

Molekulare Strategien in der Umwelt – 135 Jahre spannende Forschung

Seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts ist die Molekularbiologie eine eigene Disziplin. Ihre Wurzeln hat sie im Bereich der Mikrobiologie, die anfänglich vor allem die Lebensprozesse und damit auch das Funktionieren der Ökosysteme untersuchte. Während der heutige biotechnologische und medizinische Einsatz der Molekularbiologie den meisten Menschen bekannt ist, stehen die molekularen Ansätze im Kontext der problemorientierten Umweltforschung noch meist im Hintergrund. Dies zu Unrecht, denn ihre Ansätze sind für die Lösung aktueller Probleme von grossem Nutzen.

Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts haben Forscher die biologische Umsetzung definierter Stoffe durch Mikroorganismen studiert. Triebfeder für die meisten Studien war die Urzeugungstheorie, die davon ausging, dass Leben immer wieder spontan entstehen könnte. Gleichsam als Abfallprodukt lieferten diese Arbeiten erste molekulare Erkenntnisse zum Stoffwechsel der Mikroorganismen. Auch der französische Forscher Béchamp [1], ein Zeitgenosse von Louis Pasteur, war Anhänger der Urzeugungstheorie. Er untersuchte unterschiedliche Umweltproben auf ihre Kapazität, spezifische Substanzen umzusetzen, und beschrieb u.a. die Methanbildung aus Ethanol. Seiner Meinung nach waren dafür Mikroorganismen verantwortlich, die im Versuchsgefäss neu entstanden waren und denen er den Namen *Microzyma cretae* gab. Es ist Pasteurs genialen Experimenten zu verdanken, dass die Urzeugungstheorie

widerlegt werden konnte. Die vermeintliche spontane Schöpfung entpuppte sich als Anreicherung bereits vorhandener Mikroorganismen.

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts verfolgte der deutsche Wissenschaftler Felix Hoppe-Seyler die molekulare Strategie in der Umweltforschung konsequent weiter. Als erster Professor für Physiologische Chemie an der Universität Strassburg koppelte er das molekulare Verständnis von biologischen Prozessen an energetische Überlegungen. Er erkannte, dass bei jeder biochemischen Umsetzung Energie frei wird, die von den Mikroorganismen zum Wachstum und im Zellstoffwechsel genutzt werden kann. Bemerkenswert ist, dass die heutige, allseits anerkannte klassische Thermodynamik damals erst im Entstehen begriffen war (erst 1878 führte Josiah Gibbs den Begriff der freien Energie ein) [2]. Der Forschungsansatz von Hoppe-Seyler ist in den folgenden Jahren noch verfeinert worden.

Radioaktive Isotope markieren die Stoffwechselprodukte

Der nächste Durchbruch erfolgte in den dreissiger und vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts mit der Entdeckung der radioaktiven Isotope ^{11}C und ^{14}C durch den Chemiker Samuel Ruben und den Physiker Martin Kamen [3]. Beide Forscher hatten das Potenzial dieser Isotope für die Forschung sofort erkannt. Versuche mit ^{11}C erwiesen sich jedoch als schwierig, da dieses Isotop lediglich eine Halbwertszeit von 21 Minuten hat. Erst durch den Einsatz des Isotops ^{14}C mit einer Halbwertszeit

von ~5700 Jahren war es möglich, die Zwischenprodukte bei biochemischen Umsetzungen auch in komplexen Systemen zu verfolgen und die Assimilationsprodukte spezifischer Organismen in einem Ökosystem zuzuordnen. Mit Hilfe der Mikro-Autoradiographie können Organismen, die eine biochemische Umsetzung im Ökosystem katalysieren, direkt sichtbar werden (Abb. 1). Wegbereiter dieser Methode war in den 60er Jahren das Ehepaar Luise und Thomas Brock [4].

Nachweis spezifischer Mikroorganismen

In den 70er und 80er Jahren legten die Biologen, und unter ihnen vor allem die mikrobiellen Ökologen, ihr Hauptaugenmerk auf die Entwicklung von Methoden, mit denen Mikroorganismen direkt in komplexen Umweltproben identifiziert werden können.

Spezifische Verbindungen: Manche Substanzen kommen nur bei bestimmten Organismengruppen vor. Ein Beispiel ist das Elektronen übertragende Coenzym F_{420} , das mit einer Ausnahme lediglich bei den Methan produzierenden Bakterien gefunden wird. Diese Substanz ist besonders interessant, weil sie fluoresziert und die Bakterien dadurch einfach nachweisbar sind (Abb. 2).

Immunologische Verfahren: Der Nachweis bestimmter Bakterienarten durch immunologische Verfahren, die in der medizinischen

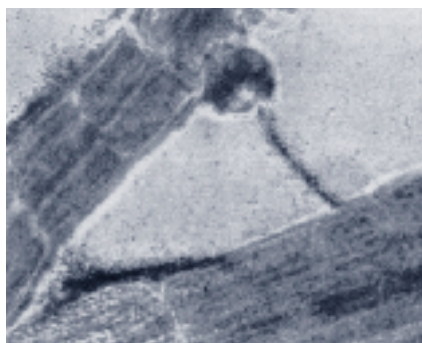


Abb. 1: Autoradiogramm von epiphytischen Bakterien (sichtbar als schwarze Kolonie links unten), die auf marinen Rotalgen leben. Den Bakterien wurde ^{14}C -Glutamat als Kohlenstoffquelle angeboten [aus 4].

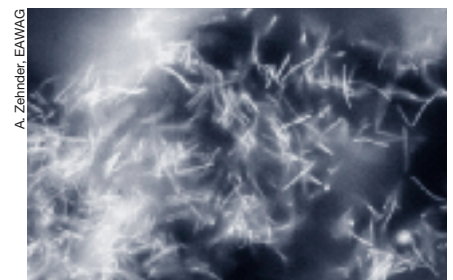
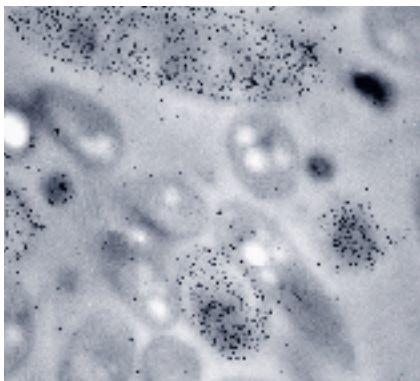


Abb. 2: F_{420} , ein Elektronen übertragendes Coenzym, das fast ausschließlich in Methan produzierenden Bakterien vorkommt. Es fluoresziert nach Anregung durch ultraviolettes Licht. Diese Eigenschaft erlaubt die direkte Identifizierung von Methanbakterien in natürlichen Populationen, hier von *Methanobacterium formicicum*.



Fotos: Wageningen Agricultural University, The Netherlands

Abb. 3: Mit Goldkolloiden (schwarze Punkte), die an Antikörper gebunden sind, können in elektronenmikroskopischen Dünnschnitten Bakterien immunologisch identifiziert werden. Hier ist spezifisch das Essigsäure verwertende Bakterium *Methanosaeta concilii* in einem auf Propionsäure gewachsenen Biofilm markiert.

Mikrobiologie bereits breite Anwendung gefunden hatten, wurde gegen Ende der 70er Jahre vermehrt auch in Umweltsystemen eingesetzt. Für die Sichtbarmachung der Antikörper auf dem Zielorganismus standen bereits zu dieser Zeit viele Markierungsmöglichkeiten offen. Sie reichten von der radioaktiven Markierung über Enzyme, die bestimmte Reaktionen katalysieren (ELISA-Technik), bis hin zu spezifischen Schwermetallen und fluoreszierenden Farbstoffen. Mit Antikörpern können sogar individuelle Proteine, meist Enzyme, in einem komplexen System in einer Einzelzelle nachgewiesen werden (Abb. 3 und 4). Nachteil der immunologischen Techniken ist, dass die Organismen oder Eiweissmoleküle, die von den Antikörpern erkannt werden sollen, zunächst isoliert werden müssen. Sie werden für die Produktion der Antikörper gebraucht.

RNA- und DNA-Sonden: Ein Quantensprung gelang mit der Entwicklung der RNA- und DNA-Sonden in der ersten Hälfte der 80er Jahre. Dazu waren zwei Voraussetzungen nötig. Erstens musste die RNA als universelles Molekül zur Ableitung von Verwandtschaftsbeziehungen unter Organismen erkannt und erforscht werden. Carl Woese [5] und Norman Pace [6] waren die Pioniere auf diesem Gebiet. Zweitens musste die DNA ausserhalb der Zelle im Reagenzglas vervielfältigt werden können. Mit der so ge-

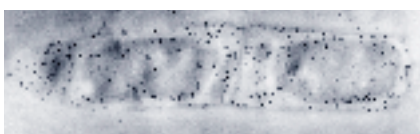


Abb. 4: *Methanosaeta concilii* im elektronenmikroskopischen Dünnschnitt. Das Enzym Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase ist immunologisch mit Goldkolloiden markiert. Die schwarzen Punkte sind über die ganze Zelle verteilt, ein starker Hinweis, dass es sich um ein in der Zellflüssigkeit lösliches Enzym handelt.

nannten Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR («polymerase chain reaction»), gelang Kary Mullis 1985 [7] die grosse Entdeckung (Abb. 5). Die Sonden werden so konstruiert, dass sie spezifische RNA- oder DNA-Abschnitte erkennen. Je nachdem, ob es sich dabei um variable oder konservierte Regionen handelt, können einzelne Arten oder ganze Organismengruppen identifiziert werden. Sind die Sonden darüber hinaus mit Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft, können die markierten Mikroorganismen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe der PCR können ausserdem unbekannte Gensequenzen aus einem Ökosystem isoliert und anschliessend mit bereits bekannten DNA-Sequenzen verglichen werden. Aufgrund der immensen Datenbanken ist die Chance heute relativ gross, dass die unbekannt Sequenzen spezifischen Funktionen oder Organismengruppen zugeordnet werden können.

Wodurch werden Organismen negativ beeinflusst?

Neben den Fragen zum Prozessverständnis – wer macht was, wo und wie – hat sich in den letzten Jahrzehnten ein neuer Komplex entwickelt, der sich mit Ursachen und Auswirkungen von Umweltschäden beschäftigt. Dazu gehört auch die Problematik rund um giftige Chemikalien, die in die Umwelt gelangen und sich negativ auf die Organismen auswirken können. Die Dringlichkeit, dieses Gebiet zu erforschen und Problemlösungen zu erarbeiten, hat einerseits zu grossen Fortschritten in der analytischen Chemie geführt – heute können die verschiedensten

Schadstoffe selbst bei tiefsten Konzentrationen in einer komplexen Matrix bestimmt werden. Andererseits bilden unsere Kenntnisse der Steuerung molekularer biologischer Prozesse die Basis für die Konstruktion so genannter Biosensoren. Diese zeigen geringste Schadstoffbelastungen durch Expression spezifischer Enzyme oder fluoreszierender Proteine an. Darüber hinaus eröffnete die Sequenzanalyse ganzer Genome die Möglichkeit, spezifische Gengruppen zusammenzustellen und sie auf so genannte DNA-Chips aufzutragen. Mit diesem Chip können dann die Reaktionen der Gene auf Chemikalien oder andere Umwelteinflüsse untersucht werden.

Das molekulare Verständnis des Lebens in einer sich immer wieder ändernden Umwelt ist in den letzten anderthalb Jahrhunderten einen langen Weg gegangen. Gerade die letzten 20 Jahre waren durch eine rasante Wissensexplosion im angewandten Bereich gekennzeichnet, zu der auch wir an der EAWAG unseren Beitrag geleistet haben. Einige Beispiele aus dieser Arbeit möchten wir in diesem Heft vorstellen.

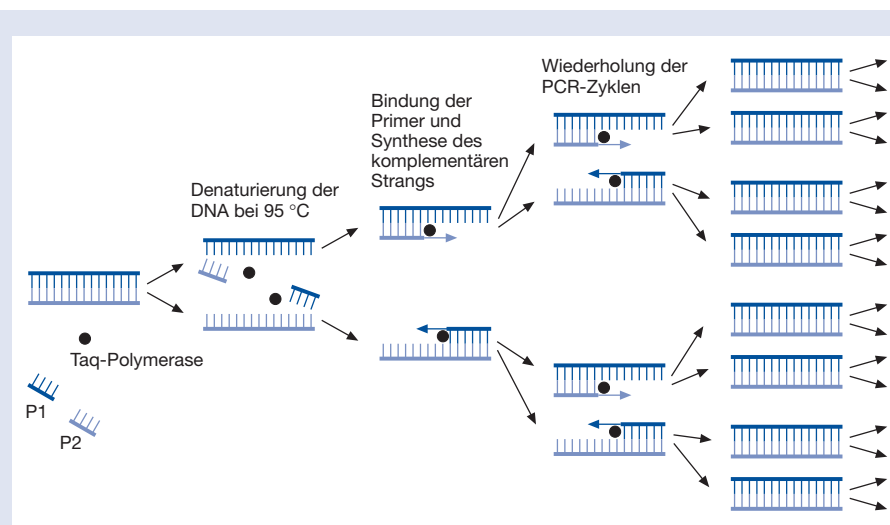


Abb. 5: Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte durch die PCR-Methode. Die zu vervielfältigende DNA wird mit zwei Primern (P1 + P2) und dem Enzym Taq-Polymerase vermischt. Diese Mischung durchläuft ca. 30 Temperaturzyklen in einem PCR-Automaten. Ein Temperaturzyklus dauert etwa 4 Minuten und setzt sich aus 3 Arbeitsschritten zusammen. 1. Schritt: die DNA wird bei 95 °C denaturiert; 2. Schritt: die Temperatur wird auf maximal 37 °C abgesenkt, so dass die Primer an die DNA binden; 3. Schritt: bei 72 °C synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären DNA-Strang.

den biologischen Strukturen. B. Escher (siehe S. 9) hat mit ihrer Arbeitsgruppe eine ganze Reihe schadstoffinduzierter Reaktionen untersucht und beschreibt die primären Wirkungsmechanismen solcher Reaktivchemikalien.

Stickstoffeliminierung und einwandfreies Trinkwasser

Eine Gruppe von Ingenieuren und Mikrobiologen (siehe Artikel von C. Fux und Kollegen auf S. 20) haben gemeinsam neue Wege zur Stickstoffeliminierung aus Abwasser untersucht. Der in den Niederlanden entdeckte Anammox-Prozess, bei dem Ammonium ohne Sauerstoff mit Nitrit direkt in Luftstickstoff umgewandelt wird, eignet sich vorzüglich für die Behandlung von Abwässern mit hohen Ammoniumgehalten. Allerdings galt es zunächst, die Mikroorganismen, die für diese Umsetzung verantwortlich sind, zu identifizieren. Dies gelang mit spezifischen Gensonden. Mit Hilfe eines Pilotreaktors konnte anschliessend die Praxistauglichkeit des Anammox-Prozesses bestätigt werden, sodass dem grosstechnischen Einsatz des Anammox-Verfahrens auf Kläranlagen nun nichts mehr im Wege steht.

Die biologische Qualität von Trinkwasser wird auch heute noch mit Kultivierungsmethoden bestimmt, die in ihren Grundlagen z.T. noch aus dem 19. Jahrhundert stammen. Problematisch ist, dass diese Kultivierungsmethoden sehr zeitaufwändig sind, frühestens nach 24, oft aber erst nach 72 Stunden liegen die Ergebnisse vor. Akut auftretende Kontaminationen lassen sich damit nicht mehr rechtzeitig unter Kontrolle bringen. Die PCR-Methode würde hier einen grossen Fortschritt bringen. In rund vier Stunden könnten Kontaminationen erkannt und die nötigen Massnahmen eingeleitet werden. A. Rust und W. Köster zeigen in ihrem Artikel auf S. 18 auf, wie diese Methode zur Sicherung der Trinkwasserqualität eingesetzt werden kann.

Gentransfer und genetische Diversität

Zwei weitere Artikel behandeln evolutionäre Aspekte. Die Gruppe von J.R. van der Meer (siehe S. 6) konnte als erste zeigen, wie grosse DNA-Stücke zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Diese DNA-Stücke werden als Genominseln bezeichnet; sie können mehr als 10% des gesamten Erbmateriale ausmachen und die Empfängerbakterien mit zusätzlichen Eigenschaften, z.B. bestimmte Schadstoffe abzubauen, ausstatten. Der so genannte horizontale Gentransfer gibt den Bakterien die Möglichkeit, wichtige evolutionäre Schritte mit gros-

sen Erfolgchancen in wenigen Generationen zu durchlaufen. M. Winder und P. Spaak (siehe S. 22) haben die genetische Diversität von Wasserflöhen in unterschiedlich hoch gelegenen alpinen Seen untersucht. Sie wollten prüfen, ob sich die gängige Schulmeinung – je höher der See, desto geringer die Artenvielfalt der Planktongemeinschaften – auch auf die genetische Diversität von Populationen anwenden lässt. Ihr Fazit ist, dass genetische Diversität nicht mit zunehmender Höhe abnimmt, sondern dass sie auch in höheren Lagen noch gross sein kann.

«More is different»

Der rasante Fortschritt bei den molekularen Methoden birgt die Gefahr in sich, dass der Blick für das Ganze verloren geht und versucht wird, mit einigen detaillierten Informationen das Funktionieren eines ganzen Ökosystems zu erklären. Wichtig ist, die molekularen Strategien zum Prozessverständnis einzusetzen und dieses Verständnis am Gesamtsystem zu reflektieren. Bereits 1972 stellte Philip W. Anderson in seinem Artikel «More is different» fest, dass die Zerlegung eines Systems in die Einzelteile nicht genügt, um das Funktionieren des Ganzen zu verstehen [8]. Es braucht beides, dessen sind wir uns an der EAWAG bewusst.



Alexander Zehnder, Mikrobiologe, Direktor der EAWAG und Professor für Gewässerschutz und Wassertechnologie an der ETH Zürich. Sein wissenschaftliches Interesse gilt der Umweltmikrobiologie und der Anwendung von mikrobiellen Prozessen in der Umweltbiotechnologie. Seit einigen Jahren beschäftigt er sich auch mit der nachhaltigen Entwicklung, insbesondere in Bezug auf das Wasser.

- [1] Béchamp A. (1868): Lettre de M. Béchamp à M. Dumas. *Annales de Chimie et de Physique* 13, 103–111.
- [2] Hoppe-Seyler F. (1887): Die Methangärung der Essigsäure. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift der Physiologischen Chemie* 11, 561–568.
- [3] Kamen M.D. (1963): Early history of carbon-14. *Science* 140, 584–590.
- [4] Brock T.D., Brock M.L. (1966): Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* 209, 734–736.
- [5] Woese C.R., Fox G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5088–5090.
- [6] Pace N.R., Stahl D.H., Lane D.J., Olson G.J. (1985): Analyzing of natural populations by RNA sequences. *ASM News* 51, 4–12.
- [7] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239, 487–491.
- [8] Anderson P.W. (1972): More is different. *Science* 177, 393–396.