte von *Bacillus licheniformis*, dass die Produktion extrazellulärer Proteasen eine Folge von Nährstofflimitierung (Kohlenstoff- und Stickstoff-Stress) beim Eintreten in die stationäre Phase ist. Andere *Bacillus*-Arten wiesen eine parallel zum Wachstum verlaufende Enzymproduktion auf, so dass die maximale Enzym-Menge beim Eintreten in die stationäre Phase erreicht wurde (Kumar & Takagi, 1999). Der Einsatz von Plattentests ist daher im allgemeinen vorteilhaft, da die Enzymproduktion während aller Wachstumsphasen erfasst wird und auch geringe Enzym-Mengen, die nur innerhalb eines kurzen Zeitraums ausgeschüttet werden, nachgewiesen werden können – vorausgesetzt, die Platten werden ausreichend lange inkubiert. Im Flüssigmedium wird die Enzymaktivität nur zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt (Martins et al., 2001).

4.4.1 Detektion von Proteasen

Zahlreiche Arbeiten hatten gezeigt, dass die Verwendung verschiedener anorganischer bzw. schnell metabolisierbarer Stickstoffverbindungen wie Ammonium und Aminosäuren im Medium bei einer Reihe von Bakterien zu einer geringen Produktion von alkalischen Proteasen führte (Chaphalkar & Dey, 1994; Sen & Satyanarayana, 1993; Giesecke et al., 1991; Frankena et al., 1986; Chandrasekaran & Dhar, 1983). Dies bestätigte die Annahme, dass ein Enzym möglichst nur dann gebildet und daraufhin sekretiert wird, wenn es tatsächlich gebraucht wird und sein

Substrat vorliegt. Die Verwendung komplexer organischer Stickstoff-Quellen hatte in vielen Fällen eine höhere Enzymproduktion zur Folge (Kumar & Takagi, 1999). Dies berücksichtigend wurde in der vorliegenden Arbeit Casein als Substrat in den Testplatten für Protease-Produktion eingesetzt, während hingegen im Kulturmedium Casaminosäuren als N-Quelle verwendet wurden. Der Casein-Agar-Plattentest ist nach Gupta und Mitarbeiter (2002a) neben wenigen anderen Substraten wie Magermilch, Gelatine, Rinderserumalbumin und Keratin ein allgemein verwendetes Verfahren für das initiale Screenen auf proteolytische Aktivität. Durch die Einstellung des pH-Werts im Plattentest ist zusätzlich eine Unterscheidung zwischen neutraler und alkalischer Protease möglich. Wallace und Kopecny (1983) bewiesen, dass Proteasen aus Pansen-Bakterien mit Casein als Substrat höhere Proteinabbauraten zeigten als mit anderen Proteinen wie Albumin oder Katalase bzw. Proteingemischen aus u.a. Soja oder Mais, was die Autoren auf die höhere Löslichkeit von Casein im Wasser und die damit positiv beeinflusste Abbaugeschwindigkeit zurückführten. Gupta und Mitarbeiter (2002a) schlossen ebenfalls aus zahlreichen Veröffentlichungen, dass insbesondere alkalische Proteasen mit Casein als Substrat höhere Aktivitäten zeigen als mit Azocasein, Hämoglobin oder Albumin. Die meisten fluorogenen und chromogenen synthetischen Substrate – nicht nur für Proteasen, sonder auch für zahlreiche andere hydrolytische Enzyme – besitzen funktionelle Gruppen mit Phenol- oder Anilin-Leavinggroups. Sie neigen dazu, zu schnell und unspezifisch abgespalten zu werden, so dass sie unter drastischen Screeningbedingungen mit ungereinigten Extrakten oder hohen pH-Werten nicht eingesetzt werden können (Wahler & Reymond, 2001).

Nach Kumar und Takagi (1999) zeigen die meisten alkaliphilen Mikroorganismen extrazelluläre Protease-Produktion, Interesse finden aber nur die Stämme mit hoher Produktionsleistung. Bei der Wahl der zu isolierenden Organismen wurde in der vorliegenden Arbeit keine Unterscheidung in der Stärke der Enzymsekretion gemacht (dies betrifft alle getesteten Enzyme). Alle Stämme, die auch nur geringste Hydrolyse im Test zeigten, wurden in die Stammsammlung aufgenommen. Mao und Mitarbeiter (1992) zeigten, dass *B. licheniformis* sehr kleine Hydrolyse-Höfe auf Casein-Agar aber starke Protease-Produktion im Submersverfahren aufwies. Allein die Ergebnisse aus dem Plattentest sind damit nicht ausreichend, um die Eignung eines Stammes für die spätere Enzym-Produktion in großem Maßstab zu bestimmen. Die besondere Fähigkeit alkaliphiler Mikroorganismen, extrazelluläre Proteasen zu produzieren, konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Von 77 Lanzarote-Isolaten auf pH 9,5 waren nur 15 in der Lage, Proteolyse zu betreiben. DNA und RNA konnten vergleichsweise durch 31 bzw. 34 Isolate hydrolysiert werden. Unter 182 La Baule-Isolaten auf pH 9,5 fanden sich ebenfalls nur 55 Protease-Produzenten. Zu berücksichtigen ist auch, dass es sich bei den Isolaten auf pH 9,5 sowohl um alkaliphile als auch um alkalitolerante Organismen handeln kann. Exemplarische Untersuchungen von Vogt (2000) zeigten, dass von 21 Lanzarote-Stämmen aus der Gruppe auf SML 12% NaCl, pH 9,5 nur 4 auf diesen hohen pH-Wert angewiesen waren (2 davon mit

Protease-Aktivität), 17 Stämme zeigten bei pH 8,0 höhere Wachstumsraten. Auf 20% NaCl waren 10 von 15 getesteten Stämmen alkaliphil (keiner zeigte Proteolyse). Ähnliche Ergebnisse sind vermutlich auch für die La Baule-Isolate auf pH 9,5 zu erwarten.

4.4.2 Detektion von Nucleasen

Eine Nuclease, die in Aufreinigungskits für DNA bzw. RNA eingesetzt werden soll, muss zuckerspezifisch für ihr Substrat sein und ihre Zielverbindung komplett zerlegen. Es ist daher zweckmäßig, komplexe Substrate einzusetzen wie sie auch später in der tatsächlichen Anwendung anfallen. Für den DNase- und RNase-Nachweis wurde hochmolekulare genomische DNA aus Lachsspermien bzw. Gesamt-RNA aus Hefe verwendet. Während der Nachweis von hydrolysierter RNA durch Säurepräzipitation zumeist möglich ist, scheint der Nachweis von DNasen über das säurepräzipitierte Substrat häufig zu wenig empfindlich, weshalb die Färbung der DNA mit Methylgrün bevorzugt wurde. Mit dieser Methode können sowohl extrazelluläre als auch zellgebundene (periplasmatische) DNasen erfasst werden (Basse et al., 1994). Zudem hat die Zugabe des Farbstoffs zum Medium den Vorteil, dass der Test mehrmals zu verschiedenen Zeiten abgelesen werden kann. Die Säureüberschichtung wie im RNase-Nachweis oder die Überschichtung mit Farbstoff hat zur Folge, dass der Test beendet wird und bei noch nicht eindeutigem Ergebnis bezüglich einer DNase-Sekretion wiederholt werden muss. Ein Nachteil des Methylgrün-Tests zeigte sich im verminderten Wachstum einiger Stämme. Dem gegenüber konnten Smith und Mitarbeiter (1969) anhand von 498 auf Methylgrün-Testagar inkubierten medizinischen Abstrichen keinen Einfluss von Methylgrün auf das Wachstum oder die Nuclease-Sekretion feststellen, im Gegensatz zu Toluidinblau O, das sich in der nötigen Konzentration von 0,01% wachstumshemmend auf Gram-positive Bakterien auswirkt (Schreier, 1969). Weiterhin hatte die Alkaliempfindlichkeit von Methylgrün zur Folge, dass Testplatten mit einem pH-Wert von 9,5 nicht lange gelagert werden konnten und allgemein wegen der geringeren Farbintensität schwieriger auszuwerten waren. Während also Methylgrün in medizinischen Anwendungen ein weit verbreiteter basischer Farbstoff ist, scheint er für den Einsatz an haloalkaliphilen Umweltisolaten nur bedingt geeignet. Es besteht die Möglichkeit, dass durch diesen Test einige DNase-Produzenten nicht erfasst wurden.

Wenn DNA abgebaut wird, ist zu beachten, dass nicht nur DNasen dies bewerkstelligen können. Auch durch Bakterien gebildete Radikale können zu einem DNA-Abbau führen (O`Connor & Savage, 1993). Ein Einfluss auf die Ergebnisse im Plattentest ist aber unwahrscheinlich, da die DNA-Menge (und die Menge anderer Substanzen, mit denen interagiert werden könnte) im Agar-Medium groß und der Test damit nicht so empfindlich ist wie beispielsweise der *In-vitro*-DNase-Test, der in ähnlicher Form explizit zum Nachweis radikalischer Reaktionen herangezogen wird (Ueda et al., 1998).

4.4.3 Detektion von Lipasen und Esterasen

Eine Unterscheidung zwischen „echter Lipase“ und Esterase sowie zwischen Lipasen per se war in der Vergangenheit mangels Standardsubstrat oder Standardtest schwierig (Jaeger et al., 1999). Bei Simons und Mitarbeitern (1998) wurden beispielsweise für die Charakterisierung einer Lipase von *Staphylococcus aureus* 11 weitere bakterielle Lipasen vergleichend untersucht. Es hat sich wegen der Probleme bei der Differenzierung zwischen Esterase und Lipase eine sehr praktische Definition für Lipasen durchgesetzt. Während vormals ein deckelartiger Klappmechanismus am aktiven Zentrum des Enzyms sowie eine rapide Zunahme der Aktivität, wenn das Substrat eine Emulsion bildet, als ausschlaggebende Merkmale für eine echte Lipase angesehen wurden, werden Lipasen heute einfach als Carboxylesterasen definiert, die die Hydrolyse und Synthese von langkettigen Acylglycerinen katalysieren. Die Kettenlänge der Acylreste sollte dabei über 10 C-Atome betragen. Glycerinester mit kürzeren Ketten werden als Esterase-Substrate eingesetzt, wobei diese auch von vielen Lipasen hydrolysiert werden. Als optimales Lipase-Standardsubstrat gilt Trioleoylglycerin. Nach Kouker und Jaeger (1987) ist ein titrimetrischer Test, wie er Ende der 80er Jahre üblich war und heute noch als am verlässlichsten gilt (Jaeger et al., 1999), mit diesem Substrat sehr zeitaufwändig. Daher wurde von diesen Autoren der einfachere (und kostengünstigere) Plattentest mit Olivenöl und Rhodamin B entwickelt, der sowohl qualitativ als auch quantitativ auswertbar ist und daher in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Das gleiche Testprinzip kann auch mit dem Standardsubstrat Trioleoylglycerin durchgeführt werden (Jaeger et al., 1999). Wie Plou und Mitarbeiter (1998) zeigen konnten, sind Olivenöl und Trioleoylglycerin keine Substrate, die für ein initiales Screenen auf Lipasen bzw. Esterasen geeignet sind, da einige der in den Arbeiten verwendeten Enzyme durch sie nicht erfasst werden. Lipasen katalysieren sehr spezifische Reaktionen, so dass mit jedem Substrat nur eine kleine Auswahl an Enzymen detektiert werden kann (Jaeger et al., 1999). Wenn also das Substrat, das ein Enzym später in einer biotechnologischen Anwendung umsetzen soll, noch nicht bekannt ist, ist beim Screenen die Verwendung einer Substanz angezeigt, die von einer möglichst großen Anzahl verschiedener Enzyme zerlegt werden kann. Die verschiedenen Tween-Verbindungen sind dabei die in Agar-Medien am weitesten verbreiteten Substrate für den Nachweis lipolytischer Enzyme (Plou et al., 1998). Die Ergebnisse des Vergleichs von Lipase- und Esterase-Aktivität anhand einiger Lanzarote-Stämme unterstreichen die Verwendung dieser Methodik. Esterase-Produzenten wurden in mehr als ⅓ der Fälle durch den Olivenöl-Rhodamin-B-Agar nicht detektiert. Tween 20 ist ein sehr unspezifisches Substrat mit guter Löslichkeit, welches sehr allgemein Esterase-Aktivität anzeigt.

4.4.4 Detektion von Amylasen

Während niedermolekulare Dextrine keine Färbung mit Iod-Lösung ergeben, bilden Cyclodextrine mit Iod eine Einschlussverbindung, die blau gefärbt ist und in der die Iod-Atome perlschnurartig in den Kanälen angeordnet sind (Römpp, 2000). So kann ein Abbau der Stärke durch Amylasen nachgewiesen werden, CGTasen werden aber durch den in dieser Arbeit verwendeten Plattentest vermutlich nicht erfasst, da ihre Produkte durch Überschichtung der Agar-Platten mit Lugolscher Lösung nicht vom Substrat unterscheidbar sind.

4.5 Potenzial zur Bildung extrazellulärer Enzyme im hypersalinen Milieu

Ein durch Sánchez-Porro und Mitarbeiter (2003a) durchgeführtes Screening auf extrazelluläre Enzyme von moderat halophilen Bakterien aus sechs spanischen Salinen ergab unter 9.848 Isolaten 2,7% Amylase-, 2% Protease-, 2,1% Lipase-, 1% DNase-, 1% Pullulanase- und keine Xylanase-Produzenten (Tab. 26 enthält diese Werte im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit). Die Enzym-Aktivitäten wurden ebenfalls auf festen Medien ermittelt, mit ähnlichen oder gleichen Substraten und Nachweismethoden wie in der vorliegenden Arbeit (außer Pullulanasen und Xylanasen). Überschneidungen zwischen den Enzym-Produktionen gab es in nur wenigen Fällen (Tab. 27 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zu denen der vorliegenden Arbeit). 2% der 892 Enzym-positiven Isolate zeigten 2 der 5 Aktivitäten, bei 4% konnten 3 Aktivitäten und bei 0,5% 5 Aktivitäten nachgewiesen werden (über 4 Aktivitäten wurden keine Angaben gemacht. Es ist aber anzunehmen, dass der Wert zwischen dem von 3 und 5 Aktivitäten lag. Vermutlich 90% der positiven Isolate sekretierten ausschließlich eines der getesteten Enzyme).

Tab. 26: Anteile der Enzymproduzenten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Standorte auf Lanzarote und aus den Salinenfeldern bei La Baule sowie aus sechs spanischen Salinen.

Parameter	Standorte		
	6 spanische Salinen*	Lanzarote	La Baule
Getestete Isolate	9848	671	626
Isolate mit mind. einer Enzymaktivität	9%	51%	83%
Isolate mit Amylase-Aktivität	2,7%	n.u.	39%
Isolate mit Protease-Aktivität	2%	33%	21%
Isolate mit Lipase-Aktivität	2,1%	n.u.	n.u. (41% Esterase)
Isolate mit DNase-Aktivität	1%	18%	19%
Isolate mit Pullulanase-Aktivität	1%	n.u.	n.u.
Isolate mit Xylanase-Aktivität	0%	n.u.	n.u.

* Sánchez-Porro et al., 2003a
n.u. = nicht untersucht

Tab. 27: Überschneidungen in den Enzymaktivitäten durch Isolate der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Standorte auf Lanzarote und aus den Salinenfeldern bei La Baule sowie aus sechs spanischen Salinen.

Parameter	Standorte		
	6 spanische Salinen*	Lanzarote	La Baule
Anteil der Isolate mit 1 Enzymaktivität	Vermutlich >90%	55%	33%
Anteil der Isolate mit 2 Enzymaktivitäten	2%	26%	35%
Anteil der Isolate mit 3 Enzymaktivitäten	4%	19%	14%
Anteil der Isolate mit 4 Enzymaktivitäten	k.A.	n.u.	12%
Anteil der Isolate mit 5 Enzymaktivitäten	0,5%	n.u.	6%

* Sánchez-Porro et al., 2003a
k.A. = keine Angaben
n.u. = nicht untersucht

Die Ergebnisse von Sanchéz-Porro und Mitarbeitern (2003a) weichen erheblich von denen aus der vorliegenden Arbeit ab und zwar sowohl im Bezug auf die Anteile an Enzymproduzenten unter den isolierbaren Stämmen (in der vorliegenden Arbeit zeigten 51 bzw. 83% der Isolate Enzym-Aktivität) als auch in der Anzahl der Isolate mit mehr als nur einer Aktivität (45 bzw. 67% der positiven Stämme in der vorliegenden Arbeit). Von Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) wurden parallel zu den Umweltisolaten 21 moderat halophile Laborstämme getestet (DNase, Protease, Lipase, Amylase, Pullulanase), die in 11 Fällen Aktivität zeigten. Zwei dieser Stämme waren in der Lage, 2 dieser Enzyme zu sekretieren, und 3 Stämme konnten 3 Enzyme bilden. Trotz der geringen Fallzahlen bei diesem Parallelversuch, die keine statistische Absicherung erlauben, zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit größere Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen als zu denen der Umweltisolate von Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a). Auch die Berücksichtigung der Tatsache, dass teilweise andere extrazelluläre Enzyme untersucht wurden, und der Vermutung, dass Pullulanasen sowie Xylanasen scheinbar seltener zu findende Enzyme darstellen als RNasen, erklärt nicht die Differenz zwischen den Datensätzen. In einer weiteren Arbeit von Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003b) wurden 310 moderat halophile Isolate aus der spanischen Saline Isla Christina (Huelva, Spanien) auf extrazelluläre proteolytische Aktivität gescreened, von denen 8,4% ein positives Ergebnis zeigten (dieser Standort wurde ebenfalls in der oben genannten Arbeit von Sánchez-Porro et al., 2003a, beprobt). Von den insgesamt 201 Isolaten mit Protease-Aktivität, die von 6 Standorten stammten, entfielen aber nur 6 Isolate auf die Saline Isla Christina. Angaben über die Anzahl der untersuchten Isolate dieses Standortes sowie über die Zeitpunkte der Probenahmen wurden nicht gemacht. Es ist daher nicht bekannt, ob es sich um gleiches Probenmaterial oder voneinander unabhängige Untersuchungen handelt). In der vorliegenden Arbeit konnten mit 32% der Lanzarote-Isolate innerhalb der Isolationsgruppe auf 12% NaCl, pH 8 bzw. 35% der La Baule-Isolate wesentlich mehr Protease-Produzenten kultiviert werden (die Bedingungen in diesen Isolationsgruppen kommen denen bei Sánchez-Porro et al., 2003a/b, mit 10% NaCl, pH 7,2 am nächsten).

Bei Martins und Mitarbeitern (2001) konnten durch selektive Anreicherung in stärkehaltigem Medium (das zusätzlich Hefeextrakt, Pepton und Casaminosäuren als C-Quellen enthielt) 89 Isolate aus drei äthiopischen alkalischen Seen gewonnen werden, von denen 18% im Plattentest auf Stärke-Agar eine Sekretion von amylolytischen Enzymen zeigten (die restlichen Isolate besaßen vermutlich zellgebundene Enzyme oder nutzten die anderen angebotenen C-Quellen). Das verwendete Anreicherungsmedium enthielt keine nennenswerten Salzmengen, so dass eine Isolation von Halotoleranten oder Halophilen nicht forciert wurde. Es zeigte sich aber bei anschließenden Untersuchungen, dass alle Isolate halotolerant waren und die überwiegende Anzahl der Stämme Wachstum auf 10% NaCl zeigte. Die gewählte Inkubationszeit betrug in der vorliegenden Arbeit lediglich 24h. Daher ist zu vermuten, dass nur sehr schnellwachsende Stämme isoliert wurden. Eine Anreicherung in Flüssigkultur als initialer Schritt führt ebenfalls zur Selektion schnellwüchsiger Arten, da sich wenige Bakterien mit hohem Substratumsatz durchsetzen. Trotz der unterschiedlichen Voraussetzungen sind die erzielten Anteile an Amylase-Produzenten im Vergleich zu denen aus der vorliegenden Arbeit ähnlich (in den La Baule-Proben durchschnittlich 39% bzw. 25% auf 12% NaCl, pH 9,5, was den Bedingungen bei Martins und Mitarbeitern (2001) am nächsten kommt; die Lanzarote-Isolate wurden nicht auf Amylase-Produktion getestet). In einer Arbeit von Gibbons wurde bereits 1957 über 9 positive Isolate aus 49 halophilen Bakterien berichtet, die bezüglich Stärkehydrolyse getestet wurden. Dies entspricht ebenfalls einem Anteil von 18%.

Die Ursachen für die höheren Anteile an Enzymproduzenten, die in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a, 2003b) erzielt wurden, liegen vermutlich im unterschiedlichen Probenmaterial, in der Art der Isolate-Auswahl und der Wahl des Kulturmediums. Die allgemeine Verschiedenheit von Salinen wurde bereits oben diskutiert. Die Anzahl Enzym-produzierender Organismen ist vermutlich abhängig von der Menge an eingetragenem Substrat, die je nach Standort sehr schwanken kann. So sind bereits innerhalb der Proben, die aus verschiedenen Becken einer Saline stammten, erhebliche Unterschiede in der Anzahl enzymproduzierender Bakterien zu finden, wie an den Ergebnissen der Lanzarote-Isolate in Abbildung 18 sowie der La Baule-Isolate in Abbildung 28 zu ersehen ist. Weiterhin kann nicht beurteilt werden, ob in den zitierten Arbeiten besonderer Wert auf die Erfassung morphologisch diverser Organismen gelegt wurde, da entsprechende Angaben nicht gemacht wurden. Allerdings hätte der Test von zufällig ausgewählten Isolaten, unabhängig von ihrer morphologischen Diversität, eventuell eine Verzerrung der Ergebnisse zur Folge. Wenige Arten mit besonders hohen Individuenzahlen auf dem verwendeten Medium würden so häufiger isoliert und getestet und der Anteil an Enzymproduzenten könnte besonders hoch oder besonders niedrig ausfallen, je nach Fähigkeit dieser wenigen Spezies. Das Kulturmedium für die spanischen Salinenproben enthielt bei Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a/b) neben anderen Salzen 1,4 M NaCl und 154 mM Mg bei einem pH-Wert von 7,2 (Ventosa et al., 1982) und unterscheidet sich damit erheblich von den SML-Varianten. In der vorliegenden Arbeit

wurden drei verschiedene NaCl-Konzentrationen (12, 20 und 30%) eingesetzt, was das Spektrum an isolierbaren Organismen erheblich erweiterte (s. a. Kapitel 4.5.1). An den Lanzarote-Proben konnte weiterhin gezeigt werden, dass z.B. die Verschiebung des pH-Werts von 8,0 auf 9,5 einen bedeutenden Einfluss auf die Anzahl der isolierbaren Bakterien hatte und einen ebenso großen Einfluss auf den Anteil an Enzymproduzenten. Auf 20% NaCl konnten bei pH 8,0 ca. 17 mal so viele Isolate gewonnen werden wie auf pH 9,5 (Kapitel 3.1.4), und der Anteil der Enzymproduzenten unterschied sich im Fall der DNasen und RNasen um 50% und im Fall der Proteasen um 30% (Kapitel 3.1.7.2). Die Magnesium-Konzentration des Kulturmediums beeinflusst ebenfalls wie oben schon diskutiert die Auswahl an Bakterien, die aus den Proben isoliert werden können. Diese Aspekte berücksichtigend ist zu vermuten, dass die relative Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen von Martins und Mitarbeitern (2001) sowie von Gibbons (1957) zufällig sind und die Ausbeute an Enzym-produzierenden Stämmen aus Umweltproben stark vom Probenstandort sowie – in Übereinstimmung mit Wahler und Reymond (2001) – von den gewählten Isolations- und Testbedingungen abhängt.

Nach Rangarajan und Shankar (1999) ist das Wissen über Nucleasen häufig sehr gering. So sind Nucleasen, die für die Analytik interessante Eigenschaften besitzen und hauptsächlich von Pilzen stammen, häufig nicht ausreichend untersucht. Daten über die Verteilung von Nuclease-Produzenten in marinen Habitaten sind ebenfalls kaum vorhanden. Extrazelluläre Nucleasen sind – im Gegensatz zu intrazellulären – nach Benedik und Strych (1998) rar und auf eine geringe Anzahl bakterieller Spezies limitiert, die weit über das Reich der Eubacteria verstreut sind. Die Enzyme zeigten daher auch geringe Verwandtschaft zueinander. Bei Maeda und Taga (1973) konnten in verschiedenen marinen Sedimenten zwischen 16 und 76% der auf festen Nährmedien isolierbaren Bakterien extrazelluläre DNasen produzieren. In der vorliegenden Arbeit konnten aus hypersalinem Material DNasen im Vergleich zu den anderen hier untersuchten extrazellulären Enzymen seltener nachgewiesen werden (18 bzw. 19% der Isolate). RNasen waren hingegen mit 33% von Lanzarote bzw. 64% aus La Baule häufig. Bei Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) zählen DNasen ebenfalls zu den weniger häufig gebildeten Enzymen. Die in den verschiedenen Arbeiten erzielten Produzentenanteile bestätigen daher nicht uneingeschränkt die Aussage von Benedik und Strych (1998). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten BLAST-Ergebnisse der 16S-rRNA-Gen-Teilsequenzen einer Auswahl der Lanzarote-Stämme (Kapitel 3.1.8) zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung der DNase-Produzenten auf 4 von 5 Bacteria-Familien. RNasen wurden hingegen mit 51% hauptsächlich innerhalb der Familie der Halomonadaceae gebildet. Die Aussage von Benedik und Strych (1998) scheint daher eher auf DNasen als auf RNasen zuzutreffen.

Die hier erzielten geringen DNase-Produzenten-Anteile sind vermutlich nicht nur auf die Verwendung von Methylgrün zurückzuführen, das sich auf die Synthese negativ ausgewirkt haben könnte. Vielmehr wird der Zucker Ribose von mehr Organismen als Kohlenstoffquelle genutzt als die Desoxyribose (Al-Khaldi et al., 2000). RNA kann daher scheinbar besser

verwertet werden als DNA, und Organismen mit extrazellulärer RNase könnten daher häufiger nachzuweisen sein als solche mit DNase. Ein weiterer Grund könnte die Nutzung von DNA als Informationsquelle alternativ zur Nutzung als Nahrungsquelle sein. Es wurden bereits 40 Bakterienspezies (sowohl Bacteria als auch Archaea) beschrieben, die in der Lage sind, durch natürliche Transformation DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren (Stand 1999, Dröge et al., 1999; Lorenz & Wackernagel, 1994). Die ungezielte komplette Hydrolyse von DNA in der Umgebung der Zelle ist daher vermutlich bei einer Reihe von Bakterien nicht von Vorteil. DNasen, die für den Transformationsvorgang benötigt werden, sind zellgebunden und ihre Expression ist stark reguliert (Dubnau, 1999), so dass trotz der Verwendung von Methylgrün als empfindlicher Indikatorfarbstoff im Plattentest ein Nachweis wahrscheinlich in vielen Fällen nicht gelingt.

4.5.1 Taxonomie der Enzymproduzenten aus hypersalinem Milieu

Bei Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) wurde eine Auswahl von 122 Enzymproduzenten taxonomisch charakterisiert (durch Gram-Verhalten, Zellmorphologie, Mobilität, Salztoleranz des Wachstums, anaerobes Wachstum, Katalase- und Oxidase-Produktion, hydrolytische Aktivität und BIOLOG) und den Gattungen *Salinivibrio* (Vibrionaceae, 55 Isolate), *Bacillus-Salibacillus* (Bacillaceae, 29 Isolate), *Halomonas* und *Chromohalobacter* (Halomonadaceae, 27 Isolate), *Salinicoccus* (Staphylococcaceae, 2 Isolate) sowie *Marinococcus* (Sporolactobacillaceae, 1 Isolat) zugeordnet. Die Daten sind vergleichend mit der Familien- bzw. Gruppenzuordnung anhand der Ergebnissen der 16S-rRNA-Gen-Teilsequenzierung der Lanzarote-Stämme (Kapitel 3.1.8) in Tabelle 28 dargestellt.

Tab. 28: Anteil der taxonomisch charakterisierten Enzymproduzenten in den ermittelten Organismen-Gruppen von Lanzarote (Kapitel 3.1.8) und von 6 spanischen Salinen (Sánchez-Porro et al., 2003a).

Organismen-Gruppe	Anteil der Enzymproduzenten [%]	
	Lanzarote	6 spanische Salinen
Halomonadaceae	32	22
Pseudomonadaceae	23	0
Vibrionaceae	22	45
Bacillaceae	12	24
Alteromonadaceae	3	0
Sporolactobacillaceae	0	1
Staphylococcaceae	0	2
Archaea	6	0
Nicht zugeordnet	3	7

Der Schwerpunkt der Familien lag in beiden Arbeiten bei den Halomonadaceae, den Vibrionaceae und den Bacillaceae. Die in Proben von Lanzarote als große Gruppe auftretende Familie der Pseudomonadaceae konnte in den sechs spanischen Salinen nicht nachgewiesen werden, was auf den geringen Salzgehalt von 10% (8,5% NaCl) im Kulturmedium bei Sánchez-

Porro und Mitarbeitern (2003a) zurückzuführen ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Enzym-positive Vertreter der Pseudomonadaceae hauptsächlich auf 20 und 30% NaCl isoliert. Nur 3 der 50 Isolate wurden auf 12% NaCl herangezogen. Bis auf ein Isolat (extrem halophil) waren alle in der Lage, bei 12% NaCl zu wachsen, wurden aber den Grenzlinien-extrem bis extrem halophilen Bakterien zugeordnet. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben von Rodríguez-Valera und Mitarbeitern (1985), wonach Vertreter der *Pseudomonas-Alteromonas-Alcaligenes*-Gruppe in einer spanischen Meerwassersaline bei über 15% Salinität häufig auftraten (numerische Taxonomie von 724 Stämmen). Durch die von Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) angestrebte Erfassung von ausschließlich moderat halophilen Enzymproduzenten, wurden daher Pseudomonadaceae nicht nachgewiesen, auch wenn sie in den beprobten Salinen abundant waren. Weiterhin kann eine tendenzielle Übereinstimmung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den weiteren nachgewiesenen taxonomischen Gruppen aus der spanischen Meerwassersaline bei Rodríguez-Valera und Mitarbeitern (1985, dargestellt in Tab. 29) festgestellt werden.

Tab. 29: Durchschnittliche taxonomische Verteilung von 724 heterotrophen halophilen Eubakterien aus einer spanischen Meerwassersaline, ermittelt durch numerische Taxonomie (Rodríguez-Valera et al., 1985).

Nr.	Taxonomische Gruppe	Anteil [%]
1	*Pseudomonas, Alteromonas, Alcaligenes*	52,1
2	*Vibrio*	19,2
3	Gram-pos. Kokken	10,1
4	*Flavobacterium*	9,5
5	*Acinetobacter*	4,2
6	Gram-pos. Stäbchen	3,2
7	*Chromobacterium*	0,4
8	*Enterobacteriaceae*	0,9
9	*Actinomycetes*	0,4

Zu berücksichtigen ist die Reklassifizierung zahlreicher Arten und Gattungen innerhalb der letzten Jahre. So wird auch durch Ventosa und Mitarbeiter (1998) und Yamamoto und Harayama (1996) die Reklassifizierung eines Großteils der Isolate aus den Gruppen 1, 2, 4 und 5 bei Rodríguez-Valera und Mitarbeitern (1985) in die Familie der Halomonadaceae gefordert. Diese Familie ist daher vermutlich ebenfalls mit einem hohen Anteil vertreten. Weniger häufig auftretende taxonomische Gruppen variieren zwischen den hier aufgeführten Standorten, was vermutlich sowohl auf die geringe Abundanz an den Standorten als auch auf die verschiedenen Isolationsbedingungen zurückzuführen ist.

Archaea wurden vermutlich aus den selben Gründen bei Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) nicht erfasst wie die Pseudomonadaceae. Unter den taxonomisch untersuchten Enzymproduzenten von Lanzarote wurden Archaea nur in der Gruppe mit Isolation auf 30% NaCl gefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Rodríguez-Valera und Mitarbeitern (1985) sowie von Benlloch und Mitarbeitern (1996), die ein vermehrtes Auftreten

von Archaea mit steigender Salinität innerhalb der Meerwassersalinen nachweisen konnten. Oren (1990) stellte dort zudem anhand von Stoffwechselaktivitätsmessungen eine zahlenmäßige Dominanz der Archaea über die Bacteria fest. Diese Daten können anhand der Ergebnisse der ARDRA-Gruppierungen und 16S-rRNA-Gen-Teilsequenzierungen der Enzymproduzenten aus der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da Bacteria mit 65% gegenüber 35% Archaea häufiger isoliert wurden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Vergleich zu den Ausbeuten an Enzymproduzenten aus anderen hypersalinen Habitaten aus den in der vorliegenden Arbeit beprobten Standorten relativ hohe Zahlen an Enzymproduzenten gewonnen werden konnten, was die Eignung der Kulturmedien und der Testbedingungen auf extrazelluläre Hydrolasen (mit Einschränkungen für den Methylgrün-Testagar) bestätigt.

4.6 Charakterisierung der Stämme EG2S/2 und SJ1/4 sowie Vergleich ihrer Nuclease-Aktivitäten

4.6.1 Systematische Zuordnung von EG2S/2 und SJ1/4

Die Vorcharakterisierung der neun Isolate von Lanzarote mit DNase-Aktivität führte zur Auswahl von zwei Bacteria, die der Gattung *Halobacillus* (EG2S/2) bzw. *Halomonas* (SJ1/4) angehörten (s.u.). Stamm EG2S/2 zeigte zuweilen eine Zellmorphologie, wie sie für die *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*-Gruppe charakteristisch ist (Beispiel *Cytophaga aurantiaca*: dünne flexible, pleomorphe Stäbchen mit sehr langen schwach geschwollenen Zellen, ältere Zellen mit zitronenförmigen Aufblähungen, die später zu Sphäroblasten entarten [Balows et al., 1992]), was aber vermutlich auf den Zellform-verändernden Einfluss des Salzes zurückzuführen ist. Während die Zellwände der Halococcen ihre Form auch in destilliertem Wasser beibehalten, benötigen z.B. die der Halobakterien hohe Salzkonzentrationen, um ihre Stäbchenform und ihre Stabilität zu wahren. Bei einer Salzkonzentration weit unter 3 M NaCl (optimales Wachstum bei ca. 4 M) kommt es bei den Zellen zu einem Verlust der Form bis hin zur Bildung von Sphäroblasten. Unterhalb von 1 bis 2 M NaCl zersetzen sich die äußeren Schichten der Zelle (Kushner, 1978). Eine ähnliche Schädigung der Zellwand ist auch bei hyperoptimalen Salzbedingungen anzunehmen. SJ1/4 wird mit optimalem Wachstum bei 20% NaCl nach Kushner (1978) zu den Grenzlinien-extrem-halophilen Bakterien gezählt, obwohl auch bei 5% NaCl noch nennenswertes Wachstum erfolgte (Herzog, 2002). EG2S/2 tolerierte zwar ähnlich hohe Salzkonzentrationen wie SJ1/4, zeigte aber optimales Wachstum bei 2,9% NaCl. Das Wachstum wurde nicht auf Salzkonzentrationen unterhalb von 0,5% NaCl getestet. Die untere Salzgrenze ändert sich zudem mit der Kultivierungstemperatur. Es kann daher nicht beurteilt werden, ob es sich bei EG2S/2 um einen halotoleranten oder schwach halophilen Organismus handelt. Beispiele mit ähnlichem Verhalten gegenüber Salz sind *Vibrio (Salinivibrio) costicola* und *Halomonas elongata,* die nach Vreeland (1987) eher den

Halotoleranten als den Halophilen zugeordnet werden, sie benötigen aber eine geringe Menge Salz (0,05 M). Vreeland (1987) benutzte daher den Begriff euryhaline (eury = griechisch für weit, umfassend), um dem Rechnung zu tragen (das Gegenteil wäre stenohalin, die Begriffe wurden bereits 1980 durch Golubic geprägt).

Die L-Alanin-Aminopeptidase ist ein Enzym, das in ausreichender Menge nur in Gram-negativen Bakterien vorkommt (Ausnahmen wurden bei den Gattungen *Bacteroides*, *Campylobacter* und *Veillonella* beobachtet) und welches die Aminosäure L-Alanin aus unterschiedlichen Substraten abspaltet. Der L-Alanin-Aminopeptidase-Schnelltest von Merck ist nach Süßmuth und Mitarbeiter (1999) nicht für gelb-pigmentierte Mikroorganismen geeignet. Da SJ1/4 eine leichte Gelbfärbung aufweist und auch die Reaktionszeit über die Angaben des Herstellers von max. 30 min auf 5 h verlängert wurde, ist das positive Ergebnis nicht zuverlässig. Die Lyse der Zellen bei der Gram-Färbung und natürlich die Ergebnisse der 16S-rRNA-Gen-Analyse sind allerdings weitere Hinweise auf Gram-negatives Verhalten von SJ1/4.

EG2S/2 zeigte 99,6% Basenidentität der 16S-rRNA-Gen-Teilsequenz zum nächsten bekannten Verwandten *Halobacillus litoralis*. Durch die Bestimmung der Sequenz eines kurzen Fragments der 16S rRNA und Vergleich mit den entsprechenden Fragmenten von Referenzstämmen können Bakterien Familien und Gattungen zugeordnet werden (Busse et al., 1996). Durch Fox und Mitarbeiter (1992) konnte am Beispiel von *Bacillus psychrophilus* und *Bacillus globisporus* eine 16S-rRNA-Gen-Basenübereinstimmung von 99,8% ermittelt werden, aber nur eine 23%ige Übereinstimmung der Gesamt-DNA durch DNA:DNA-Hybridisierung. Martinez-Murcia und Mitarbeiter (1992) wiesen eine 99,9%ige 16S-rRNA-Gen- aber nur 30%ige Gesamt-DNA-Basenübereinstimmung (ebenfalls durch DNA:DNA-Hybridisierung) bei *Aeromonas trota* und *Aeromonas caviae* nach. Eine >70%ige Gesamt-DNA-Übereinstimmung ist ein Hinweis auf gleiche Arten, während 20 bis 60% Übereinstimmung die gleiche Gattung anzeigt (Busse et al., 1996). Die 16S-rRNA-Analyse eignet sich daher nicht zur Identifikation auf Artebene. Weitere morphologische und physiologische Unterschiede zu *Halobacillus litoralis* wie die Koloniefarbe (weiß statt orange), die optimale NaCl-Konzentration für das Wachstum (2,9 statt 10%) sowie die Fähigkeit, Casein und Stärke zu hydrolysieren (Vergleichsdaten aus Ventosa et al., 1998), machen es wahrscheinlich, dass es sich bei EG2S/2 nicht um *Halobacillus litoralis* handelt. Im Fall von SJ1/4 ist aufgrund der Übereinstimmung von nur 97,7% mit dem nächsten Verwandten *Halomonas halmophila* die Zugehörigkeit zu einer anderen Art als der genannten innerhalb der Gattung *Halomonas* ebenfalls wahrscheinlich. 95% wird allgemein als Grenzwert für die Zuordnung zu einer anderen Gattung angesehen (Ludwig et al., 1998). Die Basen-übereinstimmung des 16S-rRNA-Gens divergiert innerhalb der Gattung *Halomonas* sogar noch weiter, da es sich um zwei phylogenetische Gruppen handelt und zahlreiche Vertreter der Gattung selbst diesen zwei Gruppen nicht zugeordnet werden können (91.7 – 96,4% Sequenz-übereinstimmung zur Gruppe 1 und 2 [Arahal et al., 2002]).

4.6.2 *In-vitro*-DNase-Test

Nuclease-Aktivität wurde bisher mit Hilfe verschiedener Verfahren nachgewiesen, u.a. durch den Nachweis säurelöslicher Mono- und Oligonucleotide, die bei der enzymatischen Zerlegung hochmolekularer DNA entstehen (Nestle & Roberts, 1969), durch die Fällung von DNA mit EtOH und anschließender Extinktionsmessung bei 260 nm (Kamekura & Onishi, 1974), durch die Abnahme der Fluoreszenz während des Abbaus von DNA in Mikrotiterplatten (Ball et al., 1987) sowie durch die Abnahme der Fluoreszenz-Polarisationswerte mithilfe eines Spektropolarimeters (Yonemura et al., 1983). Die Unitdefinitionen für Nucleasen sind daher so verschieden wie ihre katalysierten Reaktionen bzw. die angewandten Nachweismethoden. Nuclease-Aktivität wird zumeist wie folgt angegeben: 1 Unit Enzym bewirkt die Freisetzung von x nmol säurelöslichen Produkten aus einem Nucleinsäure-Substrat pro Zeiteinheit (bei definierten Temperaturen und pH-Werten). Gängig ist ebenfalls die Angabe der bewirkten Absorptionsdifferenz bei 260 nm (ΔA_{260}) pro Zeiteinheit. Die oben genannten Nachweisverfahren sind sehr geräte- oder zeitaufwändig oder erfordern z.T. hohen Substrat- und Enzymeinsatz und erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit als wenig geeignet. Daher wurde das Verfahren nach Ahrenholtz und Mitarbeitern (1994b) in abgewandelter Form eingesetzt (linearisierte Plasmid-DNA hat gegenüber zirkulären Plasmiden als Substrat den Vorteil, dass sowohl Endo- als auch Exonuclease-Aktivität nachgewiesen werden kann), was allerdings zur Folge hat, dass die erzielten Aktivitäten aufgrund der abweichenden Unitdefinition wenig mit den Daten aus der Literatur vergleichbar sind. Da eine Darstellung und Bestimmung der Spezifischen Aktivität des reinen Enzyms in dieser Arbeit nicht erzielt werden konnte, ist ein Vergleich der Aktivitäten mit Daten aus der Literatur ohnehin nicht sinnvoll.

4.6.3 Vergleich der Nuclease-Eigenschaften

4.6.3.1 Sekretionscharakteristika

EG2S/2 zeigte auf festen Medien zehnmal mehr DNase-Aktivität als in Flüssigkultur. Good und Hartman (1970) hatten die gleiche Beobachtung bei der Amylase-Produktion von *Halobacterium halobium* gemacht und haben daraufhin ebenfalls die Enzyme aus Kulturüberständen fester Medien gewonnen. Die geringere Produktion kann auf den Verdünnungseffekt im Flüssigmedium zurückzuführen sein, da – bezogen auf die Bakterienzellzahl – aus dem Flüssigmedium zehnmal mehr Flüssigkeit bei der Ernte der Enzyme anfällt als aus festen Medien. Martins und Mitarbeiter (2001) konnten bei zahlreichen haloalkaliphilen Isolaten mit starker Aktivität im Plattentest ebenfalls nur geringe extrazelluläre Amylase-Aktivität in Flüssigmedium nachweisen und führten dies auf das unterschiedliche Detektionsprinzip der Enzymaktivität zurück. Im Flüssigmedium wird die Enzymaktivität zu einem festgelegten Zeitpunkt bestimmt, auf festen Nährböden wird die Substratverwertung über den gesamten Zeitraum der Inkubation gemessen. Bei SJ1/4 ergaben sich umgekehrte Verhältnisse.

In Flüssigmedien konnte ca. 2,5 mal mehr Aktivität nachgewiesen werden als in Agarüberständen. Die Menge an sekretiertem Enzym scheint bei Stamm SJ1/4 somit stärker von der Konsistenz des Mediums (fest/flüssig) abzuhängen als bei Stamm EG2S/2.

Die Aktivität des Stamms SJ1/4 erreichte sein Maximum in Flüssigkultur erst in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase und blieb dann bis zur stationären Phase konstant (Abb. 36). Ähnliche Muster des zeitlichen Verlaufs der Enzymsynthese wurden auch bei anderen Bakterien beschrieben (s. Kapitel 4.4). Whitehead und Mitarbeiter (2001) führen zahlreiche Bakterienspezies auf (u.a. *Serratia* sp. und *Erwinia* sp.), deren Sekretion extrazellulärer Enzyme durch Quorum sensing gesteuert wird. Auch durch Paggi und Mitarbeiter (2003) konnte gezeigt werden, dass das Archaeon *Natronococcus occultus* seine Produktion/Aktivierung der extrazellulären Protease durch Quorum sensing bei hoher Zelldichte steuert. Wie sich zunehmend zeigt, handelt es sich beim Quorum sensing um ein weit verbreitetes Phänomen (Whitehead et al., 2001). Die Enzymsynthese von SJ1/4 könnte möglicherweise ebenfalls durch diesen Steuermechanismus induziert worden sein. Die höhere Enzymproduktion im Submersverfahren im Vergleich zu der im Plattentest kann auf die effektivere Weiterleitung von Informationssubstanzen im Rahmen des Quorum sensing in flüssiger Umgebung zurückgeführt werden.

EG2S/2 zeigte hingegen in Flüssigkultur die höchste Aktivität noch in der lag-Phase. Bereits zu Beginn der log-Phase war die Aktivität wieder erheblich gesunken. In diesem Fall scheint eine Induktion der Enzymsynthese durch ein Substrat möglich zu sein, was auch die höheren Aktivitätsraten im Plattentest erklären könnte. Im Gegensatz zum Flüssigmedium wurde im Plattentest Lachsspermien-DNA zugesetzt, so dass dort eine weit höhere Substrat-Konzentration vorlag. Das Flüssigmedium enthielt lediglich Oligonucleotide aus dem Hefeextrakt. Eine Induktion durch DNA wurde aber bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Ein Einfluss des pH-Werts oder der Stoffwechselprodukte auf die Expression der EG2S/2-Nuclease kommt ebenfalls in Betracht. Durch die fehlende Durchmischung auf festen Medien wirken sich stoffwechselbedingte pH-Verschiebungen lokal stärker aus und Konzentrationen von Stoffwechselprodukten steigen in der Umgebung der Zellen schneller an. Ein veränderter pH-Wert oder hohe Katabolit-Konzentrationen könnten so zur vermehrten Synthese der Nuclease geführt haben oder die Synthese einer von der Nuclease aus dem Submersverfahren verschiedenen Nuclease induziert haben. Die Ergebnisse der Bestimmung der pH-Toleranz der EG2S/2-Aktivität im *In-vitro*-DNase-Test zeigten zudem ein Aktivitätsoptimum bei pH 6 bis 7 (Abb. 42). Es besteht die Möglichkeit, dass die Stabilität des Enzyms im sauren Bereich ebenfalls höher war und deshalb eine lokale pH-Absenkung durch den Stamm EG2S/2 auf festen Medien – ausgehend von pH 8 – einen positiven Einfluss auf die Enzymstabilität ausübte.

4.6.3.2 Vergleich der EG2S/2- und SJ1/4-Nucleasen mit nichthalophilen Nucleasen

Für die Anwendung halophiler Nucleasen in leicht handhabbaren Aufreinigungskits für Nucleinsäuren ist die Toleranz der Nucleasen gegenüber elevierten pH-Bedingungen sowie gegenüber chaotropen Agenzien und Detergenzien mit hoher Aktivität bei moderaten Temperaturen von ausschlaggebender Bedeutung. Auf Silicagel basierende Nucleinsäure-Aufreinigung bedient sich der Möglichkeit, Proteinverunreinigungen aufgeschlossener Zellen oder Agarose durch chaotrope Salze zu denaturieren. Nucleinsäuren bleiben von dem Salz unbeeinträchtigt und Nucleasen, die die Zielsubstanz degradieren, werden inaktiviert. Das Salz sättigt zusätzlich die negativen Ladungen auf dem Silicagel ab und kompensiert dadurch die Abstoßungskräfte, wodurch Nucleinsäuren an das Säulenmaterial binden und von den restlichen Zellbestandteilen oder Agarosegel-Komponenten separiert werden können. Zur Verringerung der Oberflächenspannung werden noch Detergenzien eingesetzt, die für einen problemloseren Durchfluss durch das in Säulen gepackte Silicagel sorgen. Für die Isolierung von RNA muss in vielen Fällen vor der Abtrennung der Nucleinsäuren von den restlichen Bestandteilen die DNA abgebaut werden (z.B. für eine anschließende Reverse Transkriptase/RT PCR bei Untersuchungen zur Genexpression, wo die Anwesenheit von DNA stört). Dies erfolgte bisher in einem der Zugabe von chaotropen Salzen vorgelagerten Schritt. Unter Einsatz einer salztoleranten DNase könnten Arbeitsschritte eingespart und das Verfahren vereinfacht werden, wobei störende RNasen aber sicher denaturiert würden. Bei einem Zellaufschluss durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) herrschen im Lysat außerdem hohe SDS-Konzentrationen und hohe pH-Werte. Bei hoher SDS und Alkali-Toleranz der DNase wäre eine pH-Einstellung nicht nötig. Bisher wurden üblicherweise für die RNA- und Protein-Präparationen die DNase I oder II eingesetzt (White & White, 1997), die extreme Bedingungen nicht tolerieren und zudem aus Bauchspeicheldrüse oder Galle vom Rind oder Schwein und nicht mikrobiell gewonnen werden. Mikrobielle Enzyme sind zumeist extrazellulär und werden ins Medium abgegeben, was aufwändigen Zellaufschlüsse und -abtrennungen überflüssig macht und damit die Herstellungskosten senkt (Gupta et al., 2002a).

Durch die Bestimmung der oben genannten Parameter anhand der Aktivität im Kulturüberstand zeigte sich, dass die Stämme EG2S/2 und SJ1/4 Nucleasen mit verhältnismäßig robusten Eigenschaften sekretierten. In der folgenden Tabelle 30 werden einige Eigenschaften mit denen der Benzonase von Merck verglichen, die hier als Standard-DNase herangezogen wird (die Benzonase ist das Produkt eines in *E. coli* exprimierten Nuclease-Gens von *Serratia marcescens* und wird allgemein als ein robustes Enzym angesehen).

Tab. 30: Vergleich einiger Aktivitäts-Eigenschaften der Nucleasen von EG2S/2 und SJ1/4 mit der Benzonase von Merck bzw. der ursprünglichen extrazellulären Nuclease von *Serratia marcescens*.

Parameter bezogen auf die Enzym-Aktivität	Nucleasen		
	EG2S/2	SJ1/4	Benzonase[A]
Effekt monovalenter Kationen	100-30% Akt. bei allen getesteten Konzentrationen, bis 4 M K^+ und bis 5 M Na^+	Salzabhängige Nuclease Opt. bei 3,5 M K^+ bzw. 5 M Na^+	Salzempfindliche Nuclease < 10% Akt. in 200 mM Na^+ oder K^+
Toleranz gegenüber chaotropen Agenzien	55-65% Akt. in 0,5 M Guanidin-Salz, 70% Akt. in 1% SDS	59-65% Akt. in 6 M Guanidin-Salz, 65% Akt. in 1% SDS	30% Akt. in 23 mM Na-Desoxycholat, 100% Akt. in < 0,05% SDS, keine Akt. nach 15 min. bei 0,1% SDS
Temp. -Toleranz	Opt. ca. 40 °C, < 10% Akt. bei 13 °C, < 10% Akt. bei 60 °C	Opt. ca. 37 °C, < 40% Akt. bei 13 °C, 10% Akt. bei 60 °C	Opt. ca. 40 °C 25% Akt. bei 10 °C keine Akt. nach 15 min bei 50 °C[B]
pH-Toleranz	Opt. ~ pH 6-7, 20% Akt. bei pH 4,5, 20% Akt. bei pH 10	Opt. ~ pH 8, 20% Akt. bei pH 3,5, 20% Akt. bei pH 11	Opt. pH 8, 20% Akt. bei pH 6, 20% Akt. bei pH 10[B]
Substratspezifität	Abbau von DNA und RNA	Kein Abbau von RNA	Abbau von DNA und RNA

[A] Benzonase-Produktinformation Merck (1999), wenn nicht anders gekennzeichnet
[B] Eaves & Jeffries, 1963

Die Ermittlung der Salztoleranz und der Zuckerspezifität ergab für Stamm SJ1/4 eine halophile DNase, die in Anwesenheit von KCl im Vergleich zu NaCl die 6fache Aktivität zeigte (Kapitel 3.3.3.3). Nach Gilmour (1990) besitzen einige Enzyme mehr Aktivität in Anwesenheit von KCl als von NaCl, da K^+ weniger fest an das Enzym gebunden wird als Na^+, was sich günstig auf die Enzymflexibilität auswirkt. Guanidin-Salze konnten bei der SJ1/4-Nuclease in eingeschränkter Weise die Funktion von NaCl oder KCl übernehmen, so dass maximale Aktivität bei 6 M GuHCl bzw. GuSCN erreicht wurde (Kapitel 3.3.3.4). Die Ergebnisse für Stamm EG2S/2 deuten darauf hin, dass sowohl ein salzunabhängiges (oder wenig Salz benötigendes) als auch ein halophiles Enzym sekretiert wurden (Kapitel 3.3.3.3). Die Bestimmung der Toleranz gegenüber Guanidin-Salzen zeigte keinen parallelen Verlauf zu NaCl oder KCl, sondern lediglich eine Salzempfindlichkeit der DNase-Aktivität (Kapitel 3.3.3.4). Für die Benzonase liegt kein direkter Vergleich für die Toleranz von Guanidin-Salzen vor. Zunehmende Aktivitätsverluste in Gegenwart von monovalenten Kationen und Na-Desoxycholat (ein ähnlich der Gallenflüssigkeit stark chaotropes Salz) weisen allerdings auf eine weitaus geringere Toleranz hin, als bei den Salinennucleasen zu beobachten war. Durch den Kulturüberstand von EG2S/2 konnte sowohl DNA als auch RNA abgebaut werden (Kapitel 3.3.3.7). Dass es sich, aufgrund von zwei Aktivitätsmaxima bei der Salztoleranzbestimmung (Kapitel 3.3.3.3), im Kulturüberstand von EG2S/2 um mehrere Nucleasen handeln könnte, führt zu der Überlegung, dass die Enzyme nicht zwangsläufig zuckerunspezifisch sein müssen. Die Aktivitäten können sich auf verschiedene Enzyme verteilen. Die Bildung mehrerer Nucleasen, die eine Isolierung

noch erschwert hätte, war u.a. ein Grund dafür, die SJ1/4-Nuclease anstelle der EG2S/2-Nuclease(n) für die weiteren Aufreinigungsschritte zu wählen.

Die Aktivität der untersuchten Nucleasen wurde durch SDS in Konzentrationen von bis zu 1% mit ca. 30 bzw. 35% Aktivitätsminderung bei EG2S/2 und SJ1/4 nur wenig verringert (Kapitel 3.3.3.4). Im *In-vitro*-DNase-Test wurde dem SDS NaCl zugesetzt. Anhand der Überschichtungsversuche in Kapitel 3.4.4 wurde deutlich, dass SDS die Funktion von NaCl für die Nuclease von SJ1/4 nicht übernehmen konnte, da in SDS-Polyacrylamidgelen ohne NaCl keine Aktivität beobachtet wurde. Die Benzonase zeigte im *In-vitro*-DNase-Test bereits bei 0,1% SDS keine Aktivität mehr. Die Angaben der Produktinformation von Merck (1999) konnten damit bestätigt werden: ab einer SDS-Konzentration von 0,05% findet eine verringerte Aktivität und ab 0,1% innerhalb von 15 min eine völlige Inaktivierung der Benzonase statt.

Die Beobachtung, dass viele halophile Enzyme auch eine gewisse Thermotoleranz in Anwesenheit von Salz zeigen, führte zu dem Schluss, dass hohe Salzkonzentrationen hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der Proteine fördern und somit zur Stabilität bei erhöhten Temperaturen beitragen (Rodríguez-Valera, 1993). Die Temperaturtoleranz der Enzyme muss daher immer im Zusammenhang mit der bestehenden Salzkonzentration betrachtet werden. Als Prinzip gilt: Je höher die Salzkonzentration, desto höher ist die Thermotoleranz. Die im *In-vitro*-DNase-Test ermittelten Temperaturtoleranzen sind somit nicht absolut, sondern eher als Ausschnitt aus dem Toleranzbereich bei der exemplarisch eingesetzten Salzkonzentration zu sehen. Meerwassersalinen etablieren sich in solchen Klimaten, die eine schnelle Verdunstung von Wasser durch Wärme und hohe Sonneneinstrahlung begünstigen, da eine Salzgewinnung nur unter solchen Bedingungen rentabel ist. Zusätzlich weisen konzentrierte Salzlösungen eine geringe Wärmeleitfähigkeit und Verdunstungsrate auf und erhitzen sich daher schnell im Laufe warmer Tage. Durch die Pigmentierung der typischerweise in diesen Habitaten auftretenden Organismen wird die Strahlungsabsorption noch verstärkt. Diese Faktoren führen dazu, dass hypersaline Gewässer mit kleinen Wasserkörpern, wie sie in Meerwassersalinen auftreten, starke Temperatur-schwankungen mit hohen Maximaltemperaturen aufweisen können. Die Maximaltemperatur liegt dabei um so höher, je salzhaltiger das Gewässer ist (Rodríguez-Valera, 1988). Es ließ sich daher im Vorfeld bereits vermuten, dass die extrazellulären Enzyme extrem halophiler Mikroorganismen wie die Nuclease von SJ1/4 an solche Temperaturschwankungen adaptiert sind und sich von der Nuclease des mesophilen opportunistischen Krankheitserregers und Bodenbewohners *Serratia marcescens* diesbezüglich unterscheidet. Der im *In-vitro*-Test im Kapitel 3.3.3.5 ermittelte breite Temperaturtoleranzbereich der SJ1/4-Nuclease von vermutlich 5 bis > 60 °C (mind. 10% Restaktivität) bestätigte diese Hypothese. Die Benzonase zeigt hingegen einen Toleranzbereich von ca. 5 bis < 50 °C mit höherem Optimum als die SJ1/4-Nuclease (40 °C statt ca. 37 °C; Kapitel 3.3.3.5). Die Nuclease des schwach halophilen bis halotoleranten EG2S/2, der aus dem küstennahen See auf Lanzarote isoliert wurde, wies ein

zur Benzonase vergleichbares Aktivitätsspektrum mit Verschiebung in höhere Temperaturbereiche auf (< 10% Restaktivität bei 13 bis 60 °C). Abgesehen von der relativen Kälteempfindlichkeit der EG2S/2-Nuclease(n) besaßen beide Überstände der Salinenstämme höhere Rest-Aktivität bei nichtoptimalen Temperaturen als die Benzonase.

Die pH-Toleranz ist für die Benzonase und die EG2S/2-Nuclease ähnlich, mit einer Verschiebung des Optimums und einer höheren Restaktivität für letzteres Enzym in den sauren Bereich (20% Restaktivität für EG2S/2 bei ca. pH 4,5 und 10, Optimum bei pH 6 – 7; 20% Restaktivität für die Benzonase bei pH 6 und 10, Optimum bei pH 8). SJ1/4 wies ein breiteres Toleranzspektrum mit höherer Toleranz sowohl im sauren als auch im alkalischen pH-Bereich auf (20% Restaktivität bei ca. pH 3,5 und 11). Die Optima sind für beide Enzyme mit pH 8 gleich.

4.6.3.3 Vergleich der SJ1/4-Nuclease mit anderen halophilen Nucleasen

Die Nuclease von SJ1/4 zeigte im Vergleich zur Benzonase deutliche Unterschiede in ihren Aktivitäts-Eigenschaften. Für eine biotechnologische Anwendung ist aber weiterhin von Bedeutung, dass sich das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzym ebenfalls von anderen halophilen Nucleasen unterscheidet, da sich diese nicht für eine Anwendung in RNA-Aufreinigungskits eigneten (Gründe dafür s. u.). In der Vergangenheit erfolgten Untersuchungen an der Nuclease H von *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* durch Kamekura und Onishi (1974, 1976, 1978a, 1978b, 1979, 1982). Gegenstand war die optimale Bildung und Charakterisierung des Enzyms sowie dessen mögliche kommerzielle Anwendung. Eine weitere halophile Nuclease wurde 1983 von Onishi und Mitarbeitern aus dem Stamm *Bacillus* sp. N23-2 isoliert und charakterisiert. Nach García und Mitarbeiter (1987) handelt es sich bei dem betreffenden Stamm um *Bacillus halophilus.* In der folgenden Tabelle 31 werden die Eigenschaften dieser beiden Nucleasen mit denen der SJ1/4-Nuclease verglichen.

Tab. 31: Vergleich einiger Eigenschaften der Nucleasen der moderat halophilen Bakterien *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* (Kamekura & Onishi, 1974, 1978a) und *Bacillus halophilus* (Onishi et al., 1983) mit denen der Nuclease des Grenzlinien-extrem-halophilen SJ1/4 (Salztoleranz des Wachstums 4.6.1, Nuclease-katalysierte Reaktion 3.3.3.7-8, Molekulargewicht 4.7.4, Salzabhängigkeit der Nuclease-Aktivität 3.3.3.3, Reaktivierbarkeit der Nuclease nach Salzentzug 3.4.4, Temp.-Optimum der Nuclease-Aktivität 3.3.3.5, pH-Wert-Optimum der Nuclease-Aktivität 3.3.3.6)

Parameter	Stämme		
	Micrococcus varians ssp. *halophilus*[a]	*Bacillus halophilus*[b]	SJ1/4
Salztoleranz des Stamms	moderat halophil	moderat halophil	Grenzlinien-extrem halophil
Nuclease-katalysierte Reaktion	zuckerunspezifische Exonuclease-Aktivität	zuckerunspezifische Exonuclease-Aktivität	Endo-DNase-Aktivität
Molekulargewicht der Nuclease	99 kDa (denaturiert) bzw. 105 kDa (nativ)	138 kDa (nativ)	ca. 31 kDa (nativ / Gelfiltration)
Salzabhängigkeit der Nuclease-Aktivität	max. RNase-Akt. in 2,9 M NaCl bzw. 2,1 M KCl, max. DNase-Akt. in 3 - 4 M NaCl	max. RNase-Aktivität in 1,4 - 3,2 M NaCl bzw. 2,3 - 3,2 M KCl, für DNase keine Angaben	max. DNase-Aktivität in ca. 5 M NaCl bzw. 3,5 M KCl
Reaktivierbarkeit der Nuclease nach Salzentzug	Inaktivierung bei < 0,2 M NaCl, 77% reaktivierbar nach Dialyse gegen 3,4 M NaCl (100%iger Schutz der Aktivität in 10 mM Mg^{2+}	Inaktivierung bei < 0,5 M NaCl, 68% reaktivierbar nach Dialyse gegen 3,5 M NaCl (100%iger Schutz der Aktivität in 10 mM Ca^{2+}	Inaktivierung bei < 0,3 M NaCl, Reaktivierung durch Dialyse nicht getestet, Schutz durch 40 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} nicht gegeben.
Temp.-Optimum der Nuclease-Aktivität	43 °C für DNA, 50 °C für RNA, jeweils bei 1,6 M NaCl, pH 8	50 °C für DNA, 60°C für RNA, jeweils bei 4 M NaCl, pH 8	ca. 37 °C (bei 3,4 M NaCl, pH 8)
pH-Wert-Optimum der Nuclease-Aktivität	8 (bei 1,6 M NaCl, 40°C)	8,5 (bei 4 M NaCl, 40 °C)	8 (bei 3,4 M NaCl, 30 °C)

[a] Kamekura & Onishi, 1974, 1978a

[b] Onishi et al., 1983

Die SJ1/4-Nuclease unterscheidet sich von den bereits bekannten halophilen Nucleasen aufgrund ihrer geringen Größe im Molekulargewicht. Die Salzabhängigkeit ist sowohl für die Aktivität des Enzyms als auch für das Wachstum von SJ1/4 größer als bei den Vergleichsstämmen. Die pH-Wert-Optima der Enzyme ähneln sich, das Temperatur-Optimum liegt für die SJ1/4-Nuclease unter dem der beiden Vergleichs-Nucleasen. Das wohl bedeutendste Merkmal des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyms ist aber seine Substratspezifität. Soweit im ungereinigten Kulturüberstand möglich, konnte keine RNase-Aktivität unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Die beiden halophilen Vergleichsstämme (Kamekura & Onishi, 1974, 1978a; Onishi et al., 1983) zeigten demgegenüber sowohl RNase- als auch DNase-Aktivität. Die Reaktivierbarkeit der Nuclease nach Salzentzug wird in den nächsten Kapiteln gesondert diskutiert.

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen halophilen Nucleasen und auch im Vergleich zur Benzonase zeigte die hier untersuchte SJ1/4-DNase aufgrund ihrer Substratspezifität eine Eignung für die Anwendung in RNA-Aufreinigungskits. Ihr Optimum bei moderaten Temperaturen (niedrigeres Optimum als die Vergleichsstämme) gewährleistet eine hohe Aktivität bei nur leichter Erwärmung des Ansatzes bzw. bei R.T. Das pH-Optimum der Nuclease im alkalischen Bereich und ihre Toleranz gegenüber SDS lässt sie eine alkalische SDS-Lyse nach Birnboim und Doly (1979), die für einen Zellaufschluss angewendet wird, mit vermutlich

ausreichender Restaktivität überstehen. Ihre hohe Salztoleranz macht den Einsatz sehr hoher GuSCN-Konzentrationen zur Denaturierung störender Nucleasen und anderer Proteine möglich. Einer genaueren Untersuchung bedarf allerdings die Vollständigkeit des DNA-Abbaus durch die SJ1/4-Nuclease, da, wie in Kapitel 3.3.3.7 angeführt wurde, Oligonucleotide als Produkte entstehen. Ungünstig für eine Anwendung in RNA-Aufreinigungskits wäre ein unvollständiger Abbau mit zu großen Produkten.

4.7 Methodische Probleme der Reinigung halophiler Enzyme

Die Aufreinigung halophiler Enzyme ist aufgrund ihrer Salzabhängigkeit schwierig (Leicht & Pundak, 1981), da die Anwendung chromatographischer Standardmethoden zumeist nicht möglich ist (Eisenberg et al., 1992). Extrazelluläre Enzyme halophiler Organismen sind stabil und aktiv in Medien mit hoher Ionenstärke, was auf ihre besondere Struktur zurückzuführen ist. Durch Röntgenstrahl-Kristallographie ermittelte 3D-Strukturen (Dym et al., 1995; Frolow et al., 1996) sowie durch gezielte Mutagenese veränderte Primärstrukturen (Jolley et al., 1997) haben gezeigt, dass halophile Enzyme einen schwach hydrophoben Kern besitzen und einen Überschuss an negativer Ladung auf ihrer Oberfläche tragen. Letzteres sorgt dafür, dass hydratisierte Ionen gebunden und so eine polare Schicht gebildet wird, die den schwach hydrophoben Kern vom Medium abschirmt und damit die Tendenz der Enzyme verringert, bei hohen Salzkonzentrationen zu aggregieren. Bei fehlendem Salz in der Umgebung des Enzyms kommt es zur gegenseitigen Abstoßung der negativen Ladungen auf der Enzymoberfläche und damit zur Entfaltung des Enzyms.

Nach Godfrey und West (1996) muss beachtet werden, dass Stabilität und Aktivität nicht immer unter den selben Bedingungen am größten sind. Katalyse (Aktivität) und Stabilität können sich sogar gegensätzlich verhalten, wie von Shoichet und Mitarbeitern (1995) gezeigt wurde. Auch Gilmour (1990) stellt dar, dass hohe Salzkonzentrationen Enzyme stabilisieren können, ihre Aktivität aber gering sein kann aufgrund mangelnder Flexibilität. So zeigte als Beispiel eine Isocitrat-DH aus *Halobacterium* sp. bei 4 M Salz kaum Aktivität, war aber unter diesen Bedingungen am stabilsten.

Die Isolierungsschritte der halophilen Nucleasen der Vergleichsstämme aus Kapitel 4.6.3.3 dienten als Anhaltspunkt für die Isolierung der SJ1/4-DNase und wurden wie folgt durchgeführt:

EtOH-Fällung, DEAE-Sephadex A-50 Säulenchromatographie mit Elution durch NaCl-Gradienten (0,3 bis 0,5 M für *Micrococcus* und 0 bis 0,4 M für *Bacillus*) und anschließende 2- bis 3-malige Sephadex G-100/200 Säulenchromatographie. Die Fraktionen wurden zwischen den Reinigungsschritten durch Ultrafiltration (PM30 bei *Micrococcus* und PM10 bei *Bacillus*) aufkonzentriert und durch Dialyse über Nacht den erforderlichen Salzkonzentrationen angepasst. Die *Bacillus*-Nuclease wurde in allen NaCl-freien Arbeitsschritten durch 40 mM $CaCl_2$ und 40 mM $MgSO_4$ stabilisiert, für die *Micrococcus*-Nuclease wurde eine Mindestkonzentration

von 0,3 M NaCl erhalten. Die Ausbeute betrug 9,7% DNase-Aktivität (267fache Aufreinigung) für die *Bacillus*-Nuclease und 18,8% Nuclease-Aktivität (1.600fache Aufreinigung) für die *Micrococcus*-Nuclease (Kamekura & Onishi, 1974; Onishi et al., 1983).

4.7.1 Theorie zur Wirkung von Ionen auf Proteine

Die Art und Weise der Interaktion von Ionen mit Proteinen wird durch die „Hofmeister-Reihe" definiert. Einige Ionen wie Sulfat, Phosphat und Ammonium fördern die Faltung, intermolekulare Bindungen und sogar Aggregation, eignen sich daher sehr gut für die schonende Fällung von Proteinen, während andere Ionen wie Iodid und Guanidin die Dissoziation von Protein-Komplexen und Aggregaten sowie die Entfaltung von Proteinen fördern (= Denaturierung; Mevarech et al., 2000). Die Ursache dafür liegt in der Strukturierung des Wassers durch die Ionen. Kleine Ionen mit kompakter Ladung (kosmotrope Ionen oder „salting-out"-Salze) zeigen starke Wechselwirkungen mit Wasser und ordnen die Wassermoleküle, fördern daher seinen polaren Charakter und machen es in gewisser Weise hydrophiler. Proteine werden dann durch hydrophobe Wechselwirkungen kompakter und stabilisiert. Große Ionen mit geringer Ladungsdichte (chaotrope Ionen oder „salting-in"-Salze) hingegen durchbrechen die relative Ordnung des Wassers (chaosgenerierend), da ihre Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen schwächer sind als Wasser mit sich selbst, und machen es hydrophober. Proteine werden destabilisiert und entfalten sich (Nucleinsäuren bleiben von chaotropen Salzen unbeeinflusst, da sie nicht von hydrophoben Wechselwirkungen zusammengehalten werden, s. Kapitel 4.6.3.2). Im Folgenden werden einige Ionen mit zunehmend chaotropen Eigenschaften aufgeführt:

$$F^- < PO_4^{3-} < SO_4^{2-} < CH_3COO^- < Cl^- < Br^- < I^- < NO_3^- < ClO_4^- < SCN^- < Cl_3CCOO^-$$

$$NH_4^+ < Rb^+ < K^+ < Na^+ < Li^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+}$$

(Mülhardt, 2002; Madern et al., 2000)

Das Verhalten von Salzen ist nicht in jedem Lösungsmittel gleich, und es kann zu einer Verschiebung oder Vertauschung einzelner Ionen in der „Hofmeister-Reihe" kommen (Chaplin, 2003; Römpp, 2000). Die Eignung eines Salzes zur Ein- oder Aussalzung muss daher zuvor am Protein getestet werden.

4.7.2 Enzymstabilität

Die Aktivität der SJ1/4-Nuclease war in gesättigter NaCl-Lösung am größten. Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms wurden nicht vorgenommen. Unter der Annahme, dass die größte Stabilität bei ebenfalls hohen NaCl-Konzentrationen bestehen müsste, wurde versucht, Arbeitsschritte mit niedrigen Konzentrationen zu vermeiden. So zeigte sich eine teilweise Inaktivierung des Enzyms in Puffer mit 0,3 M NaCl und eine vollständige Inaktivierung, wenn diese Konzentration unterschritten wurde. Daher wurde Puffer mit 0,3 M NaCl als ein Kompromiss gewählt, zwischen Aktivitätsverlust und Durchführbarkeit der Methoden. Allgemein

konnten aber nur geringe Enzym-Ausbeuten oder Reinigungseffekte bei den hier durchgeführten Methoden erzielt werden.

Ein Schutz der Aktivität durch 40 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} konnte nicht beobachtet werden. Es ist möglich, dass diese Konzentration zu hoch gewählt und das Enzym eher destabilisiert als stabilisiert wurde. Die halophilen Vergleichsstämme (Kapitel 4.6.3.3) wurden erfolgreich mit nur 10 mM Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} stabilisiert. Bei der Isolierung der Nuclease von *Bacillus halophilus* wurde aber ebenfalls erfolgreich 40 mM $CaCl_2$ und 40 mM $MgSO_4$ eingesetzt (Kapitel 4.7). Während nach Voet und Voet die Effizienz der Stabilisierung oder Destabilisierung von dem Protein weitgehend unabhängig ist, konnten Madern und Zaccai (1997) sowie Taupin und Mitarbeiter (1997) anhand von Enzymen von *Haloarcula marismortui* zeigen, dass NaCl oder KCl nicht nur durch die für gewöhnlich zu den „salting-out"-Salzen gezählten Verbindungen wie Sulfat oder Phosphat ersetzt werden können, sondern auch „salting-in"-Salze wie $MgCl_2$ und $CaCl_2$ geeignet sind, die Funktionalität von Enzymen zu bewahren. Mevarech und Mitarbeiter (2000) postulieren eine Kombination von zwei Funktionen, die ein Salz bei der Stabilisierung eines halophilen Proteins ausübt. Zum einen fördert es die hydrophoben Wechselwirkungen im Enzym in Abhängigkeit von ihrer Position in der „Hofmeister-Reihe" (s. Kapitel 4.7.1) und zum anderen binden wenige Ionen spezifisch an das gefaltete Enzym mit einer von der Art des Salzes abhängigen Affinität zu den Bindungsstellen. Die Kombination dieser Funktionen macht die Effektivität der Stabilisierung aus. Es gibt Salze, die die gefaltete Form des Enzyms nicht stabilisieren oder die gefaltete Form nur bei niedrigen Salzkonzentrationen stabilisieren und bei hohen destabilisieren. Sie interagieren bei hohen Salzkonzentrationen bevorzugt mit dem ungefalteten Polypeptid und verschieben das Gleichgewicht in Richtung Denaturierung. So zeigten Anionen mit hoher Ladungsdichte (SO_4^{2-}, $Acetat^{2-}$, F^-) die effektivste Stabilisierung der gefalteten Form der *Haloarcula marismortui* Malat-Dehydrogenase, Kationen mit hoher Ladungsdichte (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Li^+) vermochten das Enzym nur bei geringen Konzentrationen zu stabilisieren (Madern et al., 2000). Stabilitätstests der SJ1/4-DNase in anderen Salzen, die evt. in geringeren Konzentrationen als NaCl einsetzbar wären, könnten wahrscheinlich zur Erhöhung der Ausbeuten führen.

4.7.3 Enzymfällung

Entgegen der Annahme, dass eine Ammoniumsulfat-Fällung halophiler Proteine nicht möglich sei (Kirst, 1995), konnten ca. 50% der Proteine aus dem Ammoniumsulfat-gesättigten SJ1/4-Kulturüberstand präzipitiert werden. Untersuchungen des gelösten Präzipitats über native PAGE und Vergleich zu den Überständen aus der Fällung zeigten, dass bevorzugt höhermolekulare Substanzen bzw. Verbindungen mit geringerer negativer Ladung (kürzere Laufstrecke im Gel) präzipitiert wurden (aufgrund des veränderten Laufverhaltens von halophilen Enzymen in Polyacrylamidgelen kann keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten gemacht werden; s. Kapitel 4.7.4). Die Nuclease verblieb mit über 100% seiner

Ausgangsaktivität im Überstand. Die hohe Aktivität ist vermutlich auf die Zugabe von Ammonium zurückzuführen, das sich positiv auf die Enzymaktivität im *In-vitro*-Test auswirkte. Die Malat-DH aus *Halobacterium* sp. zeigte ebenfalls mit NH_4Cl höhere Aktivität als mit KCl (Gilmour, 1990), und Kim und Dordick (1997) postulieren allgemein eine Erhöhung der Stabilität von halophilen Proteinen durch Ammoniumsulfat. Die hohe Aktivität in Anwesenheit von Ammoniumsulfat ist weiterhin ein Anhaltspunkt dafür, dass die SJ1/4-DNase nicht oder nur auf geringe Mengen Ca^{2+} angewiesen ist, da dieses zusammen mit Sulfat ein nahezu unlösliches Salz bildet. Das Ergebnis aus der Vorcharakterisierung wurde damit bestätigt.

Da die gesuchte DNase in gesättigten Lösungen von Ammoniumsulfat, KCl und NaCl nicht zu präzipitieren war, sollte ein Salz mit höherer max. Löslichkeit als Fällungsmittel getestet werden. Die Tabelle 32 gibt die max. Löslichkeiten verschiedener Salze wieder.

Tab.32: Max. Löslichkeit der aufgeführten Salze in Wasser bei 20 °C (Merck, Chemikalienkatalog 2003).

Salz	Löslichkeit in Wasser bei 20 °C	
	$[g \cdot l^{-1}]$	[M]
NaCl	358	6,1
KCl	347	4,7
GuHCl	2.150	22,5
Gu_2SO_4*	2.500	11,6
GuSCN	1.420	12
$(NH_4)_2SO_4$	754	5,7

* Werte für 15 °C
Gu = Guanidin

Aufgrund der hohen Löslichkeit von Guanidin-Salzen wurde GuHCl als Fällungsmittel gewählt, da es allgemein weniger denaturierend wirkt als GuSCN und auch bei hohen Konzentrationen im *In-vitro*-Test noch Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich aber, dass GuHCl als „salting-in"-Salz ab einer Konzentration von ≥ 7 M zur Denaturierung der DNase führte. Die Verwendung von z.B. Gu_2SO_4 wäre möglicherweise ein geeigneteres Fällungsmittel gewesen, da es nach Voet und Voet (1992) die Stabilität von Proteinen erhöht.

Während beide Vergleichsenzyme aus *Bacillus halophilus* (Onishi et al., 1983) und *Micrococcus varians* (Kamekura & Onishi, 1974) erfolgreich mit 40 bzw. 75% EtOH gefällt wurden, erwies sich EtOH für die SJ1/4-DNase als nicht geeignet. Die Ergebnisse der PAGE zeigten, dass mit steigender Ethanolkonzentration Proteine mit zunehmender Laufgeschwindigkeit im Gel ausgefällt wurden. Dabei war die Fällung nicht sehr selektiv, da bestimmte Proteine in mehreren Fällungspellets wiedergefunden werden konnten (Abb. A, Anhang). Die starke Schmierbildung, die im Gel beobachtet werden konnte, deutet auf eine Zerstörung der Proteine durch den Alkohol hin, was durch geringe Aktivität im *In-vitro*-Test bestätigt wurde. Es ist bekannt, dass es bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigen Temperaturen mit EtOH zu einer Kältedestabilisierung bei halophilen Proteinen kommen kann (Madern et al., 2000).

4.7.4 Bestimmung des Molekulargewichts

Die mangelnde Rückhaltefähigkeit von Aktivität durch die Membran in der Ultrafiltration bei der Ausschlussgröße von 30 kDa wurde als Hinweis gesehen, dass das Molekulargewicht des Enzyms nur wenig oberhalb dieser Größenordnung lag. Bei der Gelfiltration mit Sephadex G-200 ohne Größenstandards wurde aufgrund des Übergangs von Fraktionen mit DNase-Aktivität und gelb-gefärbter Fraktionen niedermolekularer Substanzen (Kapitel 3.4.3) geschlossen, dass es sich bei der Nuclease um ein relativ kleines Enzym handelte. Mithilfe einer Sephadex G-75-Säule wurde im Vergleich mit Größenstandards ein Molekulargewicht der SJ1/4-DNase von ca. 31 kDa ermittelt. Das Verfahren beinhaltet allerdings seine Fehler. Das native Enzym bindet – im Gegensatz zu nichthalophilen Proteinen – signifikante Mengen an Salz und Wasser. Als Effekt könnte die Elution aus dem Gel beschleunigt werden (Überschätzung des Molekulargewichts; Madern et al., 2000). Weiterhin interagieren die zahlreichen Carboxyl-Gruppen auf der Proteinoberfläche halophiler Proteine mit Sephadex, was zu einer verzögerten Elution führt (Angaben des Herstellers). Das errechnete Molekulargewicht wird damit unterschätzt. Der stetige Anstieg im Extinktionsprofil E_{280} der Eluate aus Sephadex G-75 bzw. Superdex 75 (Kapitel 3.4.5) könnte ein Hinweis auf solche Interaktionen und damit schlechtes Trennverhalten der Säule sein. Das Vorkommen von extrazellulären Substanzen im Kulturüberstand, die evt. ebenfalls das Laufverhalten der Proteine veränderten (polymere Verbindungen wie Schleime oder unspezifische Anlagerungen), könnten ein weiterer Grund für den Extinktionsverlauf sein. Auch die niedermolekularen Proteine aus dem Hefeextrakt, die nicht vollständig durch das Waschen des Ultrafiltrationsretentats entfernt werden konnten, absorbierten, wie in Kapitel 3.4.3 schon erwähnt, bei 280 nm und überdeckten evt. andere Proteinmaxima. Die Verwendung eines Minimalmediums könnte eine derartige Störung verhindern und die Isolierung des Enzyms erleichtern.

Durch die Überschichtung eines Polyacrylamidgels mit DNA-Agarose konnte die DNase-Aktivität direkt im Gel nachgewiesen werden. Aufgrund der schlechten Auflösung, dem Fehlen eines verlässlichen internen Standards und der noch mangelhaften Reproduzierbarkeit konnte dieser Versuch aber nicht zur Bestimmung des Molekulargewichts herangezogen werden.

Beim Vergleich der Bandenmuster aller durch native PAGE aufgetrennten Proben ist das Auftreten zweier Banden in Proben mit DNase-Aktivität im *In-vitro*-DNase-Test auffällig: eine Bande etwa auf der Höhe von 29 bis 30 kDa und eine bei ca. 5 kDa. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine große und eine kleine Untereinheit der DNase handelt, wenn man berücksichtigt, dass die DNase in dem salzarmen Puffer der nativen PAGE denaturiert vorliegt. Die SDS-beladenen Marker werden ebenfalls denaturiert eingesetzt, durch die Verwendung SDS-loser Polyacrylamidgele kann es aber durch Verdünnungseffekte zu leichten Abweichungen in der Bestimmung des Molekulargewichts kommen. Die Molekulargewichts-bestimmung einer Protease von *Halobacterium halobium* durch Izotova und Mitarbeiter (1983) mithilfe von Sephadex G-75-Gelfiltration (nativ), PAGE mit SDS (anionisches Detergens,

denaturierend) und Cetyl-trimethylammoniumbromid (kationisches Detergens, denaturierend) hatte unterschiedliche Ergebnisse von ca. 41.000, 56.000 und wiederum 41.000 Da ergeben. Es wurde daraus geschlossen, dass das halophile Enzym resistent gegenüber der SDS-Denaturierung war und weniger SDS gebunden hatte als die nichthalophilen Marker-Proteine. Madern und Mitarbeiter (2000) gehen von einer Überschätzung des Molekulargewichts in der SDS-PAGE von bis zu 50% aus, was auf das anormale Migrationsverhalten halophiler Proteine aufgrund des Überschusses an negativer Ladung auf ihrer Oberfläche zurückzuführen ist. Das im Vergleich zur Sephadex G-75-Filtration errechnete größere Molekulargewicht der SJ1/4-DNase von insgesamt 34 bis 35 kDa wird durch die von Madern und Mitarbeitern (2000) angeführte mögliche Überschätzung der Größe im SDS-Gel, was vermutlich auf native PAGE übertragbar ist, relativiert. Ein Molekulargewicht von ca. 31 kDa, bestimmt durch Gelfiltration mit Sephadex G-75, scheint daher das plausibelste Ergebnis zu sein.

4.8 Ausblick

Es hat sich gezeigt, dass mit der Erstellung einer Stammsammlung aus halophilen und halotoleranten Bakterien und dem hierarchischen Screenen dieser Organismen auf extrazelluläre Enzyme die Suche nach neuen Enzymen in hypersalinen Habitaten erfolgreich sein kann. Obwohl aus der Literatur wenig über extrazelluläre Nucleasen berichtet und mit geringen Abundanzen in der Umwelt gerechnet wurde, konnte eine relativ große Auswahl an Enzymproduzenten aus den Salinen isoliert werden. Nur ein Bruchteil der Isolate wurde weiteruntersucht und trotzdem konnte mit der SJ1/4-DNase ein geeignetes Enzym beschrieben werden, dass den angestrebten Eigenschaften, die ein neues Enzym für die Anwendung in RNA-Aufreinigungskits besitzen sollte, entsprach.

Die Wahl der Standorte sowie der Isolations- und Testbedingungen sind aber, wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, ein entscheidendes Kriterium für den Erfolg der Suche. So kann ein Zusammenwirken dieser Aspekte wie bei Sánchez-Porro und Mitarbeitern (2003a) zu sehr geringen Produzenten-Ausbeuten führen. Eine gezielte Wahl der Isolationsbedingungen kann aber auch bereits ungeeignete Stämme „heraussieben“. So hatte die Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Salinen gezeigt, dass in den Marais Salants allgemein mit höheren Organismenzahlen und einer größeren Diversität gerechnet werden kann, die Anzahl halophiler Stämme im Vergleich zu denen aus den Salinen von Lanzarote aber relativ gering war. Die Salztoleranz der Aktivität von Enzymen ist, wie gezeigt werden konnte, in vielen Fällen vergleichbar mit der Salztoleranz des Wachstums der Produzenten. Bei der Suche nach einem Enzym mit sehr hohem Salzbedürfnis erweisen sich die Marais Salants daher als weniger geeignet als die Salinen von Lanzarote. Weiterhin konnten unter den Isolaten auf pH 9,5 überdurchschnittlich viele Enzymproduzenten nachgewiesen werden. Diese Gruppe scheint sich daher für die Suche nach extrazellulären Enzymen besonders zu eignen.

Halophile Enzyme sind bisher wenig untersucht und stellen damit vermutlich ein weites Feld neuartiger Biokatalysatoren dar. Der Vorteil der relativ schnellen Auffindung von Enzymen mit neuen Eigenschaften wird allerdings immer noch durch den Nachteil der erschwerten Aufreinigung ausgeglichen. Um die Aufreinigung der SJ1/4-DNase (und evt. auch der EG2S/2-Nuclease) zu ermöglichen, sind umfangreichere Stabilitätsuntersuchungen nötig, die Temperatur, Salzgehalt und pH-Wert einschließen. Sollten salzempfindliche Reinigungsverfahren angewendet oder Salzgradienten genutzt werden (z.B. Ionenaustauschchromatographie), besteht die Möglichkeit, die Stabilität halophiler Enzyme bei niedrigen Salzkonzentrationen zu erhöhen durch die Wahl des Salzes, das Absenken des pH-Werts (Elcock & McCammon, 1998) oder die Verwendung von Cosolvents wie Dimethylsulfoxid (Kim & Dordick, 1997). Hierbei ist die Art des Lösungsmittels für den Effekt des Ein- oder Aussalzens aber genauso wichtig wie die Art des Salzes.

Während die Kontaminationsgefahr beim Einsatz von Extremophilen bei der Herstellung von biotechnologisch relevanten Substanzen gering ist, kann die Korrosion von Materialien durch die Anzucht halophiler Produzenten ein Problem sein (Margesin & Schinner, 2001). Um die Produktionskosten gering zu halten, ist die Klonierung in mesophilen Wirten daher ein vielfach angestrebtes Ziel, das auch die Aufreinigung der halophilen Enzyme erleichtern kann (van den Burg, 2003; Sellek & Chaudhuri, 1999).

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bereitstellung und Untersuchung neuer extrazellulärer Enzyme aus halophilen oder halotoleranten Bakterien. Durch hierarchisches Screenen einer für diese Zwecke aufzubauenden Bakterien-Stammsammlung sollten aus einer großen Auswahl an extrazellulären Enzymen schrittweise Enzyme für weitere Untersuchungen selektiert werden, um ihre Eignung für biotechnologische Anwendungen zu prüfen.

Aus Wasser- und Sedimentproben zweier Salinen und einem küstennahen See auf Lanzarote, Kanarische Inseln, Spanien, wurden 671 Bakterienisolate hinsichtlich extrazellulärer Enzymproduktion getestet und 396 der Isolate in eine Stammsammlung aufgenommen. Durch eine weitere Probenahme in den Salinen bei La Baule, Pays de la Loire, Frankreich, konnten weitere 626 Isolate getestet und gehältert werden. Die Sammlung ökologischer Daten der Probenstandorte erlaubte einen Vergleich der physiko-chemischen Merkmale der Salinen, der erzielten Lebendkeimzahlen und der verschiedenen Morphotypen und zeigte signifikante Unterschiede in der Organismenzusammensetzung der Salinen auf Lanzarote und bei La Baule. Es kann daraus auf eine höhere Abundanz und Diversität von Bakterien in den Salinen bei La Baule geschlossen werden. Der Anteil extrem halophiler Isolate war im Vergleich zu halotoleranten und schwach- bis moderat halophilen in den Lanzarote-Proben höher als in den La Baule-Proben. Die Suche nach Enzymen mit extremem Salzbedürfnis ist daher vermutlich trotz geringerer Diversität in den Salinen von Lanzarote erfolgversprechender.

Die Plattentests auf extrazelluläre Enzymaktivität ergaben verhältnismäßig hohe Produzentenanteile und bestätigten allgemein die Eignung der Kultur- und Testmedien sowie der Probenstandorte für das initiale Screenen. 51% der 671 Isolate aus Lanzarote zeigten mindestens eine der drei getesteten Aktivitäten, wobei 18% DNasen und jeweils 33% aller Isolate RNasen bzw. Proteasen sekretierten. Durch die Erweiterung der Plattentests um zwei Enzymaktivitäten war der Anteil der 626 La Baule-Isolate mit mindestens einer Enzymaktivität mit 83% höher als unter den Lanzarote-Isolaten. 19% bildeten DNasen, 21% Proteasen, 39% Amylasen, 41% Esterasen und 64% RNasen. Isolate, die mehr als nur eine der Aktivitäten zeigten, waren mit 45% (für Lanzarote) bzw. 67% der positiven Stämme (für La Baule) häufig. Übereinstimmend mit Literaturangaben wurden DNase-Produzenten von allen getesteten Enzymen am seltensten nachgewiesen.

Die Produzentenausbeuten waren in Vorflutern zumeist höher als in Kristallisationsbecken der Salinen. Die Enzym-positiven Stämme konnten am häufigsten der Familie der Halomonadaceae zugeordnet werden, gefolgt von den Pseudomonadaceae und den Vibrionaceae. Vertreter der Familie der Bacillaceae, die sonst die wichtigste Gruppe mit Produktion extremophiler Enzyme darstellt, wurden seltener nachgewiesen.

Alkaliphile und -tolerante Bakterien zeichneten sich überdurchschnittlich häufig durch extrazelluläre Enzym-Produktion aus, wobei aber eine extreme Häufung von alkaliphilen Protease-Produzenten, wie in der Literatur beschrieben, nicht bestätigt werden konnte.

Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz einer halophilen DNase in labortechnischen RNA-Aufreinigungskits wurden aus insgesamt 118 DNase-Produzenten aus Lanzarote neun Isolate ausgewählt, die verschiedene physiologische Eigenschaften aufwiesen. Im *In-vitro*-DNase-Test wurden ihre Aktivität und einige Eigenschaften ihrer Nucleasen bestimmt (pH-Toleranz, Salztoleranz und mögliche Cofaktoren). Zwei Isolate mit auffallenden Nuclease-Merkmalen wurden weiterführenden Untersuchungen unterzogen.

Beide Isolate sekretierten Nucleasen mit robusten Eigenschaften sowie hoher Toleranz gegenüber Detergenzien und chaotropen Substanzen. Stamm EG2S/2, ein euryhaliner Vertreter der Gattung *Halobacillus*, zeigte Ca^{2+}-abhängige, salztolerante, zuckerunspezifische extrazelluläre Nuclease-Aktivität, wobei nicht auszuschließen ist, dass es sich dabei um mehrere Nucleasen handelte. Stamm SJ1/4, ein Grenzlinien-extrem-halophiles Bakterium aus der Gattung *Halomonas*, sekretierte eine salzabhängige DNase ohne nachweisbare RNase-Aktivität. Die SJ1/4-DNase-Aktivität wies außerdem ein breiteres Temperatur- und pH-Spektrum auf als die EG2S/2-Nuclease(n).

Im weiteren Vergleich zu bereits beschriebenen halophilen Nucleasen zeigte die SJ1/4-DNase für einen biotechnologischen Einsatz in RNA-Aufreinigungskits geeignetere Eigenschaften. Aufgrund ihrer Substratspezifität, ihres hohen Salzbedürfnisses und niedrigeren Temperatur-Optimums scheint ihre Anwendung in der RNA-Aufreinigung als lohnend.

Es wurden erste Schritte zur Aufreinigung der SJ1/4-DNase unternommen, wie Ultra- und Gelfiltrationen sowie Enzym-Fällungen, die aber allgemein geringe Ausbeuten oder Reinigungserfolge ergaben. Das Molekulargewicht der DNase konnte auf 31 kDa geschätzt werden.

6. Literatur

Aguilar, A. 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. FEMS Microbiol. Rev. **18**: 89-92.

Ahrenholtz, I., M.G. Lorenz, W. Wackernagel. 1994a. A conditional suicide system in *Escherichia coli* based on the intracellular degradation of DNA. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3736-3751.

Ahrenholtz, I., M.G. Lorenz, W. Wackernagel. 1994b. The extracellular nuclease of *Serratia marcescens*: studies on the activity in vitro and effect on transforming DNA in a groundwater aquifer microcosm. Arch. Microbiol. **161**: 176-183.

Al-Khaldi, S.F., L. Lawren, S.A. Martin. 2000. Deoxyribonuclease activity in *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, and *Bacteroides ovatus*. Curr. Microbiol. **41**: 182-186.

Antón, J., R. Rosselló-Mora, F. Rodríguez-Valera, R. Amann. 2000. Extremely halophilic *Bacteria* in crystallizer ponds from solar salterns. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3052-3057.

Antón, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodríguez-Valera, R. Amann. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. Env. Microbiol. **1**: 517-523.

Austin, B. 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.

Arahal, D.R., W. Ludwig, K.H. Schleifer, A. Ventosa. 2002. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 241-249.

Ball, T.K., P.N. Saurugger, M.J. Benedik. 1987. The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. Gene **57**: 183-192.

Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. 1992. The Prokaryotes Vol IV, Kap. 199, 2. Aufl., Springer Verl., Berlin, Heidelberg.

Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol. Prog. **15**: 147-157.

Basse, G., M.G. Lorenz, W. Wackernagel. 1994. A biological assay for the sensitive and quantifiable detection of extracellular microbial DNases. J. Microbiol. Meth. **20**: 137-147.

Bast, E. 2001. Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin.

Benedik, M.J., U. Strych. 1998. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. FEMS Microbiol.ogy Letters **165**: 1-13.

Benlloch, S., A. Lopéz-Lopéz, E.O. Casamayor, L. Øvreås, V. Goddard, F.L. Daae, G. Smerdon, R. Massana, I. Joint, F. Thingstad, C. Pedrós-Alió, F. Rodríguez-Valera. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. Environ. Microbiol. **4**: 349-360.

Benlloch, S., S.G. Acinas, A.J. Martínez-Murcia, F. Rodríguez-Valera. 1996. Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. Hydrobiologia **329**: 19-31.

Benzonase® – Produktinformation Merck. 1999. Broschüre W 220 911. Merck KGaA, Deutschland.

Bertoldo, C., G. Antranikian. 2002. Starch-hydrolysing enzymes from thermophilic Archaea and bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol. **6**: 151-160.

Bidle, K.A. 2003. Differential expression of genes influenced by changing salinity using RNA arbitrarily primed PCR in the archaeal halophile *Haloferax volcanii*. Extremophiles **7**: 1-7.

Bierbaum, G., U.E. Giesecke, C. Wandrey. 1991. Analysis of nucleotide pools doing protease production with *Bacillus licheniformis.* Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 725-730.

Birnboim, H.C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. **7**: 1513-1523.

Biwer, A., G. Antranikian, E. Heinzle. 2002. Enzymatic production of cyclodextrins. Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**: 609-617.

Black, K.L., J.D. Ciacci, M. Ammirati, M.T. Selch, D.P. Becker. 1993. Clinical trial of *Serratia marcescens* extract and radiation therapy in patients with malignant astrocytoma. J. Clin. Oncol. **11**: 1746-1750.

Boynton, Z.L., J.J. Koon, E.M. Brennan, J.D. Clouart, D.M. Horowitz, T.U. Gerngross, G.W. Huisman. 1999. Reduction of cell lysate viscosity during processing of poly(3-hydroxyalkanoates) by chromosomal integration of the Staphylococcal nuclease gene in *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 1524-1529.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

Brandt, H. 1939. Die bakteriologische Untersuchung von Butter und ihre Auswirkung. Molkereizeitg. **9**: 262-264.

Brosius, J., M.L. Palmer, P.J. Kennedy, H.F. Nolther. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. **75**: 4801-4805.

Busse, H.-J., E.B.M. Denner, W. Lubitz. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotechnol. **47**: 3-38.

Chandrasekaran, S., S.C. Dahr. 1983. A low cost method for the production of extracellular alkaline proteinase using tapioca starch. J. Ferment. Technol. **61**: 511-514.

Chaphalkar, S., S. Dey. 1994. Some aspects of production of extracellular protease from *Streptomyces diastaticus*. J. Microbiol. Biotechnol. **9**: 85-100.

Chaplin, M. 2003. Kosmotropes and chaotropes. Water structure and behaviour. http://www.sbu.ac.uk/water/kosmos.html.

Chaudhuri, P., S.D. Singh. 1992. Modified methods for simple and rapid detection of bacterial deoxyribonuclease production. J. Microbiol. Meth. **16**: 307-311.

Claes, M. 1989. Geochemische Untersuchungen an Salinen und entsprechenden Labormodellen. DFG-Bericht zum Projekt "*In situ*-Bildung biogener Carbonate in Mikrobenmatten". AG Geomikrobiologie (Prof. Dr. Dr. h.c. W.E. Krumbein), ICBM, Universität Oldenburg.

Coronado, M.-J., C. Vargas, J. Hofemeister, A. Ventosa, J.J. Nieto. 2000. Production and biochemical characterization of an α-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. FEMS Microbiol. Lett. **183**: 67-71.

Cottrell, M.T., J.A. Moore, D.L. Kirchman. 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2552-2557.

Crabb, W.D., C. Mitchinson. 1997. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. Trends Biotechnol. **15**: 349-352.

Demain, A.L. 2000. Microbial biotechnology. Trends Biotechnol. **18**: 26-31.

Demirjian, D.C., F. Morís-Varas, C.S. Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 144-151.

Demirjian, D.C., P.C. Shah, F. Morís-Varas. 1999. Screening for novel enzymes. Top. Curr. Chem. **200**: 1-29.

Dennis, P.P., L.C. Shimmin. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 90-104.

Dröge, M., A. Pühler, W. Selbitschka. 1999. Horizontal gene tranfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. Biol. Fertil. Soils **29**: 221-245.

Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **53**: 217-244.

Dym, O., M. Mevarech, J.L. Sussman. 1995. Structural features that stabilise halophilic malate dehydrogenase from an Archaebacterium. Science **267**: 1344-1346.

Eaves, G.N., C.D. Jeffries. 1963. Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. **85**: 273-278.

Eichler, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnol. Advances **19**: 261-278.

Eisenberg, H.M., M. Mevarech, G. Zaccai. 1992. Biochemical, chemical and molecular genetic aspects of halophilism. Adv. Protein Chem. **43**: 1-62.

Elcock, A.H., J.A. McCammon. 1998. Electrostatic contribution to the stability of halophilic proteins. J. Mol. Biol. **280**: 731-748.

Elsner, H.-A., I. Sobottka, D. Mack, R. Laufs, M. Claussen, R. Wirth. 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 39-42.

Farrell, R.L., K. Hara, M.B. Wall. 1997. Solving pitch problems in pulp and paper processes by the use of enzymes or fungi. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **57**: 197-212.

Ferrer, C., F.J.M. Mojica, G. Juez, F. Rodíguez-Valera. 1996. Differentially transcribed regions of *Haloferax volcanii* genome depending on the medium salinity. J. Bacteriol. **178**: 309-313.

Ferrer, M.R., J. Quevedo-Sarmiento, M.A. Rivadeneyra, V. Béjar, R. Delgado, A. Ramos-Cormenzana. 1988. Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations. Curr. Microbiol. **17**: 221-227.

Focareta, T., P.A. Manning. 1991. Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* an development of a transformation system. Mol. Microbiol. **5**: 2547-2555.

Fox, G.E., J.D. Wisotzkey, P. Jurtshuk Jr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. **2**: 166-170.

Frankena, J., G.M. Koningstein, H.W. van Verselveld, A.H. Stouthamer. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**: 106-112.

Frazier, W.C., P. Rupp. 1928. Studies on the proteolytic bacteria of milk. I. A medium for the direct isolation of caseolytic milk bacteria. J. Bacteriol. **16**: 57-63.

Frolow, F., M. Harel, J.L. Sussman, M. Mevarech, M. Shoham. 1996. Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. Nat. Struct. Biol. **3**: 452-457.

Galinski, E.A. 1993. Halophile und halotolerante Eubakterien. In: Extremophile Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen. K. Hausmann, B.P. Kremer (Hg.). VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

García, M.T., A. Ventosa, F. Ruiz-Berraquero, M. Kocur. 1987. Taxonomic study and amended description of *Vibrio costicola*. Int. J. Syst. Bacteriol. **63**: 63-66.

Giani, D., J. Seeler, L. Giani, W.E. Krumbein. 1989. Microbial mats and physicochemistry in a saltern in the Bretagne (France) and in a laboratory scale saltern model. FEMS Microbiol. Ecol. **62**: 151-162.

Gibbons, N.E. 1957.The effect of salt concentration on the biochemical reactions of some halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. **3**: 249-255.

Giesecke, U.E., G. Bierbaum, H. Rudde, U. Spohn, C. Wandrey. 1991. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**: 720-724.

Gilmour, D. 1990. Halotolerant and halophilic microorganisms. In: Microbiology of extreme environments. C. Edwards (Hg.). Alden Press, Oxford.

Godfrey, T., S. West. 1996. Industrial enzymology. 2. Aufl., Macmillan Press, London.

Golubic, S. 1980. Halophily and halotolerance in cyanophytes. Origins of Life **10**: 169-183.

Good, W.A., P.A. Hartman. 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. **104**: 601-603.

Groß, M. 1997. Exzentriker des Lebens. Zellen zwischen Hitzeschock und Kältestreß. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg; Berlin.

Gupta, R., Q.K. Beg, S. Khan, B. Chauhan. 2002a. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl. Microbiol. Biotechnol. **60**: 381-395.

Gupta, R., Q.K. Beg, P. Lorenz. 2002b. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**: 1-15.

Hampp, N.A. 2000. Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into a optoelectronic material. Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**: 633-639.

Herzog, P. 2002. Klonierung von Genen für extrazelluläre Enzyme aus halophilen Bakterien. Diplomarbeit, Universität Bremen.

Hodgson, J. 1994. The changing bulk catalysis market: recombinant DNA techniques have changed bulk enzyme production dramatically. Bio/Technology **12**: 789-790.

Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 735-750.

Horikoshi, K. 1991a. Microorganisms in alkaline environments. Kodansha-VCH, Tokyo, Japan.

Horikoshi, K. 1991b. General view of alkaliphiles and thermophiles. In: Superbugs. Microorganisms in extreme environments. K. Horikoshi, W.D. Grant (Hg.). Japan Scientific Societies Press, Springer Verl., Berlin, Heidelberg.

Hough, D.W., M.J. Danson. 1999. Extremozymes. Curr. Opin. Chem. Biol. **3**: 39-46.

Izotova, L.S., A.Y. Strongin, L.N. Chekulaeva, V.E. Sterkin, V.I. Ostoslavskaya, L.A. Lyublinskaya, E.A. Timokhina, V.M. Stepanov. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. **155**: 826-830.

Jaeger, K.-E., T. Eggert, A.Eipper, M.T. Reetz. 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. Appl. Microbiol. Biotechnol. **55**: 519-530.

Jaeger, K.-E., B.W. Dijkstra, M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. **53**: 315-351.

Jaeger, K.-E., M.T. Reetz.1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol. **16**: 396-403.

Javor, B.J. 2002. Industrial microbiology of solar salt production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **28**: 42-47.

Javor, B.J. 1983. Nutrients and ecology of the Western salt and Exportadora de Sal saltern brines. In: 6th Int. Symp. Salt, 1983, Salt Institute: 195-205.

Jolley, K.A., R.J.M. Russell, D.W. Hough, M.J. Danson. 1997. Site-directed mutagenesis and halophilicity of dehydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. Eur. J. Biochem. **248**: 362-368.

Kamekura, M., Y. Seno, M. Dyall-Smith. 1996. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies. Biochim. Biophys. Acta **1294**: 159-167.

Kamekura, M., H. Onishi. 1982. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5`-GMP. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 994-995.

Kamekura, M., H. Onishi. 1979. A medium for commercial production of the halophilic *Micrococcus* nuclease. Can. J. Microbiol. **25**: 1113-1116.

Kamekura, M., H. Onishi. 1978a. Properties of the halophilic nuclease of a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. J. Bacteriol. **133**: 59-65.

Kamekura, M., H. Onishi. 1978b. Flocculation and adsorption of enzymes during growth of a moderate halophile *Micrococcus varians* var. *halophilus*. Can. J. Microbiol. **24**: 703-709.

Kamekura, M., H. Onishi. 1976. Effect of magnesium and some nutrients on the growth and nuclease formation of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. *halophilus*. Can. J. Microbiol. **22**: 1567-1576.

Kamekura, M., H. Onishi. 1974. Halophilic Nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. J. Bacteriol. **119**: 339-344.

Kim, J., J.S. Dordick. 1997. Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile. Biotechnol. Bioeng. **55**: 471-479.

Kirst, G.O. 1995. Halophile Mikroalgen. In: K. Hausmann, B.P. Kremer (Herg.). Extremophile, Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen, 2. Aufl. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Kitada, M., K. Horikoshi. 1977. Sodium ion-stimulated α-[1-^{14}C]aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* species. J. Bacteriol. **131**: 784-788.

Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature **409**: 241-246.

Kouker, G., K.-E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 211-213.

Kraegeloh, A., H.J. Kunte. 2002. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. Extremophiles **6**: 453-462.

Krulwich, T.A., A.A. Guffanti. 1989. Alkalophilic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **43**: 435-463.

Krulwich, T.A. 1986. Bioenergetics of alkalophilic bacteria. J. Membrane Biol. **89**: 113-125.

Kumar, C.G., H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol. Advances **17**: 561-594.

Kurinenko, B.M., M.I. Beliaeva, I.E. Cherepneva, F.G. Kuprianiova-Ashina. 1977. Permeability of dextran-bound nuclease through the vascular barrier and tumor cell membrane. Vopr. Onkol. **23**: 86-90; Antitumor action of *Serratia marcescens* nuclease covalently bound to soluble dextrans. Vopr. Onkol. **23**: 94-98.

Kushner, D.J. 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: R.H. Vreeland, L.I.Hochstein (Hg.). The biology of halophilic bacteria. CRC Press, Inc., Broca Raton, Fla.: 87-103.

Kushner, D.J. 1988. Halophilic bacteria: their life in and out of salt. In: M.S. Da Costa, J.C. Duarte, R.A.D. Williams (Hg.). Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. 49. FEMS Symposium, Portugal, 18.-23.09.1988.

Kushner, D.J., M. Kamekura. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. In: F. Rodríguez-Valera (Hg.). Halophilic bacteria. Vol. I, CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla.: 109-138.

Kushner, D.J. 1985. The Halobacteriaceae. In: C.R. Woese, R.S. Wolfe (Hg.). The bacteria, Vol. 8. Academic Press, Inc., N.Y.: 171-214.

Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In: Kushner, D.J. Microbial life in extreme environments. Academic Press, Ltd., London, UK.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

Leicht, W., S. Pundak. 1981. Large-scale purification of halophilic enzymes by salting-out mediated chromatography. Anal. Biochem. **114**: 186-192.

Litchfield, C.D., P.M. Gillevet. 2002. Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **28**: 48-55.

Litchfield, C.D., A. Irby, T. Kis-Papo, A. Oren. 2000. Comparison of the polar lipid and pigment profiles of two solar salterns located in Newark, California, U.S.A., and Eilat, Isreal. Extremophiles **4**: 259-265.

Lorenz, M.G., W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. **58**: 563-602.

Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, K.H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis **19**: 554-568.

Madern, D., C. Ebel, G. Zaccai. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles **4**: 91-98.

Madern, D., G. Zaccai. 1997. Stabilisation of halophilic malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* by divalent cations – effects of temperature, water isotope, cofactor and pH. Eur. J. Biochem. **249**: 607-611.

Maeda, M., N. Taga. 1973. Deoxyribonuclease activity in seawater and sediment. Marine Biology **20**: 58-63.

Mao, W., R. Pan, D. Freedman. 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. J. Ind. Microbiol. **11**: 1-6.

Margesin, R., F. Schinner. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles **5**: 73-83.

Marhuenda-Egea, F., M.J. Bonete. 2002. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 385-389.

Martínez-Murcia, A.J., S.G. Acinas, F. Rodríguez-Valera. 1995. Evaluation of prokaryotic diversity by restirctase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. FEMS Microbiol. Ecol. **17**: 247-256.

Martínez-Murcia, A.J., S. Benlloch, M.D. Collins. 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**: 412-421.

Martins, R.F., W. Davids, W. Abu Al-Soud, F. Levander, P. Rådström, R. Hatti-Kaul. 2001. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes. Extremophiles **5**: 135-144.

Meurer, G., J. Eck. 2003. Unkultivierte Mikroorganismen als Ressource für neuartige Enzyme und Wirkstoffe. Laborwelt **4**: 33-34.

Mevarech, M., F. Frolow, L.M. Gloss. 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. Biophys. Chem. **86**: 155-164.

Mijts, B.N., B.K.C. Patel. 2002. Cloning, sequencing and expression of an α-amylase gene, *amyA*, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Microbiology **148**: 2343-2349.

Mims, C., J. Playfair, I. Roitt, D. Wakelin, R. Williams. 1998. Medical Microbiology. 2. Aufl. Mosby, London, UK.

Mojica, F.J.M., E. Cisneros, C. Ferrer, F. Rodríguez-Valera, G. Juez. 1997. Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes: the bacterium *Halomonas elongata* and the archaeon *Haloferax volcanii*. J. Bacteriol. **179**: 5471-5481.

Moon, S.H., S.J. Parulekar. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnol. Bioeng. **37**: 467-483.

Moran, A.J., M. Hills, J. Gunton, F.E. Nano. 2001. Heat-labile proteases in molecular biology applications. FEMS Microbiol. Lett. **197**: 59-63.

Mülhardt, C. 2002. Choatrope Salze. Das gezähmte Durcheinander. Laborjournal Biotech Europe. http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v26.html.

Müller, V., A. Oren. 2003. Metobolism of chloride in halophilic prokaryotes. Extremophiles **7**: 261-266.

Nestle, M., W.K. Roberts. 1969. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. J. Biol. Chem. **244**: 5213-5218.

Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kähler, G. Antranikian. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Appl. Environ. Microbiol. **51**: 711-729.

Obayashi, A., N. Hiraoka, K. Kita, H. Nakajima, T. Shuzo. 1988. US Patent 4: 724, 209, US Cl. 435/199.

Ochsenreiter, T., F. Pfeifer, C. Schleper. 2002. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. Extremophiles **6**: 267-274.

O´Connor, L.T., D.C. Savage. 1993. Characterization of an activity from the strict anaerobe *Roseburia cecicola* that degrades DNA when exposed to air. J. Bacteriol. **175**: 4681 ff.

Oren, A. 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **28**: 56-63.

Oren, A. 2002b. Molecular ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. FEMS Microbiol. Ecol. **39**: 1-7.

Oren, A., F. Rodríguez-Valera. 2001. The contribution of halophilic *Bacteria* to the red coloration of saltern crystallizer ponds. FEMS Microbiol. Ecol. **36**: 123-130.

Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 334-348.

Oren, A. 1990. Estimation of the contribution of halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts. FEMS Microbiol. Ecol. **73**: 41-48.

Onishi, H., T. Mori, S. Takeuchi, K. Tani, T. Kobayashi, M. Kamekura. 1983. Halophilic nuclease of a moderatly halophilic *Bacillus* sp.: production, purification and characterization. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 24-30.

Onishi, H., O. Hidaka. 1978. Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. Can. J. Microbiol. **24**: 1017-1023.

Paggi, R.A., C.B. Martone, C. Fuqua, R.E. De Castro. 2003. Detection of quorum sensing in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. FEMS Microbiol. Lett. **221**: 49-52.

Patil, D.R., D.G. Rethwisch, J.S. Dordick. 1991. Enzymatic synthesis of a sucrose-containing linear polyester in nearly anhydrous organic media. Biotechnol. Bioeng. **37**: 447-450.

Plou, F.J., M. Ferrer, O.M. Nuero, M.V. Calvo, M. Alcalde, F. Reyes, A. Ballesteros. 1998. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activitiy assay. Biotechnol. Techniques **12**: 183-186.

Post, F.J. 1981. Microbiology of the Great Salt Lake north arm. Hydrobiologia **81**: 59-69.

Rangarajan, S., V. Shankar. 1999. Extracellular nuclease from *Rhizopus stolonifera*: purification and characteristics of – single strand preferential – deoxyribonuclease activity. Biochim. Biophys. Acta **1473**: 293-304.

Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 597-635.

Rawlings, N.D., A.J. Barrett. 1993. Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. **290**: 205-218.

Rethmeier, J., A. Rabenstein, M. Langer, U. Fischer. 1997. Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. J. Chromatogr. **A 760**: 295-302.

Rivadeneyra, M.A., G. Delgado, A. Ramos-Cormenzana, R. Delgado. 1998. Biomineralization of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities: crystal formation sequence. Res. Microbiol. **149**: 277-287.

Ryu, K., J. Kim, J.S. Dordick. 1994. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. Enzyme Microb. Technol. **16**: 266-275.

Römpp, Chemie-Lexikon. 2000. Version 2.0, Thieme Verlag.

Rodríguez-Valera, F. 1993. Introduction to saline environments. In: The biology of halophilic bacteria. R.H.Vreeland, L.I. Hochstein (Hg.). CRC Press, Inc., Broca Raton, Fla.

Rodríguez-Valera, F. 1988. Halophilic bacteria. Vol. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla.

Rodríguez-Valera, F., A. Ventosa, G. Juez, J.F. Imhoff. 1985 Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. Microb. Ecol. **11**: 107-115.

Sánchez-Porro, C., S. Martín, E. Mellado, A. Ventosa. 2003a. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol. **94**: 295-300.

Sánchez-Porro, C., E. Mellado, C. Bertoldo, G. Antranikian, A. Ventosa. 2003b. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. Extremophiles **7**: 221-228.

Schiraldi, C., M. De Rosa. 2002. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. Trends Biotechnol. **20**: 515-521.

Schopfer, P., A. Brennicke. 1999. Pflanzenphysiologie, 5. Aufl., Springer Verl., NY.

Schreier, J.B. 1969. Modification of deoxyribonuclease test medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. Amer. J. Clin. Pathol. **51**: 711-716.

Schumann, G., K. Cannon, W.P. Ma, R.J. Crouch, J.D. Boeke. 1997. Antiretroviral effect of a gag-RNase HI fusion gene. Gene Ther. **4**: 593-599.

Sehgal, S.N., N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutrirubrum*. Can. J. Microbiol. **6**: 165-169.

Sellek, G.A., J.B. Chaudhuri. 1999. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. Enzyme Microb. Technol. **25**: 471-482.

Sen, S., T. Satyanarayana. 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. Ind. J. Microbiol. **33**: 43-47.

Serour, E., G. Antranikian. 2002. Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilium*, *Picrophylus torridus* and *Picrophilus oshhimae*. Antonie Van Leeuwenhoek **81**: 73-83.

Shoichet, B.K., W.A. Baase, R. Kuroki, B.W. Matthews. 1995. A relationship between protein stability and protein function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 452-456.

Simon , J.-W.F.A., M.D. van Kampen, S. Riel, F. Götz, M.R.Egmond, H.M. Verheij. 1998. Cloning, purification and characterization of the lipase of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. **253**: 675-683.

Smibert, R.M., N.R. Krieg. 1981. In: Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt et al. (Hg.). American Society for Microbiology, Washington, DC.

Smith, P.B., G.A. Hancock, D.L. Rhoden. 1969. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. Appl. Microbiol. **18**: 991-993.

Stan-Lotter, H., E. Doppler, M. Jarosch, C. Radax, C. Gruber, K.I. Inatomi. 1999. Isolation of a chymotrypsinogen B-like enzyme from the archaeon *Natronomonas pharaonis* and other halobacteria. Extremophiles **3**: 153-161.

Sterchi, E.E., W. Stöcker. 1999. Proteolytic Enzymes, Tools and Targets. Springer Verl., Berlin, Heidelberg.

Sudge, S.S., K.B. Bastawde, D.V. Gokhale, U.R. Kalkote, T. Ravindranathan. 1998. Production of D-hydantoinase by halophilic *Pseudomonas* sp. NCIM 5109. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**: 594-599.

Süßmuth, R., J. Eberspächer, R. Haag, W. Springer. 1999. Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum, 2. Aufl., Thieme Verlag.

Svensson, B. 1994. Protein engineering in the α-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. Plant Mol. Biol. **25**: 141-157.

Taupin, C.M., M. Hartlein, R. Leberman. 1997. Seryl-tRNA synthetase from the extreme halophilic *Haloarcula marismortui* – isolation, characterization and sequencing of the gene and its expression in *E. coli*. Eur. J. Biochem. **243**: 141-150.

Tichy, H.V., R. Simon. 1994. Effiziente Analyse von Mikroorganismen mit PCR-Fingerprint-Verfahren. Bioforum **17**: 499-505.

Ueda, J.-I., M. Takai, Y. Shimazu, T. Ozawa. 1998. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(II) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. Arch. Biochem. Biophys. **357**: 231-239.

Van Qua, D., U. Simidu, N. Taga. 1981. Purification and some properties of a halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp. Can. J. Microbiol. **27**: 505-510.

Vedder, A. 1934. *Bacillus alcalophilus* n. sp.; benevens enkele ervaringen met sterk alcalische voedingsbodems. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. **1**: 143-147.

Ventosa, A., J.J. Nieto, A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 504-544.

Ventosa, A., E. Quesada, F. Rodríguez-Valera, F. Ruiz-Berraquero, A. Ramos-Cormenzana. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. J. Gen. Microbiol. **128**: 1959-1968.

Voet, D., J.G. Voet. 1992. Biochemie. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Vogt, M. 2000. Taxonomische Untersuchungen von halophilen Bakterien aus marinen Standorten mit erhöhter Salzkonzentration. Diplomarbeit, Universität Bremen.

van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source of novel enzymes. Curr. Opin. Microbiol. **6**: 213-218.

v. Wintzigerode, F., U.B. Göbel, E.Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. **21**: 213-229.

Vreeland, R.H. 1987. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. CRC Crit. Rev. Microbiol. **14**: 311-356.

Wahler, D., J.-L. Reymond. 2001. Novel methods for biocatalyst screening. Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 152-158.

Wallace, R.J., J. Kopecny. 1983. Breakdown of diazoticed proteins and synthetic substrates by rumen bacterial proteases. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 212-217.

White, J.S., D.C. White. 1997. Source book of enzymes, CRC Press, Inc., Broca Raton, Fla.

Whitehead, N.A., A.M.L. Barnard, H. Slater, N.J.L.Simpson, G. P.C. Salmond. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25: 365-404.

Wichmann, F. 1999. Charakterisierung eines Schutzfaktors aus Spinat (*Spinacia oleracea*) in kupfer- und zinkabhängigen biochemischen Metallreaktionen und dessen Nachweis als Metallkomplexator. Diss., Universität Hannover.

Wind, R.D., W. Liebl, R.M. Buitelaar, D. Penninga, A. Spreinat, L. Dijkhuizen, H. Bahl. 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1257-1265.

Yamamoto, S., S. Harayama. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of gyrB genes and on the amino acid sequences of their products. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 506-511.

Yonemura, K., K. Natszniti, H. Maeda. 1983. Isolation and characterization of nucleases from a clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. J. Biochem. **93**: 1287-1295.

Zweifel, U., A. Hägstrom. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleotide-containing bacteria (ghosts). Appl. Environ. Microbiol. **61**: 2180-2185.

7. Anhang

Tab. A: Lanzarote-Isolate der Stammsammlung mit laufender Nummer, ihre Isolationsbedingungen, Gram-Verhalten (Vogt, 2000), extrazelluläre Enzym-Aktivitäten, die Ergebnisse der Teilsequenzierung des 16S-rRNA-Gens, die Kolonie- und Zellmorphologie, ihre Eingruppierung aufgrund von ARDRA und FISH (Vogt, 2000) sowie NaCl-Toleranz und -Optimum des Wachstums (Vogt, 2000).

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Protease	Esterase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
1	EG1S/5	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas pacifica* (96,1%)	beige, klein, ggg, etwas durchsichtig	P, 1 x 1-4 µm (bew.n.e.) Stäbchen	26/γ	12-20	12
2	EG2S/6	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas pacifica* (96,1%)	weiß-beige, ggg, mit dunklem Kern, nicht immer rund	P, unbew. Stäbchen, untersch. dick, 2-4 µm lang, aufgebläht zu Keulen und Kokken, teilweise in Ketten	26/γ	12	12
3	EG2S/7	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, klar bis milchig, rel. rund, ggg	Bew. Stäbchen, wie EG2S/5, haften gut am Glas	4	2,9-20	2,9-12
4	EG2S/8	12/8	-	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas salina und halophila* (99,2%)	beige-weiß, trüber als /7, klarer Rand, ggg	Ovale bew. Stäbchen, 1 x 2 µm selten länger, einige mit dunklem Fleck in der Mitte der Zelle, haften schlecht, max. 2 Zellen aneinander	4/Eub.	12-20	12
5	SJ2/1	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, ggg, zu großen K. zerlaufend, leicht rosa	P, Vibrio, haften fast alle am Glas, an den Enden spitzer werdend, 1 x 2-3 µm, einige hängen in langen Ketten zusammen	2	2,9-20	2,9-12
6	SJ3/1	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	weiß, ggg, leicht zerlaufend	Wie SJ2/1, Vibrio, haften nicht so gut am Glas	2	2,9-20	2,9-12
7	SJ5/9	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	*Salinivibrio vallismortis* (98,6%)	rel. klare, durchs., ggg, beige	Wie SJ2/1, Vibrio, sehr agil	n.u.	0,5-12	0,5-12
8	SJ5/6	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	etwas trüber als /9	Wie SJ2/1, Vibrio	2	0,5-20	12
9	SJ5Ü/1	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, groß (zerlaufend), ggg	P, Stäbchen, kantig, haften gut am Glas, bew. aber wenig agil	n.u.	2,9-20	2,9-12
10	SJ5S/2a	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, durchscheinend, ggg, rel. kleine K.	Wie SJ2/1, Vibrio	2	2,9-12	12
11	SJ5Ü/3	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, stärker zerlaufend als /1	Wie SJ2/1, Vibrio	2	0,5-12	2,9-12
12	SJ5Ü/4	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	Bak. `A6-UMH 8% pond´(100%)	beige, sonst wie /1	Wie SJ2/1, Vibrio, nur etwas runder an den Enden	2	2,9-12	2,9-12
13	SJ5Ü/6	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-beige, klein, wenig zerlaufend, ggg	P, bew. Stäbchen, 1 x 2-3 µm, scheinen dicke Schleimhülle zu haben da unscharf	1	12-20	12
14	SJ5S/6	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, durchs., klein, ggg	Wie SJ5S/11	n.u.	0,5-20	12
15	SJ5Ü/7	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, klein, ggg	Wie SJ5Ü/6	1	12-20	12
16	SJ5S/7	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-beige, ggg, rel. klein	Eher wie EG2S/8 als SJ2/1 auch Vibrio	2	2,9-20	2,9-12
17	SJ5S/8	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /7	Wie SJ5S/7, Vibrio	2	2,9-12	12
18	SJ6/5	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-beige, rel. durchs., ggg	Wie SJ5S/7, Vibrio	2	2,9-12	12
19	SJ6Ü/1	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-gelb, kleine K., ggg	Wie SJ5Ü/6, Stäbchen oder Vibrio	2	2,9-20	12
20	SJ6Ü/2	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	außen weiß, innen grau-beige, zerlaufend	Wie SJ2/1, Vibrio, haften gut am Glas	2	0,5-20	2,9-12
21	SJ6Ü/3	12/8	n.u.	n.e.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 2 nur etwas gelblichgrauer	Wie SJ2/1, Vibrio, haften gut am Glas	2	2,9-20	12
22	SJ6Ü/5	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, etwas durchs., ggg, etwas zerlaufend	Wie SJ5S/7, Vibrio	n.u.	0,5-20	2,9-12
23	SJ6S/5	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	durchs. beige, rel. groß, zerlaufend, ggg	Wie SJ5S/7, Vibrio	2	0,5-20	12
24	SJ6Ü/6	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	weiß, wenig durchs., weit zerlaufend	Wie SJ5S/7, Vibrio, haften gut am Glas	2	0,5-20	2,9-12
25	SJ6S/6	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	ähnlich /5 aber milchiger, sternförmig schimmernd	Wie SJ5S/7, Vibrio, haften gut am Glas	2	2,9-20	12
26	SJ6S/7	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	zerlaufener als /5 und /6, rel. groß, ggg	Wie SJ5S/7, Vibrio	2	2,9-20	2,9-12
27	SJ6S/8	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	sehr klein, beige, etwas durchs., ggg	Unbew. Stäbchen, 1 x 2-3 µm, Enden abgerundet	1	2,9-20	12
28	SJ6S/9	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	weiß-beige, etwas durchs., leicht zerlaufend, ggg	Vibrio (oder Spirillen n.e.), wenig agil, haften gut am Glas, 1 x 1,5 µm (bis 3 µm)	n.u.	2,9-20	2,9-12
29	SJ6S/10	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	stärker zerlaufend als /9, sonst ähnlich	Wie SJ6S/9	n.u.	0,5-20	12
30	SJ6S/11	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /9	Wie SJ2/1, Kokken (Sphäro. n.e.) dabei	n.u.	2,9-20	12
31	SJ1/1	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, leicht rosa, wie SJ2/1	Wie SJ2/1 haften gut am Glas	n.u.	2,9-20	12
32	SJ3/2	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, weniger zerlaufend als /1	P, ähnlich wie SJ2/1 aber kleiner und manchmal unförmiger, bew.	n.u.	0,5-20	12
33	SJ3/3	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	orange-weiß, klein, ggg	P, Kokken und Stäbchen	n.u.	2,9-20	12-20
34	SJ3/4	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /1	1 x 2-3µm gekrümmte bew. Stäbchen, wie SJ2/1	n.u.	0,5-20	12
35	SJ5/3	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, wenig zerlaufend, ggg, rel. kleine K.	Wie SJ3/4, Vibrio	n.u.	2,9-12	12
36	SJ5S/1	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /2 (Nr. 10)	Wie SJ3/4, Vibrio	n.u.	2,9-20	12
37	SJ5Ü/2	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, zerlaufend, ggg	Wie SJ3/2, Vibrio	2	2,9-20	12

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-Ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
38	SJ5S/2b	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	*Halomonas variabilis* (99,2%)	wie /3 nur weniger zerlaufend	P, unbew. Stäbchen, ungleichm. dick, 1 x 3-4 µm	7/γ	12	12
39	SJ5S/3	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	Nichtident. Klon K2-30-15 (90,6%)	gelb-beige, durchsichtig, ggg	Wie SJ3/2, Vibrio	2	0,5-20	12
40	SJ5S/4	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /6	Wie SJ3/2, Vibrio	n.u.	0,5-20	12
41	SJ5Ü/5	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-beige, klein, ggg	P, unbew. Stäbchen, 1 x 2-3 µm	1	12-20	12
42	SJ5S/5	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-rosa, durchs., ggg, etwas zerlaufend	Wie SJ3/2, Vibrio	2	0,5-20	2,9-12
43	SJ5S/9	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /6	Wie SJ3/4, Vibrio	n.u.	0,5-20	12
44	SJ5S/10	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	beige, zerlaufend, leicht durchs., ggg	Wie SJ3/4, Vibrio	2	2,9-20	2,9-12
45	SJ5S/11	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, sehr durchs., leicht zerlaufend, ggg	P, Vibrio, sehr agil, ½ x 2-3 µm, an den Enden spitz	n.u.	0,5-20	12
46	SJ5S/12	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	sehr klein, gelb-beige, ggg, perlmutartige Oberfl., zäh	Bew. Stäbchen, sehr kurz, teilweise eher Kokken, 1 x 1-2µm	n.u.	12-20	12-20
47	EG1S/1	12/8	n.u.	+	+	+	+	-	n.u.	weiß, rel. klein, ggg, am Rand kräftig gewachsen	P, dünne, sehr durchs. Stäbchen, 0,5 x 15 µm und größer, kurze Stäbchen 1 x 1-2 µm, dunkler, bilden Ketten mit Zellen untersch. Länge, Scheiden?., dünne Stäbchen scheinen zu den Ketten dazuzugehören (alt?), Pleomorphie, unbew., einige Sphäro.	9	2,9-20	2,9
48	EG1S/2	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, ggg	Ähnlich gestaltreich wie /1 aber lange Stäbchen fehlen	1	12-20	12-20
49	EG1S/4	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	ähnlich /2, höher als /2, weniger rau, zäh	P, bew, Stäbchen, untersch. lang, 0,5 x 0,5-2 µm, sehr agil	1	2,9-20	2,9
50	EG2S/2	12/8	n.u.	+	+	+	+	-	*Halobacillus litoralis* (99,6%)	weiß, flach, am Rand kräftiger, ggg	P, sehr untersch. geformte Stäbchen, bilden Ketten, ähnlich EG1S/1, teilweise an den Enden aufgebläht	9	0,5-20	2,9
51	EG2S/3	12/8	n.u.	+	+	+	+	-	n.u.	orange-beige, am Rand kräftiger, wirkt daher zerlaufen, ggg	Wie EG1S/1, Pleomorphie mit teilweise sehr dünnen Stäbchen	9	0,5-20	2,9
52	EG2S/4	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, gleichm., gg, etwas matte Oberfl., ältere braun	P, lange Stäbchen, 0,5 x sehr lang, teilweise auch wieder mit dicken kurzen Stäbchen in Ketten	9	2,9-20	12
53	EG2S/5	12/8	n.u.	+	+	-	+	-	n.u.	orange-beige, am Rand kräftiger, ggg	Wie EG1S/2	9	2,9-20	2,9-12
54	EG2S/9	12/8	n.u.	+	+	-	+	-	n.u.	orange, am Rand kräftiger, ggg	P, wie EG1S/2 aber Zellen schlanker	9	0,5-20	0,5-12
55	EG2S/10	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	orange, ggg, am Rand kräftiger und später zerlaufend	P, ähnlich EG1S/1, Pleomorphie mit teilweise sehr dünnen Stäbchen, aber Stäbchen kürzer und kontrastreicher (dunkler)	9	0,5-20	2,9
56	SJ6S/1	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	weiß, groß, zerlaufend, rund, ggg, etwas durchs.	P, Kokken < 1 µm (Sphäro. oder eingerollte Vibrios n.e.) und Vibrios 0,5 x 1 µm, sehr flink bew.	2	2,9-20	2,9
57	SJ6S/2	12/8	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie /1	Vibrio wie SJ6S/1 aber ohne Kokken (jünger oder rein n.e.)	2	0,5-20	2,9-12
58	SJ6S/3	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, trüb, ggg, rel. klein, am Rand schwacher, zäh	P, Kokken bis Stäbchen, 0,5 x 0,5-1,5 µm, unbew. n.e.	1	2,9-20	2,9
59	SJ6Ü/4	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, rel. klein, ggg, knubbelig, weniger zerlaufend	Wie SJ6S/3, haften gut am Glas, 0,5 x 0,5-2,5 µm	4	2,9-20	2,9
60	SJ6S/4	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie /3 aber gelblicher, zäh	P, bew. Stäbchen, 1 x 2 µm, Kokken 1 µm, Stäbchen teilweise gebändert	1	2,9-20	12-20
61	SJ6Ü/7	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	klein, wenig zerlaufend, ggg, beige, leicht durchs., zäh	P, Stäbchen sehr agil, ¼ x 0,5-1,5 µm, manche gekrümmt, manche gemasert, (Einschlüsse n.e.), haften gut am Glas	n.u.	2,9-12	2,9
62	SJ6Ü/8	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, rosa-weiß-beige, ggg	Wie Ü/7, Vibrio	2	2,9-12	2,9
63	SJ6Ü/9	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	stark zerlaufend, weiß-beige, wenig durchs.	Wie SJ6S/1, Vibrio	n.u.	0,5-20	2,9-12
64	SJ6Ü/10	12/8	-	+	+	+	+	+	n.u.	weiß-beige, durchsichtig, zerlaufend	Wie SJ6S/1, Vibrio	1/Eub.	0,5-20	2,9
65	SJ6S/12	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-gelb, Schmier, durchs., zäh	P, Stäbchen, ¼ x 2-3 µm, so flink wie bei SJ6S/1, Kokken 1 µm, sieht aus als wenn Stäbchen aus einer runden Haut heraus schlüpfen	n.u.	2,9-12	2,9
66	SJ1/2	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	ggg, beige, transparent, rel. klein, zäh	P, Kokken und Stäbchen (vielleicht Vibrio), 0,5-1 x 1-3 µm, bew.n.e., an den Enden spitzer werdend	2	12-20	20
67	SJ1/4	12/8	n.u.	+	-	-	n.u.	n.u.	Bac.´Ä310-UMH 31% pond`(99,2%)	ggg, gelb-beige, transparent, rel. klein	Kokken 1 µm, manchmal 2 zusammen, sehen dann fast wie Stäbchen aus	n.u.	12-20	20
68	SJ5/1	12/8	n.u.	-	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	orange-rosa, ggg, rel. klein, zäh	Vibrio oder Stäbchen n.e., 0,75 x 1,5-3 µm, häufig gebändert und untersch. dick	8	2,9-12	2,9
69	EG1Ü/2	12/8	-	-	+	-	n.u.	n.u.	Nichtkult. *Halomonas* sp. HD 2000/10 (95,3%)	rosa-braun-beige, zerlaufen, ggg, perlmutartig	P, bew. Stäbchen, einige mit Eindellungen vor den Enden, haften mäßig am Glas, einige meliert, aufgebläht oder anders deformiert, 0,75 x 1-3 µm	12/ Eub.	2,9-20	2,9
70	EG1S/3	12/8	n.u.	+	+	-	+	-	n.u.	weiß-grau-beige, zerlaufen, ggg, undurchs.	Wie EG1S/1	9	0,5-20	0,5-2,9
71	EG2S/1	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, Rand wirkt sehr distinkt, wenig auslaufend, ggg	P, wie EG1S/1, haften alle am Glas	9	0,5-20	2,9-20

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
72	SJ3/5	12/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	Halophiles Bak. 2HS38b (100%)	rosa, durchs., sehr klein	bew. Stäbchen (0,3-0,5 x 2 µm) und bew. Kokken (0,75 -2 µm), Übergänge auch bew., haften gut am Glas	3	2,9-30	20
73	SJ2/3-1	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	altrosa, etwas durchs., stark zerlaufend, ggg	Bew. Stäbchen bis Kokken, sehr agil, 0,75 x 0,75-2 µm, haften kaum am Glas, gekrümmt (Vibrio n.e.)	2	0,5-20	0,5-12
74	SJ2/4	12/8	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rosa, klein, ggg, eher beige	P, 1 x 1,2-4 µm Stäbchen, bew., recht eckig, haften gut am Glas, starr	n.u.	12-20	12
75	SJ2/5	12/8	n.u.	-	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-gelb, durchs., sehr klein	bew. Stäbchen, haften fast alle am Glas, wenig agil, wie SJ3/5 Kultur nur dichter (älter n.e.)	n.u.	12-30	20
76	SJ6/1	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, etwas zerlaufend, ggg, leicht durchs., zäh	Kurze Stäbchen, 0,75 x 1-2 µm, haften alle am Glas, bew. aber wenig agil, häufig 2 aneinander	1	12-20	12-20
77	SJ6/2	12/8	n.u.	+	+	-	+	-	n.u.	weiß, leicht zerlaufend, ggg	P, bew. Stäbchen, bilden scheinbar Scheiden oder Einschlüsse n.e., gut 1 x 1->20 µm, schraubige Bew.,	5	2,9-12	2,9
78	SJ6/3	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-gelb, klein, ggg, zäh	P, Stäbchen, 0,5 x 0,5-1 µm, sehen platt aus, haften recht gut am Glas, bew.n.e.	1	12-20	12-20
79	SJ6/4	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	*Salinivibrio vallismortis* (98,8%)	weiß, etwas zerlaufend, ggg	P, Kokken 1 µm, Vibrio 0,5 x bis zu 4 µm, einige agile dabei, viele haften am Glas	13	0,5-12	2,9
80	SJ6/6	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	Nichtident. Bak. K2-30-15 (99%)	weiß, wie /4 nur etwas stärker zerlaufen	P, kürzere Vibrios als SJ6/4, eher wie SJ6S/1	2	0,5-20	2,9
81	SJ6/7	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, klein, ggg	Wie SJ6/3	1	2,9-20	2,9-20
82	SJ5/2	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-grau, wenig zerlaufend, ggg, zäh	P, bew. Stäbchen, haften nicht am Glas, sehr durchs., einige meliert, 0,75 x 2-5 µm	10	2,9-20	2,9-12
83	SJ5/3	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-rosa, etwas zerlaufend, ggg, leicht durchs., zäh	Wie SJ6/S1	2	2,9-20	2,9
84	SJ5/4	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-gelblich, klein, ggg,	P, bew. Stäbchen, 1-1,5 x 2-5 µm, wie SJ6/2	n.u.	12-20	12-20
85	SJ5/5	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	*Halomonas variabilis* (98,4%)	weiß-gelblich, etwas zerlaufend, undurchs.	Ähnlich SJ5/4 aber Längenverteilung anders, nur kurze und ganz lange Zellen, Zwischengrößen fehlen	5/γ	2,9-12	2,9
86	SJ5/7	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	Nichtident. Bak. K2-30-15 (99,4%)	weiß-rosa, stark zerlaufend, ggg, undurchs.	Wie SJ6/S1	2	0,5-20	2,9
87	SJ5/8	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /7	Wie SJ6/S1	2	0,5-20	2,9
88	BP/1	12/8	n.u.	+	+	-	+	-	n.u.	gelb, stark zerlaufend, zum Rand hin heller, ggg	Ähnlich EG1S/1	9	2,9-20	2,9
89	BP/2	12/8	n.u.	n.e.	+	-	n.u.	n.u.	*Halobacillus* sp. YIM-kkny15 (95,6%)	beige, transparent, flach, auslaufender Rand, ggg	Wie EG2S/9	14	2,9-20	2,9
90	BP/3	12/8	+	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halobacillus trueperi* (99,2%)	wie BP/1	Wie BP/2 aber Zellen länger und mehr Ketten, Zellen haben ab und zu hellgelbe Einschlüsse	9/Eub.	2,9-20	2,9
91	BF/1	12/8	-	n.e.	+	-	-	-	n.u.	sehr klein, gelb, ggg, orange, unregelm. Form und Größe	P, Sammelsurium an Zellentypen, Pleomorphie n.e.	15/ Eub.	0,5-12	0,5-12
92	BF/3	12/8	n.u.	n.e.	+	-	n.u.	-	n.u.	weiß-altrosa, klein, etwas durchs., ggg	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-4 µm und Kokken und Sphäro.	14	0,5-20	2,9
93	BF/4	12/8	n.u.	+	+	-	n.u.	-	n.u.	wie Perlmutt, altrosa, knubbelig, nicht zerlaufend	P, Zellen klumpen stark zusammen, Pleomorphie, Stäbchen 1-1,5 x 3-5 µm	1	2,9-20	2,9-12
94	SJ1/3-1	12/8	n.u.	n.e.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, sehr aufgewölbt, zäh	P, klumpen stark zusammen, Pleomorphie, >1 µm	1	2,9-20	2,9-12
95	SJ1/3-2	12/8	n.u.	n.e.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transparent, klein, flach	Stäbchen 0,5 x 1-1,5 µm und untersch. große Kokken 1-3 µm	3	12-30	20
96	SJ2/2	12/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	Halophiles Bak. 2HS38b (100%)	beige, durchs., klein	wie SJ3/5 aber mehr Unregelmäßigkeiten in der Stäbchenform und mehr Kokken wie bei SJ1/3-2, Stäbchen etwas größer, 0,5 x 1,5-3 µm, ältere Kultur n.e.	3	12-30	20
97	SJ2/3-2	12/8	n.u.	+n.e.	+n.e.	+n.e.	n.u.	n.u.	n.u.	klein, gelb, wenig durchs.	2 x P, große Kokken 2-8 µm, leuchten gelb/grün, Sphäro. ungefähr gleiche Größe, viele Zelltrümmer (Kultur alt n.e.)	n.u.	12-20	12-20
98	SJ5Ü/8	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	Nichtident. Bak. K2-30-15 (92,7%)	weiß-rosa, ggg, zerlaufend, wenig durchs.	Wie SJ6S/1, Kokken haben dunklen Pol, sehen auch etwas aus wie Sphäro.	2	0,5-20	2,9
99	SJ5Ü/9	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-gelb, klein, nicht zerlaufend, nicht durchs., ggg	P, haften fast alle am Glas, bew., gebändert, ¼ x 1-2 µm, leicht gekrümmt, einige Kokken (Sphäro. n.e.)	n.u.	2,9-20	2,9-12

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
100	EG1Ü/1	12/8	n.e.	-	+	+	n.u.	n.u.	*Pseudoalte-romonas ruthenica* KMM300 (96,9%)	beige, transp., ggg, flach	Kokken bis Stäbchen, 1 x 1-3 µm, teilweise mit hellen Stellen wie SJ6/2, unbew. n.e.	16/ k.H.	2,9-12	2,9
101	SJ1S/1	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	ggg, beige	wie SJ1S/9 aber Zellen im Mittel kürzer	3	12-30	12-20
102	SJ1S/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, ggg, beige	wie SJ1S/1	3	12-30	12-20
103	SJ1S/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, klein	wie SJ1S/1	3	12-30	12-20
104	SJ1S/4	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, Oberfl. glatt, Rand gesprenkelt auslaufend	Bew. Stäbchen, 0,5 x 2-3 µm, recht agil, haften mäßig am Glas	3	12-30	12-20
105	SJ1S/5	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	vgl. 116	Wie SJ1S/4, bew. Stäbchen	3	12-30	12-20
106	SJ1S/6	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	transparent, beige, ggg, rel. klein	P, bew. Stäbchen, zu Enden spitzer werdend, teilweise mit Ausbuchtungen, oder meliert, 1 x 2-5 µm, nicht sehr agil, haften ganz gut am Glas	3	12-30	12
107	SJ1S/7	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-beige, ggg	wie SJ1S/9, Stäbchen	3	12-30	12-20
108	SJ1S/8	20/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	*Halomonas salicampi* (98,4%)	gelb-beige, ggg, zäh	pleomorphe Stäbchen, bew., bis 1 µm dick, Sphäro. 1-2 µm ∅	1	2,9-20	2,9-20
109	SJ1S/9	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	vgl. 112, rel. groß	wie SR5Ü/3 aber Zellen ½ µm dick	n.u.	12-30	20
110	SJ1S/10	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	vgl. 112	Wie SJ1S/4, bew. Stäbchen	3	12-30	12-20
111	SJ1S/11	20/8	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	P, Kokken 1-4 µm, unbew., = Sphäro. n.e.	n.u.	12-20	20
112	SJ1S/12	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	P, unbew. Stäbchen, 1 x 2-4 µm, häufig 2 aneinander, einige Kokken (Sphäro. n.e.), haften gut am Glas	1	12-20	12
113	SJ1S/13	20/8	-	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige/weiß, rel. klein, ggg, leicht transparent	haften gut am Glas, Stäbchen, 1/3 x 2-5 µm, unbew. n.e., wenige Kokken 1-2 µm	3/Eub.	12-20	20
114	SJ1Ü/1	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	vgl. 116	P, bew. Stäbchen (0,5 x 1-2 µm) und unbew. Kokken 2 µm	3	12-20	12
115	SJ1Ü/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	ggg, gelb-beige, klein	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1-3 µm und einige Kokken, haften gut am Glas	3	12-30	12-20
116	SJ1Ü/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-beige, klein, ggg, zäh	wie SR5Ü/5 aber Zellen max. 1 µm dick	n.u.	12-30	12-20
117	SJ1Ü/4	20/8	-	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 106	wie SJ1S/13	n.u.	12-30	20
118	SJ1Ü/5	20/8	-	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	rel. groß, gelb-weiß, ggg	P, bew. Vibrios aber wenig gekrümmt, wenig agil, 0,5 x 1-3 µm	2/Eub.	2,9-20	2,9
119	SJ1Ü/6	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 113	P, bew, Kokken und Stäbchen	3	20-30	20
120	SJ1Ü/7	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, ggg	Wie SJ1Ü/2, bew. Stäbchen	3	12-20	20
121	SJ1Ü/8	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, gelblich, glasig, ggg	wie SR5Ü/3	3	12-30	12-20
122	SJ1Ü/9	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, Wollweiß, ggg	Wie SJ1Ü/2	3	12-30	12-20
123	SJ1Ü/10	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige/weiß/kl. ggg, Rand wellig transparent auslaufend	P, bew. Stäbchen, 0,5 x 2-5 µm, wenn aufgebläht dann größer, viele gekrümmt, sehr agil	n.u.	12-20	20
124	SJ1Ü/12	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	rel. klein, gelb-beige, ggg	P, Pleomorphie von Stäbchen n.e.	n.u.	12-30	12-20
125	SJ1Ü/13	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, ggg	wie SR5Ü/3, bew. Stäbchen	3	12-20	12-20
126	SJ2S/1	20/8	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	Spiegeleigelb, gg, Rand etwas wellig	P, unbew. Stäbchen, 1-1,5 x 2-4 µm, haften gut am Glas	9	12-30	12
127	SJ2S/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, gelb-beige, ggg	Kleiner als SJ2S/1 und etwas ungleichmäßiger dick	n.u.	12-30	20
128	SJ2S/3	20/8	n.u.	n.e.	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, rel. groß, ggg	P, unbew. n.e. Stäbchen, 1 x 2-3 µm, haften fast alle am Glas, sehr eckig	n.u.	12-20	12
129	SJ2S/4	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	klein, gelblich weiß, ggg	P, untersch. lange bew. Stäbchen, 0,75-1 x 1,5-5 µm, teilweise, mit Blasen oder aufgewölbt, teilweise sehr große Sphäro., 5,5 µm ∅, haften gut am Glas	3	12-30	12-20
130	SJ2S/5	20/8	n.u.	n.e.	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	Wollweiß, ggg	P, 1 x 2-15 µm unbew. Stäbchen, teilweise mit Aufblähungen	9	2,9-20	12
131	SJ3Ü/1	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, rel. groß, ggg	P, unbew. Stäbchen mit hellen Blasen (Gaseinschlüsse n.e.), 1 x 2-3 µm	n.u.	2,9-20	12
132	SJ4Ü/1	20/8	n.u.	n.e.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	vgl. 133	Wie SJ1Ü/2, bew. Stäbchen	3	12-30	12-20
133	SJ4Ü/2	20/8	n.u.	n.e.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	gelb-weiß, ggg	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1-2 µm	n.u.	12-30	12-20
134	SJ4Ü/3	20/8	-	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	ggg, beige-weiß, klein	0,5 x 1-2 µm Stäbchen und 1,2 µm Kokken	n.u.	12-20	12-20
135	EG2S/11	12/9,5	n.u.	+	-	-	+	-	n.u.	beige, ggg, zäh	von Kokken 1 µm bis Stäbchen 1 x 3 µm alle Längen als Übergänge vorhanden, Sphäro. auch dabei, Stäbchen unregelm. gefärbt, unbew. oder wenig agil, haften schlecht am Glas aber gut aneinander	1	2,9-20 (0,5-12)	12 (2,9)
136	EG2S/12	12/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	wie EG2S/11 aber Sphäro. größer 4 µm	1	12 (0,5-12)	12 (2,9)
137	EG2S/14	12/9,5	n.u.	+	-	-	+	-	*Halomonas pacifica* (99,2%)	beige-weiß, ggg, flach, transp., Rand leicht auslaufend ausgefranst, Bakterienflecken linksdrehend	wie EG2S/11 aber Stäbchen durchschnittl. Länger , bis 4 µm	1	2,9-20 (0,5-12)	12 (2,9)

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
138	SJ5Ü/10	12/9,5	-	+	-	+	+	+	Nichtident. Bak. K2-30-15 (99,6%)	wie 137, zäh	wie SJ5Ü/11, Pleomorphie	2/Eub.	2,9-12 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
139	SJ5Ü/11	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie EG2S/11 aber fast nur Kokken, vereinzelt sind Stäbchen dabei, variieren etwas in Größe, haften nicht am Glas	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
140	SJ5Ü/12	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	Kokken, kleiner als SJ5Ü/11, vielleicht auch eher kurze Stäbchen, 0,75 x 1 µm, unbew. n.e., haften nicht	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
141	SJ5S/14	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
142	SJ5S/16	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (2,9)	2,9-12 (2,9)
143	SJ5S/17	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
144	SJ6Ü/11	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9-12)
145	SJ6Ü/12	12/9,5	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	12 (-)	12 (-)
146	SJ6S/13	12/9,5	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, haften stark aneinander	n.u.	2,9-12 (2,9-12)	12 (2,9-12)
147	SJ6Ü/13	12/9,51 2/9,5	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 137	ähnlich SJ5Ü/12 und EG2S/11, einige längere Stäbchen dabei, sonst aber kurze Stäbchen	2	2,9-12 (2,9-12)	12 (2,9-12)
148	SJ6S/14	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (-)	2,9-12 (-)
149	SJ6S/15	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-12 (2,9)	12 (2,9)
150	SJ6S/16	12/9,5	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	Nichtident. Bak. K2-30-15 (94,5%)	wie 137	wie SJ5Ü/12, Pleomorphie	2	2,9-20 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
151	SJ6S/17	12/9,5	n.u.	+	+	+	+	+	n.u.	wie 137	wie EG2S/11 aber nur der Kokkenanteil, kaum Stäbchen, Pleomorphie	2	2,9-12 (2,9-12)	2,9-12 (2,9)
152	SJ6S/18	12/9,5	-	+	+	+	+	+	*Salinivibrio costicola* (99%)	wie 137	wie EG2S/11, Pleomorphie	13/ Eub.	2,9-20 (0,5-12)	2,9-12 (0,5)
153	SJ5S/13	12/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
154	SJ5S/15	12/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
155	SR3Ü/1	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	Halophiles Bak. 2HS38b (100%)	wie /3 aber weniger zerlaufend, etwas durchsichtiger	bew. Stäbchen, untersch. dick, 1/3-1 x 1,5-4 µm, Sphäro. 1,5 µm ∅, nicht rein n.e.	1	2,9-30	12
156	SR3Ü/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-gelb, durchsichtig, sehr kleine K., ggg	Kokken mit wenigen bew. Stäbchen, wie SJ2S/2, Kokken wahrscheinlich wieder Alterungsstadium	3	12-30	12
157	SR4Ü/2a	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, leicht transp., ggg	wie SR4Ü/4	3	12-30	12-20
158	SR4Ü/4	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg	wie SR4Ü/3 aber Zellen kürzer und 1/3-1/2 µm dick	3	12-30	12-20
159	SR4Ü/5	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg, zäh	wie SR5Ü/3, bew. Stäbchen	3	12-30	20
160	SR4Ü/6	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg, rel. klein	wie SR5Ü/3, bew. Stäbchen	n.u.	12-30	20
161	SR4Ü/8	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg, rel. klein	Wie SJ2S/2, unbew. Stäbchen	3	12-30	12-20
162	SR5Ü/1	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg	wie SR5Ü/5 haften stark aneinander, Pleomorphie also auch Kokken und untersch. lange Stäbchen	20/γ	2,9-20	2,9-12
163	SR5S/1	20/8	n.u.	+	-	-	n.u.	-	n.u.	weiß-rosa, nicht zerlaufend, undurchs., ggg	2 x P, große unförmige Kokken, die stark leuchten, wahrscheinlich stark aufgeblähte kurze Stäbchen, alle mit Blase	1	2,9-20	2,9-12
164	SR5Ü/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie /3	wie SR5Ü/3, bew.Stäbchen,1/3 µm dick	3	12-20	12
165	SR5Ü/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	2 versch.!!, a) flach zerlaufend b) aufgewölbt nicht zerlaufend , beide durchs. gelb	P, bew. Stäbchen, ¼ x 2-4 µm, haften gut am Glas, an den Enden eher spitzer zulaufend	3	12-20	12
166	SR5S/4	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg	P, bew. Stäbchen, Kokken (bew.n.e.), Pleomorphie	10	2,9-20	12-20
167	SR5Ü/5	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-altrosa, wie /7	P, bis zu 1,2 µm dicke Stäbchen, teilweise nicht gleichm. dick, bew., 2-3 µm lang, an den Enden sehr eckig, werden auch zu Sphäro. 2µm ∅	1	12-20	12
168	SR5Ü/7	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-altrosa, leicht zerlaufend, ggg	Wie SR5S/4	1	2,9-20	12
169	SR5Ü/10	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, ggg, wenig zerlaufend, etwas gelblich	Ähnlich SR5S/4	10	2,9-20	2,9-20
170	SR5Ü/11	20/8	-	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-altrosa, kaum zerlaufend, ggg	Ähnlich SR5S/4, hafte stark aneinander	1/Eub.	2,9-20	12-20
171	SR3Ü/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, sehr klein, etwas durchsichtig, ggg	Kokken wie SJ2S/2, bew., haften gut am Glas, wieder einige Stäbchen dabei, Kokken = Sphäro. n.e.	n.u.	12-30	20
172	SR4Ü/1a	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	Wollweiß, rel. klein, ggg, transp.	Wie SJ1Ü/2, bew. Stäbchen	3	12-20	12-20
173	SR4Ü/7	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß-beige, ggg, etwas zerlaufend, durchs.	P, bew. Stäbchen, 0,5 x 1-3 µm, von Kokken bis Stäbchen alle Längen vorhanden	n.u.	12-30	20
174	SR5Ü/8	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, undurchsichtig	Wie SJ2S/2, unbew. Stäbchen	n.u.	12-30	20
175	SJ3Ü/2	20/8	n.u.	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	wächst nicht	P, ¼ x 2-5 µm bew. Stäbchen, einige gekrümmt oder gewellt, vielgestaltig	n.u.	12-20	12
176	EG2S/13	12/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, kurze Stäbchen, fast wie Kokken 1 µm, einige sehr lange Stäbchen dabei, unbew. oder wenig agil	1	12 (12)	12 (12)

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
177	SR5S/3	20/8	n.u.	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Wie SR5S/4, haften gut am Glas, häufig 2 aneinander	n.u.	2,9-20	12
178	SR5Ü/4	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas variabilis* (100%)	beige-weiß, ggg	P, unbew. Stäbchen, wie SJ3Ü/1, haften gut am Glas	10/γ	2,9-20	2,9-20
179	SR5S/6	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Wie SR5Ü/4 aber häufiger Stäbchen mit Bänderung (Einschlüsse n.e. Scheiden n.e.), Zellen länger -4 µm	10	2,9-20	12
180	SR5S/7	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, Stäbchen, 0,5 x 1-4 µm, raue Oberfl., blähen auf zu Sphäro. 1-2 µm	n.u.	12-20	12
181	SR5S/9	20/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Wie SR5S/7 und bew.	n.u.	2,9-20	2,9
182	SR6S/1	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	P, Stäbchen, ungleichm. dick, 0,75 x 2-4 µm, bew. aber wenig agil, gleichm. gefärbt, Sphäro. 1,5 µm ∅	n.u.	2,9-20	12
183	SR6S/4	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Wie SJ3Ü/1	n.u.	12-20	12-20
184	SJ3/7	20/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Wie SJ2S/2, unbew. Stäbchen	3	12-30	20
185	SR5S/5	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Kokken 1 µm und Stäbchen 1 x 1,5-4 µm, häufig kurze Stäbchen in Ketten	n.u.	12-30	20
186	SR5Ü/6	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	bew. Stäbchen, untersch. geformt mit hellen Einschlüssen, 0,75 x 1-8 µm, Verdickungen, wenige Kokken wie SJ1/3-2	n.u.	2,9-20	2,9
187	SR5S/8	20/8	n.u.	-	+	+n.e.	n.u.	n.u.	n.u.	ggg, a) weiß b) beige	0,5 x 1,5 µm Stäbchen mit hellen Stellen wie SR5Ü/4 und SR5S/6	n.u.	2,9-20	2,9
188	SR6S/5	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	Wollweiß, rel. klein, ggg	¼ x 2µm Stäbchen, Kokken 1 µm, haften gut am Glas, bew.	3	12-20	12-20
189	SR5/1	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	orange, rel. klein, ggg	P, untersch. lange und dicke Stäbchen, haften alle am Glas, unbew.	9	12-30	20
190	SR5S/2	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, Sphäro. und helle leuchtende Tröpfchen 3 µm ∅,unbew. stark deformierte und verzweigte Stäbchen, 1,5 x ...µm	n.u.	2,9-20	2,9
191	SR4Ü/3	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	*Pseudomo-nas halophila* (100%)	wie 217-220	Kokken und Stäbchen	21	20-30	20
192	SR6S/3	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, ggg	wie SJ2/4 aber unbew. n.e.	n.u.	12-20	12
193	SR6S/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 217-220	P, unbew. Stäbchen, 0,75 x 2 µm	n.u.	20-30	20
194	EG1Ü/3	12/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	weiß, ggg	P, wie SR5/1 nur Stäbchen kürzer	n.u.	12-20	12
195	SJ1Ü/11	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	wollweiß glänzend klein, flach, unebener rauer Rand	¼ x 2 µm bew.n.e. Stäbchen, haften alle am Glas	n.u.	20	20
196	SJ1Ü/14	20/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas* sp. Esilfide1.N2P (95,3%)	beige-weiß, ggg, zäh	wie EG2S/11, Zellen aber nur ca. 0,5 µm dick	17	12-20 (-)	12
197	SJ1S/14	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11	1	12-20 (12-20)	12
198	SJ1Ü/15	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	Bak.`A310-UMH 31% pond`(99,2%)	beige-weiß, ggg	wie SJ6Ü/13	23/γ	12-20 (12-20)	12
199	SJ1S/15	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	P, große Sphäro. (bis zu 4 µm ∅), lange Stäbchen (bis zu 15 µm lang), sonst wie EG2S/11 also ungleichm. gefärbte Zellen, untersch. lang mit Übergangsformen	1	12-20 (12)	12
200	SJ1Ü/16	20/9,5	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	17	12-20 (-)	12 (-)
201	SR5Ü/12	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, ggg, zäh	wie SR6S/6	1	12-20 (-)	12 (-)
202	SR5Ü/13	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
203	SR6S/6	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	unbew. Stäbchen, 0,75 x 3->7µm, viele Sphäro. 1,25µm ∅	1	12-20 (12-20)	12 (12)
204	SR6S/7	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	P, wie EG2S/11 aber haupts. Stäbchen	1	12-20 (-)	12 (-)
205	SR6S/8	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
206	SR6S/9	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, zäh	ähnlich SJ5Ü/10	1	12-20 (-)	12 (-)
207	SR7S/1	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
208	SR7S/2	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
209	SR7S/3	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (12-20)	12 (20)
210	SR7S/4	20/9,5	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg, zäh	wie EG2S/11, Pleomorphie	1	12-20 (-)	12 (-)
211	EG1S/6	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, Rand rau auslaufend, gg.	P, Stäbchen 0,5 x bis zu 20µm, an den Enden spitzer, unbew. n.e., mäßig am Glas haftend, blähen auf zu Sphäro.	n.u.	2,9-12	2,9
212	SJ5Ü/14	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige, sehr feiner rauer Rand, gg,	wie SJ5S/18	14/γ	2,9-12	2,9
213	SJ5S/18	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	braun-beige, sonst wie 212	wie EG2S/11 aber Zellen größer 1 x 1,5-4µm, Sphäro. 1-3µm, Pleomorphie	n.u.	2,9-12	2,9
214	SJ5S/19	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	wie SJ6S/19, Zellen im Durchschn. etwas kürzer, aber wieder untersch. dick	14	0,5-12	2,9
215	SJ5S/20	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige, wie 212	wie EG2S/11, Zellen etwas größer, Pleomorphie	1	2,9-12	2,9
216	SJ6S/19	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, ungleichm. dicke Stäbchen, haften nicht am Glas, können in Ketten zusammenhängen, 0,75 x 1-5µm, längere vermutlich zusammengesetzt, eher unbew.	9	0,5-12	2,9-12

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
217	EG1S/10	12/8	n.u.	+	+	+	-	-	n.u.	beige-weiß, flach, transp., ggg, Salzkristalle	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-3µm, mäßig agil, gleichm. Oberfl., ungleiche Teilung n.e. (einige Zellen kürzer und dicker), haften mäßig am Glas	9	0,5-20	0,5-2,9
218	EG2S/15	12/8	n.u.	+	+	-	-	-	n.u.	wie 217, auslaufender Rand	Wie EG1S/10	9	0,5-20	0,5-2,9
219	EG2S/16	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 217	Bew. Stäbchen, wenig agil (taumeln), 1 x 2µm, häufig 2 aneinander (geknickt), haften nicht am Glas	11	0,5-20	0,5
220	EG2S/17	12/8	-	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas pacifica* (96%)	wie 217	Ähnlich EG2S/16 aber haften mäßig am Glas, Ketten länger, ab und zu mit Verdickung	11/ Eub.	0,5-20	0,5
221	EG2S/18	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, kurze Stäbchen, 0,75 x 1-2µm und Kokken 0,75µm, einige schalenförmig, , Stäbchen oft spitzendig, ab und zu lange Zellfäden, haften gar nicht am Glas	n.u.	12-20	12
222	EG2S/19	12/8	n.u.	+	+	+	+	-	n.u.	beige-weiß, ggg	wie EG1S/2	n.u.	0,5-20	2,9
223	SJ6Ü/25	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	*Halomonas salicampi* (98,5%)	beige-weiß, ggg, zäh	kurze Stäbchen, 0,75 x 1-2µm, Kokken, haften mäßig am Glas, nicht spitz wie EG2S/18, bew.	1	2,9-20	12
224	EG2S/26	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas ventosae* und *salina* (96,9%)	beige, ggg	wie SJ6Ü/25	25/γ	2,9-20	12
225	SJ6Ü/22	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	kurze Stäbchen, viele wie ovale Kokken, 0,5-1µm ∅, wenige Stäbchen länger, wenn bew. dann wenig agil,	1	12-20	12
226	EG1S/11	12/8	n.u.	+	+	+	-	-	n.u.	beige-weiß, ggg	wie EG1S/2	9	0,5-20	0,5-12
227	EG1S/7	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 217-220	wie EG2S/16	n.u.	0,5-20	0,5-12
228	SJ6Ü/24-2	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, gg, leicht unregelm. abgesetzter Rand	P, ähnlich SJ6/2 aber Zelloberfl. der langen Fäden ungleichmäßiger, lange Fäden scheinbar nicht zusammengesetzt und immer noch bew.	5/γ	2,9-12	12
229	SJ6Ü/16	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, wie SJ6Ü/24-2 aber mehr mittellange Fäden und meliert	5	2,9-12	2,9
230	SJ6Ü/26	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	orange-beige, klein, transp. ggg, zäh	blässliche kleine Stäbchen, 0,5 x 2-5µm, teilweise "gestreift", sehr agil	8	2,9-12	12
231	EG2S/22	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 230, zäh	P, Stäbchen, ausgefüllt oder meliert, 0,5 x 2µm, bew.n.e., haften gut am Glas	17	12	12
232	EG2S/23	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 230, Salzkristalle evt. als Einschlüsse	P, Standard-Stäbchen, 1/3 x bis zu 20µm, durchschn. 4µm lang, wenn 2 zusammen dann häufig geknickt	n.u.	0,5-20	0,5
233	EG1S/8	12/8	n.u.	+	+	+	-	-	n.u.	wie 230	P, sehr vielgestaltig wie EG1S/2 aber Zellen kleiner	9	0,5-20	12
234	EG1S/9	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	*Halomonas pacifica* (96%)	beige, leicht orange, transp., ggg, mittig erhoben, zäh	P, Stäbchen, meliert wie EG2S/22, sehr klein und blass, 1/3 x 1,5µm, unbew. n.e., haften gut am Glas	17/ Eub.	2,9-12	2,9
235	EG2S/25	12/8	+	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-orange, ggg	ähnlich EG1S/1	9 n.e./ Eub.	2,9-20	12
236	SJ6Ü/27	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-orange, transp., wie 230	wie SJ6S/1, Vibrio	13	0,5-20	12
237	EG2S/20	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., rel. klein, ggg	P, Pleomorphie, Zellen aber recht klein, 0,75 x 1µm	9	0,5-20	2,9
238	SJ6Ü/18	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	Unident. Gamma-Proteo-bakterium (99,6%)	wie 237, zäh	wie SJ6S/1 aber Vibrios etwas dünner 1/4µm, echte Flitzer, haften gut am Glas	6/γ	2,9-12	2,9
239	SJ5S/21	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	*Idiomarina loihiensis* (97,4%)	beige, transp., ggg	kurze untersch. lange Stäbchen und wenige Spirillen (Vibrio n.e.) 1/4-0,5 x 1-2µm, haften fast alle am Glas, Kokken auch dabei in recht großer Zahl	22/ k.H.	2,9-20	2,9
240	SJ6Ü/19	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg	ähnlich SJ5S/21 alle bew., Stäbchen oder Spirillen (Vibrio n.e.)	n.u.	2,9-12	2,9
241	SJ6Ü/20	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, transp., ggg, zäh	Kokken und Kurzstäbchen, 0,75 x 0,75-1,25µm, bew. aber nur langsames Schlagen	1	2,9-20	12
242	SJ6Ü/17	12/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	P, Pleomorphie wie bei SJ6Ü/16, 1µm dick,	1	2,9-20	12
243	SJ6Ü/23	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 234	wie SJ5S/21, Stäbchen oder Spirillen (Vibrio n.e.)	6	2,9-20	2,9
244	EG2S/29	12/8	n.u.	+	+	+	-	-	n.u.	beige, transp., unebener Rand, Kranz weiß/strukturiert, gg	1 x 1-15µm, Pleomorphie, bilden Ketten und Haufen	9	2,9-20	2,9-12
245	SJ5Ü/17	12/8	-	-	+	+	n.u.	n.u.	Nichtkult. Bak. 3-3 (98,5%)	beige-orange, transp., ggg, zäh	bew. Stäbchen, nicht sehr agil, 0,75 x 2-3µm, haften gut am Glas, häufig mit hellen Bläschen	8/Eub.	2,9-12	2,9-12

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
246	SJ6Ü/24-1	12/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	*Halomonas variabilis* SWO4 (98,5%)	beige-weiß, ggg, leicht transp., leicht gelblich	Pleomorphie, 1µm x ..., viele sehr lange Zellen, und wieder sehr kurze Stäbchen (wie SJ6Ü/24-2)	18/γ	2,9-12	2,9
247	EG2S/28	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, leicht transp., ggg	Pleomorphie, keine sehr langen Zellen, etwas kleiner als SJ6Ü/24-1	9	0,5-20	2,9
248	SJ5Ü/16	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 246	Pleomorphie wie SJ6Ü/24	n.u.	2,9-12	2,9
249	SJ6Ü/21	12/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	transp., beige-weiß, ggg, rel. klein	wie SJ5S/21, Stäbchen oder Spirillen (Vibrio n.e.)	6	2,9-20	12
250	EG2S/27	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	transp., beige-weiß, ggg, rel. klein	unbew. (n.e.) Stäbchen, 0,5 x 1-5µm, teilweise meliert oder mit Blasen, haften gut am Glas	19/γ	2,9-20	2,9
251	SJ5Ü/15	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	leicht transp., beige-orange, ggg, zäh	wie EG2S/27 aber Zellen größer (0,75µm breit), manchmal deformiert oder verzweigt	8	2,9-20	2,9
252	SJ5Ü/18	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 249	Kokken, 0,75µm, Stäbchen, ¼ x 1-1,5µm, haften gut am Glas, bew.	6	2,9-20	2,9
253	SJ6Ü/15	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	Wollweiß, rel. groß, jung transp., ggg	Diplokokken, 1µm, unbew., haften alle am Glas	n.u.	0,5-12	0,5-2,9
254	SJ5S/22	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 246, zäh	P, Kokken und Kurzstäbchen, 0,75 x 0,75-1µm, und größere runde Gebilde(Kokken,Salze oder Öl n.e.), unbew. n.e.	1	12-20	12
255	SJ6Ü/14	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 246, zäh	wie SJ5S/22 aber ohne leuchtende Gebilde	n.u.	2,9-20	12
256	EG2S/21	12/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, leicht transp., ggg, zäh	P, wie SJ6Ü/14 , manche der Stäbchen meliert, (älter n.e.)	1	12-20	12
257	SJ5S/23	12/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige kl. Kolo. transparent ggg	P, Vibrios, Stäbchen, Kurzstäbchen, Kokken, Kurzstäbchen und Kokken kleiner als sonst, 0,5 x 0,5-0,75µm, Vibrio bew., die anderen n.e.	18	2,9-20	2,9
258	SJ1Ü/17	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	Bew. Stäbchen, manchmal ungleichm. dick, 1 x 2-3µm, haften kaum am Glas	n.u.	2,9-20	2,9
259	SJ1S/16	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-orange, ggg	P, Kokken, häufig 2 oder mehr aneinander, 1µm	n.u.	2,9-20	2,9
260	SJ1S/17	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Bew. Stäbchen 0,5 x 2-3µm) und Kokken (1µm) mit Übergangsstadien	n.u.	12-30	12-20
261	SJ2S/6	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	12-20	12
262	SJ2S/7	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	2,9-20	12
263	SJ2S/8	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	12-20	12
264	SJ3Ü/3	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	12-20	12-20
265	SJ3S/1	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, 0,5 x 2-4µm bew. Stäbchen aber wenig agil	n.u.	2,9-20	2,9
266	SJ3S/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	rel. klein, beige-weiß, transp., ggg	P, bew. Stäbchen, ¼ x 3-4µm, Kokken auch dabei, haften mäßig am Glas	n.u.	12-30	12-20
267	SJ3S/4	20/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rel. klein, beige-weiß, ggg	Stäbchen, haften nicht am Glas, 0,5 x 2-5µm, manchmal ungleichm. dick und helle Enden (Gaseinschlüsse)	n.u.	2,9-20	12
268	SJ4Ü/2	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 266	P, etwas dicker als SJ3S/3 und weniger Kokken, wenn dann voll ausgefüllt	n.u.	12-30	12-20
269	SJ4Ü/3	20/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie 267	P, sehr agile Stäbchen und Kokken, (auch bew.) sonst wie SJ2S/2	n.u.	12-30	12-20
270	SR5S/11	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg		n.u.	12-20	12
271	SR6S/10	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie 267	Wie SJ2/4 aber etwas unregelmäßiger und häufig zusammenhaftend, bilden kleine Häufchen, stärkere Längenvariabilität	n.u.	12-20	12
272	SR6S/11	20/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, ggg	Wie SJ2S/2	n.u.	12-20	12
273	SJ3S/2	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, rel. klein	n.u.	n.u.	2,9-30	2,9
274	SJ3Ü/4	20/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	transp., flach, ungleichm. Rand, jung evt. wie 217-220	n.u.	n.u.	12-20	12
275	SR5S/10	20/8	n.u.	+n.e.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Wächst nicht	Wächst nicht
276	SR3Ü/4	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, wie SR7S/8	muffig, aromat., bew. Stäbchen, wie SJ4S/15 aber kleiner, durchschn. 2µm lang	n.u.	12-30	12-20
278	SJ4S/15	30/8	-	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas rau, ausgefranster Rand	aromat., bew. nicht sehr agile Stäbchen, sehr untersch. dick, keulenförmig, haften schlecht am Glas, durchschn. 3µm lang	3/Eub.	12-30	12-20
279	SR7S/8	30/8	n.u.	n.e.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ1S/19	aromat., bew. Stäbchen, 2-6µm lang, haften gut am Glas	n.u.	12-20	12-20
280	SR7S/7-1	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-orange, Ränder verdickt, ggg	muffig, altölig, Kokken auf Häufchen, 2-viele, Diplokokken n.e., 2µm ∅	n.u.	2,9-30	2,9
281	SJ4S/12	30/8	n.u.	-n.e.	-n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., Lsgmittel-ähnlich, bew. Stäbchen, 2-5µm lang, haften nicht am Glas	3	12-30	12
282	SJ4S/16	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas dunkler als /15, leicht matt, ggg	aromat., bew. Stäbchen, haften gut am Glas, sehr agil, 2-4µm lang	3	12-30	12
283	SR4S/10	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, Rand etwas matt, ggg	aromat., bew. Stäbchen, 3-4µm lang, recht agil und flexibel	3	12-20	12-20
284	SR4S/6	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., unbew., Stäbchen, ½ x 2-4µm, etwas ungleichm. dick	3	12-20	12-20
285	SJ4S/14	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bitter, stark pleomorph, bew., durchschn. µm lang	3	12-20	12-20
286	SR4S/5	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	orange-rot, milchig, ggg, leicht meliert	aromat, süßl. stinkig, Bew. n.e.Stäbchen, 1 x 1-2µm, haften gut am Glas, Reinkultur oder untersch. Morphotypen n.e.	Arch.	20-30	20

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
287	SJ2/6	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ1S/19 aber mit Rand	leicht aromat., dünne Fäden, 10-20µm lang, bew., blähen mit zunehmendem Alter auf	n.u.	12-30	20
288	SR4S/13	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, Rand etwas matt	aromat., altölig, weniger flexibel als SR4S/12, bew. (schraubend) Stäbchen, haften nicht so gut am Glas, 2-8µm lang	3	12-30	20
289	SR4S/12	30/8	-	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, Rand etwas matt	aromat., süßlich, bew. Stäbchen, rel. weich flexibel, haften gut am Glas, ½ x 3-5µm	21/ Eub.	12-30	20
290	SJ4S/13	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., altölig, bew. Stäbchen, recht klein und dünn, max. 5µm lang	3	12-30	12-20
291	SR3S/2	30/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	aromat., etwas wie Altöl, Kokken, 1µm ∅, nicht ganz rund (Sphäro. n.e.), Verunreinigung oder sind Kokken Sphäro. n.e., da Stäbchen 2µm lang, 1-1/2µm breit und platt!, bew.	Arch.	20-30	20-30
292	SJ3/6	30/8	n.u.	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bew. Stäbchen, dicker als SR4Ü/1, weniger agil, haften gut am Glas, weniger gleichm. dick, 3-10µm lang	3	12-30	20
293	SR4Ü/1b	30/8	n.u.	+	-n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, glatte Oberfläche, raue Ränder	aromat., bew. Stäbchen, 4-10µm lang, rel. dünn, rel. steif, aber noch recht agil, sehr gleichm. dick	3	12-30	12-20
294	SR4/3	30/8	n.u.	+	-n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bew. Stäbchen, sehr agil, weich flexibel, durchschn. 3µm lang	n.u.	12-30	20
295	SR3/2-1	30/8	-	+	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., wie SJ4S/3-2, an den Enden dunkler, mehr Späro.	24/ Eub.	12-30	12-20
296	SJ4S/3-2	30/8	n.u.	+	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, sehr matte raue Oberfl., glatter Rand	aromat., bew. Stäbchen, rel. viele aufgebläht und mit Gaseinschlüssen, 3-5µm lang	3	12-30	12-20
297	SR1S/2-1	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., bew. Stäbchen, ½ x 2µm, wie SR3/1-2 nur alle ungefähr gleichlang	Arch.	20-30	20
298	SJ4S/2	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, raue Oberfl., rauer Rand	n.u.	3	12-30	12
299	SJ4S/3	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, raue Oberfl., glatter Rand	aromat., bew. Stäbchen, wenig agil, ½-1 x 2-5µm, gestreift	3	12-30	12-20
300	SR3S/8	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SR3S/5-1 bzw. SR3S/5-2	aromat., bew. Stäbchen, dünner als SR4/5, sehr flexibel, 2-8µm lang, einige meliert und mit Gaseinschlüssen	3	12-30	12-20
301	SR4/5	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	sehr schwach aromat., bew. Stäbchen, 0,5 x 3-6µm, sehr flexibel, blähen mit dem Alter auf	3	12-30	20
302	BFS/2	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, klar	aromat., pleomorph, bew., 1µm x 1-5µm	Arch.	12-30	20
303	SJ4S/1-3	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, raue Oberfl., glatter Rand	aromat., bew. Stäbchen, weniger agil als SR3Ü/1-2, 3-4µm lang	3	12-30	20
304	SR3Ü/1-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., sehr agil, bew. Stäbchen, 2-3µm lang	Arch.	20-30	20
305	SR1S/1-1	30/8	n.u.	+	+n.e.	+n.e.	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bew., Stäbchen, wenig agil, 2-3µm lang	24	12-30	20
306	BPS/2-3	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	süßl., aromat., Kokken, teilweise als Diplokokken, bew.n.e., etwas kleiner als BFS/4	Arch.	20-30	20
307	SR4Ü/2b	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bew. Stäbchen, 2-5µm lang, gestreift (Gaseinschlüsse n.e.)	3	12-30	20
308	BFS/4	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, milchig, ggg	aromat., eckige Kokken (kurze Stäbchen n.e.), 1µm ∅, teilweise als Diplokokken (Teilung n.e.), bew. n.e.	Arch.	20-30	20-30
309	SR3/1-2	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	wie SR4/4	aromat., gerade steife Stäbchen, bew., wenig agil, an den Enden verdickt n.e., 0,75 x 2-9µm, scheinbar in der Mitte abgeflacht	Arch.	20-30	20-30
310	SR3S/7	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ4S/9, aber etwas glatter	aromat., bew. Stäbchen, leicht gewunden, 2-10µm lang, nicht sehr agil	24	12-20	20
311	SR1S/2-2	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., wie SR3Ü/1-1	n.u.	20-30	20-30
312	SR3Ü/1-1	30/8		-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat. bew. Stäbchen, aus kürzeren zusammegesetzt n.e., 2µm lang	Arch.	20-30	20
313	SR1S/6	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	sehr wenig aromat., bew. Stäbchen, 2-3µm lang	n.u.	12-30	20
314	SR1S/1-2	30/8	n.u.	+	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	sehr wenig aromat., bew. Stäbchen, 3µm lang	n.u.	12-30	20
315	SR2S/3	30/8	n.u.	+	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., bew. Stäbchen, 3-10µm lang, nicht rein n.e. (Kokken oder kurze Stäbchen n.e.)	n.u.	12-30	12-20
316	SR4S/3-2	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SR7S/8	stark aromat., wie SR1S/1-3	n.u.	12-30	20
317	SJ4S/3-1	30/8	n.u.	+	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, sehr matte raue Oberfl., glatter Rand	aromat., bew. Stäbchen, sehr flexibel, agiler als SR1S/1-3, in Ruhe auch noch etwas gewellt, 3-10µm lang, so dünn wie SR1S/1-4	n.u.	12-30	12
318	SR4S/3-1	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SR7S/8	aromat., bew. Stäbchen, rel. langsam, nur kürzere sind schneller, wie SR1S/1-3	n.u.	12-30	20
319	SR1S/1-4	30/8	n.u.	+	-n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, wie SR7S/8	aromat., bew. Stäbchen, etwas schneller drehend, steifer und dünner als -3, 3-5µm lang	n.u.	12-30	12-20
320	BPS/2-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	stinkt, , undefinierbare Form, Einzelzellen oder Zellaggregate, -Ketten n.e.	n.u.	20-30	20
321	SJ4S/8	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, raue Oberfl. und Rand	aromat., bew. Stäbchen, ähnlich SR1S/1-3, 2-10µm lang	n.u.	12-30	12-20
322	SR1S/1-3	30/8	n.u.	+	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, etwas dunkler als /1-2	schwach aromat., Stäbchen, rel. langsame Drehbew., in Ruhe fast gerade, < 1 x 5µm	n.u.	12-30	20
323	SR1S/5-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., bew. Stäbchen, ½ x 3-4µm, gleichm. dick	n.u.	30	30

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
324	SR3/1-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas dunkler als SR4/5	scharf aromat., bew. Stäbchen, ½ x 2µm, wie kleine Würmer, sehr agil, gleichm. dick, haften schlecht am Glas	n.u.	12-30	12
325	SR4/1	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, glatte Oberfl., glatter Rand	aromat., Pleomorph, bew. Stäbchen sehr steif, bis 15µm lang	Arch.	20-30	30
326	SR4/6	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	P, aromat., herb, bew. Stäbchen, ausgebeult, sehr formenreich, bis 15µm lang	n.u.	12-30	30
327	SR4/4	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., ekelig süß, haften schlecht am Glas, sehr abgeflacht, Sphäro.?	Arch.	20-30	20-30
328	SR3S/5-2	30/8	n.u.	+	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas dunkler als SR1S/4	aromat., bew. Stäbchen, haften schlecht am Glas, ½ x 3µm, recht agil, weich flexibel	n.u.	12-30	20
329	SR3S/5-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas dunkler als SR1S/4	aromat.., bew. Stäbchen, wenig agil, haften gut am Glas, 2-5µm lang	n.u.	12-30	20
330	SR2S/2-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, aromat., bew. Stäbchen, 4-8µm lang, wenig agil, Sphäro. 2µm ∅	n.u.	12-20	20
331	BPS/2-4	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	P, süßl. beißend aromat., sehr kurze unbew. Stäbchen, sehr ungleichm. geformt, 1 x 1-2µm	Arch.	12-30	20
332	SR2S/2-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat. muffig, bew. Stäbchen, haften weniger gut am Glas, länger und ungleichm. gefärbt als SR3S/5-1	n.u.	12-30	20
333	SR7S/9-1	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, Mitte aufgewölbt, Ränder rissig	P, aromat., unbew. Stäbchen, 1 x 2-5µm, haften nicht am Glas, häufig 2 und mehr aneinander, dann abgeknickt	n.u.	12-30	20
334	SR1S/1-5	30/8	n.u.	+	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, wie SR7S/8	aromat., bew. Stäbchen wie SR2S/2-2 aber häufiger an den Enden dunkler, recht agil, Aufblähungen	n.u.	12-30	12-20
335	SR2S/5	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, teils milchig, teils klar		Arch.	20-30	30
336	SJ1S/18	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, milchig, ggg	aromat.. muffig, wie Schwimmbad, Kokken unregelm. rund, unbew., einige wie Erythrozyten, häufig "eckig-rund" , mit Beulen auf Oberfl.	Arch.	20-30	20
337	SJ4S/11	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	beißend aromat., unbew. (n.e.) Stäbchen (3-4µm lang), die scheinbar mit zunehmendem Alter deformieren zu Sphäro.	n.u.	12-30	12-20
338	SR1S/3-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	P, etwas wie Bierhefe, bew. Stäbchen, 3µm lang, abgeflacht?	Arch.	12-30	20
339	SR3S/4	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg, klar!	Muffig aromat., bew. Stäbchen, wie SJ4S/11	Arch.	20-30	20
340	SR7S/5-1	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, gg, Mitte sieht eingetrocknet aus	Muffig aromat., wie SR7S/9, bew., etwas kürzere Stäbchen, viele nur 2µm lang	n.u.	12-30	12
341	BPS/1-2	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, milchig, ggg	Aromat., wie Lsgmittel, Kokken/kurze Stäbchen, 1µm groß, haften gut am Glas, und sehr kleine Kokken (1/4µm), nicht rein? oder Zelltrümmer	n.u.	12-30	20
342	BPS/2-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	P, bew. eher Kokken als Stäbchen, sieht aus wie Zellschrottplatz, sehr unregelm. geformt, eckig mit kantigen Auswüchsen, durchschn. 2µm groß	n.u.	12-30	12-20
343	SR3S/9	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	Aromat. herb, wie SJ4S/11	n.u.	20-30	20
344	SR1S/4	30/8	n.u.	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, aromat., bew. Stäbchen, sehr agil, durchschn. 10µm lang, sehr dünn, manchmal an den Enden verdickt	n.u.	12-30	12-20
345	SJ4S/10	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, raue Oberfläche, matt, ganzrandig	P, aromat., bew. Stäbchen, teilweise ungleichm. dick, viel weniger agil als SR7S/7, sonst ähnlich	n.u.	12-30	12-20
346	SR7S/7-2	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, aromat., sehr kleine dünne bew. Stäbchen, recht agil, in Ruhe etwas wellig, ¼ x 2-5µm	n.u.	12-30	12-20
347	SR4/2	30/8	n.u.	+	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ4S/1-1 aber glattere Oberfläche	Aromat., bew. Stäbchen, wenig agil, Größe wie SR7S/7, häufig Verdickungen in Stäbchen, schrumpelig	n.u.	12-30	12-20
348	SR4S/7	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, aromat., haften gut am Glas, ähnlich SJ4S/10 und SR7S/7 aber scheinbar unbew. und gerade, manchmal an den Enden abgeknickt	n.u.	12-30	12-20
349	SR4S/9	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, Rand etwas matt	Aromat., bew. Stäbchen, einige ungleichm. dick, wie SR4/2	n.u.	12-30	20
350	SR7S/6-1	30/8	n.u.	-	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SR7S/5-1 bzw. SR7S/5-2	P, käsig aromat., Kokken in Haufen, 1,5µm ∅, unbew., nicht ganz rund aber glatte Oberfl.	n.u.	2,9-30	12
351	SR3Ü/1-3	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	süßl. Vergoren, wie SR1S/3-2	n.u.	12-30	20
352	SR4S/8	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, etwas matt	wenig aromat., bew. Stäbchen, sehr agil, gleichm. dick, ½ x 2-5µm, eher steif rotierend, haften nicht am Glas	n.u.	12-30	20
353	SR3S/6	30/8	n.u.	-	-	+n.e.	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Aromat., wie SR4/2	n.u.	12-30	12-20
354	SR7S/6-2	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg, Rand etwas matt	Aromat., wie SR4S/9 nur Stäbchen etwas kürzer, viele an Enden Gaseinschlüsse, bis 4µm lang	n.u.	12-30	12-20
355	SR2S/4	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, etwas milchig	P, aromat., wie BPS/2-4, einige keulenförmig	n.u.	30	30
356	BPS/1-1	30/8	n.u.	-	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, milchig, ggg	Aromat., wie Lsgmittel, wie SR2S/6	n.u.	12-30	20
357	SJ4S/6	30/8	n.u.	+	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ4S/1-1aber weniger deutlich, klarerer Ring am Rand	Aromat., bew. Stäbchen, 5-15µm lang, ab und zu an einem Ende leicht verdickt	n.u.	12-30	20
358	SJ4S/1-2	30/8	n.u.	+n.e.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ4S/1-1, etwas dunkler, etwas abgesetzter Rand	Aromat., wie SJ4S/11	n.u.	12-30	20
359	SR3/5	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, klar, ggg	P, aromat., wie BPS/2-1, bew.	n.u.	20	20

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	Gram	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Lipase	Teilsequenz.	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)	ARDRA	NaCl-Tolz. (bei pH 8)	NaCl-Opt. (bei pH 8)
360	SR7S/5-2	30/8	-	+	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige, gg, Mitte sieht eingetrocknet aus	süßl. Muffig, sehr kurze dicke Stäbchen, unbew., haften aneinander aber nicht am Glas, ungleichm. dick, 1 x 2 max. 3µm	n.u.	12-30	20
361	SJ4S/1-1	30/8	n.u.	+	-n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, etwas raue Oberfl., daher matt, ganzrandig	Aromat., wie SR7S/6-2	n.u.	12-30	12-20
362	SJ4S/9	30/8	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	wie SJ4S/1-1 nur etwas gräulicher	Aromat., recht agile bew. Stäbchen, 2-10µm lang	n.u.	12-30	12-20
363	SR2S/6	30/8	n.u.	-	+n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg, etwas milchig	Aromat. süßl., wie SJ1S/18	Arch.	20-30	30
364	SR1S/5-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat.. mild süßl., wie SR1S/3-2	Arch.	20-30	20-30
365	SR1S/3-1	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., wie SR1S/3-2	Arch.	20-30	20-30
366	SR1S/2-3	30/8	n.u.	-	+n.e.	+			n.u.	kräftig rot, ggg	aromat., mild süßl., wie SR1S/3-2	Arch.	20-30	20-30
367	SJ1S/20	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, nicht zerlaufend	P, aromat., lange dünne bew. Stäbchen, sehr wellig und nicht immer gleich dick, haften gut am Glas	n.u.	12-30	20
368	BFS/1-2	30/8	n.u.	-	+n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot milchig	aromat. süßl., bew., wie Erythrozyten oder Dreiecke, schalenförmig, 2µm ∅, auch wieder wie BPS/2-1	n.u.	20-30	30
369	SJ1S/19	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, sehr dünn auslaufend, ohne wirklichen Rand	2 x P, aromat., lange Fäden, bew., ¼ x 20µm, Spirillen n.e.	n.u.	12-30	20
370	SR3/4	30/8	n.u.	n.e.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	2 x P, Kokkenähnlich aber nicht rund, bew. aber wenig agil, 1-1,5µm ∅	n.u.	30	30
371	SR4S/4	30/8	n.u.	n.e.	+	-	n.u.	n.u.	n.u.	nicht rein zu bekommen, rot und weiß (Gasvakuolen?)	P, aromat., bew. Stäbchen mit einigen Unregelmäßigkeiten (Verdickungen, Melierungen), haften kaum am Glas, ½ x 2->20µm, selten Sphäro.	n.u.	n.u.	n.u.
372	SJ4S/7-3	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	alt, aromat., wie SJ4S/7-7b	n.u.	12-20	12
373	SJ4S/7-8c	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	aromat., wie SJ4S/7-7b	n.u.	n.u.	n.u.
374	SJ4S/7-7b	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	P, bew. Stäbchen, 1/3 x 4-5µm, die zu Sphäro. deformierten Übergänge in allen Varianten vorhanden, haften nur mäßig am Glas	n.u.	n.u.	n.u.
375	SJ4S/7-7a	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	aromat., wie SJ4S/7-7b	n.u.	12-20	12
376	SJ4S/7-8b	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	P, Diesel-aromat., bew. Stäbchen, alle recht gleichm. dick, mit sehr hellen Stellen, sieht aus wie Färbung der Zellwand und nicht wie Einschlüsse	n.u.	20-30	20
378	SJ4S/7-8a	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	Diesel-aromat., wie SJ4S/7-7b	n.u.	30	20
379	SJ4S/7-5a	30/8	n.u.	n.e.	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	rot-rosa in transp. rötlichen Ausläufern	aromat., bew. Stäbchen, wenig agil, keulenförmig gerade oder anders eingedellt, haften nicht am Glas, 0,5-1 x 2-5µm, rotieren um Längsachse	n.u.	12-30	30
380	SR7/S10	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	30	20
381	SJ4S/7-4	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	n.u.	n.u.	12-30	30
382	SR4S/2-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	30	20
383	SJ4S/4a	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wie 379, noch stärker rosa Struktur in fast transp. Umfeld	n.u.	n.u.	30	30
384	SJ4S/4b	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	20-30	30
385	BFS/1-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	30	20
386	BFS/1-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	20-30	30
387=370	SR3/4	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	2 x P, Kokkenähnlich aber nicht rund, bew. aber wenig agil, 1-1,5µm ∅	n.u.	n.u.	n.u.
388	SJ1S/21	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Beige-weiß, ggg	n.u.	n.u.	20-30	20-30
389	SJ4S/7-6	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot-orange, ggg	n.u.	n.u.	30	30
390	SJ4S/7-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
391	SJ4Ü/1-2	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
392	SJ4S/7-5b	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
393	SJ4S/2-1	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
394	SJ4S/7-1	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
395	SJ4Ü/1-1	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
396	SJ4S/2-2	30/8	n.u.	-	n.e.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

n.u. = nicht untersucht
n.e. = nicht eindeutig
P = Photo
k.H. = keine Hybridisierung möglich

Tab. B: La Baule-Isolate der Stammsammlung mit laufender Nummer, ihre Isolationsbedingungen, extrazelluläre Enzym-Aktivitäten, in einigen Fällen das Gram-Verhalten sowie ihre kolonie- und zellmorphologischen Merkmale.

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
400	B2/1	12/9,5	-	++	-	+	-	Ähnlich B2/13, zerläuft aber nicht so stark	Süßlich aromat., Stäbchen, 1-1,5 x 2->10µm, bew. aber kaum agil, teilweise sehr aufgebläht, Sphäroblasten als Endstadium
401	B2/2	12/9,5	++	++	+++	+++	-	Wie B2/14	Aromat., Vibrio wie B3/8-2
402	B2/3	12/9,5	+	++	+++	+++	+++	Ähnlich B4/3-1 aber gelblicher, zerlaufen etwas weniger, ggg	Käsig, muffig Vibrio wie B3/8-2
403	B2/4	12/9,5	-	+	-	+	-	Ähnlich B8/10	Käsig, aromat., unbew. Stäbchen, mit Sphäroblasten, 0,75 x 1-4µm
404	B2/5	12/9,5	-	++	-	-	-	Helles orange, undurchs., zerlaufen kaum, ggg	Süßlich muffig, Kokken wie B8/16
405	B2/6	12/9,5	-	+	-	-	-	Orange, undurchs., ggg, zerlaufen kaum	Wie B2/5
406	B2/7	12/9,5	-	-	-	+	-	Wie B2/1	Wenig süßlich aromat., bew. Stäbchen, sehr große Kreisbew., 1 x 1,5-3µm, scheinen sich mit dem Alter zu deformieren, Beulen, Aufquellungen, sonst sehr regelmäßig geformt
407	B2/8	12/9,5	-	+++	-	+	-	Orange, ggg, klein, etwas zerlaufend, undurchs.	Streng, herb, Kokken wie B8/16 aber ungeordneter
408	B2/9	12/9,5	-	+	-	+	-	Beige, undurchs., klein aber zerlaufend, ggg	Süßlich muffig, bew. Stäbchen, wenig agil, 0,75 x 1-4µm, größere (=ältere?) häufig unregelmäßig deformiert
409	B2/10	12/8	-	+++	-	-	-	Dunkles orange, klein, zerlaufen nur wenig, undurchs., ggg	Herb, Kokken wie B8/16
410	B2/11	12/8	-	+++	-	-	-	Wie B2/6	Malzig herb, Kokken wie B8/16
411	B2/12	12/8	-	-	-	+	-	Wie B12/17	Wenig süßlich muffig, wie B2/7 haften nicht am Glas
412	B2/13	12/8	-	-	-	-	-	Beige-weiß-beige (konzentrische Ringe), stark zerlaufend, ggg, undurchs., wirkt flüssig	Kaum Geruch, Stäbchen wie B2/7 aber nicht oder nicht mehr bew.
413	B2/14	12/8	+	++	++	+++	-	Beige, durchs., ggg, etwas zerlaufend	Muffig aromat., Vibrios mit sehr vielen Sphäroblasten
414	B2/15	12/8	+	++	-	++	+++	Beige-gelb, kaum durchs., gg, etwas raue Oberfl., etwas zerlaufend	Süßlich käsig, wie B2/14
415	B2/16	12/8	-	+	-	-	-	Rosa-weiß, zerlaufen kaum, ggg, undurchs.	Kaum aromat., wie B2/9 aber größer, 1-1,5 x 1,5->5µm, unbew. (wie B4/21)
416	B2/17	12/8	+	++	+	+++	-	Beige, zerlaufen recht gut, flach, ggg, etwas durchs.	Aromat. (anders als die anderen), Vibrio, ¼ x 2-3µm, wenig agil
417	B3/1-1	12/9,5	-	++	-	-	-	Orange wie B2/6	Käsig herb, wie B8/16
418	B3/1-2	12/9,5	-	++	+	+++	++	Wie B12/23-1	Herb, aromat., Vibrio 1 x 2µm, wenige länger, sehr agil, keine Sphäroblasten, wie B4/3-2
419	B3/2	12/9,5	-	++	++	++	++	Weiß-beige, etwas durchs., rel. groß, etwas zerlaufend, ggg	Kaum süßlich aromat., große Spirillen oder Vibrionen, 1 x 2->5µm, und Sphäroblasten
420	B3/3	12/9,5	+	++	++	++	++	Weiß, rel. groß, wenig durchs., ggg	Aromat. muffig, wie B3/4-2 aber noch bew., weniger Sphäro., wie B3/8-2
421	B3/4-2	12/9,5	+	++	-	++	++	Weiß, Rand klar, Zentrum milchig, distinkte Randbegrenzung, ggg	Süßlich aromat., Vibrio, fast nur noch Sphäro. und Zellen unbew. geworden
422	B3/5	12/9,5	-	+	-	-	-	Beige, rel. klein, undurchs., ggg	Herb muffig, (unbew.) Stäbchen, 0,75 x 1-3µm, an den Enden spitz zulaufend
423	B3/6	12/9,5	+	++	+	+	+++	Beige, etwas durchs., Rand etwas klarer, ggg	Aromat., Vibrio wie B3/8-2 aber weniger deformiert und Sphäro.
424	B3/7	12/9,5	-	+	-	-	-	Beige-rosa, zum Rand hin weißlicher, äußerer Rand klar, ggg	Käsig muffig, Pleomorphie, Stäbchen knapp 1µm dick und bew.
425	B3/8-1	12/9,5	+	++	+	++	++	Weiß, zerlaufen etwas, etwas durchs.	Wenig herb süßlich, wie -2
426	B3/8-2	12/9,5	+ n.e.	++	+	++	++	Wie -1 aber in der Mitte klarer, etwas größer, ggg	Süßlich herb, Vibrios und viele Sphäro., Pleomorphie
427	B3/9	12/9,5	-	+	-	-	-	Weiß, undurchs., wird in der Mitte beige, zerlaufen etwas, ggg	Herb bitter, bew. Stäbchen, 0,75 x 2-4µm, Drehung um Querachse
428	B3/11	12/8	-	+	-	-	-	Beige-gelb, rel. klein, zerlaufen recht gut, ggg	Kaum käsig, bew. Stäbchen, wie B4/21 aber dünner (½ µm)
429	B3/13	12/8	+	++	-	++	+++	Ähnlich B2/17 aber milchiger	Herb aromat., Vibrio, 1 x 1µm, wie B4/3-2
430	B3/14	12/8	+	++	+	+	++	Wie B3/13	Herb aromat., Vibrio wie B8/3
431	B3/15-1	12/8	-	+++	-	+	-	Orange wie B2/5	Herb aromat., wie B4/15
432	B3/15-2	12/8	-	+	-	-	-	Dunkel beige, zerlaufen wenig, ggg, undurchs.	Süßlich aromat., bew. Stäbchen, raue Oberfl., knapp 1 x 2-4µm (einige länger)
433	B4/1	12/9,5	-	++	++	++	+	Orange, ggg, klein, etwas zerlaufend, undurchs.,	Muffig aromat., wie B4/15
434	B4/2	12/9,5	-	+	-	-	-	Wie B4/1	Käsig alkohol., wie B4/15
435	B4/3-1	12/9,5	+	++	+	++	-	Wie B4/3-2	Süßlich muffig, wie B4/3-2
436	B4/3-2	12/9,5	+	++	+	++	-	Beige, zerlaufen stark, ganz flach, etwas durchs., ggg	Kaum Geruch, Vibrio, 1-5µm lang, sehr agil
437	B4/4	12/9,5	-	+	-	-	-	Orange, wenig zerlaufend, ggg, undurchs.	Herb süßlich bitter, wie B4/15
438	B4/5	12/9,5	-	+	-	-	-	Ähnlich B4/6 aber Mitte heller beige, ggg	Wie Hefe und Alkohol, bew. Stäbchen, 1 x 2µm (einige länger) steife Taumelbew., sehr kompakte Stäbchen, alt wie B4/6 meliert
439	B4/6	12/9,5	-	+	-	-	-	Weißer breiter Rand, Mitte beige, zerlaufen kaum, undurchs., ggg	Kaum Geruch, bew. Stäbchen, knapp 1 x 1,5-5µm, werden scheinbar mit dem Alter meliert
440	B4/8	12/9,5	-	++	-	-	-	Orange, ggg, undurchs., zerlaufen nicht	Malzig herb, wie B4/15
441	B4/9	12/9,5	-	+	-	-	-	Weiß, rel. klein, ggg, dünner klarer Rand, zerlaufen nicht	Aromat., bew. Stäbchen, unterschiedlich lang und dick, nicht sehr agil, lange Stäbchen untersch. stark aufgebläht, Sphäro. 0,5-1 x 1-5µm
442	B4/10	12/9,5	-	+	-	-	-	n.u.	Kaum Geruch, kurze unbew. Stäbchen, knapp 1 x 1,5-4µm
443	B4/11	12/8	-	-	-	-	-	Rosa, groß, zerlaufen wenig, ggg, undurchs.	Kaum Geruch, ½ x 2-20µm Stäbchen, ungleichm. gefärbt oder dicht
444	B4/12	12/8	-	-	-	-	-	Grau-weiß, meliertes Glitzern, zerlaufen stark, glatt, wachsen schlecht, undurchs., Rand ausgefranst	Süßlich bitter, bew. Stäbchen, 1/3 x 3-5µm, haften kaum am Glas, ähnlich B4/21 aber viel zierlicher, dünner, einige Sphäro.
445	B4/14	12/8	-	+	-	++	-	Beige, zerlaufen stark, etwas durchs., ggg, flach	Süßlich aromat., unbew. (n.e.) Stäbchen, 1 x 2-4µm, Enden dünnerwerdend, viele Sphäro.
446	B4/15	12/8	-	++	-	-	-	Orange, ggg, undurchs., zerlaufen nicht	Malzig muffig, wie B8/16 aber ungleichmäßiger gepackt
447	B4/16	12/8	-	-	-	+	-	Beige-gelb, ggg, etwas durchs., zerlaufen recht gut, Ränder heller und aufgewölbt	Süßlich aromat., bew. Stäbchen ähnlich B4/21 aber weniger Gaseinschlüsse
448	B4/17	12/8	-	-	-	++	-	Beige, ggg, zerlaufen recht gut, undurchs.	Aromat., bew. (n.e.) Stäbchen, 0,5 x 1,5-3µm, blähen später auf
449	B4/18	12/8	-	-	-	-	-	Rosa-weiß, ggg, wachsen schlecht, hoch aufgewachsen, zerlaufen nicht, undurchs.	Süßlich aromat., unbew. kurze Stäbchen, 1-1,5 x 1,5-3µm, einige länger
450	B4/19	12/8	-	-	-	++	-	Rosa-beige, undurchs., zerlaufen stark, ggg	Aromat. süßlich, ähnlich B4/21
451	B4/20	12/8	-	+++	-	+	-	Wie B6/7	Malzig herb, wie B8/16 aber nicht so geordnet in Paketen, größere Klumpen bis zu Diplokokken
452	B4/21	12/8	-	-	-	+ n.e.	-	Wirken sehr flüssig, weiß, später beige, ggg	Aromat., unbew. Stäbchen, 1 x 1,5-10µm, helle und dunkle Stellen in den Zellen, einige Sphäro.

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
453	B6/1-2	12/9,5	+	++	+++	+++	-	Beige, durchs., ggg, zerlaufen	Herb muffig, Vibrios aber dünner als B6/2, hauptsächlich Sphäro., Stäbchen mit dabei (n.e.)
454	B6/2	12/9,5	-	++	++	++	+++	Wie B6/5	Schwach süßlich, wie B8/27 aber älter, hauptsächlich Sphäro.
455	B6/3	12/9,5	-	+	-	-	-	Rosa-weiß, etwas weniger zerlaufend als B6/5, undurchs., ggg	Kaum Geruch, bew. Stäbchen knapp 1 x 2-4µm, evt. noch Spirillen dabei!
456	B6/4	12/9,5	-	+	+	-	-	Beige, undurchs., ggg, zerlaufen etwas	Käsig süßlich, bew. (um Längsachse) kurze Stäbchen, schraubende Bew., 0,75 x >10µm (meistens 3µm lang)
457	B6/5-1	12/9,5	++	++	-	++	-	Beige, leicht milchig, zerlaufen stark, ggg	Wenig süßlich bitter, Vibrios wie B8/3, keine Sphäro., haften gut am Glas
458	B6/5-2	12/9,5	+	++	++	++	-	Wie -1	Wenig süßlich bitter, wie -1 aber älter und hauptsächlich Sphäro.
459	B6/6	12/9,5	-	+ n.e.	-	-	-	Rosa-beige, zerlaufend, Ränder etwas weißlicher, undurchs.	Süßl. bitter, pleomorphe Stäbchen, 0,75 x untersch. Länge, unbew., haften gut am Glas, Sphäro.
460	B6/7	12/9,5	-	++	-	-	-	Orange, ggg, undurchs., etwas blass	Malzig bitter, Kokken, Ø 2µm, untersch. viele hängen aneinander
461	B6/8	12/9,5	+	++	++	++	+	Wie B6/1-2	Süßlich bitter, wie B6/9-1
462	B6/9-1	12/9,5	+	++	-	+	++	Wie B12/11	Aromat., wahrscheinlich die gleichen Spirillen/Vibrios wie -2 und -3 aber viel länger, hauptsächlich Sphäro.
463	B6/9-2	12/9,5	+	++	+	+++	++	Wie B6/17	Etwas herber als -3, Vibrios ähnlich B6/19
464	B6/9-3	12/9,5	+	++	-	+++	+++	Beige-weiß, groß, zerlaufend, wenig durchs., sehr flach	Süßlich aromat., wie B8/3
465	B6/10	12/9,5	++	+	+	+	-	Beige, fast durchs., klein, etwas zerlaufend, zum Rand noch dünner	Süßlich muffig, Vibrios haften fast alle am Glas, meistens 3-4µm lang, sehr agil, recht groß
466	B6/11	12/9,5	-	+	-	-	-	Beige, milchig, undurchs., wie B4/6	Süßlich aromat., ähnlich B6/12 aber dicker (1µm) und sehr untersch. lang, fast Kokken bis >5µm , unbew.
467	B6/12	12/9,5	-	+	-	-	-	Wie B6/11	Bitter aromat., künstlich, kurze Stäbchen, 0,75 x 1,5-3µm, bew., recht agil, haften gut aneinander aber nicht am Glas
468	B6/13	12/8	+ n.e.	++	++	++	+++	Beige-gelb, klein, etwas zerlaufend, rel. durchs., ggg	Aromat., wie B8/3 aber einige sehen entartet aus, aufgebläht, länger, dicker, nicht rein (n.e.), wie Mischung aus B8/3, B8/27 und Pleomorphe
469	B6/14	12/8	+	++	-	+++	-	Wie B6/13	Herb aromat., wie B8/27
470	B6/15	12/8	+	++	+	+++	++	Etwas gelber als B6/13 oder B6/14 und etwas trüber, ggg	Süßlich muffig aromat., wie B8/3
471	B6/16	12/8	+	++	+	+++	+++	Wie B6/13	Süßlich muffig aromat., wie B8/3
472	B6/17	12/8	+	++	+	+	-	Wie B6/13 aber kleiner, ggg	Herb aromat., wie B8/26-2, sehr agil
473	B6/18	12/8	-	+	+	++	+++	Beige, zerlaufend, Rand klarer etwas durchs., ggg	Herb aromat., künstlich, wie B6/19 aber keine Sphäro., Kultur auch nicht so dicht, jünger (n.e.)
474	B6/19	12/8	++	++	+++	+	-	Beige, kaum zerlaufend, durchs., ggg	Herb aromat., bew. Stäbchen oder Vibrios und (wahrscheinlich) Sphäro., 0,5 x 2 bzw. 1µmØ
475	B6/20	12/8	-	+	-	-	-	Beige-orange, etwas durchs., Rand ganz klar, ggg, kaum zerlaufend	Herb süßlich, Pleomorphe mit Sphäro., haften stark aneinander und am Glas, 1µm dick, untersch. lang
476	B6/21-1	12/8	+ n.e.	+++	++	++	-	Weiß-beige, Rand klar, Mitte wird milchig, ggg	Muffig fruchtig aromat., wie B8/3 aber teilweise zusammengerollt, so dass sie wie Kokken aussehen
477	B6/21-2	12/8	+	++	++	+	-	Wie -1	Muffig aromat., Vibrios, wie B8/3 aber länger
478	B6/22	12/8	-	++	-	+	-	Etwas dunkler als B6/7 und größer	Herb muffig, untersch. große Kokken und Sphäro., Ø 1-5µm häufig aneinander haftend
479	B6/23-1	12/8	-	+ n.e.	-	-	-	Beige, kaum zerlaufend, ggg, etwas dunkler	Süßlich aromat., wie B8/6 und 1µm dick
480	B6/23-2	12/8	-	+ n.e.	-	-	-	Wie -1	Angenehm aromat., wie -1
481	B8/2	12/9,5	-	+	-	-	-	Beige-rosa, undurchs., zerlaufen kaum, Rand wird weißlicher	Süßlich käsig aromat., wie B8/6 und 1µm dick
482	B8/3	12/9,5	+	++	+++	++	+++	Wie B6/21-1 aber etwas milchiger, leicht rosa	Herb aromat., Vibrios, eher rund an den Enden, wirken wie kurze Stäbchen, bew., sehr agil, haften wenig am Glas, 0,75 x 1-2µm
483	B8/4-1	12/9,5	+	++	+++	++	-	Beige, durchs., wie B6/4	Süßlich muffig, wie B8/27
484	B8/4-2	12/9,5	+	++	+++	++	-	Wie B12/6	Süßlich aromat., wie B8/4-3 aber einige Stäbchen dabei
485	B8/4-3	12/9,5	+	++	+++	++	-	Wie -1	Süßlich muffig, wie B8/27 aber einige Zellen länger
486	B8/5	12/9,5	++	++	+++	+++	-	Wie B8/14 aber noch etwas größer und milchiger	Süßlich muffig, wie B8/27
487	B8/6	12/9,5	-	+	-	-	-	Wie B8/13-1	Fruchtig aromat., bew. Stäbchen knapp 1 x 2->10µm, nicht gleichmäßig dick
488	B8/7-2	12/9,5	+	+++	++	++	+++	Beige, etwas durchs., rel. groß, zerlaufend	Aromat., wie B8/27
489	B8/9	12/9,5	-	++	+	-	-	Rosa-weiß, wirken trocken, matt-raue Oberfl., Ränder zerlaufend ausgefranst	Herb aromat., bew. Stäbchen, teilweise stark flächig aneinander haftend, ½ x 4µm, ähnlich B8/12-2 aber noch dicker als /12-1
490	B8/10	12/9,5	-	-	-	-	-	Beige-rosa, zerlaufen stark, wenig durchs., Ränder etwas gewellt, gg	Leicht aromat., bew., Pleomorphie, mit Gaseinschlüssen (n.e.), recht agil, 1,2 x 1,5-10µm und länger
491	B8/12-1	12/9,5	-	++	+	-	-	Beige, rel. durchs., rel. klein	Ähnlich /12-2 aber bitter und Zellen etwas dicker
492	B8/12-2	12/9,5	-	+	-	-	-	Wie -1	Wenig aromat., eher käsig, bew. Stäbchen, wenig agil, bilden teilweise sehr lange Ketten, 1/3 x 2µm, Ketten bis 70µm lang
493	B8/13-1	12/9,5	n.e.	+	-	+	-	Wie B8/15	Kaum Geruch, leichte Pleomorphie, Stäbchen nicht ganz gleichmäßig dick, 1x 1,5-10µm, unbew. (n.e.)
494	B8/14	12/9,5	+	++	+++	++	+ n.e.	Wie B6/14 aber größer	Bitter aromat., wie B8/27
495	B8/15	12/9,5	-	+	-	-	-	Beige-weiß, Ränder weiß, wenig durchs., ggg, zerlaufen gut	Aromat., Stäbchen, die mit dem Alter entarten und aufblähen, kürzere Stäbchen sind noch bew., 1 x 2-20µm, wenig agil
496	B8/16	12/9,5	-	+++	-	-	-	Dunkel orange, groß, zerlaufen nicht, undurchs., ggg	Süßlich muffig, Kokkenpakete, bestrebt immer 4 oder ein Vielfaches davon zusammenzuhalten, Ø1µm
497	B8/17-1	12/9,5	+	+	-	-	-	Beige, matte etwas raue Oberfl., wirkt trocken, brüchige Zellmasse, zerlaufen nicht, undurchs.	Ganz leicht aromat., Pleomorphie, klumpen stark aneinander, bilden scheinbar auch eine Matrix, mit der sie aneinander haften

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
498	B8/19	12/9,5	-	+	-	-	-	Rand weit ausgelaufen und ausgefranst, beige, etwas durchs.	Typischer Bakt.-Muff, dünne bew. Stäbchen, ¼ x 4µm (einige kürzer, viele länge) einige Kokken (Sphäroblasten (n.e.), 1-1,5µm Ø)
499	B8/20	12/9,5	-	+	-	+	-	Beige, undurchs., sieht flüssig aus, zerlaufend, ggg	Wie zerdrückte Blätter, etwas bitter, lange bew. Stäbchen, schlagen sehr langsam mit Flagelle, keine Vorwärtsbew. sondern Taumeln, 1 x 30µm, Einschlüsse, Kokken die genauso groß sind wie die Einschlüsse
500	B8/21	12/8	-	+	+	-	-	Beige, rel. durchs., zum Rand hin milchiger, ggg	Süßlich aromat., wie B8/22 nur mehr lange Stäbchen dabei
501	B8/22	12/8	-	++	+	-	-	Gelb, durchs., ggg, ähnlich B8/21	Süßlich muffig, langsam schwimmende Stäbchen (gegen B8/24 wie in Zeitlupe), 0,75 x 2µm (wenige kürzer, einige länger) haften gut aneinander aber nicht am Glas
502	B8/23	12/8	++	++	+++	++	-	Beige, durchs., zum Rand hin dünner werdend, ggg	n.u.
503	B8/24	12/8	-	-	-	-	-	Orange-gelb, Ränder durchs., glitzernd, zerlaufen nicht, ggg	Beißend (käsig), bew. Spirillen und Stäbchen (mit Übergangsstadien), 0,75 x 2-5µm, einige dicke Pleomorphe dabei, bilden alle gerne Häufchen, aber extrem agil, auch aufgeblähte Spirillen dabei
504	B8/26-2	12/8	++	++	+++	+++	+++	Groß und flach, beige, zerlaufend, ggg, etwas durchsichtiger als -1	Leicht aromat., bew. Spirillen, 2-5µm und länger, korkenzieherartiger als B8/27, auch Stäbchen dabei, nicht rein (n.e.)
505	B8/27-1	12/8	++	++	+++	++	-	Beige, rel. durchs., zerlaufen, ggg, rel. groß	Kein Geruch, bew. Vibrios, sehr agil, 0,75 x 2-4µm
506	B8/27-2	12/8	-	++	+++	++	-	Wie -1	Wenig aromat., wie -1
507	B8/29	12/8	-	++	-	-	-	Gelb-beige, zerlaufen kaum, durchs., ggg	Süßlich, käsig, wenig aromat., bew. Stäbchen, haften gut am Glas und aneinander, 0,75 x 3-5µm, einige länger
508	B1/2	20/8	-	++	-	-	+	weiß-beige, meliert aber undurchs., zerlaufen gut, ggg	Süßlich aromat., bew. Stäbchen, 0,75 x 1,5-5µm bilden Ketten mit untersch. langen Zellen, haften schlecht am Glas aber gut aneinander
509	B1/3	20/8	-	+++	-	-	++	weiß, flach zerlaufen gut, undurchs., ggg	Bitter aromat., unbew. Stäbchen, Pleomorphie, ungleichm. dick (~1µm) untersch. lang (1-5µm), bilden Ketten und Häufchen
510	B1/4	20/8	-	-	-	-	-	grau-weiß, undurchs., flüssig	Bitter aromat., ähnlich B1/3 aber Zellen kaum zusammenhängend, haften nicht am Glas oder aneinander
511	B1/5	20/8	-	-	-	+	-	weiß-rosa, zerlaufen gut, undurchs., ggg	Aromat., unbew. Stäbchen, 0,75-1 x 1-5µm, teilweise ungleichm. dick, mit Einschlüssen, haften weder am Glas noch aneinander
512	B1/7	20/8	-	+	-	+	-	beige, weißer Rand, zerlaufen gut, ggg, undurchs.,	Süßlich herb aromat., wie B1/2 aber nicht in Ketten
513	B1/8	20/8	-	+	-	+	-	beige, rel. groß, ggg, wenig zerlaufend, undurchs.	Kaum Geruch, nicht aromat., wie B1/3 bew. aber wenig agil, langsames Taumeln und Drehen
514	B1/9	20/8	-	+++	++	-	+	weiß-beige, durchs. ggg, etwas zerlaufend	Kaum Geruch, nicht aromat., Stäbchen 0,5 x 2-5µm bilden lange Zellfäden (>50µm), Einzelzellen scheinbar bew., selten Sphäro.
515	B1/11	20/8	+	++	-	+	+	groß, weiß, zerlaufen etwas, undurchs., ggg, ähnlich B8/65 bis auf die Farbe	Wenig süßlich, kurze unbew. Stäbchen, 1 x 1,5-3µm, haften nicht am Glas oder aneinander
516	B1/12	20/8	-	+	-	-	++	blass orange, dunkler Rand, ggg, undurchs., zerlaufen recht gut	Stäbchen, knapp 1 x 1->5µm, bilden Ketten mit Zellen untersch. Länge, schnelle Kreiselbew. der Flagelle, (sieht zappelig aus)
517	B2/18	20/8	-	+	-	-	-	beige, ggg, undurchs., zerlaufen etwas, wie B9/19 bis auf die Farbe	Zappelige Stäbchen, rel. einheitliche Länge, 0,75 x 2-3µm, haften gut am Glas
518	B2/19	20/8	-	+	-	+++	-	orange, flach, zerlaufen recht gut, undurchs., nur etwas milchig, Rand granulös	Bew. Kokken, Ø 0,75µm, in kleinen Häufchen, zappeln recht agil, 2 oder mehr zusammen, selten allein, einige größere Sphäro.
519	B2/20	20/8	-	++	-	-	+	beige (-orange), milchig trüb, undurchs., zerlaufen gut, ggg	Bew. Stäbchen, 0,75 x 1-5µm, bilden teilweise kürzere Ketten, haften gut am Glas
520	B2/21	20/8	-	-	-	-	+	weiß-grau, flüssig	Unbew. Stäbchen, 0,75 x 2µm bis recht lang, lange Zellen teilweise erheblich deformiert
521	B2/22	20/8	-	++	+++	+++	+++	grau-beige, Rand weiß , flüssig	Spirillen/Vibrios, 0,75 x 2->15µm dicke deformierte Zellen (wie Pleomorphie) auch dabei, nicht rein oder so variabel
522	B2/23	20/8	-	+	-	+	++	wie B2/20 aber weniger zerlaufend	Bew. Stäbchen, bilden Ketten wie B1/2
523	B2/24	20/8	-	+	-	-	++	beige, recht durchs., zerlaufen gut, ggg, Rand großer Kolonien glitzert meliert	Bew. Stäbchen, bilden Ketten, 0,75 x 1-4µm, haften kaum am Glas aber gut aneinander
524	B2/25	20/8	-	+ n.e.	-	++	-	weiß-rosa, ggg, undurchs., zerlaufen etwas, gleichm. gefärbt	Wie /24 aber gleichmäßiger im Medium verteilt
525	B2/26	20/8	-	-	+	+++	-	wie B2/19	Bew. Kokken wie B2/19
526	B2/27	20/8	-	+	-	+	-	beige, zerlaufen gut, undurchs., ggg, gleichm. gefärbt	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-3µm, wenige kürzer oder länger, bilden keine Ketten
527	B2/28	20/8	-	-	-	-	-	wie B9/15 aber weißer, sehr aufgewölbt	Kurze unbew. Stäbchen, mind. 1 x 1-2µm, teilweise sehr aufgebläht
528	B3/18	20/8	-	+	-	+	+	etwas flacher als /27 und Ränder heller, nur wenige Salzkristalle	Vermutlich bew. Stäbchen, 0,5 x 2->5µm, nicht ganz gleichm. dick, ältere vermutlich deformierter als junge
529	B3/19	20/8	-	+	-	++	+	wie /18 aber Farbe eher weiß-grau, Salzkristalle in Kolonien (Nadeln ragen aus Oberfl. heraus)	Wie B2/25 kaum Ketten
530	B3/20	20/8	+	+	-	++	-	beige, wie B12/27 aber zerlaufen nicht so stark	Wie B3/19
531	B3/21	20/8	+	++	-	++	+	wie /20	Wie B3/19
532	B3/22	20/8	-	++	-	-	++	blass-orange, undurchs., zerlaufen gut, ggg	Bew. Stäbchen, knapp 1 x 1-5µm, bilden Ketten, kaum einzeln, selbst Sphäro. noch in Ketten, klumpen zu Häufchen zusammen
533	B3/23	20/8	-	+	-	+++	-	weiß, sehr flach so dass manchmal etwas durchs., zerlaufen stark wie flüssig, ggg	Unbew. Stäbchen, 0,75 x 2-4µm, raue Oberfl.
534	B3/24-1	20/8	-	+	-	+	-	weiß, zerlaufen recht gut, undurchs., ggg, leicht beige	Kurze Stäbchen, knapp 1 x 2µm, selten länger, bew. aber nur Taumeln, Ende abgerundet
535	B3/24-2	20/8	-	+	-	-	-	wie /24-1	Wie -1
536	B3/25	20/8	-	+	-	+	+	weiß, wenn sehr alt Mitte der Kolonie grau und rissig, zerlaufen stark, flach, undurchs., ggg	Wie B3/19
537	B3/26	20/8	-	+	-	-	-	weiß-beige, zerlaufen gut, undurchs., ggg	Wie B3/19 aber Zellen im Durchschnitt länger (3µm)
538	B3/27-1	20/8	-	-	-	+++	-	wie /27-2	Bew. Stäbchen, 0,75 x 1-3µm, können Ketten bilden, einige aufgebläht
539	B3/27-2	20/8	-	-	-	+++	-	weiß, zerlaufen sehr gut, undurchs., ggg	Wie -1 aber Zellen kleiner (0,5µm dick)
540	B3/28	20/8	-	++	-	++	+	ähnlich B3/25 aber stärker ins Beige	Wie B3/33 aber Zellen dünner und junge kurze Zellen bew., (0,5µm dick)

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
541	B3/29	20/8	-	-	-	++	-	weiß, klein, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	Bew. Stäbchen, 0,75 x 1,5-4µm, haften weder am Glas noch aneinander
542	B3/30	20/8	-	-	-	-	-	weiß-rosa, zerlaufen stark, wie flüssig	Wie B3/29
543	B3/31	20/8	-	+	-	-	+	weißer Rand, Mitte weiß-beige, Salzkristalle, zerlaufen gut, undurchs., recht hoch aufgewölbt, ggg	Wie B3/29
544	B4/23	20/8	-	+	-	-	++	weiß-orange, Rand etwas wellig, glitzert meliert, undurchs., zerlaufen etwas, Oberfl. etwas rau	Wie B2/25
545	B4/25	20/8	-	+	-	-	+	wie B3/18	Bew. Stäbchen, 0,5 x 2->15µm, viele mit Einschlüssen, wenig agil, haften weder am Glas noch aneinander
546	B4/26	20/8	-	+	-	-	-	Oberfl. eingedellt, Mitte glitzert, Rand beige-grau und wellig, alte K-Oberfl. rissig	Dünne bew. Stäbchen, ungleichm. dick, 1/3 x 2->15µm
547	B4/27-1	20/8	-	+	-	-	+	blass-orange, zerlaufen sehr gut, ggg, undurchs.	Wie B2/24
548	B4/27-2	20/8	-	+	-	-	+	älter blass-orange wie -1, jünger weiß-beige, Rand glitzert meliert, zerlaufen nicht so stark wie -1, Rand etwas wellig	Wie B2/24
549	B4/28	20/8	-	-	-	-	-	beige, nicht durchs. aber auch nicht richtig milchig, zerlaufen etwas, ggg	Wie B3/27-2
550	B4/29-1	20/8	-	+	-	-	++	blass-orange, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	Wie B3/27-1
551	B4/29-2	20/8	+	++	-	-	-	weiß, etwas gelblich, zerlaufen sehr gut, ggg, undurchs.	Wie B2/28
552	B4/30	20/8	-	+++	+ n.e.	-	-	weiß, grau wenn älter, groß, zerlaufen wenig, undurchs., Mitte granulös	Wie B1/2
553	B4/31	20/8	-	++	-	-	-	wie B3/19 aber etwas mehr weiß, auch Salzkristalle	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1-4µm, einige länger und dann etwas wellig ungleichm. dick, haften nicht am Glas und nicht aneinander
554	B4/32	20/8	+	-	-	++	-	weiß, wie B6/33-2	Wie B3/24-1
555	B4/33	20/8	-	+	-	-	-	wie B10/33 aber grau-beige, nicht so milchig	Wie B4/31
556	B4/34	20/8	-	-	-	-	-	ähnlich /33 aber etwas mehr beige, zerlaufen wenig, Salzkristalle in alten K., die die Oberfl. pixelig machen, ggg	Wie B1/2
557	B4/36	20/8	-	+++	+ n.e.	-	-	beige, Ältere weiß, etwas durchs., Mitte granulös, zerlaufen gut, ggg, Rand glitzert meliert	Sehr untersch. dicke und untersch. lange Stäbchen, haften gut aneinander, unbew., Pleomorphie (n.e.)
558	B4/37	20/8	-	++	-	-	-	wie /36 aber glitzernd melierte Masse in gesamter K. und kein abgegrenzter Rand	Wie B1/2 mit Sphäro.
559	B4/38	20/8	+	++	-	++	+	beige, zerlaufen etwas, undurchs., ggg, wachsen gut	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-3µm selten länger, haften weder aneinander noch am Glas
560	B4/39	20/8	-	-	-	+	-	weiß, zerlaufen stark, ggg, undurchs., wie B10/33	Kettenbildende Stäbchen, 0,5 x 2µm, Oberfl. rau, wenn bew., dann wenig agil
561	B4/40	20/8	+	+	-	+	+	weiß, flach, zerlaufen wenig, ggg, undurchs., leicht rosa-beige	Bew. Stäbchen, 1 x 1,5-2µm, recht eckig, gleichm. verteilt, haften nicht
562	B5/1	20/8	-	+	-	-	++	blass-orange, mit dunklerem Rand, ggg, zerlaufen etwas, undurchs.	Wie B1/2
563	B5/2	20/8	-	+	-	-	++	wie /1	Kettenbildende gut bew. Stäbchen, knapp 1 x 1,5-3µm, bilden Häufchen
564	B5/3	20/8	-	++	-	-	-	beige, etwas durchs., Rand sehr abgegrenzt weiß, ggg, zerlaufen gut	Bew. Stäbchen, 1 x 1,5-2µm, haften nicht, wenig agil, Sphäro.
565	B5/4	20/8	-	+++	-	-	+	beige, durchs., zerlaufen etwas, ggg	Wie B5/3
566	B5/5	20/8	-	-	-	+++	-	weiß-grau, flüssig	Wie B3/23
567	B5/7	20/8	-	-	-	+	-	wie B6/34	Wie B4/39
568	B5/8	20/8	-	+	-	-	++	wie B5/20-2 aber durchs., glitzern meliert	Wie B5/2 aber nur 0,75µm dick
569	B5/9	20/8	-	+	-	-	-	weiß, wie B3/27-2	Wie B4/39
570	B5/15	20/8	-	+	-	-	-	rosa-weiß, undurchs., zerlaufen gut, wie B2/25	Kettenbildende bew. Stäbchen, 1 x 1,5-3µm, haften nicht, unförmig
571	B5/17	20/8	-	++	-	-	-	weiß, jung durchs., alt weiß und undurchs., zerlaufen etwas, ggg, weiß entsteht sternförmig	Kettenbildende bew. Stäbchen, 0,75 x 1-3µm, haften nicht
572	B5/19	20/8	-	+	-	++	-	ähnlich B2/25	Wie B5/17
573	B5/20-1	20/8	-	+	-	-	++	blass-orange, recht groß, zerlaufen wenig, undurchs., gg, Rand glitzert meliert und ist etwas wellig	Wie B5/2
574	B5/20-2	20/8	-	+	-	-	++	blass-orange, klein, zerlaufen recht gut, undurchs., durchs. wenn jung, ggg	Wie B5/2
575	B5/26	20/8	-	+	-	-	++	blass-orange, ggg, glitzern meliert am Rand (scheint abhängig zu sein vom Nachbarn auf Platte) zerlaufen etwas, undurchs.	Wie B5/2
576	B5/27	20/8	-	+	-	-	++	orange, ggg, undurchs., zerlaufen nur etwas, milchig	Kokken, Ø 2µm, bilden Häufchen, Zellen teilweise aufgequollen bis zu 5µm (Sphäro. (n.e.)), unbew.
577	B5/28	20/8	-	-	-	-	-	wie B4/27-2	Wie B5/2
578	B5/30	20/8	-	++	-	-	+	beige, recht durchs., ggg, zerlaufen nur etwas, später starkes Flächenwachstum um neue Habitate zu besetzen (n.e.)	Bew. Kokken, Ø 1µm, teilweise aufgebläht auf 2µm, zusammengelagert zu Häufchen
579	B5/32	20/8	-	+	-	-	+	unrein (n.e.) klare durchs. Grundmasse in der kleine weniger klare K. wachsen (oder Trübung mit dem Alter (n.e.)), Wachstum schlecht	Bew. Kokken bis Stäbchen in Ketten und Häufchen, 1 x 1-2µm, wenige länger, unrein oder sehr untersch. gestaltet (n.e.)
580	B5/35	20/8	-	+	-	-	+++	orange, etwas glasiger und dunkler als B5/32, undurchs., zerlaufen kaum, ggg	Kokken, gut 1µm Ø, aufgebläht bis zu 2µm , zusammengelagert zu Häufchen, unbew. oder wenig agil
581	B3/27-3	20/8	-	-	-	-	-	weiß-rosa, ähnlich B1/11, etwas weißlicher und stärker zerlaufend, undurchs., ggg	Wie B3/27-1
582	B6/25	20/8	-	-	-	-	++	wie B5/32 aber statt orange blass beige-gelb	Wie B5/2
583	B6/29	20/8	-	+	-	++	-	ähnlich B8/62	Wie B3/27-1 aber Zellen weniger stark aufgebläht, dafür mehr Zellen deformiert
584	B6/30	20/8	-	+	-	++	-	ähnlich B8/62	Wie B6/29 aber Zellen kürzer und weniger deformiert, Kultur noch nicht so durchgewachsen (n.e.)
585	B6/31	20/8	-	-	-	-	-	ähnlich B8/62, etwas flacher	Wie B6/30
586	B6/32-2	20/8	-	-	-	+	-	weiß, zerlaufen etwas, undurchs., ggg, wie -1	Bew. Stäbchen, häufig gekrümmt, 1/3 x 1,5-5µm, kaum agil, klumpen aneinander
587	B6/33-2	20/8	-	-	-	-	+	weiß, groß, zerlaufen stark, wirken fast flüssig, ggg, undurchs.	Wie B3/27-1
588	B6/34	20/8	-	-	-	+	-	wie B11/9 aber weißer	Ähnlich B3/27-1 aber mehr runde Sphäro.

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
589	B7/3	20/8	-	+	-	-	++	blass orange, gut zerlaufend, undurchs., ggg	Wie B5/2
590	B7/6	20/8	-	++	-	+	+++	blass orange, wie B7/3 aber alte dunkler und junge heller	Wie B5/2
591	B7/8	20/8	-	-	-	-	-	weiß, wie B4/40	Wie B6/34
592	B7/10	20/8	-	+	-	-	+	weiß, zerlaufen etwas, undurchs., ggg, tendieren zu beige	Wie B6/29, sehr lange Zellen
593	B7/11-1	20/8	-	+	-	-	+	wie /10	Wie B7/10 aber Zellen kürzer, Kultur scheinbar noch nicht so durchgewachsen
594	B7/11-2	20/8	-	-	-	+++	+	weiß-cremefarbend, zerlaufen stark, ggg, undurchs.	Wie B7/11-1
595	B7/13	20/8	-	-	-	+++	+	weiß, groß, zerlaufen stark, Mitte-Oberfl. rau und fest, Rand-Oberfl. glatt und flüssig, undurchs., Tendenz zu rosa	Wie B7/11-1
596	B7/14	20/8	-	++	-	+	-	weiß-rosa-beige, undurchs., zerlaufen gut, ggg, Rand etwas grau	Wie B7/11-1
597	B8/50	20/8	-	++	-	+	+	beige-orange, blass undurchs., zerlaufen gut, gleichm. gefärbt, ggg	Wie B7/11-1
598	B8/51	20/8	-	++	-	-	+++	blass-orange-beige, jung durchs., alt undurchs., zerlaufen etwas, ggg	Wie B5/2
599	B8/52	20/8	-	+	-	-	+	weiß, innen beige, groß, zerlaufen gut, undurchs., ggg	Wie B3/27-1
600	B8/57-1	20/8	-	+	-	-	++	weiß-orange, gleichm. gefärbt, nur Rand wird etwas durchs., sonst undurchs., zerlaufen etwas mehr als /56	Nicht rein! Mischung aus B6/32-2 und B5/2 (aber gut 1µm dicke Zellen und unbew.)
601	B8/57-2	20/8	-	+	-	-	++	wie -1, jüngere etwas durchsichtiger	Wie B8/57-1
602	B8/63	20/8	-	++	-	+	+	ähnlich B4/33 aber viel kleiner	Wie B3/24-1
603	B9/1	20/8	-	+	-	-	+++	blass orange, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	Wie B8/57-1
604	B9/3	20/8	-	-	-	-	-	rosa-weiß, wie B10/23-1	Wie B7/11-1
605	B9/4	20/8	-	+	-	-	-	orange, trüb aber nicht milchig, granulös, raue Oberfl., gleichm. gefärbt, glatter Rand	Kokken, 2µm Ø, klumpen stark zusammen, teilweise auf 4µm aufgebläht
606	B9/5	20/8	-	+	-	-	+++	weiß-blass-orange, glitzern meliert am Rand, Mitte milchig trüb, g, etwas raue Oberfl., Rand etwas rau	Wie B5/2
607	B9/6	20/8	-	++	+	-	++	beige (Mitte alter K. oder junge), weiß und dann durchs. zum Rand hin, ggg, zerlaufen etwas, rel. klein,	Vermutl. bew. Stäbchen, 0,75 x 2-5µm, gleichm. verteilt, kaum agil
608	B9/7	20/8	-	+	-	-	-	rosa-weiß, wie B9/25	Wie B9/6 aber variabler in der Länge und agiler
609	B9/10-1	20/8	-	++	-	-	-	weiß, noch verunreinigt mit weißen, gelben und grauen, ggg, zerlaufen etwas, undurchs.	Wie B5/2
610	B9/10-2	20/8	-	++	-	-	-	weiß, jung durchs., alt undurchs., noch verunreinigt mit K. die genauso aussehen aber größer sind (n.e.), zerlaufen gut, ggg, recht flach	Wie B5/2 aber Ketten kürzer
611	B9/12-1	20/8	-	++	-	-	-	weiß, ohne abgegrenzten Rand, zum Rand hin durchs., glitzern meliert, zerlaufen recht gut, Rand etwas ausgefranst	Wie B9/10-2 aber Zellen im Durchschnitt länger
612	B9/12-2	20/8	-	++	-	-	-	wie B9/10-2 zerlaufen aber weniger und sind aufgewölbter	Wie B5/2 aber lange Ketten mit kurzen Zellen
613	B9/15	20/8	-	-	-	-	-	wie B10/23-1 aber noch stärker rosa, etwas flacher, alte Oberfl. (die zusammengefallen ist) zeigt feine Risse	Wie B3/27-1
614	B9/16	20/8	-	++	-	-	-	weiß, zerlaufen gut, jung durchs. und granulös, alt weiß und undurchs., ggg	Wie B3/27-1
615	B10/30	20/8	-	++	-	-	-	jung beige durchs., älter weiß undurchs., zerlaufen gut, glitzern meliert, Rand ganz leicht ungleichm., gg	Wie B5/2
616	B10/32	20/8	+	-	-	+	-	wie B10/23-1, zerlaufen aber besser, sehr kleine Risse in Oberfl.	Kettenbildende bew. Stäbchen, 0,75 x 3-4µm, ab und zu länger und kürzer, gleichm. verteilt
617	B10/33	20/8	-	n.e.	-	+	-	weiß, zerlaufen stark, wie B10/24-1	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-4µm, wenig agil
618	B10/34-1	20/8	-	+	-	+	+	beige-grau, undurchs., zerlaufen etwas, ggg	Wie B10/33 aber Zellen etwas dicker und variabler in der Länge und Alter, viele Sphäro. klumpen zu Häufchen zusammen
619	B8/53	20/8	-	+	-	-	+	beige, ggg, zerlaufen etwas, undurchs., wie getropft, gleichm. gefärbt, Salzkristalle in größeren K.	Bew. Stäbchen, wenig agil, rel. glatte Oberfl. auch bei älteren Zellen, 0,75 x 2->5µm, Einschlüsse vorhanden
620	B8/54	20/8	-	+	-	+	+	beige-weiß, zerlaufen gut, undurchs., ggg, Salzkristalle in größeren K.	Bew. Stäbchen, 0,5 x bis zu 50µm, alte Zellen aufgebläht, Oberfl. rau
621	B8/55	20/8	-	+	-	+	-	beige-grau, Rand wird heller, ggg, undurchs., zerlaufen gut	Wie B8/54 aber Zellen dicker (0,75µm)
622	B8/58	20/8	-	+	-	-	-	ähnlich B8/53 aber etwas anderer Farbton, milchiger	Bew. Stäbchen, 0,75-1 x 2µm bis sehr lange Zellen, schrauben sich trotz der Länge noch durchs Medium, haften gut am Glas
623	B8/59	20/8	-	++	-	+	-	beige-gelb, undurchs., etwas granulös, zerlaufen etwas, rel. groß, gg, Oberfl. matt und rau	Wie B8/58
624	B8/60	20/8	-	-	-	++	+	weiß, zerlaufen stark, wirken flüssig, undurchs., ggg, tendieren zu rosa	Kurze Stäbchen, 0,75 x 1-2µm, teilweise aufgebläht, unbew. oder kaum agil
625	B8/62	20/8	-	-	-	++	+	weiß, wie B10/33	Wie B3/27-1
626	B8/64	20/8	-	+	-	-	+	ähnlich B8/63 aber mehr beige als grau	Wie B8/58, lange Stäbchen aber nicht mehr so bew., teilweise sind die Enden aufgekringelt
627	B8/65	20/8	-	+	-	-	+	cremefarbend (gelb-beige-weiß), wie getropft, ggg, undurchs., zerlaufen etwas	Wie B8/58 aber nicht mehr so agil
628	B9/2	20/8	-	+	-	-	-	orange, durchs. (kontaminiert mit orange, undurchs., groß), klein, ggg, granulös, zerlaufen etwas	Kokken, 1µm Ø, klumpen zu Häufchen zusammen
629	B9/14	20/8	-	-	-	-	-	sehr klein, beige, durchs., zerlaufen gut, Einzelk. nur unter Bino erkennbar	Wie B8/58 aber nicht agil
630	B9/19	20/8	-	-	-	-	-	wie B9/3	Wie B5/2 aber Zellen schrumpeliger, 0,75µm dick
631	B9/20	20/8	+	++	-	+	-	wie B9/3, zerlaufen aber stärker und sind flacher und etwas heller	Wie B8/58, durchschnittliche Länge 7µm, Zellen sehr schrumpelig (1µm dick)
632	B9/21	20/8	-	+	-	-	-	grau-weiß, sehr flüssig, überschwemmt oder überwächst alles	Wie B1/11
633	B9/26	20/8	-	-	-	-	-	weiß-beige, sehr hoch aufgewölbt, zerlaufen aber auch stark, ggg, undurchs.	Wie B9/20
634	B10/19	20/8	-	++	+	-	+	beige, rel. klein, zerlaufen gut, undurchs., Rand weißlicher	Bew. Stäbchen, 0,75-1 x 2-5µm, glatte Oberfl., selten Ketten
635	B10/20	20/8	-	++	-	-	++	blass orange, zerlaufen recht gut, undurchs., ggg	Wie B5/2

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
636	B10/21	20/8	++	+	-	++	+	weiß, älter etwas rosa, ggg, zerlaufen recht gut, undurchs.	Bew. sehr lange Stäbchen, 0,75-1 x 1µm bis sehr lang, lange Zellen schrumpelig, anders als bei B9/20 sind viele kurze Zellen mit in der Kultur
637	B10/22	20/8	-	++	+	-	-	weiß-grau, wachsen schlecht, glitzern meliert, älter weiß, jung durchs., Oberfl. und Rand etwas rau, g	Extrem lange Zellfäden mit und ohne Unterteilung, auch untersch. dick (0,5-1µm)
638	B10/23-1	20/8	-	+	-	-	-	ähnlich B11/18 aber stärker rosa	Wie B10/21
639	B10/23-2	20/8	+	+	-	++	+	weiß-beige-rosa, flacher als -1, zum Rand hin weiß, zerlaufen besser als -1	Wie B10/21
640	B10/24-2	20/8	-	++	+++	+++	++++	weiß-beige, zerlaufen nur etwas, undurchs., ggg, zum Rand hin heller	Spirillen oder Vibrios in Ketten, 1/3 x bis zu 10µm, wenige Sphäro.
641	B10/25	20/8	-	n.e.	-	-	++	blass orange, matte Oberfl., wirkt trocken cremig, ganzrandig, Rand etwas durchs. granulös, sonst undurchs., zerlaufen wenig	Kokken, 1µm Ø auf Häufchen
642	B10/26	20/8	+ n.e.	+++	-	-	+	weiß, jung durchs., älter etwas weniger, granulös, ggg, zerlaufen gut, rel. klein	Wie B5/2
643	B10/27	20/8	-	++	-	-	-	beige, Rand ausgefranst, Oberfl. rau und matt, wirkt granulös, zerlaufen gut	Ähnlich B10/22 aber Fäden nicht so lang
644	B10/28	20/8	-	++	-	-	+	wie /27 aber ggg bzw. wie /26 aber größer	Unbew. oder wenig agile Stäbchen, an den Enden spitz zulaufend, knapp 1 x 2-5µm, haften nicht
645	B10/29	20/8	-	+	-	-	-	weiß, Rand glitzert meliert, zerlaufen etwas, undurchs., Rand wellig, Oberfl. glatt	Wie B5/2
646	B8/18	12/9,5	+	-	-	+	+	Rosa-beige, rel. klein, zerlaufen nicht, ggg, undurchs.	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1-5µm, längere Zellen schrumpelig, haften gut am Glas und aneinander
647	B8/25	12/8	-	+	-	-	+	Sehr klein, beige-orange, zerlaufen etwas, ggg, glitzern, durchs.	Kokken, schon sehr stark aufgebläht (8µm Ø), in Häufchen
648	B6/1-1	12/9,5	+	++	+++	+++	+	Beige, kaum durchs., zerlaufen nur wenig, ggg,	Vibrios, 0,75 x 2µm, wenige länger oder kürzer haften gut am Glas
649	B6/24-2	12/8	-	-	-	++	-	Weiß-beige, wachsen schlecht, zerlaufen stark, undurchs., tendieren zu rosa, ggg	Unbew. oder wenig agile Stäbchen, 1 x 1,5-7µm, teilweise aufgebläht
650	B8/1-1	12/9,5	-	+++	-	-	-	Rosa-orange, undurchs., zerlaufen stärker als -2, ggg	Kokken, 1µm Ø, unbew. oder wenig agil, in Häufchen
651	B8/1-2	12/9,5	-	+++	-	-	-	Orange, ggg, zerlaufen nicht, undurchs.	Wie -1
652	B4/22-2	12/8	-	-	-	++	-	Beige, zerlaufen nicht so stark wie -1, tendieren zu rosa, ggg	Wie B6/24-2 aber Zellen weniger aufgebläht
653	B8/39-1	12/8	+	-	-	++	-	Wie B8/18	Wie B4/22-2, sehr agil
654	B8/13-3	12/9,5	+	+	-	++	-	Beige-weiß, zerlaufen kaum, undurchs., ggg	Wie B4/22-2 aber Zellen schrumpeliger und weniger agil
655	B8/17-4	12/9,5	+ n.e.	+	-	+	-	Beige, matte etwas raue Oberfl., Zellmasse wirkt trocken und bricht auseinander, zerlaufen nicht, undurchs.	Kurze Stäbchen, haften stark zusammen, keine freischwimmenden Einzelzellen, ÜNK auch schon krümelig
656	B8/28-2	12/8	+	+	-	++	-	Beige-weiß, zerlaufen wenig, undurchs., ggg	Pleomorphie, über 1µm dick und untersch. lang, keine Ketten, gleichm. verteilt
657	B6/24-1	12/8	-	-	-	++	-	n.u.	Wie B8/28-2
658	B9/13	20/8	-	++	-	-	+	beige, granulös nicht meliert, junge durchs., ältere milchiger, zerlaufen etwas, ggg	Bew. Stäbchen, wenig agil, 1 x 2-5µm, bilden manchmal Ketten, haften wenig am Glas
659	B6/32-1	20/8	-	-	+	-	-	wie -2, weiß, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	Wenig gekrümmte Spirillen/Vibrios, wenig agil, haften gut am Glas, 0,75 x 1-4µm
660	B6/26	20/8	-	+	-	-	++	wie B10/25	Kokken, 1µm Ø, in Haufen
661	B8/61	20/8	-	++	-	++	+	grau-beige, ähnlich B8/55	Bew. Stäbchen, 0,5 x 2-5µm, teilweise auch länger, etwas raue Oberfl.
662	B10/34-2	20/8	-	n.e.	-	-	-	weiß-beige, sonst wie -1	Kurze Stäbchen, teilweise in Ketten, 1 x 1-3µm, teilweise sehr aufgebläht, Sphäro. können über 10µm Ø ausmachen (Riesen)
663	B5/10	20/8	-	+	-	-	+	gelb-beige, durchs., granulös, zerlaufen gut	Stark aufgeblähte Kokken bzw. Sphäro.
664	B5/11	20/8	-	+	-	-	-	blasser als /10, schlechteres Wachstum	Wie B5/10
665	B5/14	20/8	-	-	-	-	-	beige, durchs., granulös, wachsen schlecht, ggg, zerlaufen gut	Wie B5/10
666	B6/27	20/8	-	+++	-	-	+	grau-weiß, glitzern meliert, aber undurchs., zerlaufen gut, Oberfl. und Rand rau-wellig, g	Sehr lange Stäbchen, Zellfäden weit über 10µm lang, 0,5-0,75µm dick (unbew. (n.e.))
667	B6/28	20/8	-	+++	-	-	+	wie /27 aber etwas mehr beige und weniger rau	Wie B6/27
668	B6/33-1	20/8	-	-	-	-	-	wie -2	Kurze Stäbchen, 1 x 1,5µm, hängen in Ketten aneinander, unbew.
669	B7/9	20/8	-	-	-	+	-	weiß, durchs., granulös, zerlaufen gut, sehr klein, schwärmen am Rand wieder aus, Rand und Oberfl. rau	Bew. Stäbchen bis Spirillen, dünne Stäbchen ¼ x 2-5µm, etwas dickere Stäbchen 0,75 x 1-sehr lang, einige Sphäro. (nicht rein oder pleomorph (n.e.))
670	B8/56	20/8	-	+	-	-	++	orange, undurchs., Mitte blasser, Rand milchiger bis wieder etwas durchsichtiger granulös, ggg, zerlaufen nur wenig	Kokken, häufig einzeln, einige in Haufen, 1µm Ø, nicht rund, einige aufgebläht
671	B10/24-3	20/8	-	n.e.	-	-	-	grau-weiß, Mitte weiß, Rand durchs. grau und deutlich abgesetzt, glitzern meliert, zerlaufen etwas, Oberfl. etwas rau	Untersch. lange kettenbildende Stäbchen, vermutlich bew., 0,75µm breit, unförmig
672	B10/35	20/8	+	n.e.	+++	+	+	weiß-beige, rel. groß, zerlaufen gut, ggg, undurchs.	Spirillen/Vibrios, 0,75 x 2-5µm, recht agil
673	B10/36	20/8	-	n.e.	-	-	-	weiß-beige, ggg, undurchs., zerlaufen recht gut, kleiner als /35	Bew. Stäbchen, 0,75 x ~2µm, ältere etwas schrumpelig, einige aufgebläht, ähnlich B3/27-1 aber Ketten selten
674	B10/37	20/8	+	n.e.	-	+	+	beige, Rand weiß und deutlich abgesetzt, sonst wie B10/35	Wenn bew. dann wenig agile Stäbchen, haften stark aneinander und bilden Klumpen
675	B10/40	20/8	++	n.e.	+	-	-	weiß, glitzern meliert, gg, Oberfl. etwas rau, zerlaufen gut, durchs. nur am Rand	Wie B6/27
676	B11/1	20/8	-	n.e.	+	-	-	beige-weiß, klein, jung und am Rand durchs., zerlaufen gut, ggg, granulös	Wie B5/2
677	B11/3	20/8	+	n.e.	+	-	-	beige-gelb, zerlaufend, etwas durchs., gg, ganz leicht angeraute Oberfl.	Unbew. Stäbchen, haften gut aneinander, einige in Ketten, 0,75 x ~5µm
678	B11/4	20/8	-	+	-	-	++	Milchig-gelb, zerlaufen, bilden aber ganz klar abgegrenzte K., undurchs., ggg	Wie B5/2 aber Zellen häufiger länger
679	B11/5	20/8	-	-	-	-	++	weiß, sehr wenig durchs., zerlaufend, ggg	Pleomorphie, Kokken Stäbchen Sphäro., in Ketten (Stäbchen 1µm breit)
680	B11/6	20/8	-	++	-	-	++	wie B11/4 aber etwas mehr beige	Wie B5/2
681	B11/7	20/8	-	+	-	-	++	beige-weiß, sonst ähnlich B11/4 aber etwas durchs., wachsen etwas schlechter, kleiner	Wie B11/5 aber nicht so dicht (jünger (n.e.))
682	B11/8	20/8	-	+	-	-	++	wie B11/6	Wie B5/2
683	B11/9	20/8	-	-	-	-	-	weiß-rosa, ggg, undurchs., zerlaufen kaum	Wie B10/36
684	B12/30-1	20/8	-	-	-	++	+	weiß, zerlaufen stark, ggg, wirken schon etwas flüssig, undurchs.	Wie B11/5
685	B12/32	20/8	-	-	-	++	+	beige-weiß, ggg, zerlaufen gut, undurchs.	Wie B11/5
686	B7/5-1	20/8	-	++	-	-	++	durchs. granulös, kaum Wachstum, ggg	Kokken in Häufchen, die meisten 2µm Ø

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
687	B12/41	20/8	-	+	-	++	-	ähnlich B2/25	Wie B7/5-1
688	B12/40	20/8	-	-	-	++	-	ähnlich B2/25	Wie B11/5
689	B7/5-2	20/8	-	++	-	-	++	orange, trüb aber nicht milchig, granulös, (noch milchig orangene Kontaminanten dabei oder ältere K. (n.e.)), zerlaufen etwas, wenig durchs.	Wie B11/5
690	B11/10	20/8	-	+++	-	-	++	weiß, durchs., granulös, zerlaufen sehr gut, ggg	Wie B11/5
691	B11/11	20/8	-	+	-	-	+	weiß-rosa, undurchs., zerlaufen kaum, ggg	Ähnlich B11/5 aber Zellen sehr agil, wenig pleomorph
692	B11/13	20/8	-	+	-	-	+	weiß, zerlaufen nur etwas, undurchs., ggg, tendieren zu beige	Wie B11/11
693	B11/14	20/8	-	+	-	-	+	beige, klein, durchs., granulös, zerlaufen gut	Stark pleomorph wie B11/5
694	B11/17	20/8	+++	+	-	+	-	weiß, Tendenz zu beige, ggg, undurchs., zerlaufen wenig	Wie B11/11
695	B11/18	20/8	+	+	-	+	+	weiß-rosa, zerlaufen gut, undurchs., ggg, sehen wie Tropfen aus	Wie B11/11
696	B11/19	20/8	-	++	-	-	++	grau-weiß, jung beige, alt weiß, etwas durchs., Rand deutlich abgesetzt weiß und außen durchs., zerlaufen etwas, ggg	Wie B11/5
697	B11/20	20/8	-	++	-	-	++	wie /19	Wie B11/5
698	B12/26	20/8	-	+	-	-	++	blass orange, Rand deutlich und granulös, zerlaufen nur etwas, undurchs., rel. klein	Kokken, ~2µm Ø, einzeln, nicht auf Haufen, häufig aufgebläht mit austretendem “Fuß”, ausgelaufen oder Absicht?
699	B12/27	20/8	-	-	++	++	-	heller gelblicher als /26, sonst ähnlich, Rand nicht so deutlich abgegrenzt	Wie B12/26 aber häufiger aneinanderhaftend
700	B12/28	20/8	-	-	-	+	+	wie B10/37 aber kräftiger beige	Wie B11/11
701	B12/29	20/8	-	+	-	+	+	wie /28 aber etwas bräunlicher	Wie B11/5
702	B12/30-2	20/8	-	-	-	++	+	wie -1	Wie B11/5
703	B12/30-3	20/8	-	-	+	+	++	orange, matte Oberfl., gg, undurchs., Rand etwas durchs. und granulös, zerlaufen etwas	Wie B12/27
704	B12/31	20/8	-	-	-	+	+	beige, zerlaufen gut, undurchs., ggg, schmaler heller Rand, sonst gleichm. gefärbt	Wie B11/11
705	B12/33	20/8	-	-	-	++	+	wie /32 aber etwas heller	Wie B11/11
706	B12/36	20/8	-	+	-	+	+	weiß, zerlaufen gut, undurchs., granulös, gg, leicht angeraute Oberfl.	Kurze Stäbchen, extrem aufgequollen, 2 x 3µm, Sphäro. (Kultur schon sehr durchgewachsen?)
707	B12/37	20/8	-	+	-	+	+	innen beige, außen weiß, ggg, zerlaufen nur wenig, undurchs.	Wie B11/11
708	B12/38	20/8	-	+	-	+	+	beige, flach, groß, zerlaufen gut, undurchs., ggg	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2-5µm, sehr agil, zittrig, etwas krumm
709	B12/39	20/8	-	-	-	++	-	weiß-rosa, weniger aufgewölbt als B11/18, flacher, sonst ähnlich, zerlaufen besser	Wie B10/36 aber Zellen 1µm dick
710	B1/1	20/8	-	+	-	-	+	gelb-beige, durchs., granulös, zerlaufen gut, ggg	Kokken mit unregelm. Oberfl., unbew. (n.e.), 2µm ∅
711	B1/10	20/8	-	+	-	-	+	grau-weiß, ggg, granulös, undurchs., zerlaufen etwas	bew. kurze Stäbchen, leicht pleomorph, 1 x 1,5-4µm, keine Ketten, max. 3 aneinander, gleichm. verteilt, haften nicht
712	B3/12-1	12/8	-	-	-	-	-	n.u.	bew. 0,5 x 1-3µm Stäbchen, bilden vereinzelt Ketten aus untersch. langen Zellen, haften nicht
713	B3/12-2	12/8	-	-	-	+	-	n.u.	wie -1 aber weniger Ketten
714	B5/16	20/8	-	++	-	++	+	weiß, undurchs., glitzern meliert, zerlaufen etwas, rel. groß, Rand wellig	ähnlich B3/12 aber Zellen durchschnittlich länger, pleomorph und mehr Sphäro., sehr agil
715	B5/29	20/8	n.e.	+++	-	-	-	weiß-beige, jung durchs., alt undurchs., zerlaufen gut, K.-größe sehr untersch., ggg	½ x 1-10µm Stäbchen, alle in Ketten, einige länger, wahrscheinlich unbew., etwas ungleichm. gerade
716	B5/34	20/8	n.e.	+	+	-	-	kaum Wachstum, durchs., granulös, scheinbar 2 Arten (farblos und gelb)	Kokken in Häufchen, 1,5µm ∅
717	B7/4	20/8	-	+	++	-	++	orange, ggg, undurchs., Ränder klarer und granulös, zerlaufen nur wenig	wie B5/34
718	B8/13-2	12/9,5	-	+	-	-	-	n.u.	sehr kurze Stäbchen, fast Kokken, teilweise aufgebläht oder Gaseinschlüsse, 1 x 1-1,5µm, unbew.
719	B8/34-1	12/8	-	+	-	++	-	beige, zerlaufen stark, färben benachbarte fremde K. dunkler, etwas durchs., ggg	bew. Stäbchen, 0,75 x 2->10µm, sehen schon sehr deformiert aus, viele Zelltrümmer, aufgeblähte Zellen und sehr kleine Bakt. (0,5 x 0,5-0,75µm) = nicht rein (n.e.)
720	B8/34-2	12/8	-	+	-	++	-	wie B8/49-2	wie -1
721	B8/36	12/8	-	+	-	+	-	weiß-rosa, ggg, undurchs., Ränder weißlicher, Mitte rosa, zerlaufen etwas	wie B8/34-1
722	B8/38	12/8	-	++	-	-	++	beige, meliert glitzernd, zerlaufen, etwas durchs.	Stäbchen, vielgestaltig aber dünner als sonst, 0,5 x 2-~30µm in Ketten mit Zellen untersch. Länge, ungleichm. gerade, teilweise aufgebläht, Sphäro.
723	B8/40	12/8	-	+	-	-	-	beige, rel. klein, undurchs., zerlaufen kaum, ggg	ähnlich B8/38 aber Zellen 0,75µm dick und mehr Gaseinschlüsse, scheinbar eher lange Einzelzellen als Zellketten, haften nicht
724	B8/41	12/8	+	++	++	++	-	beige/weiß/beige, Ränder etwas ausgefranst, gg, zerlaufen kaum	Spirillen/Vibrios, 0,5 x 1-5µm, haften nicht
725	B8/42	12/8	+	++	++	++	-	wie B12/24 nur etwas milchiger	wie /41
726	B8/46	12/8	-	-	-	-	-	rosa, ggg, undurchs., zerlaufen nicht	bew. Stäbchen, 0,75 x 2->10µm, auch die längeren Zellen noch bew., raue Oberfl., Gaseinschlüsse, haften nicht, keine Sphäro.
727	B8/47	12/8	-	++	-	-	++	grau-beige, tendieren zu rosa, ggg, zerlaufen nur wenig, Ränder heller, undurchs.	bew. Stäbchen, 0,75 x 1-5µm, Aussehen sonst wie B8/46
728	B8/49-1	12/8	++	+	+	-	+ n.e.	beige, undurchs., Ränder auslaufend gewellt, gg	Spirillen, ¼ x 1-2µm, sehr agil, haften nicht
729	B8/49-2	12/8	-	+	-	++	-	beige, wenig durchs., zerlaufend	wie -1
730	B8/49-3	12/8	-	-	-	++	-	beige, etwas durchs., zerlaufend	wie B8/41
731	B10/1	12/9,5	+	++	++	+++	-	gelblich-beige, durchs., ggg, Ränder heller, zerlaufen kaum	wie B8/41
732	B10/2	12/9,5	+	++	++	+++	-	wie /1	wie B8/41 aber meistens nur 1µm lang
733	B10/3	12/9,5	+	++	-	++	+++	etwas dunkler als B10/1 und weniger durchs., größer	wie B8/41
734	B10/4	12/9,5	-	++	++	+	-	wie B10/1	wie B8/41
735	B10/11-1	12/8	+	++	+	++	+++	weiß-beige, groß, zerlaufen recht gut, kaum durchs.	wie B10/2
736	B10/11-2	12/8	+	++	+	++	+++	beige, glitzern, zerlaufen recht gut, kleiner als -1, kaum durchs.	wie B8/41
737	B10/13-1	12/8	-	-	-	-	-	weiß-beige, ggg, undurchs., Ränder werden beiger, rel. groß, zerlaufen recht gut	wie B8/13-2

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
738	B10/13-2	12/8	-	-	-	-	-	wie -1	wie B8/13-2
739	B10/14	12/8	-	++	-	+	-	gelblich-beige, Ränder gewellt und aufgewölbt, Mitte meliert schimmernd, durchs.	bew. Stäbchen, 1/3 x 2-5µm, alle als Einzelzellen, rel. gerade und gleichm. dick (alte Zellen etwas weniger), haften gut aneinander
740	B10/15	12/8	-	-	-	-	-	rosa-beige, jung durchs., alt undurchs., Ränder auch durchs.	1-0,75 x 1,5->30µm, bew. Stäbchen, sehr raue Oberfl., Gaseinschlüsse, viele Sphäro. und Stäbchenhüllen
741	B10/16	12/8	-	-	-	-	-	beige-weiß, zerlaufen stark, undurchs., ggg	wie B8/13-2
742	B10/18	12/8	-	-	-	-	n.e.	beige, zerlaufen wenig, Rand durchs., Mitte undurchs., ggg	wie B8/13-2 aber längere und aufgeblähtere Zellen dabei, Sphäro.
743	B12/2	12/9,5	-	++	-	-	-	orange, undurchs., ggg, zerlaufen wenig	Kokken, 1µm ∅, häufig einzeln oder zu 2., sonst in Häufchen
744	B12/3	12/9,5	-	+	-	-	-	rosa-weiß, ggg, undurchs., Ränder dunkler, Mitte dunkler, zerlaufen etwas, groß	wie B8/13-2 aber mehr längere Zellen dabei, 1-3µm Länge, Sphäro., bew.
745	B12/4-1	12/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	unbew. Stäbchen, schrumpelig, nicht gerade, 0,75 x 2-10µm, haften gut
746	B12/5	12/9,5	+	++	+	+	+++	beige, ggg, Ränder durchs., sonst undurchs., zerlaufen recht gut, flach	wie B10/2
747	B12/9	12/9,5	+	+	+	++	-	wie B6/1-2 aber etwas milchiger an den Rändern	wie B10/2
748	B12/10-1	12/8	+	++	++	+	-	weiß-beige, durchs., rel. klein, ggg	wie B8/49-1
749	B12/10-2	12/8	+	++	++	+	-	wie B6/1-2	wie B8/41
750	B12/11	12/8	+	++	++	++	-	weiß-beige-rosa, ggg	wie B8/41 (in die eine Richtung schwimmend rel. gerade ohne den Körper zu winden, in die andere Richtung schwimmend schraubig)
751	B12/12	12/8	-	-	-	-	-	beige, ggg, zerlaufen nicht	wie B8/46 sehr agil
752	B12/13	12/8	-	-	-	-	-	beige-rosa, ggg, zerlaufen gut	bew. lange Stäbchen wie B12/4-1 aber noch kurze Stäbchen dabei die ähnlich sind wie B8/13-2 = unrein (n.e.)
753	B12/14-1	12/8	+	++	++	+++	-	weiß-beige, rel. groß, zerlaufen gut	wie B8/49-1
754	B12/14-2	12/8	+	++	++	+++	-	heller als /14-1	wie B8/49-1
755	B12/15	12/8	-	-	-	-	-	ähnlich B12/12	Pleomorphie, Zellen haben helle Einschlüsse, bew. Stäbchen, 1 x 1,5->10µm, aufgebläht, schrumpelig, Sphäro., raue Oberfl., Ausstülpungen
756	B12/34-2	20/8	n.e.	+	-	+	+	ähnlich B4/40 aber etwas mehr zerlaufend	kurze Stäbchen, bew., mit Aufblähungen, ~1 x 2µm, gleichm. verteilt, haften nicht
757	B12/35	20/8	n.e.	+	-	-	-	grau-beige, Oberfl. rau, matt, zerlaufen recht gut, Rand schimmert granulös, aufgewölbt (fleischig), undurchs., ganzrandig	wie /34-2
758	B1/33	20/8	n.e.	+	-	-	+++	n.u.	Kokken in Haufen, 1-2µm ∅, unbew.
759	B3/4-1	12/9,5	+	++	-	++	++	n.u.	Spirillen/Vibrios wie B8/41 aber ganz viele Sphäro., (schon alte Kultur?)
760	B3/10	12/8	+	++	+	++	-	n.u.	wie /4-1 aber noch nicht so viele Sphäro., aber schon viele aufgeblähte Zellen
761	B3/16	12/8	+					Beige, wie B8/27-1	wie B8/49-1
762	B3/17	12/8	-					Beige, undurchs., klein, rel. distinkt, Rand wird heller, ggg	bew. Stäbchen, 0,75 x 2->10µm, schrumpelig, raue Oberfl., Gaseinschlüsse, haften gut aneinander
763	B4/22-1	12/8	-	-	-	+ n.e.	-	Beige, zerlaufen stark, ggg, tendiert zu weiß, undurchs.	wie B8/13-2 bew.
764	B8/7-1	12/9,5	-					Rosa-weiß, ggg, etwas zerlaufend, Ränder etwas beige	ähnlich B3/17 aber Zellen kürzer und agiler
765	B8/17-1	12/9,5	+	++	-	+++	-	Wie -4	wie B8/13-2 aber einige lange Zellen dabei (bis 3µm), bew. sehr agil, nicht aufgebläht
766	B8/17-3	12/9,5	+	++	-	-	-	n.u.	kettenbildende Pleomorphe, die stark aneinander haften und Haufen bilden, 1µm dick, unbew. (n.e.), viele Sphäro.
767	B8/28-1	12/8	-	-	+	n.e.	-	n.u.	wie B8/13-2 unbew., aufgebläht
768	B8/28-3	12/8	-	+	-	n.e.	-	n.u.	Stäbchen, 1 x 2-3µm, Gaseinschlüsse, unbew., etwas aufgebläht, gleichm. verteilt
769	B8/30	12/8	-	-	-	+	-	rosa, zerlaufen stark, undurchs., zum Rand hin weißlicher, ggg	Viele Zelltrümmer, kurze Stäbchen, fast Kokken (1µm ∅) bis lange aufgeblähte Stäbchen (~10µm), unbew.
770	B8/31	12/8	+	-	-	-	-	fast völlig durchs., Ränder zerlaufen, ähnlich B8/11 aber kleiner, glatte Oberfl.	sehr dünne bew. Stäbchen, Skalenlinien-dünn, bis >40µm lang, mit Gaseinschlüssen,
771	B8/32	12/8	-	+	-	+	-	beige, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	wie B8/13-2 aber bew. und Zellen länger (2µm), manchmal ganz lange Zellen und Sphäro. (>70µm, durchsichtig und granulös)
772	B8/33	12/8	-	+	-	+	-	beige-rosa, zerlaufen stark	a)wie B8/33 aber weniger lange Zellen, ebenfalls aufgebläht und Sphäro. vorhanden b)bew. Stäbchen, 0,75 x 2-3µm, bew. Kokken 1-1,5µm ∅ und Sphäro. (3µm ∅) unrein oder pleomorph (n.e.)
773	B8/35	12/8	-	-	-	-	-	beige-rosa, wie Knöpfchen, ggg, undurchs., zerlaufen nicht	Stäbchen, 0,75 x 2-sehr lang, alte Zellen raue Oberfl., schrumpelig, aufgebläht und Gaseinschlüsse, haften gut aneinander
774	B8/39-1	12/8	-	+	-	+	-	wie B8/18	Stäbchen, 1 x 3µm, stark deformiert und aufgebläht, bew. aber wenig agil, kleine Stäbchen 0,5 x 1µm = unrein (n.e.)
775	B8/39-2	12/8	-	+	-	+	-	wie B8/44 etwas milchiger, etwas größer	wie -1
776	B8/44	12/8	-	+	-	-	-	beige, zerlaufen, wenig durchs., ggg	ähnlich B8/39-1 aber Zellen dünner (0,5µm)
777	B8/45-1	12/8	-	-	-	-	-	wie B8/11 aber kleiner	wie B8/31 aber Gaseinschlüsse häufiger, Sphäro. gut 1µm∅
778	B8/45-2	12/8	+	+	-	-	-	wie -1	wie -1 aber noch mehr Sphäro.
779	B10/5	12/9,5	++	++	++	+++	-	wie B10/1	n.u.
780	B10/6	12/8	++	++	++	++	-	wie B10/1 aber größer	n.u.
781	B10/7-1	12/8	-	++	+	++	+++	wie B10/1 aber zerlaufen stärker	Spirillen/Vibrios wie B8/41
782	B10/7-2	12/8	-	++	+	++	+++	wie -1	wie -1
783	B10/8	12/8	-	-	+	-	n.e.	altrosa-beige, ggg, zerlaufen nicht, undurchs.	schrumpelige bew. Stäbchen, sehr agil, 0,75 x 1-sehr lang, lange krumme Stäbchen schwimmen im Med. ohne sich zu drehen, lange kräftige Flagelle,

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Koloniemorphologie	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
784	B10/9	12/8	-	++	+	+	+++	wie B10/1 aber weniger durchs., Ränder etwas heller	Spirillen/Vibrios wie B8/41
785	B10/10	12/8	-	-	-	-	n.e.	wie B10/8	0,75 x 1-2µm bew, Stäbchen, sehr agil, einige länger
786	B10/12	12/8	-	-	-	-	-	total flüssig, wie B4/21	stark aufgeblähte Stäbchen, kaum noch als Stäbchen zu erkennen, Sphäro.
787	B11/15	20/8	n.e.	+	+ n.e.	++	+	wie B11/18	Wie B8/17-1
788	B11/29	20/8	n.e.	-	-	-	-	rot, sehr klein, ggg, durchs., zerlaufen	Stäbchen, ¼ x 1-5µm, aufgebläht, deformiert, haften gut am Glas, unbew.
789	B12/1	12/9,5	-						kurze Stäbchen, bew., aufgebläht, 1 x 1-3µm
790	B12/4-2	12/9,5						beige-weiß, zerlaufen nur wenig, undurchs., ggg	Pleomorphie, wie B12/15
791	B12/6-1	12/9,5	++	++	+++	+	+++	beige, durchs., ggg	extrem schnelle Stäbchen, einige sehr aufgewunden, meliert, nicht alle so agil, Kultur schon sehr dicht, viele Stäbchen mit Blase am Ende, Skalierungslinien-dünn, ~3-5µm lang
792	B12/6-2	12/9,5	++	++	++	+	+++	wie -1	wie -1
793	B12/7	12/9,5	+	++	++	+++	n.e.	wie B12/6-1	wie B8/49-1
794	B12/8	12/9,5	+	++	++	+	+++	wie B12/6-1	wie B8/49-1
795	B12/16	12/8	+	+	+++	+	+	wie B12/10-1 etwas heller	wie B8/49-1
796	B12/17	12/8	-	+	-	-	-	rosa-weiß, zerlaufen etwas, undurchs., ggg	wie B10/8
797	B12/18-1	12/8	-	+	-	-	-	beige, zerlaufen kaum, ggg, undurchs.,	Stäbchen, 0,75-1 x 1-1,5µm und einige sehr lange Zellen die auch raue Oberfl. haben und schrumpelig, meliert sind, Sphäro.
798	B12/18-2	12/8	-	+	-	-	-	dunkles altrosa, stark zerlaufend, ggg, undurchs.	melierte aufgeblähte Stäbchen, 1,5 x 7-10µm, Sphäro. und viele Zelltrümmer
799	B12/19-1	12/8	+	+	-	+	-	weiß-beige, Rand klar, der teilweise ausgefranst ist, gg, zerlaufen wenig, wenig durchs., durch Einfluss der Nachbarstämme scheint Ausfransen begünstigt zu werden	bew. Stäbchen, pleomorph, 1µm dick, bilden richtige Gelage

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
800	B12/19-2	12/8	+	+	-	+	-	n.u.	wie -1	wie -1 nur nicht so dicht
801	B12/20	12/8	-	+	-	+	-	n.u.	blass orange, undurchs., Ränder klarer, ggg, zerlaufen nur etwas	Spirillen, Spirochaeten (n.e.), meliert, haften gut am Glas, kaum agil, 1/3 x 1->10µm
802	B12/22	12/8	+	+	+	++	++	n.u.	beige, zerlaufen, flach, ggg, etwas durchs.	wie B8/49-1
803	B12/23-1	12/8	+	+	+	+	++	n.u.	wie /22 aber milchiger	wie B8/41
804	B12/23-2	12/8	+	+	+	+	++	n.u.	wie -1	wie B8/41
805	B12/24	12/8	+	+	+++	++	+	n.u.	beige-gelb, durchs., ggg, zerlaufen kaum	wie B8/49-1 aber schon meliert
806	B12/25	12/8	-	-	-	-	+	n.u.	beige-rosa, durchs., ggg, Rand klar, Mitte glitzert, recht klein	Spirillen/Vibrios (n.e.), 0,5 x 3µm
807	B12/34-1	20/8	n.e.	+	-	+	+	n.u.	beige-rosa, groß, flach, undurchs., zerlaufen gut, hellerer Rand	bew. kurze Stäbchen, 1 x 2µm einige aufgebläht, einige länger, Sphäro.
808	B1/6	20/8	-	+	-	-	+	n.u.	gelb-beige, durchs., granulös, ggg	Zelltrümmer und Sphäro.
809	B3/4-1	20/8	+	++	+	++	+++	n.u.	n.u.	bew. Stäbchen, leicht gebogen bis gerade, 0,75 x 1,5->5µm, sehr weich und flexibel (nicht starr), sehr agil, haften nicht
810	B3/10	20/8	+	+++	-	++	+	n.u.	n.u.	Vibrios, haften fast alle am Glas, 0,8 x 2µm, wenige länger oder kürzer, wenig gewunden, fast eher Stäbchen
811	B4/22-1	12/8	+	++	-	++	-	n.u.	beige, zerlaufen stark, ggg, tendiert zu weiß, undurchs.	bew. Stäbchen, wenig agil, 1 x 2,5-4µm, haften nicht, sehr wenige deformiert (Kultur noch jung)
812	B5/31	20/8	-	-	-	-	-	n.u.	unrein (n.e.), klare durchs. Grundmasse in der kleine weniger klare K. wachsen (oder Trübung mit dem Alter?), Wachstum schlecht	Zelltrümmer und Sphäro.
813	B8/13-2	12/9,5	++	+	-	++	-	n.u.	n.u.	Stäbchen, 1 x 2µm, bew. (n.e.), wenn dann nicht sehr agil, einige schon deformiert und aufgebläht
814	B8/17-1	12/9,5	++	++	-	+++	-	n.u.	Wie -4, beige, matte etwas raue Oberfl., Zellmasse wirkt trocken und bricht auseinander, zerlaufen nicht, undurchs.	bew. Stäbchen, 1 x 1,5-5µm, haften gut, einige schon deformiert
815	B8/17-3	12/9,5	++	++	+	+	-	n.u.	n.u.	(n.e.), hängen so fest in Haufen, dass Form nicht eindeutig zu sehen, wahrscheinlich sehr kurze Stäbchen
816	B8/25-1	12/8	-	++	+++	-	++	n.u.	sehr klein, beige-orange, zerlaufen etwas, ggg, glitzern, durchs.	Kokken in Haufen, 2µm ∅ (schon Sphäro. (n.e.))
817	B8/25-2	12/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Wie -1	wie -1 aber Zellalter variabler, noch junge intakte und alte schrumpelige aufgeblähte Zellen
818	B8/33	12/8	+	++	-	++	-	n.u.	beige-rosa, zerlaufen stark	bew. Stäbchen, 1 x 1,5-4µm, recht agil, wenige deformiert
819	B8/28-1	12/8	++	-	+	+	-	n.u.	n.u.	unbew. (n.e.) Stäbchen, 1 x 1-4µm, ungleiche Teilung
820	B8/28-3	12/8	+	+	-	++	-	n.u.	n.u.	Ähnlich B8/33 aber deformierter
821	B12/1	12/9,5	++	-	++	+	-	n.u.	n.u.	ähnlich B8/33 und sehr agil
822	B12/4-1	12/9,5	++	++	-	+ n.e.	-	n.u.	n.u.	ähnlich B8/28-3 aber Zellen dünner (0,75µm)
823	B8/26-1	12/8	+	++	++	+++	+++	n.u.	beige, groß, flach, zerlaufend, etwas durchs.,	Vibrios, haften gut am Glas, 0,5 x 2µm, einige bilden lange Ketten, sehr agil
824	B8/11	12/8	n.e.	+	+	-	-	n.u.	beige-gelb, durchs, ggg, Ränder stark auslaufend	bew. Stäbchen, 0,75 x 2->5µm, sehr gerade und steif, gleichm. dick, haften recht gut am Glas, Sphäro. 1-1,5µm ∅
825	B12/20	12/8	-	+	-	+	-	n.u.	blass-orange, undurchs., Ränder klarer, ggg, zerlaufen nur etwas	Vibrios, sehr ungleichm. geformt, schon etwas Trümmerhaufen-ähnlich, haften gut, 0,75 x 3µm (einige länger oder kürzer)
826	B12/19-2	12/8	+	+	-	+	-	n.u.	wie -1	bew. Stäbchen, 1,25 x 2->5µm, sehr agil, etwas ungleichm. dick und wellig, flexibel, helle Umrandung (Schleime (n.e.)), haften nicht

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
827	B12/22	12/8	+	+	+	++	++	n.u.	beige, zerlaufend, flach, ggg, etwas durchs.	Spirillen/Vibrios (n.e.), sehr agil, 0,5 x 2->5µm, wie B8/26-1
828	B12/23-1	12/8	+	+	+	+	++	n.u.	wie /22 aber milchiger	wie B8/26-1
829	B12/23-2	12/8	+	+	+	+	++	n.u.	wie -1	wie B8/26-1
830	B12/24	12/8	+	+	+++	++	+	n.u.	beige-gelb, durchs., ggg, zerlaufen kaum	wie B8/26-1
831	B12/25	12/8	-	-	-	-	+	n.u.	beige-rosa, durchs., ggg, Rand klar, Mitte glitzert, recht klein	Spirillen, aber länger als B8/26-1 und einige auch dicker, 0,5 x 3µm, auch einige gerade Stäbchen
832	B9/25	20/8	-	-	-	-	-	n.u.	rosa, nach außen hin weiß, ggg, zerlaufen recht gut, undurchs., Rand granulös, wie getropft, sehr gleichmäßig	bew. Stäbchen, 1 x 2-5µm, teilweise aufgebläht zu Keulen
833	B1/34	20/8	n.e.	+	-	-	++	n.u.		Kokken, 1µm, Aufblähungen bis zu Sphäro.
834	B5/20-1	20/8	-	+	-	-	++	n.u.	Blass-orange, rel. groß, zerlaufen wenig, undurchs., gg, Rand glitzert meliert, Rand etwas wellig	Kurze bew. Stäbchen, 0,75 x 1-5µm, bilden kürzere Ketten in denen die Zellen geknickt aneinander haften, haften gut am Glas
835	B5/20-2	20/8	-	+	-	-	++	n.u.	Blass-orange, klein, zerlaufen recht gut, undurchs., durchs. wenn sehr jung, ggg	Wie -2
836	B5/23	20/8	-	-	-	-	-	n.u.	Ähnlich B5/18, größer (trotzdem noch sehr klein)	Bew. Stäbchen, 0,75 x 2 – sehr lang, Zellen sehr deformiert, aber nur wenige aufgebläht, bilden Ketten wie B5/20
837	B5/31	20/8	-	-	-	-	-	n.u.	Unrein (n.e.), klare durchs. Grundmasse in der kleine weniger klare K. wachsen oder Trübung mit dem Alter?, Wachstum schlecht,	Sehr wenige Kokken, Sphäro., wie B1/34
838	B7/1	20/8	-	++	-	-	-	n.u.	Gelb-beige, durchs., gg, Rand etwas ausgefranst, zerlaufen etwas, granulös	Wie B1/34 und viele Zelltrümmer
839	B7/7	20/8	-	++	-	-	++	n.u.	Beige, durchs., zerlaufen gut, ggg, granulös, klein	Wie B5/23 aber Zellen dicker (1µm)
840	B8/48	12/8	n.e.	-	-	-	-	n.u.	Beige, sehr klein, völlig durchs., Ränder scheinen in der Nähe anderer Stämme auszufransen	Spirillen/Spirochaeten (n.e.), teilweise über 50µm lang, bew. aber wenig agil, wenn kürzer ¼ x 2µm, einige dicker (aufgebläht), Sphäro.
841	B9/9	20/8	-	+	-	-	++	n.u.	Gelb-beige, durchs., zerlaufen gut, granulös, wachsen schlecht	Wie B1/34
842	B9/11	20/8	-	+	-	-	++	n.u.	Wie B9/9	Wie B1/34
843	B9/17	20/8	-	-	-	+++	+	n.u.	Beige-gelb, sehr klein, durchs., zerlaufen gut, granulös	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1-3µm, sehr agil, sehr wenige, Sphäro.
844	B10/38	20/8	-	n.e.	-	+	-	n.u.	Weniger beige als /37 aber weniger weiß als /36, sonst wie /36	Bew. Stäbchen, teilweise in Ketten, 0,75 x 1-2µm, Ketten vielleicht auch Einzelzellen mit Gaseinschlüssen (n.e.), ungleichm. dick
845	B10/24-1	20/8	-	-	-	++	-	n.u.	Weiß, stark zerlaufend, fast flüssig	Wie B10/38
846	B10/31	20/8	-	+	-	-	+	n.u.	Orange-beige, etwas durchs., granulös, zerlaufen gut, ggg	Wie B1/34
847	B4/13-1	12/8	n.u.	n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.	beige, sehr klein, granulös, etwas durchs., zerlaufen gut	bew. Stäbchen, sehr agil, 1 x 1-3µm, selten in Ketten
848	B4/13-2	12/8	n.u.	n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.	größer als -1, beige, undurchs., zerlaufen etwas	bew. Stäbchen, 0,75 x 2-10µm, kaum Ketten
849	B4/13-3	12/8	n.u.	n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.	Mittelding zwischen -1 und -2 aber größer, wie große Ausführung von -1	bew. Stäbchen (langsames Schlagen), etwas über 1 x 1,5-5µm, einige aufgebläht und dadurch deformiert, recht viele Ketten
850	B2/32	20/9,5	-	++	+	-	+++	+	orange-gelb, rel. groß, g, Oberfl. matt, Rand durchs. granulös, zerlaufen wenig, undurchs.	Kokken mehr oder weniger in Haufen, teilweise aufgebläht, unbew., 1,2µm
851	B2/33-1	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	beige, rel. klein, ggg, rel. durchs., zerlaufen etwas	kurze Stäbchen in Ketten, 1 x 1-2µm, unbew. (n.e.), haften alle am Glas
852	B2/37	20/9,5	-	+	-	+	-	n.u.	weiß-beige, flach, undurchs., g, zerlaufen etwas, Oberfl. etwas matt	ähnlich B2/38 aber bew., Stäbchen gleichmäßiger, nicht so schrumpelig
853	B2/38	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß-rosa, zerlaufen stark, fast flüssig, undurchs.	unbew. Stäbchen ungleichm. dick, mit Gaseinschlüssen, 0,5 x 1,5->30µm
854	B2/39	20/9,5	-	-	-	++	+	n.u.	weiß-beige, zerlaufen etwas, ggg, undurchs.	bew. Stäbchen, 0,75 x 2-5µm, ungleichm. dick, Abschnürungen kleinerer Zellen, mehr längere Zellen als B2/42-3
855	B2/41-1	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B2/37, etwas mehr beige	bew. Stäbchen, 0,75 x 2-5µm, ungleichm. dick, Abschnürungen kleinerer Zellen, wie B2/42-3
856	B2/42-3	20/9,5	-	+	-	+	-	n.u.	wie /42-1 aber etwas aufgewölbter	bew. Stäbchen, 0,75 x 2-5µm, ungleichm. dick, Abschnürungen kleinerer Zellen
857	B3/33	20/9,5	-	+	-	+	+	n.u.	beige, undurchs., glatt, glänzend, Rand ausgefranst, zerlaufen gut	bew. Stäbchen, untersch. dick, mit Gaseinschlüssen, ähnlich B2/37
858	B3/34	20/9,5	-	+	-	++	+	n.u.	weiß-beige, flach, zerlaufen etwas, ggg, Oberfl. etwas rissig, wachsen sehr in die Breite, undurchs.	kurze Stäbchen, sehr aufgebläht, teilweise bis zur Unkenntlichkeit, ca. gut 1 x 5µm, unbew. (n.e.)
859	B3/41	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B2/42-3 aber mehr beige, etwas durchsichtiger	ähnlich B2/37, aber lange Zellen seltener
860	B3/43	20/9,5	-	-	-	+	+	n.u.	ähnlich B3/47-1	ähnlich B2/42-3, häufig Gaseinschlüsse
861	B3/44	20/9,5	-	+	-	+++	+	n.u.	beige-gelb, sehr flach, Oberfl. matt, undurchs., wirken etwas granulös	bew. Stäbchen, zittern sehr schnell, sonst ähnlich B2/37, viele Zellen ca. 8µm lang
862	B4/44	20/9,5	-	+	-	-	+	n.u.	weiß-beige, zerlaufen nur etwas, ggg, undurchs.	wie B2/37 aber Zellen nur bis zu 10µm lang
863	B4/49-1	20/9,5	-	-	-	++	+	n.u.	beige-weiß, Oberfl. rau, granulös, hell-dunkel-hell	ähnlich B2/37
864	B4/49-2	20/9,5	-	-	-	++	+	n.u.	beige, zerlaufen etwas, Oberfl. etwas rau, g, wirken etwas schleimig	ähnlich B2/37
865	B5/39	20/9,5	-	+	+	-	+++	+	blass-gelb-orange, rel. groß, Oberfl. etwas matt, g, granulös, zerlaufen kaum, undurchs.	Kokken, sehr groß und leuchtend, alle eng in Häufchen, Einzelzellen wahrscheinlich über 1µm
866	B5/40	20/9,5	-	++	+	-	++	n.u.	orange, Oberfl. etwas matt, g, zerlaufen wenig, undurchs., granulös	wie B5/39
867	B6/47	20/9,5	-	-	-	+++	+	n.u.	weiß-beige, rel. klein, ggg, undurchs., zerlaufen etwas	ähnlich B2/37
868	B7/23	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	wie B3/38, weiß-beige, zerlaufen etwas, ggg, undurchs.	ähnlich B8/74, einige sehr lange Zellen dabei (evt. Ketten (n.e.))
869	B7/26	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	weiß, granulös, sehr klein, jung durchs., zerlaufen gut, Oberfl. etwas wellig, g	sehr dünne bew. Stäbchen, Teilstrich dick und 2-3µm lang (einige > 5µm)
870	B8/68	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß wenn alt, weiß-beige wenn jung, ggg, zerlaufen gut, undurchs.	wie B8/74 aber sehr agil
871	B8/73	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B8/68 aber etwas mehr beige, zerlaufen etwas weniger	Pleomorphie, haften alle so stark aneinander, dass nur große Klumpen zu sehen sind

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
872	B8/74	20/9,5	-	-	-	+++	-	n.u.	weiß-rosa, wie B4/43	sehr kleine kurze Stäbchen, 0,5 x 2-3µm, häufig Gaseinschlüsse, Zellen schrumpelig, unbew. oder wenig agil
873	B8/75	20/9,5	+	++	++	-	+++	n.u.	orange, Oberfl. etwas matt, g, durchs.-granulös am Rand oder wenn jung, zerlaufen wenig	Kokken, > 1µm, alle in Haufen, nicht einzeln, wie B8/76
874	B8/76	20/9,5	-	++	+	-	+++	n.u.	orange-beige, rel. klein, g, Oberfl. etwas matt, zerlaufen wenig, durchs. an den Rändern, granulös	Kokken, > 1µm, alle in Haufen, nicht einzeln
875	B9/34	20/9,5	-	++	+	-	+++	+	blass-orange, g, Oberfl. etwas matt, zerlaufen wenig, granulös und durchs. an Rändern	Kokken ähnlich B11/23 aber seltener in Haufen und stärker aufgebläht
876	B9/36	20/9,5	-	-	-	++	+	n.u.	ähnlich B8/68, weiß wenn alt, weiß-beige wenn jung, ggg, zerlaufen gut, undurchs.	wie B2/37
877	B10/44-1	20/9,5	-	+	+	+	-	+ n.e.	beige-weiß, undurchs., wachsen gut, zerlaufen wenig, g, Oberfl. etwas matt, wirken granulös	bew. Stäbchen, die fast nur aneinander haften, durchschnittl. 0,75 x 3µm, einige länger oder dicker
878	B11/22	20/9,5	-	-	+	-	-	n.u.	weiß, ggg, undurchs., zerlaufen gut	prod. irgendwelche Flocken an denen sie bevorzugt haften, bew. Stäbchen, glatte Oberfl. aber nicht gerade, sonst aber wie B2/37
879	B11/23	20/9,5	-	++	-	-	+++	+	blass-orange, Oberfl. etwas matt, g, Rand granulös und durchs., zerlaufen wenig, undurchs.	kleine Kokken, Einzelzellen < 1µm, in Haufen
880	B11/24-1	20/9,5	-	++	+	-	++	- n.e.	blass-gelb, undurchs., ggg, Oberfl. ganz leicht matt, zerlaufen etwas, Ränder granulös durchs.	Kokken in Haufen, schon sehr aufgebläht und viele schon vereinzelt
881	B12/26	20/9,5	-	-	-	+	-	n.u.		Stäbchen
882	B1/14	20/9,5	-	++	-	+	-	n.u.	weiß-beige, sehr untersch. groß, ggg, undurchs., zerlaufen etwas	wie B2/36
883	B1/17-1	20/9,5	+	++	-	-	+++	n.u.	etwas kräftigere Farbe als /17-2, sonst ähnlich	wie B1/18, Kokken
884	B1/17-2	20/9,5	+	++	-	-	+++	n.u.	blass-orange, Oberfl. etwas matt, undurchs., zerlaufen wenig	wie B11/26, Kokken
885	B1/18	20/9,5	+	++	-	-	++	n.u.	entweder nicht rein oder orange in klarer Grundmasse, zerlaufen etwas, g, Oberfl. etwas matt	Kokken wie B11/26 aber sehr untersch. verteilt, viele in großen Haufen aber auch Einzelzellen
886	B1/21	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	weiß, zerlaufen nur etwas, rel. klein, undurchs., ggg, nur Ränder etwas durchs.	sehr kurze Stäbchen, fast Kokken, 1µm dick, etwas länger, bew. unförmig, manchmal mit Ecken und Ausbuchtungen
887	B1/22	20/9,5	-	-	-	n.e.	-	n.u.	wie B1/14, weiß-beige, sehr untersch. groß, ggg, undurchs., zerlaufen etwas	wie B1/26, Stäbchen
888	B1/26	20/9,5	-	+	-	-	-	n.u.	weiß-grau, ähnlich B9/35-2, wachsen rel. flach	bew. Stäbchen, untersch. dick, teilweise aufgebläht, schrumpelig, bis zu 20µm lang
889	B1/30	20/9,5	-	+	-	-	+	n.u.	cremefarbend, flach zäh, undurchs., zerlaufen recht gut, Oberfl. leicht matt, g	wie B9/31, Stäbchen
890	B1/31	20/9,5	-	+	-	-	+	n.u.	etwas dunkler als B1/30 und kleiner	wie B9/31, Stäbchen
891	B2/33-2	20/9,5	-	+	-	n.e.	-	n.u.	beige-weiß, rel. klein, zerlaufen etwas , wenn jung etwas durchs., Oberfl. etwas rau aber glänzend, g	wie B10/46 und bew., Stäbchen
892	B2/36	20/9,5	-	-	-	n.e.	-	n.u.	beige-weiß, flach, klein, undurchs., zerlaufen etwas	Bew. Stäbchen, 0,5 x 1,5-> 15µm, ähnlich B9/31 aber wirken sehr steif
893	B3/38	20/9,5	-	-	-	+	-	n.u.	wie B2/39, weiß-beige, zerlaufen etwas, ggg, undurchs.	bew. Stäbchen, teilweise sehr deformiert, 0,75 x 2-10µm, sehr agil aber langsame Bew.
894	B3/40	20/9,5	-	-	-	+++	-	n.u.	wie B4/50, weiß-rosa, zerlaufen stark, ggg, jüngere etwas durchs.	wie B10/46, Stäbchen
895	B3/42	20/9,5	+	-	-	+	-	n.u.	wie B2/36, beige-weiß, flach, klein, undurchs., zerlaufen etwas	0,75 x 4-5µm, bew. Stäbchen, einige aufgebläht
896	B3/45	20/9,5	-	++	-	n.e.	++	n.u.	ähnlich B11/23 aber kleiner, blass-orange, Oberfl. etwas matt, g, Rand granulös und durchs., zerlaufen wenig, undurchs.	wie B11/26 aber Haufen sehr klein
897	B4/43	20/9,5	-	-	-	+	-	n.u.	weiß-rosa, zerlaufen sehr stark, fast flüssig, undurchs.	wie B4/50, Stäbchen
898	B4/48	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß-rosa, zerlaufen wie flüssig, ggg, Rand wirkt etwas granulös und durchs.	wie B10/46, Stäbchen
899	B4/50	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß-rosa, zerlaufen stark, ggg, jüngere etwas durchs.	ähnlich B6/41 aber 0,75µm dick, Stäbchen
900	B5/36	20/9,5	-	++	+	-	++	n.u.	wie B3/45 aber kleiner und etwas kräftigere Farbe	Kokken sehr untersch. groß, in Haufen, 1-3µm
901	B5/37	20/9,5	-	-	-	+	-	n.u.	weiß-beige, zerlaufen stark aber nicht ganz so stark wie B4/50 und etwas durchsichtiger	Pleomorphie, 0,75 x bis zu 50µm, bew. aber kaum agil
902	B5/38	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	beige, zerlaufen etwas, wirken trocken, zäh, matt, rel. klein, etwas durchs., g	kettenbildende Stäbchen, finden sich zu dichten Klumpen zusammen, 0,75 x 2-4µm
903	B5/45	20/9,5	-	+	-	n.e.	+	n.u.	sehr klein, beige-weiß, durchs., granulös, zerlaufen etwas	wie B11/26 einige aber bew.
904	B6/36	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß-beige, wie B5/37	wie B6/41, Stäbchen
905	B6/38	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	wie B5/37	wie B6/41, Stäbchen
906	B6/40	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	weiß, klein, ggg, zerlaufen gut, etwas durchs.	ähnlich B10/46, aber bew. und teilweise extrem aufgebläht
907	B6/41	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B5/38 aber größer	stark deformierte Stäbchen mit Aufblähungen und Gaseinschlüssen, ca. 1µm dick und untersch. lang
908	B6/45	20/9,5	-	++	-	-	++	n.u.	wie B11/25	wie B11/25, Kokken
909	B7/24-2	20/9,5	-	-	-	n.e.	+	n.u.	wie B5/45	wie B11/26, Kokken
910	B8/66	20/9,5	-	++	-	-	+++	n.u.	blass-orange, rel. groß, Oberfl. matt, g, zerlaufen etwas, undurchs.	wie B11/26, Kokken
911	B8/72	20/9,5	-	++	-	++	+	n.u.	braun-beige, Rand ausgefranst, Oberfl. leicht matt, undurchs, zerlaufen recht gut	wie B9/31, Stäbchen
912	B9/31	20/9,5	-	-	-	n.e.	-	n.u.	ähnlich B1/30	bew. Stäbchen, 0,75 x 1-50µm, auch lange Stäbchen noch bew., leicht gewellt aber gleichm. dick
913	B9/32	20/9,5	-	++	-	-	+	n.u.	weiß, zerlaufen etwas, ggg, undurchs., sehr aufgewölbt	Pleomorphe in Ketten, die stark geknickt sind, 0,75 x ...µm, einige sehr unförmig
914	B9/38-1	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	beige-weiß, undurchs., rel. klein, zerlaufen etwas, ggg, leicht matte Oberfl.	ähnlich B10/46 aber Zellen häufig schon kokkenförmig kurz und häufig in Ketten, bew.
915	B9/38-2	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.	beige-weiß, zerlaufen stärker als /38-1	ähnlich B10/46 aber Zellen häufig länger und in Ketten, sehr bew. und agil

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
916	B10/46	20/9,5	-	-	-	+++	-	n.u.	weiß-beige, zerlaufen recht gut, ggg, undurchs.	0,75 x 2µm Stäbchen, einige länger, einige mit Gasblasen, unbew. (n.e.)
917	B11/25	20/9,5	-	++	+	n.e.	++	n.u.	gelb-orange, undurchs., gg, Rand etwas granulös durchs., zerlaufen nur etwas, Oberfl. matt	2 versch. Kokken (n.e.), > 1µm in Haufen, < 1µm in Haufen oder Alterungsstadien?
918	B11/26	20/9,5	-	++	-	-	++	n.u.	beige-orange, kleiner als /25, sonst ähnlich, Oberfl. matt	Kokken, 1µm, in Haufen
919	B2/34	20/9,5	-	++	-	n.e.	-	+	blass-orange, sehr klein, granulös	Kokken einzellig, 1µm, nicht sehr rund, einige aufgebläht
920	B3/47-1	20/9,5	-	-	-	-	-	-	weiß-beige, rel. klein und untersch. groß, zerlaufen nur etwas, etwas durchs. granulös, g, Oberfl. leicht matt	unförmige Stäbchen, unbew., teilweise zu Sphäro. aufgebläht, untersch. dick und lang, mehr oder weniger gewellt oder geknickt, ca. 0,5 x 5-10µm oder länger
921	B7/24-1	20/9,5	-	+	-	-	++	-	wie B1/23	kleine Kokken in Haufen, ca. 1µm, wenig aufgebläht
922	B1/13	20/9,5	-	+++	-	-	-	+	weiß-rosa, zerlaufen recht gut, ggg, undurchs.	bew. Stäbchen, 0,75 x 1,2-4µm, wenig agil, haften schlecht, selten mit Gaseinschlüssen
923	B1/19-1	20/9,5	-	++	-	-	-	+	beige, ggg, undurchs., zerlaufen etwas	bew. Stäbchen, zittrig, 0,5 -0,75 x 1,2-> 20µm, gleichm. dick, etwas wellig-schrumpelig, ähnlich B9/31
924	B1/19-2	20/9,5	-	-	-	-	-	+	wie /19-1 aber etwas gelblicher	bew. Stäbchen, zittrig, 0,5 -0,75 x 1,2-> 20µm, gleichm. dick, etwas wellig-schrumpelig, wie B1/19-1 aber viele mit hellen Bläschen, einige Sphäro. dabei
925	B1/24	20/9,5	-	+++	-	-	+++	+	beige-blass-orange, Oberfl. matt, zerlaufen etwas, undurchs., g	Kokken in Haufen, einige schon sehr aufgebläht, 1-3µm
926	B1/27	20/9,5	-	+++	-	-	++	+ n.e.	beige, undurchs., zerlaufen etwas, Oberfl. matt, g	Kokken in Haufen, schon sehr aufgebläht, alt?
927	B1/28	20/9,5	-	+++	-	-	++	+	orange, Oberfl. matt, undurchs., zerlaufen etwas	Kokken in Haufen, einige schon sehr aufgebläht, 1-3µm wie B1/24
928	B2/29	20/9,5	-	+++	-	-	+++	+	beige, später gelb, Oberfl. matt, zerlaufen etwas, undurchs.	Kokken in Haufen, einige schon sehr aufgebläht, 1-3µm wie B1/24
929	B2/42-1	20/9,5						+	ähnlich B3/36-2 aber etwas durchsichtiger	bew. Stäbchen, 0,75 x 1-5µm, etwas schrumpelig, haften schlecht, wenig agil
930	B2/42-2	20/9,5	-	-	-	++	-	+ n.e.	weiß-grau, wie B1/14	bei Gram nur stellenweise Anfärbung, bew. Stäbchen, 0,75 x 1,5-3µm, etwas unförmig, einige mit Gaseinschlüssen
931	B2/43	20/9,5	-	++	-	++	-	-	weiß., ggg, zerlaufen wenig, undurchs.	ähnlich B2/42-1 aber sehr untersch. dick, einige bis zu 10µm lang
932	B3/36-1	20/9,5	-	-	-	++	-	-	ähnlich B3/36-2 aber kleiner	ähnlich B1/19-1, bew. Stäbchen, zittrig, 0,5 -0,75 x 1,2-> 20µm, gleichm. dick, etwas wellig-schrumpelig
933	B3/36-2	20/9,5	-	-	-	++	-	n.e.	weiß, undurchs., zerlaufen etwas, Ränder nur wenig durchs. granulös	Stäbchen unbew. (n.e.), 0,75 x 1-5µm, wenige länger, einige in Ketten
934	B3/36-3	20/9,5	-	+	-	-	+	+ n.e.	scheint noch eine Mischung aus -1 und -2 zu sein	lange unförmige Zellen mit Gaseinschlüssen, blähen auf zu Sphäro. , 1µm dick
935	B5/41	20/9,5	-	+++	-	-	+++	+	blass-orange, Oberfl. etwas matt, zerlaufen etwas, Ränder durchs. granulös, g, undurchs.	Kokken in Haufen
936	B5/42	20/9,5	-	+++	-	-	+++	+	wie /41	Kokken in Haufen, noch sehr viele kleine Zellen, die einzeln oder zu zweit sind
937	B5/43	20/9,5	-	+++	-	-	++	+	orange, ähnlich /41 aber kleiner	Kokken in Haufen, noch sehr viele kleine Zellen, die einzeln oder zu zweit sind
938	B6/43	20/9,5	-	++	-	-	+	+	orange, Oberfl. aber glatt, gg, undurchs. außer wenn jung, wirken flüssiger als die anderen orangen Isolate	Kokken in Haufen, noch sehr viele kleine Zellen, die einzeln oder zu zweit sind
939	B7/15	20/9,5	+	-	-	++	-	-	beige, zerlaufen gut, ggg, Ränder etwas heller, undurchs.	bew. Stäbchen, sehr agil aber einige auch schon sehr unförmig, 0,5-0,75 x 1-4µm
940	B7/16	20/9,5	-	+	+	n.e.	++	+	gelb-weiß, undurchs., rel. klein, Oberfl. matt, gg, zerlaufen etwas	Kokken in Haufen
941	B8/70-1	20/9,5	-	+++	-	-	+	- n.e.	ähnlich B9/33 aber kleiner	Kokken in Haufen schon sehr viele aufgebläht
942	B8/79	20/9,5	-	-	-	++	-	-	ähnlich B3/36-1 aber helleres weiß	stark aufgeblähte Stäbchen, viele in Ketten, 1 x ...µm
943	B9/33	20/9,5	-	+++	-	-	+++	+ n.e.	beige, groß aber nur sehr wenige K., g, Oberfl. matt, zerlaufen etwas	Kokken in Haufen schon sehr aufgebläht
944	B9/35-1	20/9,5	-	++	-	-	+	+	orange, zerlaufen wenig, undurchs., Oberfl. matt	Kokken in Haufen
945	B9/35-2	20/9,5	-	+	-	-	++	+	orange-beige, kleiner als -1 sonst ähnlich	Kokken in Haufen
946	B11/24-2	20/9,5	-	++	+	-	+	+	blass-gelb bis beige, sonst wie /24-1	große und kleine Kokken in Haufen, ähnlich B5/42
947	B11/27	20/9,5	-	++	-	-	+++	+	beige, undurchs., zerlaufen etwas, Oberfl. matt, g	Kokken in Haufen
948	B11/28	20/9,5	-	++	-	-	+++	+	orange-beige, wie B9/35-2	Kokken in Haufen
949	B10/44-2	20/9,5	-	+	+	+	-	n.u.	beige, granulös durchs., wachsen schlecht	ungleichm. dicke Stäbchen, bew., teilweise mit Blasen (Gaseinschlüsse (n.e.)), 0,75 x 2-10µm, nicht gerade
950	B1/23	20/9,5	-	++	+	-	++	+	sehr sehr klein, beige oder orange	Kokken zu wenigen in Haufen oder allein, 1µm
951	B1/29	20/9,5	-	-	-	-	-	+ n.e.	rot, völlig furchig und rau, wie zusammengeknittert, rel. klar	Kokken in sehr großen (makroskopischen)Haufen , Flocken in Fl.-Kultur sichtbar, Einzelzelle 1µm
952	B1/16	20/9,5	-	++	-	-	++	+	gelb, wachsen schlecht, Rand granulös durchs., Oberfl. etwas matt, g	Kokken in Haufen, 1µm
953	B3/47-2	20/9,5	-	+	-	-	-	-	sehr sehr klein, beige, durchs. granulös	bew. Stäbchen, wenig agil, sehr schrumpelig, teilweise schon aufgedreht wie Spirillen
954	B5/47	20/9,5	-	-	-	-	-	+	gelb-orange, sehr klein, Oberfl. matt, wenn jünger oder an den Rändern durchs. granulös, zerlaufen etwas, g	Kokken in Haufen, 1µm
955	B1/36	30/8	-	++	-	+	++	n.u.	gelb-orange, trüb, undurchs., ggg, zerlaufen gut	Kokken, 1-1,5µm, in ungleichm. großen Haufen, auch einzeln
956	B1/39	30/8	-	++	-	-	n.e.	n.u.	weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas	unbew., Pleomorphie, Kokken bis Stäbchen in Ketten, die sich dann zu Häufchen zusammenwickeln, 1µm dick
957	B1/40	30/8	-	++	-	-	n.e.	n.u.	wie B1/39 weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas	ähnlich B1/39 aber Stäbchen max. länger, bew., Zellen etwas dicker, 1,25µm
958	B1/41-1	30/8	-	++	-	-	-	n.u.	glitzern meliert, Ränder etwas eckig, Oberfl. genauso, durchs., weiß-beige	ähnlich B1/39 aber Zellen dünner, bew., 0,75µm dick, bilden eher nur Ketten, liegen nicht in Haufen
959	B1/41-2	30/8	-	-	++	-	-		blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	Stäbchen, sehr gerade, nur 1/3 x 1.5-5µm, bew., an den Enden Gasbläschen oder abgeschnürt, Sphäroblasten bis 2µm

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
960	B1/42-1	30/8	-	++	-	-	n.e.	n.u.	ähnlich B1/39 (weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas) aber größer und wirken trockener	ähnlich B1/39
961	B1/43-1	30/8	-	-	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie /42-2
962	B1/43-2	30/8	-	-	++	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie /42-2
963	B1/44-1	30/8	-	+	-	+	-	n.u.	blass-gelb, zerlaufen gut, Oberfl. matt, gg	Kokken, 1µm, in ungleichm. großen Haufen oder Ketten, wenige Sphäroblasten
964	B1/45	30/8	-	-	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie B1/42-2
965	B1/48-2	30/8	-	++	-	-	n.e.	n.u.	wie B1/39 weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas	wie B1/39
966	B1/50	30/8	-	-	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	ähnlich B1/42-2 viele Kokkenähnliche aber nicht rund und Stäbchen
967	B1/53	30/8	-	-	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie B1/50
968	B2/41-2	30/8						n.u.		unförmige aufgeblähte Stäbchen, bew., 0.75-> 1 x 1.5-4µm, mit Gaseinschlüssen
969	B5/56-1	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	weiß-beige, meliert, Oberfl. etwas matt	ähnlich B1/39, ½ µm dick, bew., 1-> 5µm lang, teilweise gebogen und unförmig
970	B5/56-2	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	sehr untersch. groß, nicht rein?, ähnlich wie -1	ähnlich B1/39 bzw. -1, Zellen läufig in Ketten und Haufen
971	B5/57-1	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B1/39 (weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas)	sehr agile untersch. lange Stäbchen, ähnlich B5/56-1, starke Salzkristallbildung, 1/3 x 1-3µm
972	B5/57-2	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B1/39 (weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas)	bew. Pleomorphie, sehr viele kurze Stäbchen, fast schon Kokken, sehr unförmig, sehr agil, 0.75 x 1-3µm
973	B5/58-1	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	ähnlich B1/39 (weiß-beige, Oberfl. etwas rau, gg, wie B1/40, durchs., erst später trüb, zerlaufen etwas)	wie /57-2 aber sehr viele Ketten und Haufen, mehr Stäbchen als in /57-2
974	B5/58-2	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	weiß, schlei8mig, stark zerlaufen, undurchs., ggg	kurze bew. Stäbchen, 0.5 x 1-1.5µm
975	B5/58-3	30/8	-	-	-	-	++	n.u.	rot, schleimig, stark zerlaufen, nicht krümelig wie B1/41-2, durchs.	Pleomorphie, Stäbchen 1 x bis zu 5µm, die meisten aber eher eckige Kokken
976	B5/60	30/8	-	-	-	-	+	n.u.	rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	bew. kurze Stäbchen oder eher Flundern, sehen platt aus, ca. 1 x 0.25µm, auch normale Stäbchen, 0.25 x bis zu 3µm
977	B5/61	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	rot, rau, zerfurcht	Tetraden in großen Haufen, 1µm
978	B5/62	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	bew. Stäbchen, starke Salzkristallbildung, 0.5 x 3-5µm, einige kürzer, teilweise sehr deformierte Stäbchen, unrein oder untersch. Alter?
979	B7/32	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B5/58-3 rot, schleimig, stark zerlaufen, nicht krümelig wie B1/41-2, durchs.	ähnlich B5/62 aber mehr von den deformierten kürzeren Stäbchen
980	B7/37	30/8	-	-	-	-	++	n.u.	rot, ggg, etwas krümelig im Innern, wie Mittelding zwischen B5/60 und B5/58-3	wie B5/60
981	B7/38	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	blass-rot, zerlaufen stark, durchs., ggg	unrein oder pleomorph?, kurze fast kugelige Stäbchen, 1 x 1.25µm, deformierte Stäbchen, teilweise abgeflacht an einigen Stellen, 0.5-0.75 x 2-5µm, und solche wie in B5/60
982	B9/43	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	kurze bew. unförmige Stäbchen, 0.75 x 1-2µm
983	B9/47	30/8	-	+	-	-	++++	n.u.	wie B5/60 rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	wie /43 aber Zellen etwas größer, 1 x 1-3µm
984	B9/48	30/8	-	-	-	-	+++	n.u.	wie B5/60 rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	wie B5/60
985	B11/30	30/8	-	++	+ n.e.	-	-	n.u.	alt-beige bis orange, zerlaufen etwas, ggg, gutes Wachstum	Tetraden und einzelne Kokken, 1µm
986	B11/41-1	30/8	-	+	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	bew. Stäbchen ähnlich B1/41-2 aber dicker, 1/3 bis 0.5µm x 2-5µm, unrein oder untersch. Alter? da noch kleine unförmigen Zellen und Sphäroblasten dabei
987	B11/41-2	30/8	-	++	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie -1
988	B11/41-3	30/8	-	++	+	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	bew. Stäbchen, 0.75 x 2µm, einige wieder wie B5/60, starke Salzkristallbildung
989	B11/42	30/8	-	+	-	-	++	n.u.	rot-rosa, sonst ähnlich B1/41-2 (blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg)	ähnlich B11/41-1 und B9/47
990	B11/43-1	30/8	-	-	-	-	+	n.u.	wie B5/60 rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	wie B5/60
991	B11/43-2	30/8	-	-	-	-	+	n.u.	wie B5/60 rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	wie B5/60
992	B11/44	30/8	-	+	-	-	++	n.u.	wie B5/60 rot, krümelig, aber nicht zerlaufend, durchs., ggg	Größe zwischen B9/43 und B9/47
993	B11/45	30/8	-	+	-	-	++	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	wie B9/47
994	B11/47	30/8	-	-	-	-	++	n.u.	wie B7/31 aber noch recht gutes Wachstum	wie B5/60
995	B12/42-1	20/9,5	-	-	-	++	-	n.u.		bew. große Stäbchen, 0.75 x 1-> 10µm, selbst lange Stäbchen noch bew.
996	B12/42-2	20/9,5	-	-	-	+	-	n.u.		wie -1
997	B12/42-3	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.		wie -1 aber Zellen dicker, 1µm
998	B1/42-2	30/8	-	-	++	-	-	n.u.	wie B1/41-2 blass-rot, durchs., krümelig im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	bew. kurze Stäbchen , 0.75 x 1-2µm, Gaseinschlüsse, unförmig, Sphäroblasten, wenige länger
999	B1/47	30/8	-	-	-	-	+++	n.u.	sehr sehr klein, kaum Wachstum, Farbe (n.e.)	fast nur Salz, keine geordneten Zellstrukturen auszumachen
1000	B7/25	20/9,5	-	-	-	-	-	n.u.		bew. Stäbchen, 1 x 3-5µm, einige aufgeblähter und dicker
1001	B7/30	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B1/46 sehr sehr klein, rot, restl. Merkmale (n.e.)	unförmige Kokken bis Stäbchen, teilweise eckig, ca.1µm, bew., scheinen wie B5/60 zu sein
1002	B9/44	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B1/41-2, blass-rot, durchs., granulös im Innern, zerlaufen sehr gut, ggg	ähnlich B7/30 aber mehr Stäbchen und Zellen etwas größer
1003	B9/50-1	30/8	-	-	-	-	+++	n.u.	wie B7/31 sehr klein, rot-rosa, durchs., restl. Merkmale (n.e.)	ähnlich B1/47, fast nur Salz aber einige Zellen wie in B7/30 zu erkennen
1004	B1/44-2	30/8						n.u.	rot, durchs., zerlaufen sehr gut, ggg	bew. Stäbchen, 0,5 x 2-5µm, einige wirken wie abgeschnürt oder eingefallen
1005	B1/48-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	blass-rot, ggg, zerlaufen sehr stark	bew. Stäbchen, teilweise abgeflacht, 0,5-1 x 2-> 10µm, Dreiecke auch dabei, blähen unter dem Mikroskop auf?!
1006	B5/50-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	gelb, undurchs., ggg, zerlaufen gut	bew. Kurzstäbchen teilweise fast Kokken, einige aber aufgebläht oder ungleichmäßig geformt, häufig 2 unförmige aneinander

Nr.	Stamm	NaCl [%]/pH	DNase	RNase	Prote-ase	Ester-ase	Amyl-ase	Gram	Koloniemorphologie (Agar-Platte)	Geruch, Zellmorphologie (Flüssigkultur)
1007	B5/50-3	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot, durchs., ggg, zerlaufen gut	„Flundern“, bew. flache Stäbchen, ca. 1µm breit und Teilstrich dünn, kaum längere Stäbchen
1008	B5/50-4	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot, aber heller als -3, durchs. granulös, zerlaufen stark, ggg	ähnlich -3 aber nicht so flach
1009	B7/36-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot, durchs, ggg, zerlaufen gut, scheinen fest auf Agar verankert zu sein, können mit Impföse nicht richtig aufgenommen werden	Zellen etwas größer als B5/50-3 und -4
1010	B7/36-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	rot, durchs., aber schlechteres Wachstum als /36-2, scheinen auch nicht am Agar zu haften, ggg	wie B5/50-3
1011	B11/31-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	gelb, wenig durchs., sehr flach wachsend	bew. Pleomorphe Stäbchen, also untersch. lang und dick, 0,5 µm breit, in Ketten, die sehr verklumpen, bilden kleine Haufen
1012	B9/39	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	gelb, wenig durchs., zerlaufen gut	kurze bew. Stäbchen, teilweise in Ketten, 0,75 x 1-1,5µm
1013	B11/31-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	ähnlich -1 aber größere Kolonien, besseres Wachstum	Ähnlich -1 aber mehr längere Zellen dabei und agiler
1014	B11/33-1	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	ähnlich B9/39	bew. Stäbchen, 0,75 x 1,25-3µm
1015	B11/33-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	gelb, wenig durchs., ggg, zerlaufen gut	Ähnlich -1
1016	B11/37	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		sehr agile bew. Stäbchen, leicht pleomorph und schrumpelig, auch kokkoide Kurzstäbchen dabei, 0,5 x bis zu 4µm, einige in Ketten
1017	B5/50-2	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	farblos, durchs., ggg, schlechtes Wachstum	bew., Pleomorphie, häufig in Ketten, sehr vielgestaltig, Stäbchen ca. 0,5 x 2-3µm
1018	B5/53	30/8	-	-	-	-	-	n.u.	wie B1/39 aber kleiner	bew. Stäbchen, 0,5 x 1,5-3µm, teilweise auch bis zu 1µm dick und über 5µm lang, alle Zwischengrößen da, Vibrio (n.e.)
1019	B9/41	30/8	-	-	-	-	n.e.	n.u.	ähnlich B5/58-1	Teilstrichdünne Stäbchen, teilweise in Ketten, 3-4µm lang, unbew. (n.e.)
1020	B9/45	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	wie B5/60, aber schlechteres Wachstum	Kokken bis Diskusförmige, ca. 1µm, wirken häufig dreieckig, wie B5/60
1021	B9/50-2	30/8	-	-	-	-	+++	n.u.	wie B7/31	unbew. (n.e.) schrumpelige Stäbchen, sehen sehr ramponiert aus, haften alle am Glas, Gaseinschlüsse, ungleichm. Oberfl., ca. 0,75 x 3-5µm, teilweise bis 10µm lang
1022	B11/46	30/8	-	-	-	-	+	n.u.	rot, sehr trockene matte Oberfl., zerlaufen kaum, undurchs., gg	plattgedrückte Stäbchen bis dreieckig, wie B5/60, Stäbchen 1/3 x 2-3µm, bew., viele Kokken dabei (0,75µm)
1023	B1/37	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		wenige bew. Stäbchen, 0,5-0,75 x 2-3µm, wenige in Ketten, sehr viele kantig wirkende Kokken, Sphäro. 1-2µm
1024	B1/46	30/8	-	-	-	-	+	n.u.	sehr, sehr klein, rot, restl. Merkmale (n.e.)	1/3µm dünne Stäbchen, unbew. (n.e.), scheinen etwas abgeflacht zu sein, 3 bis 20µm, evt. Ketten (n.e.), meliert = Gaseinschlüsse?, einige kurze dicke Stäbchen dabei = unrein? quellen unter Mikroskop scheinbar auf (Wärme?)
1025	B5/59	30/8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	kurze Stäbchen, bew., 0,75 x 2-3µm, wenig agil, leicht meliert

n.u. = nicht untersucht
n.e. = nicht eindeutig
ggg = glatt, ganzrandig, glänzend
bew. = beweglich

Tab. C: Enzymgruppen mit der EC-Codierung 3.1 und deren Enzyme (Reaktion mit Esterbindungen; Quelle: White & White, 1997)

EC-Code der Gruppe	Name der Gruppe	Name der Enzyme
3.1.1	Carboxylic ester hydrolases	Carboxylesterase, arylesterase, triacylglycerol lipase, phospholipase A_2, etc.
3.1.2	Thiolester hydrolases	hier nicht aufgeführt
3.1.3	Phosphoric monoester hydrolases	–"–
3.1.4	Phosphoric diester hydrolases	–"–
3.1.5	Triphosphoric monoester hydrolases	–"–
3.1.6	Sulfuric ester hydrolases	–"–
3.1.7	Diphosphoric monoester hydrolases	–"–
3.1.8	Phosphoric triester hydrolases	–"–
3.1.11	Exodeoxyribonucleases producing 5`phosphomonoesters	Exodeoxyribonuclease I/III/(lambda-induced)/(Phage SP3-induced)/V/VII
3.1.13	Exoribonucleases producing 5`phosphomonoesters	Exoribonuclease II/H, Oligonucleotidase, Poly(A)-specific Ribonuclease
3.1.14	Exodeoxyribonucleases producing 3`phosphomonoesters	Yeast RNase
3.1.15	Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5`phosphomonoesters	Venom Exonuclease
3.1.16	Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 3`phosphomonoesters	Spleen Exonuclease
3.1.21	Endodeoxyribonucleases producing 5`phosphomonoesters	Deoxyribonuclease I/IV (phage-T_4-induced)/V, type I site-specific Deoxy-ribonuclease, type II site-specific Deoxyribonuclease, type III site-specific Deoxyribonuclease, CC-preferring Endodeoxyribonuclease,
3.1.22	Endodeoxyribonucleases producing other than 5`phosphomonoesters	Deoxyribonuclease II/X, *Aspergillus* Deoxyribonuclease K_1, crossover junction Endoribonuclease
3.1.25	Site-specific endodeoxyribonucleases specific for altered bases	DNase (Pyrimidin-dimer)
3.1.26	Endoribonucleases producing 5`phosphomonoesters	*Physarum polycephalum* Ribonuclease, Ribonuclease α/III/H/P/IV/P4/M5/[poly-(U)-specific]/IX
3.1.27	Endoribonucleases producing other than 5`phosphomonoesters	Ribonuclease T_1/T_2/U_2/F/V, *Bacillus subtilis* Ribonuclease, pancratic Ribonuclease, *Enterobacter* Ribonuclease, tRNA-intron Endonuclease, rRNA Endonuclease
3.1.30	Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5`phosphomonoesters	*Aspergillus* Nuclease S_1 *Serratia marcescens* Nuclease
3.1.31	Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 3`phosphomonoesters	Micrococcal Nuclease

PAGE der Fraktionen aus der Reinigung der SJ1/4-Nuclease

Auf die Polyacrylamidgele in den Abbildungen B (native PAGE) und C (SDS-PAGE) wurden Proben aus den selben Versuchsansätzen aufgetragen. Lediglich die Probenmengen wurden leicht korrigiert. Die Spuren sind direkt miteinander vergleichbar. Abbildung A (native PAGE) zeigt Proben aus zu den Abbildungen B und C verschiedenen Versuchsansätzen. Fraktionen, in denen DNase-Aktivität nachweisbar war, sind in allen drei Abbildungen mit * markiert. In den Abbildungen sind Banden, die besonderer Beachtung bedürfen, markiert.

In Abb. D ist das Ergebnis des Überschichtungsversuchs zum *in-situ*-Nachweis der SJ1/4-DNase in Polyacrylamidgelen gezeigt.

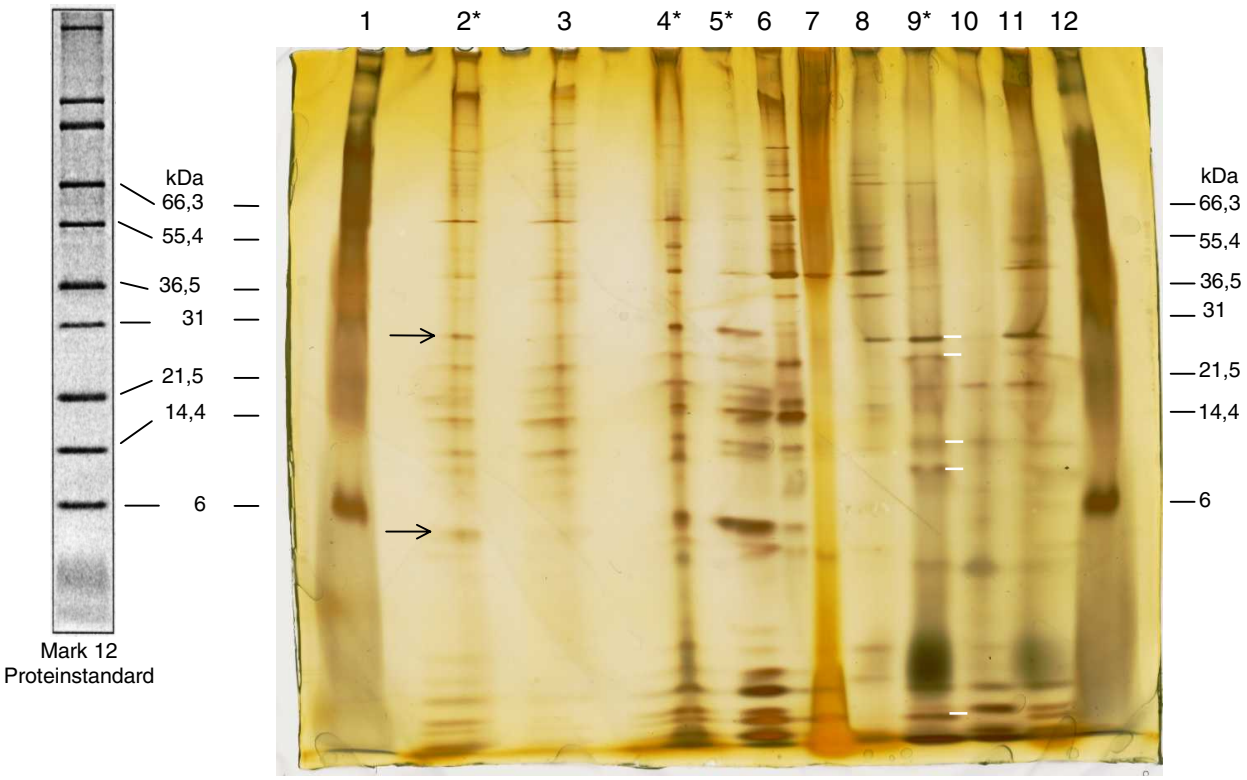

Abb. A: Silbernitrat-gefärbtes Gel einer nativen PAGE (12% Tris-Glycin-Gel, pH 8,3). Auftragung verschiedener Proben des SJ1/4-Kulturüberstands. Links vom Gel zum Vergleich die Auftrennung des Markers laut Hersteller in 4 bis 20%igen Tris-Glycin-Gelen. * = enthielt DNase-Akt. im *In-vitro*-Test
Spur 1: Marker
Spur 2: 5 µl ultrafiltriertes (2-fach-konzentriert mit PM30) Kulturüberstand-Retentat
Spur 3 und 4: Ammoniumsulfat-Fällung der Probe wie Spur 2; Spur 3: 2 µl in 4% des Ausgangsvolumens resuspendiertes Präzipitat, Spur 4: 10 µl Überstand
Spur 5 und 6: Eluat aus Gelfiltration mit Sephadex G-200; Spur 5: 10 µl der vereinigten Fraktionen mit DNase-Aktivität (II, Abb. 44), Spur 6: 10 µl der vereinigten Fraktionen mit Elution vor der Nuclease (I, Abb. 44)
Spur 7-10: resuspendierte Präzipitate aus der fraktionierten Ethanol-Fällung: Spur 7: 50% EtOH, resuspendiert in 2% des Ausgangsvolumens, 2 µl Auftragungsvolumen; Spur 8: 66% EtOH, resuspendiert in 4% des Ausgangsvolumens, 5 µl Auftragungsvolumen; Spur 9: 75% EtOH, resuspendiert in 4% des Ausgangsvolumens, 5 µl Auftragungsvolumen; Spur 10: 80% EtOH, resuspendiert in 4% des Ausgangsvolumens, 5 µl Auftragungsvolumen
Spur 11: 4 µl in 6% des Ausgangsvolumens resuspendiertes Präzipitat einer nichtfraktonierten Fällung mit 80% EtOH
Spur 12: Marker

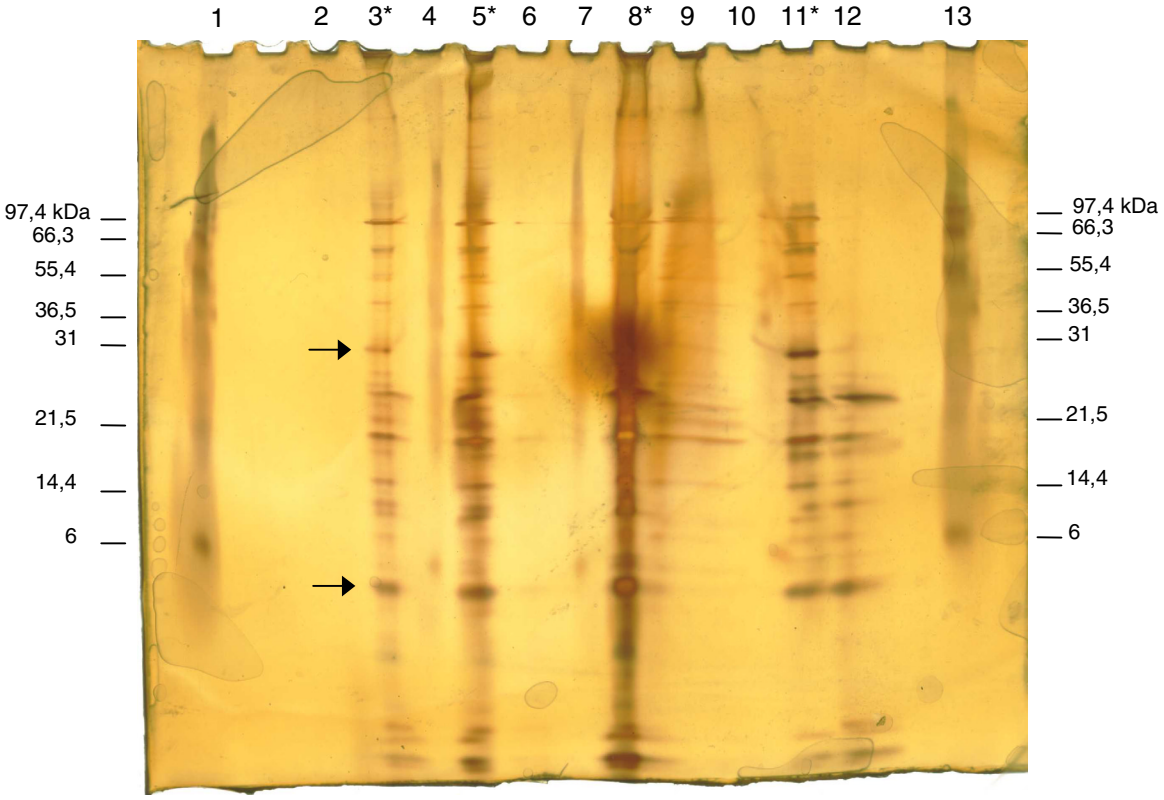

Abb. B: Silbernitrat-gefärbtes Gel einer nativen PAGE (12% Tris-Glycin-Gel, pH 8,3). Auftragung verschiedener Proben des SJ1/4-Kulturüberstands. * =enthielt DNase-Akt. im *In-vitro*-Test
Spur 1: Marker
Spur 2: 10 µl SML
Spur 3: 10 µl sterilfiltrierter Kulturüberstand
Spur 4: Marker
Spur 5 und 6: ultrafiltrierter (9,5-fach-konzentriert mit PM30) Kulturüberstand; Spur 5: 3µl Retentat, Spur 6: 10 µl Filtrat
Spur 7: Marker
Spur 8 und 9: Ammoniumsulfat-Fällung; Spur 8: 10 µl Überstand, Spur 9: 3 µl in 5% des Ausgangsvolumens resuspendiertes Präzipitat
Spur 10: Marker
Spur 11 und 12: Eluat aus Gelfiltration mit Sephadex G-200; Spur 11: 10 µl der vereinigten Fraktionen mit DNase-Aktivität (II, Abb. 44), Spur 12: 10 µl der vereinigten Fraktionen mit Elution nach der Nuclease (III, Abb. 44)
Spur 13: Marker

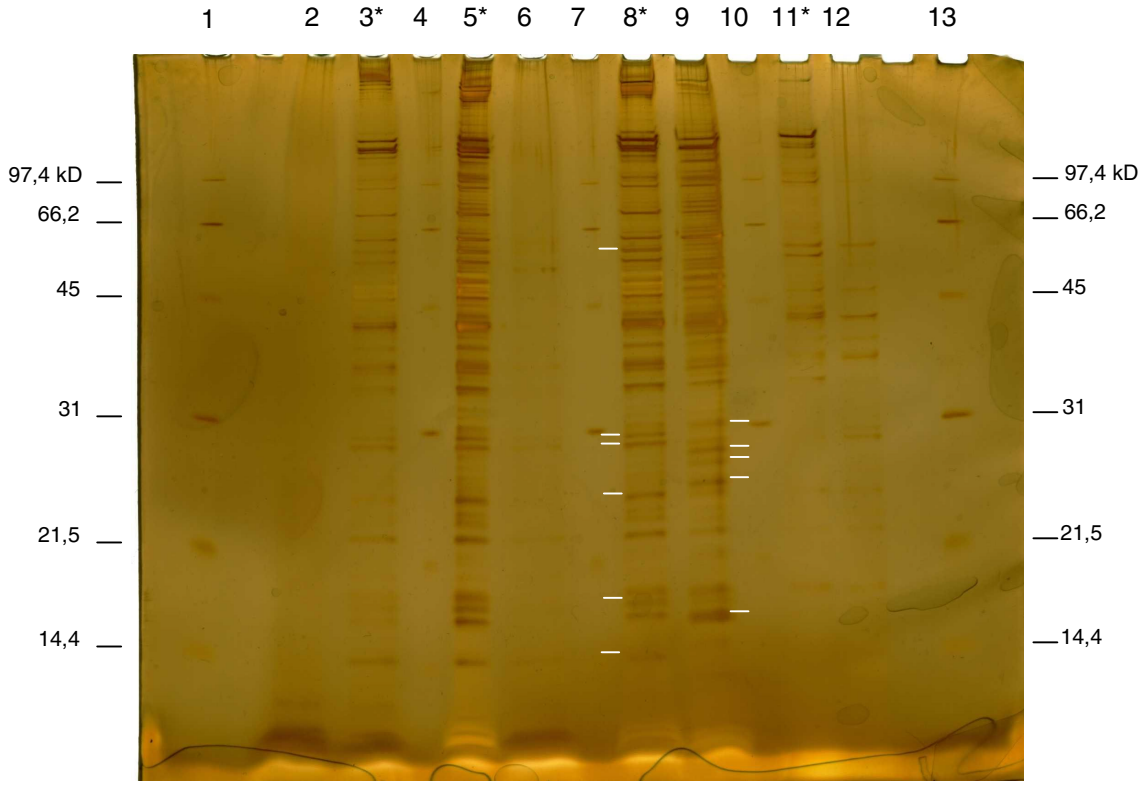

Abb. C: Silbernitrat-gefärbtes Gel einer denaturierenden reduzierenden SDS-PAGE (12% Bis-Tris-Gel). Auftragung verschiedener Proben des SJ1/4-Kulturüberstands (s. a. Abb.). * = enthielt DNase-Akt. im *In-vitro*-Test
Spur 1: Marker
Spur 2: 9 µl SML
Spur 3: 9 µl sterilfiltrierter Kulturüberstand
Spur 4: Marker
Spur 5 und 6: ultrafiltrierter (9,5-fach-konzentriert mit PM30) Kulturüberstand; Spur 5: 3 µl Retentat, Spur 6: 9 µl Filtrat
Spur 7: Marker
Spur 8 und 9: Ammoniumsulfat-Fällung; Spur 8: 3 µl Überstand, Spur 9: 3 µl in 5% des Ausgangsvolumens resuspendiertes Präzipitat
Spur 10: Marker
Spur 11 und 12: Eluat aus der Gelfiltration mit Sephadex G-200; Spur 11: 9 µl der vereinigten Fraktionen mit DNase-Aktivität (II, Abb. 44), Spur 12: 9 µl der vereinigten Fraktionen mit Elution nach der Nuclease (III, Abb. 44)
Spur 13: Marker

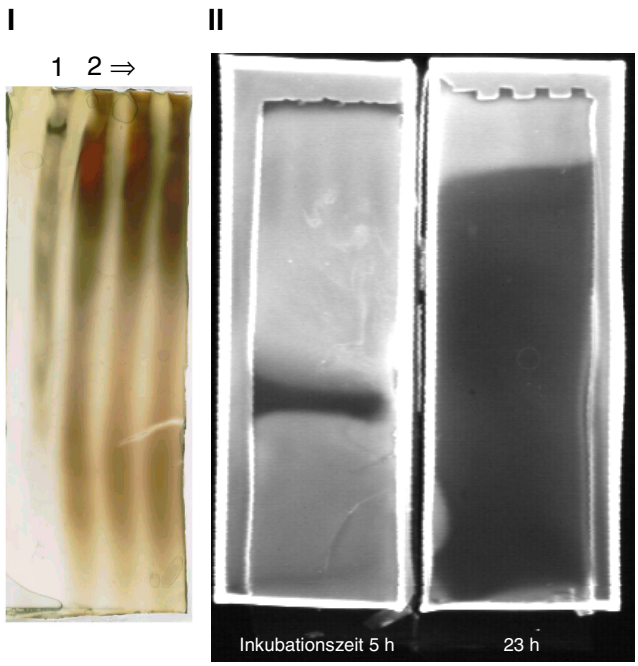

Abb. D: I – Silbernitrat gefärbter Polyacrylamidgel-Abschnitt (Tris-Glycin, pH 8,3 mit 0,3 M NaCl, 0,04 M $CaCl_2$ und 0,04 M $MgCl_2$). Spur 1: Marker, Spur 2 ff.: jeweils 10 µl 3x-konzentrierter (PM30) SJ1/4-Kulturüberstand.
II – UV-Aufnahme der DNA-Agarose-Überschichtungen (nach 5 und 23 h Inkubationszeit bei R.T. und Färbung mit Ethidiumbromid) der restlichen Abschnitte des Polyacrylamidgels. Auftragung wie I Spur 2 ff.

Lebenslauf der Autorin

Name:	Bianca Sinn-Meyer, geb. Sinn
Geburtsdatum:	11.06.1972
Geburtsort:	Bremen
Familienstand:	verheiratet seit dem 24.08.2001

Bildungsweg:

Grundschule	1978 – 1982 Grundschule in Oyten bei Bremen
Orientierungsstufe	1982 – 1984 Orientierungsstufe in Oyten bei Bremen
Gymnasium	1991 Abitur am Cato-Bontjes-van-Beek-Gymnasium in Achim bei Bremen
	09.1988 – 04.1989 Besuch der White-Plains-High-School, N.Y., USA
Entscheidungsfindung über den weiteren Werdegang	08. – 10.1991 Sozialdienst im Rahmen eines FSJ im St. Franziskus-Hospital, Flensburg
	11.1991 – 04.1992 Fernsprechauskunft bei der Deutschen Telekom AG, Bremen
	05. – 07.1992 Praktikum beim WWF, Projekt „Borgfelder Wümmewiesen" Bremen
Studium	10.1992 – 07.1998 Studiengang Dipl.-Biologie an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg
	Vordiplom im SoSe 1994
	Diplomarbeit in der AG Allg. Mikrobiologie (Biotechnologie) bei P.D.Dr. L. Berthe-Corti
Promotions-Studium	01.1999 – 09.2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) in der Abteilung Marine Mikrobiologie, Prof. Dr. U. Fischer, am Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie (UFT) der Universität Bremen
	10.2001 – 10.2002 Erziehungsurlaub (Elternzeit) nach der Geburt meiner Tochter Amelie

Erklärung gemäß § 6 Abs. 5 der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche vom 5.7.1985

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen an hydrolytischen extrazellulären Enzymen aus extremophilen marinen Mikroorganismen unter besonderer Berücksichtigung von Nucleasen

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

28876 Oyten, 22. Oktober 2003

(Bianca Sinn-Meyer)