



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Isolierung neuer Cyanid-produzierender Bakterien, Identifizierung und Manipulation der Cyanidsynthaseoperons zur Optimierung der Biolaugung von Edelmetallen

**vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Carolin Schuster**

Erstgutachter: PD Dr. Arnulf Kletzin
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Simon

Darmstadt 2024

Schuster, Carolin: Isolierung neuer Cyanid-produzierender Bakterien, Identifizierung und
Manipulation der Cyanidsynthaseoperons zur Optimierung der Biolaugung
von Edelmetallen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2024

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2024

Veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

*“The role of the infinitely small
in nature is infinitely great.”*
Louis Pasteur



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Kapitel 1	5
1. Allgemeine Einleitung.....	6
1.1. Cyanid – Toxizität, Synthese und Verwendung	6
1.2. Bakterielle Cyanidproduktion	6
1.3. Die Cyanidsynthese ist eine Cyanid-produzierende Glycin-Dehydrogenase.....	7
1.4. Die Rolle von bakteriellem Cyanid in der Umwelt.....	9
1.5. Anwendung bakterieller Cyanidproduktion in der Edelmetallgewinnung	10
1.6. Cyanid und der Mensch: Mukoviszidose und die Rolle als Signalmolekül.....	10
1.7. Ziele der Arbeit und Übersicht über die Kapitel	10
Kapitel 2	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material.....	13
2.1.1. Chemikalien.....	13
2.1.2. Bakterienstämme	15
2.1.3. Plasmide	17
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide	18
2.1.5. Antikörper, Enzyme, Enzypuffer, Größenstandards und Kits	23
2.1.6. Medien	24
2.1.6.1. Allgemeine Medien	24
2.1.6.2. Kultivierung von <i>E. coli</i>	24
2.1.6.3. Kultivierung von <i>Pseudomonas</i>	25
2.1.6.4. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Neuisolaten.....	26
2.1.6.5. Medien für die Biolaugung	29
2.1.6.6. Medien für die Statistische Versuchsplanung	29
2.1.7. Puffer und Lösungen	30
2.1.7.1. Klonierung	30
2.1.7.2. Gelelektrophorese.....	30
2.1.7.3. <i>semi-dry</i> Western Blot	30
2.1.7.4. Genexpression und Proteinreinigung.....	31
2.1.7.5. Cyanidnachweis: Methämoglobintest	31
2.1.7.6. Antibiotika	31
2.1.7.7. Puffer für Rubidiumchlorid kompetente <i>E. coli</i> Zellen.....	31
2.1.7.8. Weitere Lösungen	32
2.1.8. Substrate für die Biolaugung	32
2.1.9. Genomische DNA	33
2.1.10. Verwendete Software	33

2.2.	Methoden.....	34
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	34
2.2.1.1.	Kultivierung von Mikroorganismen	34
2.2.1.2.	Isolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien.....	34
2.2.1.3.	Wachstumskurven.....	36
2.2.1.4.	Bestimmung der Cyanidproduktion in Bakterienkulturen	37
2.2.1.5.	Hitzetoleranztest.....	38
2.2.1.6.	Gram-Färbung.....	38
2.2.1.7.	Cytochrom-c-Oxidase Test, Katalase Test und OF-Test	38
2.2.1.8.	Wachstum in Abhängigkeit von Sauerstoff	38
2.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.2.1.	Polymerase Ketten Reaktionen (PCR).....	38
2.2.2.2.	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.2.3.	Restriktion	41
2.2.2.4.	Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.2.2.5.	Elektroporation von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	41
2.2.2.6.	gDNA-Isolation	42
2.2.2.7.	Genomsequenzierung mittels Nanopore Technologie.....	43
2.2.2.8.	CRISPR/Cas9 in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25.....	43
2.2.2.9.	Proteinproduktion in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	45
2.2.2.10.	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> Bl21	46
2.2.2.11.	Genexpression in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	46
2.2.3.	Biochemische Methoden	46
2.2.3.1.	Cyanidnachweis	46
2.2.3.2.	Proteinanreicherungen der Cyanidsynthase von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	47
2.2.3.3.	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.2.3.4.	<i>semi-dry</i> Western Blot	50
2.2.4.	Biolaugungsversuche	51
2.2.4.1.	Biolaugungen in Schüttelkolben	51
2.2.4.2.	Biolaugungen im 24 Well Format	51
2.2.4.3.	Vorbehandlung von der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1	52
2.2.4.4.	Mahlen der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1	52
2.2.4.5.	Biolaugungen zur Medienoptimierung durch statistische Versuchsplanung	52
2.2.4.6.	Königswasseraufschluss und ICP-MS Messung	52
2.2.4.7.	Probenvorbereitung für die ICP-MS Messung	53
2.2.5.	Bioinformatische Methoden	53
2.2.5.1.	Genom-BLAST.....	53
2.2.5.2.	Bestimmung der ANI-Werte	53
2.2.5.3.	Identifizierung der Cyanidsynthasegencluster in Cyanid-produzierenden Neuisolaten	53
2.2.5.4.	3D-Strukturmodellierungen.....	53
Kapitel 3.....	54	
3.	Isolierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Bakterien.....	55
3.1.	Einleitung.....	55
3.1.1.	Vorarbeiten.....	55
3.1.2.	Sodaseen	56
3.2.	Ergebnisse	58
3.2.1.	Isolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien	58

3.2.2.	Charakterisierung der Cyanid-produzierenden Neuisolate.....	65
3.2.2.1.	Genomsequenzierung	65
3.2.2.2.	Terminale cyanidinsensitive Oxidasen.....	68
3.2.2.3.	Charakterisierung und phänotypische Beschreibung der sequenzierten Neuisolate ..	68
3.2.2.4.	Schwermetallresistenz der Cyanid-produzierenden Mikroorganismen.....	71
3.2.2.5.	Biolaugungsexperimente	73
3.3.	Diskussion	75
3.3.1.	Genomsequenzierung Cyanid-produzierende Neuisolate.....	76
3.3.2.	Spezies-Einteilung und Phylogenie der Neuisolate	76
3.3.3.	Cyanidinsensitive terminale Oxidasen und Schwermetallresistenz	78
Kapitel 4	80
4.	Optimierung der Biolaugung durch das Eigenisolat <i>Ps. donghuensis</i> G2#25.....	81
4.1.	Einleitung	81
4.1.1.	Bakterielle Biolaugung	81
4.1.2.	Vorbehandlung der Substrate zur Erhöhung der Biolaugungseffizienz	81
4.1.3.	<i>Ps. metallosolvens</i> BR11571	82
4.1.4.	Statistische Versuchsplanung (nach Kleppmann, 2016)	82
4.1.5.	Zielsetzung	82
4.2.	Ergebnisse	84
4.2.1.	Biolaugungsexperimente mit verschiedenen Substraten	84
4.2.2.	Optimierung der Biolaugungseffizienz mit der Asche aus der Elektroschrott- verbrennung 1	86
4.2.2.1.	Chemische Vorbehandlung der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1.....	86
4.2.2.2.	Medienoptimierung für die Biolaugung mit der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 durch <i>Design of Experiment</i> -Vorgehensweise	87
4.2.2.3.	Zweite Medienoptimierung für die Biolaugung mit der Elektroschrott- Verbrennungsasche 1.....	89
4.2.3.	Übertragbarkeit der Medienoptimierung auf andere Laugungssubstrate.....	91
4.3.	Diskussion	93
Kapitel 5	96
5.	Erhöhung der Cyanidproduktion von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 durch gezielte Promotor-/Operatorveränderungen mittels CRISPR/Cas9... 97	97
5.1.	Einleitung	97
5.1.1.	Regulation der Expression des <i>hcn</i> -Genclusters.....	97
5.1.2.	Entkoppeln der <i>hcnABC</i> -Expression von der <i>quorum sensing</i> Regulation (nach Tay <i>et al.</i> , 2013)	98
5.1.3.	Induzierbare und <i>quorum sensing</i> abhängige Promotoren in Pseudomonaden	99
5.1.4.	Das CRISPR/Cas9-System	99
5.1.5.	CRISPR/Cas9 in Pseudomonaden	99
5.1.6.	Zielsetzung	100
5.2.	Ergebnisse	101
5.2.1.	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25.....	101

5.2.2.	Analyse der Genomsequenz von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 in Bezug auf Regulatorbindestellen und Regulatorgene	102
5.2.3.	Erstellung und Charakterisierung der Promotor-/Operatormutanten	104
5.2.4.	Einfluss des Regulators GacA auf die Cyanidproduktion von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	110
5.3.	Diskussion	111
5.3.1.	Regulation der Produktion der Cyanidsynthase	111
5.3.2.	Promotor-/Operatorveränderungen von <i>Ps. donghuensis hcnABC</i>	112
Kapitel 6	115
6.	Identifikation der <i>hcn</i> - und <i>hcn</i> -ähnlichen Operons in Cyanidproduzierenden Neuisolaten und Strukturvorhersagen der Cyanidsynthase	116
6.1.	Einleitung.....	116
6.1.1.	Phylogenetische Einordnung der Cyanidsynthase	116
6.1.2.	Opin-Dehydrogenasen.....	116
6.1.3.	Die Sarcosin-Oxidase und die Prolin-Dehydrogenasen	118
6.1.4.	Zielsetzung	119
6.2.	Ergebnisse	120
6.2.1.	Identifikation des <i>hcn</i> -Genclusters in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	120
6.2.2.	Identifikation eines zweiten <i>hcn</i> -ähnlichen Genclusters in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	120
6.2.3.	Die Rolle von <i>hcnABC</i> und <i>hcnCAB</i> von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 bei der Cyanidproduktion	122
6.2.4.	Der Einfluss von Methionin auf den Methämoglobintest	126
6.2.5.	Funktion von HcnABC und HcnCAB bei der Cyanidproduktion nach Komplementierung der Deletionsmutanten	128
6.2.6.	Vorkommen von <i>hcnABC</i> - und <i>hcnCAB</i> -Genen in Pseudomonaden	129
6.2.7.	3D-Strukturmodellierungen von Cyanidsynthasen: <i>Ps. donghuensis</i> G2#25.....	131
6.2.8.	Funktionalität der Cyanidsynthase von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 nach Aminosäureaustauschen.....	133
6.2.9.	3D-Strukturmodellierung von HcnCAB.....	135
6.2.10.	Identifizierung von <i>hcn</i> -Genclustern in weiteren neuisolierten Cyanidproduzenten	137
6.2.10.1.	Identifizierung von Cyanidsynthasegenclustern in Firmicutes.....	137
6.2.10.2.	Identifikation der <i>hcn</i> -Gene in Actinomyceten.....	141
6.2.11.	Phylogenetische Analyse der HcnC-Homologen verschiedener Phyla.....	143
6.3.	Diskussion	146
6.3.1.	Die Cyanidsynthase von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	146
6.3.2.	Cofaktor/Coenzym bindende Aminosäuren	146
6.3.3.	Das putative <i>hcnCAB</i> -Operon von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 und die Komplementierung der Deletionsmutanten.....	147
6.3.4.	<i>hcn</i> -ähnliche Operons in Pseudomonaden	148
6.3.5.	<i>hcn</i> -ähnliche Gencluster in Cyanidproduzenten	148

Kapitel 7	151
7. Reinigung und Charakterisierung der Cyanidsynthese von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	152
7.1. Einleitung	152
7.1.1. Zielsetzung	152
7.2. Ergebnisse	153
7.2.1. Heterologe Genexpression von <i>hcnABC</i> (pASK-HCN.dong) in <i>E. coli</i> Bl21.....	153
7.2.1.1. Medienoptimierung zur Verringerung toxischer Effekte durch Cyanid für die Proteinreinigung aus <i>E. coli</i> Bl21	153
7.2.1.2. Einfluss der Position des Strep-tags an den verschiedenen Untereinheiten der Cyanidsynthese auf die Cyanidproduktion	154
7.2.1.3. Proteinanreicherung aus <i>E. coli</i> Bl21 pASK-HCN.dong	155
7.2.2. Proteinanreicherung von HcnABC aus <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	158
7.2.2.1. <i>In vitro</i> Aktivitätsnachweis von HcnABC nach dem Zellaufschluss	158
7.2.2.2. Anfügen einer für den Strep-tag kodierenden DNA-Sequenz an <i>hcnC</i> im Genom von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	159
7.2.2.3. Einbringen eines zweiten <i>hcnABC</i> -Operons in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25	161
7.2.2.4. Proteinanreicherung aus <i>Ps. donghuensis</i> Δ <i>hcnABC</i> compnatProABC	162
7.3. Diskussion	165
8. Fazit und Ausblick	168
9. Literaturverzeichnis	170
10. Anhang.....	183
11. Elektronischer Anhang.....	190
Abkürzungsverzeichnis	192
Beiträge anderer	194
Konferenzbeiträge	197
<i>Curriculum Vitae</i>	198
Danksagung.....	199
Ehrenwörtliche Erklärung.....	200



Zusammenfassung

Cyanwasserstoff, auch als Blausäure bekannt, ist eine toxische chemische Verbindung. Die bisher bekanntesten bakteriellen Cyanidproduzenten sind *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Ps. fluorescens/ protegens* CHA0, *Chromobacterium violaceum* und *Priestia megaterium*. Bakterielle Cyanidproduktion wird für den Pflanzenschutz und für Biolaugungsverfahren verwendet, insbesondere von Edelmetallen, wie Silber und Gold, aus Erzen oder Abfallstoffen. Durch die vom *hcnABC*-Operon kodierte Cyanidsynthese wird Glycin von Bakterien über Imminoessigsäure zu Cyanid und CO₂ oxidiert.

In dieser Arbeit wurden erstmals gezielt 55 halo-/alkaliphile und Cyanid-produzierende bzw. resistente Bakterien mit einer Cyanidproduktion von bis zu 18 mg/l isoliert. Die Mehrheit dieser Bakterien gehörte dem Phylum Firmicutes an, jedoch wurden auch Proteobakterien und Bacteroidetes isoliert. Am häufigsten waren Isolate der Gattungen *Salipaludibacillus* und *Alteribacter* vertreten. Alle Isolate gehörten der Risikostufe 1 an und waren alkalitolerant. Drei Neuisolate waren alkaliphil und vier Isolate halophil. Insbesondere Isolate der Gattung *Mongoliicoccus* wiesen eine Resistenz gegenüber ≤ 10 mM Kupfer auf, silberresistente Bakterien wurden nicht isoliert. 18 Neuisolate wurden auf ihre Laugungsfähigkeit mit einem Filterstaub getestet. Hierbei zeigte das Isolat *Ps. donghuensis* G2#25 die Fähigkeit aus fünf von acht getesteten Biolaugungs substraten, u.a. aus dem Filterstaub, Gold zu laugen. Die Goldausbeute durch Biolaugung wurde für eine Elektroschrott-Verbrennungsasche durch eine Vorbehandlung mit Lauge verdoppelt.

Anschließend wurde mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung eine Medienoptimierung durchgeführt, diese ergab eine erneute Verdoppelung der Goldausbeute im Vergleich zu dem Standard-Laugungsmedium.

In *Ps. fluorescens* erfolgt die *in vivo* Regulation der *hcnABC*-Transkription durch den anaeroben Regulator ANR. Zum Verständnis der Regulation der Transkription von *hcnABC* in *Ps. donghuensis*, zur Erhöhung der Cyanidproduktion, zur Steigerung der Biolaugungsaktivität, aber auch zur gezielten Deletion der *hcn*-Operons, wurde ein

CRISPR/Cas9-System für das *Ps. donghuensis* G2#25 Eigenisolat etabliert. Es wurden gezielte *hcnABC*-Promotor- und Operatorveränderungen im Chromosom durchgeführt. Der Austausch des nativen *hcnABC*-Promotors gegen den induzierbaren *P_{BAD}*-Promotor führte zu einer erhöhten Cyanidproduktion und zu einer gesteigerten Goldausbeute in den Biolaugungsexperimenten. Die Genomsequenzen von 18 Cyanid-produzierenden Eigenisolaten aus dieser und früheren Arbeiten wurden bestimmt. Ziel war es, die Bakterien näher zu charakterisieren und *hcn*-Operons zu identifizieren. Aus den 18 Genomsequenzierungen wurden 13 geschlossene Genomsequenzen erhalten, die übrigen fielen in mehrere Contigs. In *Ps. donghuensis* G2#25 wurde, wie auch in *Ps. protegens* CHA0, neben *hcnABC* ein zusätzliches putatives Gencluster identifiziert, dessen Genreihenfolge in *hcnCAB* geändert war. In dem ebenfalls Cyanid-produzierenden Eigenisolat *Ps. hutmensis* MG#27 wurde ein ähnliches Gencluster identifiziert, ohne dass ein *hcnABC*-Homolog vorhanden war. Die Identitäten der abgeleiteten Aminosäuresequenzen lagen zwischen 24 % und 40 % zu *HcnABC*, in 3D-Strukturvorhersagen waren die Untereinheiten beider Proteine jedoch ähnlich. Erst später stellte sich heraus, dass das *hcnCAB*-Gencluster in Pseudomonaden vermutlich eine D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase codiert. Trotzdem führten getrennt durchgeführte chromosomale Deletionen von *hcnABC* und *hcnCAB* in *Ps. donghuensis* zum Verlust der Biolaugungsaktivitäten.

In den 18 Genomsequenzen wurden nur in zwei *Salipaludibacillus* Isolaten *hcn*-ähnliche putative Cyanidsynthaseoperons identifiziert, jedoch mit veränderter Genreihenfolge und einem Austausch von *hcnA* gegen ein nicht-homologes Gen. Trotz nachgewiesener Cyanidproduktion wurden bei 14 der genomsequenzierten Eigenisolate keine *hcn*-ähnlichen Gene identifiziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder die Sequenzen der Cyanidsynthase nicht konserviert sind oder dass es weitere bisher unbekannte Mechanismen zur Cyanidproduktion in Bakterien gibt. Zur näheren Charakterisierung der Cyanidsynthase wurde versucht, das Protein zu reinigen. In *E. coli* Bl21 heterolog exprimierte

hcnABC-Gene erwiesen sich als ungeeignet zur Reinigung der Cyanidsynthase, da das Protein nach dem Zellaufschluss in der partikulären Fraktion verblieb.

Bei einer Anreicherung der Cyanidsynthase nativ aus *Ps. donghuensis* verblieb sie in Lösung nach der Abtrennung der Membranbestandteile. Die Cyanidsynthase wurde hierbei über ein Plasmid exprimiert und mit einem Strep-tag C-terminal an HcnC markiert. Eine Reinigung der Cyanidsynthase durch Affinitätschromatographie war nicht erfolgreich, da der Strep-tag wahrscheinlich maskiert war.

In vitro Cyanidaktivitätstests mit Zellextrakten der Cyanidsynthase, welche anaerob angereichert wurden, zeigten ein Temperaturoptimum des Enzyms bei 27 °C, Unterschiede zwischen 25 °C und 30 °C waren gering. Die Cyanidproduktion von Zellextrakten, resultierend aus einer aeroben und einer anaeroben Proteinanreicherung, lag bei 0,5 mg/l bzw. 5,4 mg/l. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Sauerstoffsensitivität ein möglicher Grund für die nicht erfolgreiche Proteinreinigung ist.

Abstract

Hydrogen cyanide, known as prussic acid, is a toxic chemical compound. The best-known cyanide-producing bacteria are *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Ps. fluorescens/protegens* CHA0, *Chromobacterium violaceum* and *Priestia megaterium*. Bacterial cyanide production is used for crop protection and bioleaching processes. Mainly precious metals such as silver and gold are solubilized from ores or waste materials. The cyanide synthase, encoded by the *hcnABC* operon, uses glycine as substrate for the production of cyanide and CO₂.

Here, 55 halo-/alkaliphilic and cyanide-producing or cyanide-resistant bacteria were specifically isolated for the first time. They showed a cyanide production up to 18 mg/l. Most of the bacteria belonged to the Phylum Firmicutes, especially from the Genera *Salipaludibacillus* and *Alteribacter*, in addition some Proteobacteria and Bacteroidetes were isolated. All of them were biosafety level 1 and alkali-tolerant bacteria. Three of the newly isolated bacteria were alkaliphilic and four were halophilic. Some *Mongoliicoccus* isolates were resistant against up to 10 mM copper; silver resistant bacteria could not be isolated. The bioleaching capacity of 18 newly isolated bacteria was tested with a filter dust. Only *Ps. donghuensis* G2#25 showed gold leaching activity with this material and with four other different industrial transition-metal containing waste materials. The gold yield for this bacterium was doubled by an alkaline pre-treatment of a residue from e-waste incineration in comparison to the standard-leaching media. Subsequently, the gold yield was doubled again by media optimization using statistical test planning with the “design of experiments” methodology.

The *hcnABC* transcription in *Ps. fluorescens* is regulated by the anaerobic regulator ANR. To understand the *hcnABC* regulation in *Ps. donghuensis*, to enhance the cyanide production, and to improve the bioleaching activity, a CRISPR/Cas9-system was established for this isolate. Targeted *hcnABC* promoter and operator changes were carried out in the chromosome. The exchange of the native *hcnABC* promoter against the arabinose-inducible

P_{BAD}-promotor resulted in enhanced cyanide production and gold yield in bioleaching experiments.

The genome sequences of 18 newly isolated, cyanide-producing bacteria from this and from previous works were determined. The aim was to characterize the bacteria and to identify *hcn* operons. From the 18 genome sequences, 13 closed genome sequences were obtained, the rest fell into several contigs. In *Ps. donghuensis*, the *hcnABC* operon and an additional gene cluster with the gene order *hcnCAB* were identified. This was similar in the well-known cyanide-producing bacterium *Ps. protegens*, however, only the second gene cluster was identified in a newly sequenced *Ps. hutmensis* isolate, but no *hcnABC* genes were identified.

The amino acid identities of HcnCAB and HcnABC were between 24 % and 40 %. In spite of these low identities, the structural models of these subunits were comparable. Further comparisons showed that the “*hcnCAB*” gene cluster probably encodes a D-hydroxyproline-dehydrogenase and not a cyanide synthase, so that the cyanide production of the *Ps. hutmensis* isolate remained unexplained. Nevertheless, separate deletions of *Ps. donghuensis hcnABC* and *hcnCAB* lead to loss of cyanide production and bioleaching activity.

Among the remaining genome-sequenced isolates, *hcn*-like gene clusters were only identified in two *Salipaludibacillus* isolates from the 18 genome sequences. The gene arrangement was different and *hcnA* was exchanged to a non-homologous gene. The cyanide production was verified for the other 14 sequenced bacteria, however no *hcn*-like gene cluster was identified. This suggests that either the sequences of the HCN synthase are not conserved or that there are other previously unknown mechanisms for cyanide production in bacteria.

To characterize the HCN synthase in more detail, an attempt was made to purify the protein from *E. coli* cells heterologously expressing the genes. However, this proved to be unsuitable because the protein remained in the particulate fraction after cell disruption. The native HCN synthase from *Ps. donghuensis*, expressed via plasmid and

Abstract

with a strep-tag attached to the C-terminus of HcnC, remained in solution after cell lysis and anaerobic protein enrichment. However, affinity chromatography purification was not successful, most probably due to masking of the strep-tag. *In vitro* assays with total cell extracts prepared anaerobically resulted in an optimal temperature

of 27 °C with small differences between 25 °C and 30 °C. The cyanide production with aerobically and anaerobically prepared cell extracts was 0.5 mg/l and 5.4 mg/l, respectively, suggesting that the oxygen sensitivity might be one of the reasons for the constant problems with HCN synthase purification.

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Cyanid – Toxizität, Synthese und Verwendung

Der Cyanwasserstoff, besser bekannt unter dem Namen Blausäure, ist eine toxische chemische Verbindung (Binnewies *et al.*, 2016). Blausäure ist gut wasserlöslich und bildet eine schwache Säure (Binnewies *et al.*, 2016). Aufgrund des pK_s -Werts (9-9,4, Marques *et al.*, 1988, je nach Literatur^{1,2}) liegt Blausäure bei neutralem und saurem pH-Wert protoniert vor und gast als Blausäure aus. Bei alkalischem pH liegt der Cyanwasserstoff deprotoniert in Lösung vor. HCN besitzt einen charakteristischen Bittermandel-Geruch (Binnewies *et al.*, 2016). Cyanwasserstoff ist bei Aufnahme über Inhalation, oral und subkutan toxisch. Die letale Dosis bei subkutanem Kontakt liegt bei 1 mg/kg und bei oraler Aufnahme bei 570 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht (ChemIDplus, RN: 74-90-8³). Die Giftwirkung beruht auf der Komplexbildung von Metalloenzymen, was zu deren Inaktivierung führt (zusammengefasst in Nelson, 2006, Zuhra *et al.*, 2022). Insbesondere ist die terminale Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette betroffen (Keilin, 1929). Cyanid-Ionen komplexieren das Eisen-Kupferzentrum und führen zu einer Blockade der Bindestelle von Sauerstoff (zusammengefasst in Binnewies *et al.*, 2016, Nelson, 2006). Die Bindung von Cyanidionen, ähnlich wie Kohlenstoffmonoxid, an Hämoglobin spielt bei der Cyanidvergiftung eine untergeordnete Rolle (Binnewies *et al.*, 2016, Nelson, 2006). *In vivo* erfolgt die Entgiftung durch das Enzym Rhodanase in der Leber (Nelson, 2006).

Es gibt zwei Verfahren zur chemischen Synthese von Cyanwasserstoff (zusammengefasst in Binnewies *et al.*, 2016). Einmal das Blausäure aus Methan und Ammoniak (BMA)-Verfahren, hierbei entsteht Blausäure aus einer Reaktion von Methan mit Ammoniak bei 1 200 °C unter Einsatz eines Platinkatalysators (Vogt *et al.*, 1985). Das zweite Verfahren ist das Andrussow-Verfahren, der Ablauf ist ähnlich wie bei dem

BMA-Verfahren, jedoch ist für diese Reaktion Sauerstoff nötig (Andrussow, 1927, Andrussow, 1935). 70 % des synthetisierten Cyanwasserstoffs wird zur Herstellung von Polymeren, wie Polyacrylnitril und Polymethylmethacrylat (Acrylglas), und zur Herstellung von Zwischenprodukten der Tierernährung verwendet (Binnewies *et al.*, 2016). Eine weitere Anwendung von Cyanid ist das Herauslösen von Edelmetallen, wie Silber und Gold, aus Erzen und Elektroschrotten (Binnewies *et al.*, 2016, Natarajan *et al.*, 2015).

Natürlicherweise kommen Cyanid-Verbindungen als cyanogene Glykoside in Pflanzen vor (Jones, 1998). Auch Säugetiere produzieren Cyanid über mindestens fünf verschiedene Enzyme, z.B. die Myeloperoxidase (Überblick in Zuhra *et al.*, 2022). Diese Synthesewege werden in dieser Arbeit nicht weiter behandelt. In dieser Arbeit werden Cyanid-produzierende Bakterien untersucht. Bei der bakteriellen Cyanidproduktion wird Cyanid über einen anderen Syntheseweg produziert. Die Cyanidsynthese produziert aus Glycin Cyanid und Kohlenstoffdioxid (Michaels *et al.*, 1965, Wissing, 1974).

1.2. Bakterielle Cyanidproduktion

Die Cyanidproduktion von Bakterien ist seit gut 100 Jahren bekannt. Sie wurde zuerst für *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (ehemals *Bacillus pyocyaneus*, Patty, 1921). Bakterien produzieren Cyanid als sekundäres Metabolit (Castric, 1975). Die bekanntesten bakteriellen Cyanidproduzenten sind *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas fluorescens* CHA0 und *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Diese gehören, bzw. einige Stämme, laut der Biostoffverordnung der Risikostufe 2 an (TRBA, 2020). Die genannten Stämme produzieren Cyanid über die Cyanidsynthese, dessen Transkript von dem *hcnABC*-Gencluster exprimiert wird (Laville *et al.*, 1998). Für *Ps. fluorescens* Stämme ist die Cyanid-

¹ https://www.seilnacht.com/Chemie/ch_hcn.html (Aufruf November 2023)

² https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/pka/pka_data/pka-compilation-williams.pdf (Aufruf November 2023)

³ <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/74-90-8> (Aufruf: November 2022)

produktion bei pH 8 und 30 °C maximal (Askeland *et al.*, 1983). Durch eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Medium ist die Cyanidproduktion gesteigert worden (Castric *et al.*, 1979). Sie ist maximal beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase (Abb. 1).

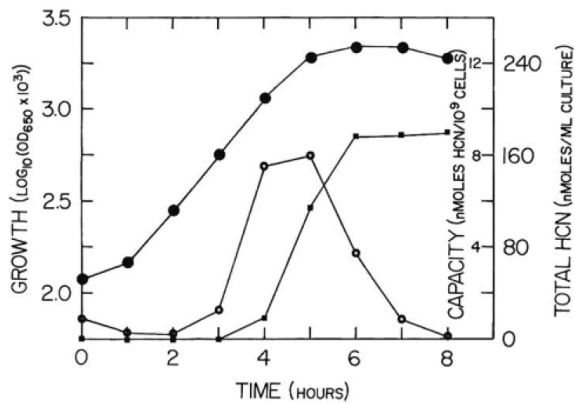


Abbildung 1 Maximale Cyanidproduktion von *Ps. aeruginosa* beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase. Abbildung aus Castric *et al.*, 1979 (<https://link.springer.com/journal/284>; „Reproduced with permission from Springer Nature“).

Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase stoppt die Cyanidproduktion, was auf eine metabolische Regulation der Cyanid Synthese schließen lässt (Castric *et al.*, 1981). Eine Inaktivierung der Cyanidsynthese *in vivo* wird möglicherweise durch das Sinken der intrazellulären Glycin Konzentration ausgelöst oder durch einen Anstieg der Sauerstoffkonzentration, da die Respirationsrate beim Erreichen der stationären Wachstumsphase sinkt (Castric *et al.*, 1981).

Als Substrat für die bakteriellen Cyanidsynthesen dient Glycin, aus einem Molekül Glycin entstehen je ein Molekül Cyanid und CO₂ (Michaels *et al.*, 1965, Wissing, 1974). Der K_M-Wert (Glycin) von ganzen Zellen ist 5 × 10⁻⁴ M (Wissing, 1974).

Die höchste Cyanidproduktion wird erreicht, wenn Glycin und Methionin im Medium vorhanden sind (Nazly *et al.*, 1981). Methionin besitzt jedoch keine induktive, sondern eine stimulierende Wirkung auf die Cyanidproduktion (Nazly *et al.*, 1981). Auch Threonin kann als Substrat statt Glycin verwendet werden (Castric, 1977), in dem es durch beispielsweise Threonin Aldolasen oder Serin Transhydroxymethylasen zu Glycin umgewandelt wird (Fesko, 2016, Schirch *et al.*,

1968). Serin dient auch als Substrat, führt jedoch zu einer Verringerung der Cyanidproduktion um den Faktor 5 (Castric, 1977).

Über das *hcnABC*-Gencluster wird das Transkript der Cyanidsynthese kodiert (Laville *et al.*, 1998). *Ps. fluorescens* CHA0 und *Ps. aeruginosa* PA01 *hcnABC*-Deletionsmutanten zeigten keine Cyanidproduktion, weshalb dies die einzigen Gene sind, die für die Cyanidproduktion in diesen Stämmen zuständig sind (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Die Genanordnung ähnelt der eines Operons (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Weitere mögliche Gene für Cyanidsynthesen wurden in dieser Arbeit identifiziert und sind in Kapitel 6 beschrieben.

Die Expression der *hcn*-Gene in *Pseudomonas* spp. ist über den anaeroben Regulator ANR reguliert (ANR: anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction; Blumer *et al.*, 2000a, Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Weitere Regulatoren unterscheiden sich je nach Cyanidproduzent. Die Expression von *hcnABC* in *Ps. aeruginosa* PA01 wird zusätzlich zu ANR durch die *quorum sensing* Systeme LasRI und RhlRI reguliert (Pessi *et al.*, 2000), während diese beiden *quorum sensing* Systeme bei *Ps. fluorescens* CHA0 nicht identifiziert wurden (Laville *et al.*, 1998). Zusätzlich wird die Transkription in beiden Stämmen durch den globalen Aktivator GacA reguliert (Blumer *et al.*, 2000a, Reimann *et al.*, 1997). Die Regulation des *hcn*-Operons in *Ch. violaceum* ist ebenfalls *quorum sensing* abhängig und wird durch Acyl-Homoserinlactone reguliert, bei Zugabe einer Lactonase verringert sich die Cyanidproduktion (Mion *et al.*, 2021). Die Regulation der *hcn*-Expression bei dem Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 (Amberger, 2016b) wird in Kapitel 5 dieser Arbeit behandelt, zudem wird die Regulation bei den bekannten Cyanidproduzenten genauer beschrieben.

1.3. Die Cyanidsynthese ist eine Cyanidproduzierende Glycin-Dehydrogenase

Die Cyanidsynthese ist eine Dehydrogenase. Glycin dient als Substrat und wird im ersten Schritt zu Iminoessigsäure oxidiert (Michaels *et al.*, 1965, Wissing, 1974, Abb. 2). Anschließend wird die C-C Bindung gespalten und als Produkte entstehen HCN und CO₂ (Michaels *et al.*, 1965,

Wissing, 1974). Sauerstoff dient *in vivo* als terminaler Elektronenakzeptor, jedoch ist der Elektronenübertragungsweg bisher unklar (Castric, 1994). Auf Grund der Sauerstoffsensitivität kann Sauerstoff nicht der direkte Elektronenakzeptor sein. Die Elektronen werden über ein Elektronentransportsystem auf Sauerstoff übertragen (Castric, 1994). Während der Cyanogenese ist die Cyanidsynthese wahrscheinlich durch die Zellrespiration und Glycin vor dem Sauerstoff geschützt (Castric, 1981).

Weitere artifizielle Elektronenakzeptoren für ganze Zellen sind Phenazin-Methosulfat (PMS), 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium (DCIP), Methyleneblau und Ferricyanid. Diese sind jedoch nicht so effektiv wie Sauerstoff. Mit PMS zeigt die Cyanidsynthese, nach dem Elektronenakzeptor Sauerstoff, die höchste Aktivität (Absatz nach Castric, 1994, Nazly *et al.*, 1981, Wissing, 1974).

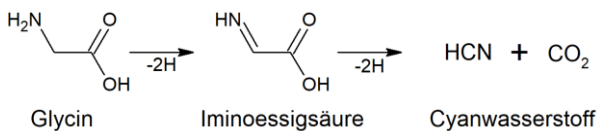


Abbildung 2 Dehydrogenase-Modell der Cyanidsynthese. Glycin wird im ersten Schritt zu Iminoessigsäure oxidiert (nach Wissing, 1974). Der Elektronenübertragungsweg ist unklar.

Bislang gelang es nicht, das Enzym zu reinigen. Alle beschriebenen Eigenschaften gehen auf Messungen von ganzen Zellen, Zellextrakten und verschiedenen Fraktionen der Proteinanreicherung zurück (siehe Einleitung, Kapitel 7). Die Cyanidsynthese kann in Extrakten durch Dithiothreitol stabilisiert werden (Bunch *et al.*, 1982). Die Sauerstoffsensitivität wurde dort auch für Extrakte nachgewiesen. Diese zeigten eine höhere Aktivität, wenn alle Schritte der Proteinanreicherung anaerob abliefen. Bei der Proteinanreicherung befand sich die Cyanidsynthese in der partikulären Fraktion nach der Zentrifugation, daraus folgt, dass es sich wahrscheinlich um ein membrangebundenes oder membranassoziertes Enzym handelt, welches sich leicht von der Membran ablösen ließ (Bunch *et al.*, 1982).

Aufbauend auf den Erkenntnissen aus den beschriebenen Publikationen wurden Proteinanreicherungen der Cyanidsynthese durchgeführt, welche in Kapitel 7 beschrieben sind.

Die Cyanidsynthese besteht aus den drei Untereinheiten HcnA, -B und -C (Laville *et al.*, 1998). Sowohl HcnA als auch HcnB enthalten je ein Cluster von Cystein-Resten, welche vermutlich je ein [2Fe-2S] oder [4Fe-4S] Zentrum koordinieren (Blumer *et al.*, 2000b, Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012, Abb. 3). Typische FAD- oder NAD(P)-Bindemotive sind im N-terminalen Bereich von HcnB (ca. 80 % der AS) und HcnC vorhergesagt (Blumer *et al.*, 2000b, Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). Damit ähnelt die Cyanidsynthese der vorhergesagten bzw. teilweise auch nachgewiesenen Untereinheitenstruktur und Cofaktorzusammensetzung von Opine-Dehydrogenasen (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2015). Für diese Enzyme wurde das Vorhandensein von den Coenzymen FAD, FMN und zwei Eisen-Schwefel-Clustern bereits gezeigt (Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016). Die Ähnlichkeiten zur Opine-Dehydrogenase bestätigten sich in der 3D-Modellierung und werden in Kapitel 6 näher beschrieben.

Für HcnB und C sind Transmembranhelices vorhergesagt (Laville *et al.*, 1998). Die HcnB/C Untereinheiten weisen Ähnlichkeiten mit bekannten FAD- oder NAD-abhängigen Dehydrogenasen auf, während HcnA Ferredoxinen oder Domänen größerer Proteine, wie z.B. der clostridialen Formiat Dehydrogenase, ähnelt (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Neuere Sequenzvergleiche ordnen HcnA zur Proteinfamilie Fer2_4 ein, dies sind Proteine mit einem 2Fe-2S Cluster Bindemotiv. Der N-terminale Teil von HcnB gehört zur Familie der Pyridin Nukleotid-Disulphid Oxidoreduktasen, der C-terminale Teil zu der Proteinfamilie mit einer Bacterioferritin-assoziierten Ferredoxin ähnlichen [2Fe-2S] Bindedomäne. Die HcnC Untereinheit gehört der DAO-Sequenzfamilie an (Vorhersagen durch <http://pfam-legacy.xfam.org/> [November 2022]).

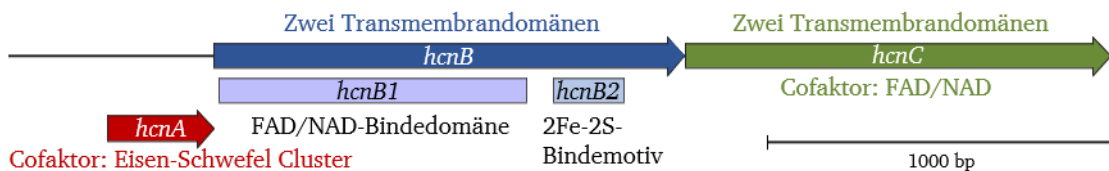


Abbildung 3 Schematische Übersicht über das *hcnABC*-Gencluster mit Domänen und Cofaktoren. Die Cofaktorvorhersagen und Transmembranhelicesvorhersagen sind aus Laville *et al.*, 1998 und Watanabe *et al.*, 2012 übernommen. Neue Vorhersagen zeigen lediglich für *hcnC* zwei Transmembranhelices (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). Die Domänen von *hcnB* wurden mit Pfam (Mistry *et al.*, 2021) vorhergesagt. Der Teil von *hcnB* mit der FAD/NAD-Bindedomäne wird folgend als *hcnB1* bezeichnet, der Teil mit dem 2Fe-2S-Bindemotiv als *hcnB2*.

Zur Eingruppierung der Cyanidsynthase in bekannte Enzymklassen wurden unterschiedliche Inhibitoren getestet (Wissing, 1974). Die bekannten Inhibitoren von Flavoenzymen Pyrrolnitrin, o-Phenanthrolin und Acriflavin zeigen einen starken inhibitorischen Effekt auf die Cyanidsynthase. Die an der Substratbindestelle von Flavinenzymen agierenden Inhibitoren Amytal und Rotenon besitzen dagegen keine inhibitorische Wirkung. Kupfersulfat inhibiert Glycin Oxidasen, zeigte aber keinen Einfluss auf die Cyanidproduktion. Auch ein D-Aminosäure Oxidase Inhibitor beeinflusst die Cyanidproduktion nicht (Wissing, 1974). Daraus folgt, dass Flavoenzyme, jedoch keine D-Aminosäureoxidasen, an der Oxidation von Glycin zu Cyanid beteiligt sind (Laville *et al.*, 1998, Wissing, 1974).

1.4. Die Rolle von bakteriellem Cyanid in der Umwelt

Das durch die Bakterien produzierte Cyanid besitzt durch die Komplexbildung von Metalloenzymen eine toxische Wirkung, die Cyanogenese kann aber auch Vorteile für die Cyanidproduzierenden Bakterien in der Umwelt haben. Das bakteriell produzierte Cyanid beeinflusst Invertebraten (zusammengefasst in Zdor, 2015). Für einige Pseudomonaden wurde eine antagonistische Wirkung gegen Nematoden und Pilze gezeigt (Gallagher *et al.*, 2001, Nandi *et al.*, 2015). Das durch *Ps. chlororaphis* und *Ps. aeruginosa* produzierte Cyanid ist für die schnelle Abtötung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* verantwortlich (Gallagher *et al.*, 2001, Nandi *et al.*, 2015). Das bakterielle Cyanid wirkt hierbei auf die gleiche Weise wie chemisch synthetisiertes (Gallagher *et al.*, 2001). Eine Ko-Kultivierung von *Ca. elegans* und

Ps. chlororaphis führte zu einer Erhöhung der *hcnA*-Expression, Pseudomonaden können ihre Fressfeinde also sensieren und abwehren (Nandi *et al.*, 2015).

Für einige Bakterien wird zudem eine Pflanzenwuchsfördernde Wirkung beschrieben (zusammengefasst in Zdor, 2015). *Ps. fluorescens* CHA0 tötet Termiten im Boden durch Cyanidproduktion ab (Devi *et al.*, 2009). Pseudomonaden wirken antagonistisch gegen die Kartoffelpflanzen Pathogene *Streptomyces scabies* und *Phytophthora infestans* (Anand *et al.*, 2020, Pacheco-Moreno *et al.*, 2021), sowie weitere Pilze (Strano *et al.*, 2017). Verschiedene *Bacillus* Isolate zeigen eine antagonistische Wirkung gegen phytopathogene Pilze der Tomatenpflanze (Kalam *et al.*, 2020). Auch der Modellorganismus *Ch. violaceum* wirkt antagonistisch gegen eine Reihe von Pilzen, wie beispielsweise *Fusarium sp.* oder *Aspergillus sp.* (Barreto *et al.*, 2008). Eine Isolation von neuen Stämmen der bekannten Cyanidproduzenten birgt Potential im Pflanzenschutz. Manche der neuen Stämme zeigten eine stärkere Wirkung oder wirkten gegen ein breiteres Spektrum an Pathogenen (Barreto *et al.*, 2008).

Cyanidproduktion spielt bei der Wirkung gegen Phytopathogene eine große Rolle, jedoch sind auch weitere sekundäre Metabolite, wie Violacein oder Phenazin, beteiligt (Anand *et al.*, 2020, Barreto *et al.*, 2008, Nandi *et al.*, 2015, Strano *et al.*, 2017, Zdor, 2015).

Cyanid-produzierende Bakterien können Pflanzen nicht nur vor Pathogenen schützen, sondern auch den Pflanzenwuchs fördern, indem sie Phosphor solubilisieren (Mahdi *et al.*, 2020).

Der Einfluss von bakteriell produziertem Cyanid auf das Pflanzenwachstum und die Wirkung gegen Pathogene wird in dieser Arbeit nicht behandelt. Hier lag der Fokus auf den Biolaugungs-

eigenschaften der Neuisolate (Kapitel 3.2.2.5, Kapitel 4).

1.5. Anwendung bakterieller Cyanidproduktion in der Edelmetallgewinnung

Edelmetalle, wie Gold und Silber, kommen natürlich in Erzen vor, können aber auch aus Industrieabfällen und Elektroschrotten wiedergewonnen werden.

Chemisch können Metalle durch Cyanid gelaugt werden, hierbei werden Konzentrationen von 300 mg/l bis über 1 g/l NaCN/KCN eingesetzt (Oraby *et al.*, 2017). Das führt zur Entstehung von toxischen Abwässern. Eine Zugabe von Glycin steigert die Goldlösungsrate (Oraby *et al.*, 2017). Eine Alternative zu der chemischen Laugung stellt die Laugung mit Bakterien dar, die sogenannte Biolaugung (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Faraji *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2015). In diesen Publikationen wurde das bakteriell produzierte Cyanid für die Edelmetallrückgewinnung eingesetzt. Eine erfolgreiche Laugung ist für verschiedene Cyanidproduzenten, wie *Bacillus megaterium*, *Ps. aeruginosa* und *Ch. violaceum*, beschrieben (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Faraji *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2015). Da Biolaugungsexperimente mit neuisolierten Cyanid-produzierenden Bakterien in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist eine genauere Beschreibung der Biolaugung in Kapitel 4 zu finden.

1.6. Cyanid und der Mensch: Mukoviszidose und die Rolle als Signalmolekül

Ps. aeruginosa ist ein humanpathogenes Bakterium der Risikostufe 2 (TRBA, 2020). Das Bakterium kommt in der Lunge bei Mukoviszidose (engl. *cystic fibrosis*: CF) vor und ist hauptsächlich für die Mortalität von betroffenen Patienten verantwortlich (zusammengefasst in Zdor, 2015). Isolierte Stämme aus Lungen betroffener Patienten zeigen eine erhöhte Transkriptmenge der Cyanidsynthese, im Vergleich zu Wildtyp Stämmen (Son *et al.*, 2007). Cyanid ist im Atem von CF-Patienten nachweisbar und kann als Biomarker für die Infektion verwendet werden (Gilchrist *et al.*, 2015). Auch im Auswurf ist eine Cyanid-Konzentration von bis zu 3,9 mg/l CN⁻ nachweisbar (Ryall *et al.*, 2008). Zusammen mit

dem Virulenzfaktor Pyocyanin, welcher zu einem geringeren Effekt führt als Cyanid, inhibiert das von *Ps. aeruginosa* produzierte Cyanid die ziliare Schlagfrequenz reversibel (Nair *et al.*, 2014). Zum heutigen Zeitpunkt ist nicht klar, ob Cyanid nur als Biomarker einer Infektion angesehen werden kann (Zdor, 2015) oder ob Cyanid eine Rolle bei der Infektion einnimmt.

In hohen Konzentrationen wirkt Cyanid toxisch, in geringen Konzentrationen dient es als Signalmolekül (im Bereich nM bis mM, zusammengefasst in Zuhra *et al.*, 2022). In humanen Zellen führt eine geringe Cyanidkonzentration zur Stimulierung der Aktivität des Komplex IV der Atmungskette, einer erhöhten ATP-Produktion und zu einer verbesserten Zellproliferation. Zudem wird eine Rolle als Regulator der Expression von verschiedenen Genen diskutiert (Zuhra *et al.*, 2022).

1.7. Ziele der Arbeit und Übersicht über die Kapitel

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, bisher unbekannte, haloalkaliphile Cyanidproduzenten zu isolieren, die der Risikostufe 1 angehören. Ein Schwerpunkt der Isolierungen liegt auf schwermetallresistenten Bakterien. Ziel ist es, das Spektrum an Bakterien zu erweitern, die sich für die Biolaugung eignen. In Zusammenarbeit mit der BRAIN Biotech AG soll das Potential getestet und erste Biolaugungsversuche durchgeführt werden. Das bereits in vorangegangenen Arbeiten isolierte Bakterium *Ps. donghuensis* G2#25 soll für die Biolaugung weiter optimiert werden, einmal durch Medienoptimierung mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung und zum anderen durch Promotormutationen von *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC*. Durch gezielte Veränderungen des Promotors/Operators bzw. Austausch gegen induzierbare/*quorum-sensing* abhängige Promotoren mittels CRISPR/Cas9-System soll die Cyanidproduktion gesteigert und damit auch die Laugungseffizienzen erhöht werden.

Bisher wurden nur *hcnABC*-Operons in Pseudomonaden oder in *Ch. violaceum* nachgewiesen. In dem für Biolaugungen verwendeten Bakterium *Ba. megaterium* wurde bislang kein Gencluster identifiziert. Ziel ist es, durch bioinformatische Analysen in weiteren Bakterien und in den neuisolierten Cyanidproduzenten, die

Gencluster für die Cyanidsynthese zu identifizieren.

Bisherige Enzymdaten beruhen auf Messungen von intakten Zellen oder Zellextrakten. Ziel ist es, das Enzym biochemisch zu charakterisieren. Hierfür soll die Cyanidsynthese erstmals über Säulenaффinitätschromatographie gereinigt werden.

Diese Arbeit hat fünf Forschungsschwerpunkte, deren Ergebnisse sind in einzelnen Kapiteln zusammengefasst:

In Kapitel 3 ist die Isolierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Bakterien beschrieben. Grundlegende Eigenschaften, die Schwermetallresistenz, das Wachstum und die Biolaugungskapazität werden erläutert. Zur genaueren Charakterisierung werden die Genome von 18 Cyanid-produzierenden/resistenten Bakterienisolaten sequenziert und analysiert.

In Kapitel 4 werden Biolaugungsversuche mit *Ps. donghuensis* G2#25 dargestellt. Die Goldlaugungseffizienzen mit verschiedenen Substraten werden verglichen. Die Effizienz soll durch eine Vorbehandlung eines Substrates erhöht werden. *DoE*-Medienoptimierungen werden zudem zur Steigerung der Goldlaugungseffizienz durchgeführt.

In Kapitel 5 werden die Promotor- und Operatorveränderungen des *hcnABC*-Operons in

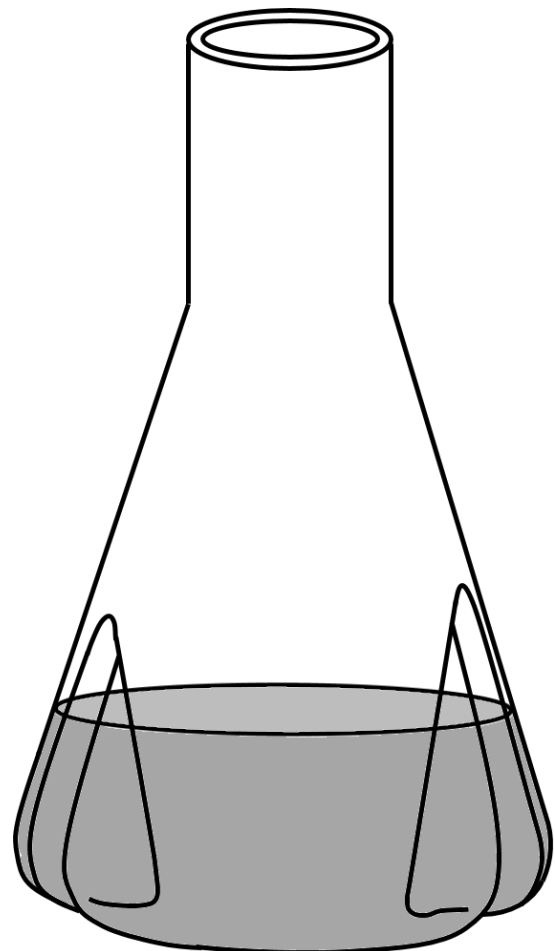
Ps. donghuensis G2#25 dargestellt. Das CRISPR/Cas9-System soll in dem Isolat etabliert werden. Die Genomsequenz wird zur Analyse der Promotorregion verwendet und um bekannte Regulatoren zu identifizieren. Der Promotor/Operator wird gezielt verändert, bzw. der native Promotor wird durch *quorum sensing* abhängige/induzierbare Promotoren ersetzt. Die Cyanidproduktion und die Biolaugungskapazität der Promotormutanten werden gemessen.

In Kapitel 6 werden bioinformatische Analysen der Cyanidsynthese und die Identifikation der *hcn*-Operons/Gencluster in Cyanid-produzierenden Neuisolaten und bekannten Cyanidproduzenten beschrieben. Die unterschiedlichen Gencluster werden anhand ihrer Aminosäuresequenzen und 3D-Strukturmodelle verglichen. Die Funktionalität der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 nach Aminosäureaustauschen wird überprüft. Zudem werden Deletionsmutanten von *Ps. donghuensis* G2#25 erstellt, um die Rolle der identifizierten Gencluster bei der Cyanidproduktion zu klären.

In Kapitel 7 wird die Proteinreinigung bzw. Anreicherung der Cyanidsynthese in *E. coli* und *Ps. donghuensis* G2#25 behandelt. Der Einfluss von Sauerstoff und der Temperatur auf die Cyanidsynthese wird untersucht.

Kapitel 2

Material & Methoden



© Patrick Haas

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die Experimente in dieser Arbeit wurden zum Teil im Rahmen einer Kooperation bei der BRAIN Biotech AG in Zwingenberg durchgeführt. Daher wurden teils für gleiche Methoden unterschiedliche Materialien, je nach Verfügbarkeit, verwendet. Materialien, die an der TU Darmstadt verwendet wurden, werden mit TUD gekennzeichnet. Materialien, die bei der BRAIN Biotech AG verwendet wurden, werden mit BRAIN gekennzeichnet.

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Verwendungsort
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz	AppliChem, Darmstadt	TUD
Agarose ME	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	TUD
ϵ -Aminocaprinsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Anhydrotetrazyklin (AHT)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA	TUD
L(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	TUD
L(+)-Arabinose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	BRAIN
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Bacto-Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	TUD
Bacto-Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	TUD
Bacto-Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	BRAIN
Gibco Bacto-Trypton (<i>tryptone enzymatic digest from casein</i>)	Gibco-Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	BRAIN
D(+)-Biotin	AppliChem, Darmstadt	TUD
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Brenztraubensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Bromkresolpurpur	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Calciumchlorid (anhydrous)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BRAIN
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
3-((3-Chloamidopropyl) dimethylammonio)-1-Propansulfonat (CHAPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Citronensäure x H ₂ O	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Cobalt-(II)-chlorid x 6 H ₂ O	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	TUD
cOmplete, EDTA <i>free</i>	Roche Diagnostics, Mannheim	TUD
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Cyanid-Standardlösung 100 mg CN ⁻ /l	Bernd Kraft, Duisburg	TUD
D-Desthiobiotin	IBA Lifesciences, Göttingen	TUD
Diisobutylene/myleic acid (DIBMA)	Prof. Dr. Sandro Keller, Technische Universität Kaiserslautern	TUD
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
<i>DNase</i> I	AppliChem, Darmstadt	TUD
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Eisen-(II)-sulfat x 7 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Eisen-(III)-chlorid x 6 H ₂ O	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 99 %	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt	BRAIN

Material & Methoden

Chemikalie	Hersteller	Verwendungsart
Essigsäure Rotipuran 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Ethanol absolute	VWR International GmbH, Darmstadt	TUD
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
dNTPs	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Gentamycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	TUD
D-Glucosemonohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
D(+)-Glucosemonohydrat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
L-Glutamat (Monokaliumglutamat x H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BRAIN
Glycerin	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Glycin	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Hefeextrakt, granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Hydroxy-Azophenyl Benzoessäure (HABA)	Acros Organics, Geel, Belgien	TUD
Iod-Kaliumiodidlösung nach Lugol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Isoamyl Alkohol	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Isopropylalkohol (2-Propanol)	VWR International GmbH, Darmstadt	TUD
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Kaliumcyanid	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Grams Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Kupfer-(II)-chlorid x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
LB-Medium (Lennox), granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Lysozym	QBIOSCIENCE, USA	TUD
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	LS Labor-Service GmbH, Griesheim	TUD
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Magnesiumsulfat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Mangan-(II)-chlorid x 4 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
L-Methionin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
L-Methionin	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Dimethylformamid (DMF) Rotipuran >99.8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Midori Green	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	BRAIN
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	TUD
Natriumacetat x 3 H ₂ O	LS Labor Service GmbH, Darmstadt	TUD
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumcarbonat	Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz	BRAIN
Natriumcarbonat x 10 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Natriumdesoxycholat Na-Salz	Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz	TUD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Natriummolybdat x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Natriumnitrit	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Nickel-(II)-chlorid x 6 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Nystatin x 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BRAIN
Oxidase-Reagenz	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich	TUD
2-Oxoglutarat Di-Na-Salz	Merck KGaA, Darmstadt	TUD

Chemikalie	Hersteller	Verwendungsort
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
pH-Teststreifen 5-10	Merck KGaA, Darmstadt	BRAIN
pH-Teststreifen 0-14	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	BRAIN
Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
L-Phenylalanin	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Phenazinmethosulfat (PMS)	Acros Organics, Geel, Belgien	TUD
Rinderhämoglobin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	TUD
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim	TUD
Roti-Blottingpapiere, Dicke 1 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Roti Blue (5x Konzentrat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Roti-Fluoro PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Rubidiumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt (Amresco)	TUD
D(+)-Saccharose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	TUD
D(+)-Saccharose	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Salpetersäure Supra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	BRAIN
Salzsäure Supra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	BRAIN
Safranin O	Alfa Aesar GmbH & CoKG, Karlsruhe	TUD
L-Serin	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Silikon-Antischaum	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Strep-Tactin <i>Gravityflow-Säule</i> (1 ml)	IBA Lifesciences, Göttingen	TUD
Styrene/maleic acid (SMA2:1)	Prof. Dr. Sandro Keller, Technische Universität Kaiserslautern	TUD
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Thiamin HCl x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	TUD
Thiamin HCl x 2 H ₂ O	Fluka Analytical, St. Gallen, Schweiz	BRAIN
Thioglykolat Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
L-Threonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	BRAIN
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Tris Buffer Grade	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt	BRAIN
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Trypton-Pepton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
L-Tryptophan	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	TUD
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
30 % Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	TUD
Zinksulfat x 7 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	TUD

2.1.2. Bakterienstämme

Bakterienstämme	Referenz	Verwendungsort
1K3	Sluka, 2018	TUD/BRAIN
2OB3	Sluka, 2018	TUD/BRAIN
20OB1	Sluka, 2018	TUD/BRAIN
AFL_1Cu F1	Diese Arbeit	TUD
AFL_1Cu F2	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_1Cu F5	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_1Cu F6	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_1Cu F7	Diese Arbeit	TUD
AFL_1Cu F10	Diese Arbeit	TUD
AFL_1Cu F12	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_Na10 F10	Diese Arbeit	TUD
AFL_Na10 F14	Diese Arbeit	TUD
AFL_Na10 F22	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_Na10 F23	Diese Arbeit	TUD
AFL_AgNO ₃ F5	Diese Arbeit	TUD
AFL_AgNO ₃ F17	Diese Arbeit	TUD/BRAIN

Material & Methoden

Bakterienstämme	Referenz	Verwendungsort
AFL_GHD F2	Diese Arbeit	TUD
AFL_GHD F7	Diese Arbeit	TUD
AFL_GHD F21	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_MBN F16	Diese Arbeit	TUD
AFL_MBN F19	Diese Arbeit	TUD
AFL_MBN F20	Diese Arbeit	TUD
AFL_Na11 F1	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
AFL_Na11 F4	Diese Arbeit	TUD
AFL_Na11 F6	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
<i>Bacillus subtilis</i> DSM347	DSMZ, Braunschweig	TUD
<i>Escherichia coli</i> Bl21	Stragene (AgilentTechnologies), Waldbronn	TUD
<i>Escherichia coli</i> NEB DH10ß	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	BRAIN
<i>Escherichia coli</i> Top10F ⁺	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt	TUD
GYT6	Popova, 2017	TUD
IHS_GHD H1	Diese Arbeit	TUD
IHS_GHD H2	Diese Arbeit	TUD
IHS_MBN H1	Diese Arbeit	TUD
IHS_MBN H2	Diese Arbeit	TUD
IHS_Na11 H1	Diese Arbeit	TUD
IHS_Na11 H2	Diese Arbeit	TUD
MG#27	Amberger, 2016b	TUD/BRAIN
NSS K10	Diese Arbeit	TUD
NSS K18	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
OS1 K39	Diese Arbeit	TUD
<i>Pseudomonas donghuensis</i> G2#25	Amberger, 2016b	TUD/BRAIN
<i>Pseudomonas metallosolvens</i>	Amberger, 2016b, BRAIN Biotech AG	BRAIN
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 ¹	DSMZ, Braunschweig	TUD/BRAIN
SL1_1Cu K1	Diese Arbeit	TUD
SL1_5Cu K2	Diese Arbeit	TUD
SL1_5Cu K5	Diese Arbeit	TUD
SL1_AgNO ₃ 2V	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(2) K6	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(2) K12	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(2) K14	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(2) K18	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(2) K25	Diese Arbeit	TUD
SL1_GHD(3) K2	Diese Arbeit	TUD
SL1_Na11 K6	Diese Arbeit	TUD
SL1_Na11 K8	Diese Arbeit	TUD
SL1_Na11 K17	Diese Arbeit	TUD
SL1_Na11 K31	Diese Arbeit	TUD
SL1_Na11 K36	Diese Arbeit	TUD
SL2_5Cu K2	Diese Arbeit	TUD
SL2_HSal K2	Diese Arbeit	TUD
SL2_HSal K13	Diese Arbeit	TUD
SL2_HSal K17	Diese Arbeit	TUD
SL2_HSal K19	Diese Arbeit	TUD
SL2_HSal K24	Diese Arbeit	TUD
W2_1Cu K2	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
W2_AgNO ₃ K1	Diese Arbeit	TUD/BRAIN
W2_AgNO ₃ K2	Diese Arbeit	TUD

¹*Pseudomonas putida* KT2440 wurde als *Pseudomonas alloputida* KT2440 reklassifiziert (Keshavarz-Tohid *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wird der Stamm weiter als *Pseudomonas putida* KT2440 angegeben.

2.1.3. Plasmide

Nr.	Plasmid	Referenz	Beschreibung ¹
pASK75-basierte Plasmide			
1	pASK75	Skerra, 1994	Expressionsvektor <i>E. coli</i> , Rückgrat für Plasmide 2-25, Amp ^R
2	pASK-HCN.dong ²	Amberger, 2016a	Expressionsvektor <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 <i>hcnABC</i> (Gene in Multiple Cloning Site)
3	pASK-HCN.dong C65A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnA</i> C65A
4	pASK-HCN.dong C68A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnA</i> C68A
5	pASK-HCN.dong C81S	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnA</i> C81A
6	pASK-HCN.dong C383A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> C383A
7	pASK-HCN.dong C418A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> C418A
8	pASK-HCN.dong C423A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> C423A
9	pASK-HCN.dong C4237A	Diese Arbeit	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> C437A
10	pASK-HCN.dong K408R	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> K408R
11	pASK-HCN.dong R344A	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnC</i> R344A
12	pASK-HCN.dong R344K	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnC</i> R344K
13	pASK-HCN.dong R371A	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnC</i> R371A
14	pASK-HCN.dong R446A	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> R446A
15	pASK-HCN.dong R446K	Peric, 2020	von 2, Mutation: <i>hcnB</i> R446K
16	pASK-HCN.dong HcnA_Strep_Nterm	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnA</i> : 5'-Ende fusionierte Strep-tag-Codons
17	pASK-HCN.dong HcnA_Strep_Cterm	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnA</i> : 3'-Ende fusionierte Strep-tag-Codons
18	pASK-HCN.dong HcnB_Strep_Nterm	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnB</i> : 5'-Ende fusionierte Strep-tag-Codons
19	pASK-HCN.dong HcnB_Strep_Cterm	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnB</i> : 3'-Ende fusionierte Strep-tag-Codons
20	pASK-HCN.dong HcnC_Strep_Nterm	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnB</i> : 5'-Ende fusionierte Strep-tag-Codons
21	pASK-HCN.dong MBP-N-term	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnA</i> : 5'-Ende fusioniertes <i>mbp</i> -Gen (amplifiziert von 52)
22	pASK-HCN.dong MBP-C-term	Diese Arbeit	von 2, <i>hcnC</i> : 3'-Ende fusioniertes <i>mbp</i> -Gen, Strep-tag-Codons am 3' Ende des <i>mbp</i>
23	pASK-HCN.dong MBP_L_Strep-C-term	Diese Arbeit	von 22, Linker zwischen <i>hcnC</i> und <i>mbp</i>
24	pASK-HCN.dong Strep_MBP_L_Strep-C-term ²	Diese Arbeit	von 23, Strep-tag-Codons am 3'-Ende von <i>mbp</i> fusioniert
25	pASK_Rox ²	Diese Arbeit	von 1, Zwischenklonierung des Rox Reparaturfragments: vfb nativer <i>hcn</i> -Promotor <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 + <i>P_{Rox3061}</i> + hfB nativer Promotor
pCas9- und pBBR1MCS-2-basierte Plasmide für <i>Ps. donghuensis</i> G2#25			
26	pB5_ara_Cas9_delBbsI_PsacB_sgrNA (pCas9)	BRAIN Biotech AG	Genomische Veränderungen in <i>Ps. donghuensis</i> mit dem CRISPR/Cas9-System (Abb. 4), Rückgrat für Plasmide 27-32; 35-45, Km ^R
27	pCas9_Sp7_2_P	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (intern <i>hcnA</i>)
28	pCas9_Sp9_3_P	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (Promotor <i>hcnA</i>)
29	pCas9_Sp14_2_P	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (intern <i>hcnCAB</i>)
30	pCas9_Sp7_CAB	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (intern <i>hcnCAB</i>)
31	pCas9_Sp9_Strep	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (intern <i>hcnC</i>)
32	pCas9_Sp5_GacA	Diese Arbeit	von 26, über <i>BbsI</i> Schnittstellen inserierte Spacersequenz (intern <i>gacA</i>)
33	pBBR1_MCS_2	BRAIN Biotech AG	Bestimmung Transformationseffizienz von <i>Ps. donghuensis</i> G2#25, Km ^R
34	pBBR1_TTH1_Sp1	AG Kletzin, TU Darmstadt	
35	pCas9_Sp9_DelUpstrANR	Diese Arbeit	von 28, mit Reparaturfragment (vfb + hfB) <i>ΔupstreamANR</i> (Abb. 29)

Material & Methoden

Nr.	Plasmid	Referenz	Beschreibung ¹
pCas9- und pBBR1MCS-2-basierte Plasmide für <i>Ps. donghuensis</i> G2#25			
36	pCas9_Sp14_-10Box	Diese Arbeit	von 29, mit Reparaturfragment (vfB + hfB) Veränderung -10 Box (Abb. 29)
37	pCas9_Rox	Diese Arbeit	von 28, mit Reparaturfragment (vfB + $P_{Rox3061}$ + hfB, amplifiziert von 25) Austausch nativer <i>hcn</i> -Promotor gegen $P_{Rox3061}$ (Abb. 5)
38	pCas9_ P_{BAD}	Diese Arbeit	von 37, $P_{Rox3061}$ gegen P_{BAD} + <i>araC</i> ausgetauscht
39	pCas9_ P_{TAC}	Diese Arbeit	von 37, $P_{Rox3061}$ gegen P_{TAC} + <i>lacI</i> ausgetauscht
40	pCas9_xut	Diese Arbeit	von 37, $P_{Rox3061}$ gegen P_{Xut} + <i>xutR</i> ausgetauscht
41	pCas9_Rha	Diese Arbeit	von 37, $P_{Rox3061}$ gegen P_{Rha} + <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> ausgetauscht
42	pCas9_Δ <i>hcnABC</i>	Diese Arbeit	von 27, Reparaturfragment vfB (ab Terminator) + hfB von <i>hcnABC</i>
43	pCas9_Sp7_Δ <i>hcnCAB</i>	Diese Arbeit	von 30, Reparaturfragment vfB + hfB von <i>hcnCAB</i>
44	pCas9_HcnC_Strep	Diese Arbeit	von 31, Reparaturfragment Insertion Streptag-Codons an <i>hcnC</i> 3' (vfB + Strep-tag + hfB)
45	pCas9_Δ <i>gacA</i>	Diese Arbeit	von 32, Reparaturfragment vfB + hfB von <i>gacA</i>
46	pBBR1MCS-2_Δ <i>lacZabc</i> ²	Diese Arbeit	von 33, zur Expression von <i>hcnABC</i> , Strep-tag-Codons 3' <i>hcnC</i>
47	pBBR1MCS-2_natProabc ²	Diese Arbeit	von 44, Austausch P_{lacZ} gegen nativen <i>hcnABC</i> Promotor <i>Ps. donghuensis</i> G2#25

In vitro Protein Synthese

48	NEBExpress Control DHFR-His Plasmid	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	Positivkontroll-Plasmid <i>in vitro</i> Protein Synthese, Amp ^R
49	DHFR_HcnABC ²	Diese Arbeit	von 48, Austausch <i>dhfr</i> gegen <i>hcnABC</i>

Weitere Plasmide

50	pET28	Novagen, Merck, Darmstadt	Amplifizierung P_{TAC} + <i>lacI</i> , für 39, Km ^R
51	PMQ688	Robert M. Q. Shanks, University of Pittsburgh	Amplifizierung P_{Rha} + <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> für 41, Km ^R
52	pPR1 malE-TEV-mccC(delta)1-3_2	Jakob Eller	Amplifizierung <i>mbp</i> für 21, Amp ^R

¹Die Oligonukleotide sind unter dem jeweiligen Abschnittsnamen in 2.1.4. dargestellt.

2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Die dargestellten synthetischen Oligonukleotide stammen von Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt).

Zweck ¹	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (für Plasmid)
Seq +	BAC 27F	agagtttgatcctggtcag	16S rDNA PCR und
PCR	BACT 1390R	gacggcggtgwgtrcaa	Sequenzierung
Seq	HcnB Seq Rev	ccgagttgctggaatgc	Sequenzieren <i>hcn</i> -Gencluster <i>Ps. donghuensis</i> G2#25

pASK75

Seq +	ask1_2	agagttattttaccactccctat	Kolonie-PCR + Sequenzierung von 2-25
PCR	ask2	gtagcggtaaacggcagacaa	
3-9	HcnACys65Ala For HcnACys65Ala Rev HcnACys68AlaFor HcnACys68AlaRev HcnBCys383AlaFor HcnBCys383AlaRev HcnBCys418AlaFor HcnBCys418AlaRev	cccattgctgctgtgtcgc cgacacccatgccgagaaag gcctggtgtgatcaacgg gcaatggcagacacccatgc ccgctgcgaacacgtgac gcgatcaccgtgtcggg gcccagggcgcatgtg gtgcccattgctcaccg	template: 2 Erstellung: 3-9

Zweck ¹	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (für Plasmid)
pASK75			
	HcnBCys423AlaFor	ccgtcggctactgcagcg	
	HcnBCys423AlaRev	ccatgcgccctggcag	
	HcnBCys427AlaFor	gccagcgatcgctgcgcgaag	template: 2
	HcnBCys427AlaRev	gtagccgacgcacatgcgcc	Erstellung: 3-9
Umpositionierung des Strep-tags <i>hcnABC</i>			
16	HcnA_Strep_N For	cgcagttcgggtggcgcccagactctggagcgaagc	template: 2
	HcnA_StrepN_Rev	ggtagcggcagctggccatttttgcctcgttatctag-	Erstellung: 16
	Comp2	atttttgtg	
17	HcnA_Strep C For	gcagttcgggtgtaataatgagcctgcgtccagtgatt-	template: 2
	HcnA_Strep C Rev	gggtggcgccagctggctggctcctcgcccggcaaa-	Erstellung: 17
	Comp	gcg	
18	HcnB_Strep N For	cgcagttcgggtggcgcccagcctgcgtccagtgattg	template: 2
	HcnB_Strep N Rev	ggtagcggcagctggccatcatggtgcctcctgccgg-	Erstellung: 18
	Comp	caaag	
19	HcnB_Strep C For2	ccgcagttcgggtgtaataaagcatgaacagaac-	template: 2
	HcnB_Strep C	ctatgatgtg	Erstellung: 19
	RevComp2	gtggcgccagctagcggcttcctgcccagttgctg-	
	Comp2	gaatg	
20	HcnC_Strep N For	cgcagttcgggtggcgccaacagaac-	template: 2
	HcnC_Strep N Rev	ctatgatgtggtc	Erstellung: 20
	Comp	ggtagcggcagctggccatgcttcaggcttcg	
Klonierung <i>mbp</i> an die Cyanidsynthese (pASK75)			
21	MBP N-term fwd	agggcaaaaaatgatgttttccgcctcg	template: 52
	MBP N-term rev	ccagagtctgacctggaaatacaggttc	Erstellung: 21
21	pASK_HCN_M_Nt_	tttccagggtcagactctggagcgaag	template: 2
	Fwd		Erstellung: 21
	pASK_HCN_M_Nt_rev	aaaacatcatttttgcctcgttatctag	
22	MBP C-term fwd	gaaaactgtactccagggttttccgcctcgg	template: 52
	MBP C-term rev	gtgacgccaagccttggtagacgag	Erstellung: 22
22	pASK_HCN_M_c-tFwd	caccaaggcttggcgtcaccgcgag	template: 2
	pASK_HCN_M_c-t_rev	accctggagtagcaggttttcggcaaggcgacc	Erstellung: 22
23	MBP_L_St Fwd	ggtagttctgggtggttctggcttggcgtcaccg-	template: 22
	MBP_L_St Rev	cag	Erstellung: 23
	MBP_L_St Rev	accagaaccaccaccagaaccaccttggtagacgag-	
		tctg	
24	St_MBPC_St Fwd	cgcagttcgggtgaaacctgtacttcc	template: 23
	St_MBPC_St Rev	ggtagcggcaagcggcaaggcagc	Erstellung: 24
pCas9			
Seq	7_Seq_sgRNA_	tcagcgatcactggcagac	Sequenzieren pCas9 Einbau
	EcChim375		Spacer, 27-32
	Seq_Spacer_	gaatgatgtagccgtcaagttg	
	pCas9_Fwd		
Seq +	pCas9_Seq_	cactcatcgagctggcc	Sequenzieren + Kolonie-PCR
PCR	HR_Fwd		35-45
Seq +	pCas9_Seq_	gtttacaacgtctgactg	Sequenzieren pCas9 Reparatur-
PCR	HR_Rev		fragment + Kolonie-PCR: 35-45
			+ Nachweis <i>Curing</i> -PCR
PCR	pCas9_Seq_	cttattcaggcgtagcaccaggcgttaagggc	Nachweis <i>Curing</i> -PCR
	HR_Fwd2		
27	Spacer 7_P Fwd	ggtcgcaactgaccggcgttctg	Spacer Deletion <i>hcnABC</i>
	Spacer 7_P Rev	aaaccagaaagcgggtcagttgc	Erstellung: 27

Material & Methoden

Zweck ¹	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (für Plasmid)
pCas9			
28	Spacer 9_P Fwd Spacer 9_P Rev	ggtcgcagatggcctgtgettac aaacgataagcacagccatctgc	Spacer Deletion Bereich <i>upstream</i> ANR <i>Ps. donghuensis</i> G2#25/ Austausch vollständiger Promotorsequenz Erstellung: 28
29	Spacer 14_P Fwd Spacer 14_P Rev	ggtcgctggcctggatcaatagacc aaacggtctattgatccagccagc	Spacersequenz Veränderung -10 Box in <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 29
30	Spacer7_Pdong_ CAB_Fwd Spacer7_Pdong_ CAB_Rev	ggtcggaacagttgcgctcagc aaacgctgagcgcgcaactgttc	Spacersequenz <i>hcnCAB</i> intern Erstellung: 30
31	StrepSpacer9_Fwd StrepSpacer9_Rev	ggtcgtggcctgattgtgataaac aaacgtttatccacaatcaggccac	Spacersequenz <i>hcnC</i> C-terminal Erstellung: 31
32	GacA_Spacer5_Fwd GacA_Spacer5_Rev	ggtcgaacgggtcttcttcaaaa aaactttgtaagaagacccttc	Spacersequenz <i>gacA</i> intern Erstellung: 32
Konstruktion pCas9 mit Reparaturfragmenten			
35	Sp9P_Deletion_Fwd Sp9P_Deletion_Rev	ctcgcgtccggtgcccctcttcgcta ggcagaccatcgatcgccttccaacag	<i>template</i> : 28 Erstellung: 35
35	HRTemp bis Term Fwd HRTemp bis Term Rev2	agggcgatcgatcggcgtggtctgagc gatccagccagggtcattcaaatcggtgacccg	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 35
35	HRTemp ab ANR Fwd HRTemp ab ANR Rev	ttgaatgcacctggcctggatcaatagacc aggccccgaccggacgcgaggcttcac	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 35
36	Sp14P_-10_Fwd Sp14P_-10_Rev	ttcgcgggcegtgcccctcttcgcta cgcagcgaacgatcgccttccaacagttgc	<i>template</i> : 29 Erstellung: 36
36	HRTemp_- 10_vfb_Fwd HRTemp_- 10_vfb_Rev	agggcgatcgtttcgctgcgatcttcgatg caagcgcgctcatgatctattgatccagccagct	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 36
36	HRTemp_- 10_hfb_Fwd HRTemp_- 10_hfb_Rev	atagatcatgagcgcgttggcatataatgce agtcattgttc aggccccgacggcccgcgaaagaccag	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 36
25	vfbRox_pASK_Fwd vfb_Rox_Rev	agggcaaaaatgggctagtgaagcccttc gaaaggaggcgtgattcaaatcggtgacc	<i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 25
25	hfb_Rox_Fwd hfbRox_pASK_Rev	gaggtcggtcatgcagactctggagcgaag gtcaagcttagaccacgccctcttgatc	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 25
25	P _{Rox3061} _Fwd P _{Rox3061} _Rev	ttgaatgcacgectcttctggttgc gagctgcatgaccgacctctcaggtttttattg- gaaggcagattataagagcctgg	<i>template</i> : gDNA <i>Ps. putida</i> KT2440 Erstellung: 25
25	pASK_Rox_Rev pASK_Rox_Fwd	aactagcccattttgcccctgattctag cggcgtggctctaaagctgacctggaag	<i>template</i> : 1 Erstellung: 25
37	PCas9_Rox_Fwd PCas9_Rox_Rev	cggcgtggctgctgcccctcttcgcta aactagcccacgatcgccttccaacag	<i>template</i> : 28 Erstellung: 37
37	vfb_Rox_fwd hfb_Rox_rev	agggcgatcgtgggctagtgaagcccttc aggccccgacgaccacgccctcttgatc	Amplifikation vfb-P _{Rox3061} -hfb <i>template</i> : 25 Erstellung: 37
38	pBAD_Crispr_Fwd pBAD_Crispr_Rev	gatttgaatgcacgacgaagcaggattctgcaaac cagagtctgcatttttgcctctaaaataaactcgag	<i>template</i> : 26 Erstellung: 38

Zweck ¹	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (für Plasmid)
Konstruktion pCas9 mit Reparaturfragmenten			
38	pCas9(Rox)_pBad_ Fwd pCas9(Rox)_pBAD_ Rev	ggaggcaaaaaatgcagactctggagcgaagc ctgcttcgtcgtgcattcaaatcggtgacccg	<i>template</i> : 37 Erstellung: 38
39	pCas9(Rox)_pTAC3_ Fwd pCas9(Rox)_pTAC3_ Rev	gatataccatgcagactctggagcgaagc cttgagaggtgcattcaaatcggtgacccg	<i>template</i> : 37 Erstellung: 39
39	pTAC_Crispr_Fwd pTAC_Crispr_Rev	gatttgaatgcacctctcaagggcatcggtcgag gagtctgcatggtatatctccttcttaaagttaaac	<i>template</i> : 50 Erstellung: 39
40	pCas9_xut_Fwd pCas9_xut_Rev	gacattgccaatgcagactctggagcgaagc ccgtgtcctggtgcattcaaatcggtgacccg	<i>template</i> : 37 Erstellung: 40
40	xut_pCas9(rox)_ Fwd xut_pCas9(Rox)_ Rev	gatttgaatgcaccaggacacggcgcgtattctcc gagtctgcattggcaatgtcctgtgttcttgg	<i>template</i> : gDNA <i>Ps. fluorescens</i> Pf01 Erstellung: 40
41	pCas9_Rha_Fwd pCas9_Rha_Rev	ggattttgaatgcagactctggagcgaagcttg ccgtgtcctggtgcattcaaatcggtgacccg	<i>template</i> : 37 Erstellung: 41
41	Rha_Fwd Rha_Rev	gatttgaatgcaccaggacacggcgcgtattctccc gagtctgcattcaaaaatcctccttaattaatcctgctg	<i>template</i> : 51 Erstellung: 41
42	pCas9_DelHcn_Rev pCas9_ DelHcn_lang3_Fwd	cgcgccaagccgatcgccctccaacag cagcaacacctgtcgggcctctcgctattacg	<i>template</i> : 27 Erstellung: 42
42	vfb_DelHcn_Fwd vfb_DelHcn_lang_Rev	aggcgcatcggttggcgcgatgcatttc cgccaggaactaatgggtcgttgcg	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 42
42	hfb_Del- Hcn_lang_Fwd hfb_DelHcn_lang_Rev	gaccattagtctcgccgagcgttttg aggcccgacaggtgttgcgcgagg	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 42
43	pCas9_DelCAB_ Fwd pCas9_DelCAB_ Fwd	cggtgctgacgtgcccctcttcgctattacg cggtgctgacgtgcccctcttcgctattacg	<i>template</i> : 30 Erstellung: 43
43	vfb_DelCAB_Fwd vfb_DelCAB_Rev	ggcgcatcgccgcccgttgggtcagcgc cgcgcatcggttgcgctggcaaccttcg	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 43
43	hfb_DelCAB_Fwd hfb_DelCAB_Rev	ccagccgaaccgactgcgcgagccgcgc gaggcccgacgtcgaccacggccagaaggtc	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 43
44	pCas9Strep_Fwd pCas9Strep_Rev	cttgagtgcctgtcgggcctcttcgctattacgc ccttgaccgcatcgccctccaacagttg	<i>template</i> : 31 Erstellung: 44
44	vfbStrep_Fwd vfbStrep_Rev	ggaagggcgcgtcggtcaagccagatcatcctcac tgaagccggttatccacaattattaacca ccgaactcggtgacgccaagc	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 44
44	hfbStrep_Fwd hfbStrep_Rev	ggttaataattgtgataaacggccttc agccctggg ggcccgacaggcactcaagccggcgcctcg	Amplifikation hfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 44
45	pCas9_GacA_Fwd pCas9_GacA_Rev	gttcgagaaggggtgcccctcttcgctattacgcccagc cctggcgactcgatcgccctccaacagtt- gcgagcctg	<i>template</i> : 32 Erstellung: 45
45	vfb_GacA_Fwd vfb_GacA_Rev	gaagggcgcgatgcaggtgatggcacttagc ctggtgaccgagaccaccagaccctaatacaagc	Amplifikation vfb <i>template</i> : gDNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25 Erstellung: 45

Material & Methoden

Zweck ¹	Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (für Plasmid)
Konstruktion pCas9 mit Reparaturfragmenten			
45	hfb_GacA_Fwd hfb_GacA_Rev	gctggtggtctcggtcaccagcgacgtcgagctg gaggeccgcacccttctcgaaactccagggccatg	Amplifikation hfb template: gDNA Ps. donghuensis G2#25 Erstellung: 45
Komplementierung der Deletionsmutanten			
46	Pdong_pbbr1_ Fwd_neu P_dong_pbbr1_ Rev_neu	gcaggaattcttaaccaccgaactgcgg cccctcagatgcagactctggagcgaag	template: 2 Erstellung: 46
46	pBBR1_P.dong Fwd2_neu pBBR1_P.dong Rev2_neu	gagtctgcatctcgaggggggcccggta cccagctttg tggttaataagaattcctcgagcccggggat ccactag	template: 33 Erstellung: 46
47	natPro ABC pBBR1 fwd natPro ABC pBBR1 rev	gagtctgcatagctttctcgctgaaaaagaaacatgg caccagctttctagaatcgccgttgagaaacg	template: gDNA Ps. donghuensis G2#25 Erstellung: 47
47	pBBR1 BB natPro ABC fwd2 pBBR1 BB natPro ABC rev2	gattctagaaaagcctggggtgcctaagt- gagctaact gacgaaaagctatgcagactctggagcgaagctaga- tatac	template: 46 Erstellung: 47
Insertüberprüfung pBBR1MCS-2			
Seq + PCR	pCas9 Seq HR Fwd 2 pBBR1MCS-2 RevSeq 2	cttattcagcgtagcaccagcgcttaagggc gcgcaacgcaattaatgtg	PCR-Nachweis Insert 46, 47
DHFR <i>in vitro</i> Protein Synthese			
49	T7 Plasmid HCN Rev T7 Plasmid HCN Fwd	gagtctgcat- atgtatatctccttcttaagttaacaaaattattctagac tggttaataatgaggatcccgggaattc	template: 48 Erstellung: 49
49	T7_HcnABC_fwd T7_HcnABC_rev	agatatacatatgcagactctggagcgaag gggatcctcattattaaccaccgaactgcg	template: 2 Erstellung: 49
Ps. donghuensis G2#25 Kolonie-PCR			
Seq + PCR	Seq UpstHcnA Fwd Seq_HcnB Rev	caactagcgcgtgaactgag ccgagttgctggaatgc	PCR-Überprüfung Promotor- mutationen in Ps. donghuen- sis G2#25 + Sequenzierung
Seq + PCR	SeqUpstHCNA2_ Fwd Seq_dsHCNC Rev	cgactggaagcatcttgaccctcaaggcccg ccagcatcgcgccgacattgtttatg	Kolonie-PCR + Sequenzierung Deletion hcnABC
Seq + PCR	Seq_PdongDel CAB_2_Fwd Seq_PdongDel CAB_2 Rev	gatgggcaccgcgaggtgttacatcgg ctacgaccgctcgcctcgcgcacc	Kolonie-PCR Deletion hcnCAB
Seq + PCR	Seq Hcn B 2 For HcnB Seq Rev	aggcgcataatccactg ccgagttgctggaatgc	PCR-Amplifizierung hcnABC intern
PCR	SeqCAB intern_Fwd Pdong_lang Seq3	caaccggcaatgcacctcaaccagagc gcatggctgctcgc	PCR-Amplifizierung hcnCAB intern
Seq + PCR	KoloniePCR_GacA Fwd KoloniePCR_GacA Rev	cctcaccgtcgaacatccggtagac caggttcgctccagcaattgctgg	PCR-Amplifizierung und Sequenzieren gacA Ps. donghuensis G2#25
Seq + PCR	GacA_CRISPR_Fwd GacA_CRISPR_Rev	ccgttataatcaacaagttaaagttgttattag catcgccgctgcccttccatg	Kolonie-PCR Deletion gacA

¹Die Nummer der jeweils erstellten Plasmide ist angegeben und weitere Verwendungen.

Seq: Sequenzierung; PCR: verschiedene durchgeführte PCRs.

2.1.5. Antikörper, Enzyme, Enzympuffer, Größenstandards und Kits

Material	Hersteller	Verwendungsart
Antikörper und Streptavidin		
Anti-MBP Monoclonal Antibody	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody	LI-COR, Lincoln, USA	TUD
IRDye 800CW Streptavidin	LI-COR, Lincoln, USA	TUD
Enzyme		
<i>BbsI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
<i>BpiI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
<i>DpnI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD/BRAIN
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	TUD
NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD/BRAIN
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
T4 Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
T4 Quick Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	BRAIN
<i>XbaI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD/BRAIN
<i>XhoI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD/BRAIN
Enzympuffer		
Biotin Blocking Buffer	IBA-Lifescience, Göttingen	TUD
CutSmart	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD/BRAIN
10x DreamTaq Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	TUD
FastDigest Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
5x Q5 High GC Enhancer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
5x Q5 Reaction Buffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
T4 Quick Ligase Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	BRAIN
T4 Ligase Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
Größenstandards		
Fisher BioReagents EZ-Run Prestained Rec Protein Ladder	Fisher BioReagents, Schwerte	TUD
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	TUD
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	TUD
GeneRuler 1 kB DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
Kits		
DeNovix dsDNA Broad Range Kit	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	BRAIN
DNA Clean and Concentrator Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg	BRAIN
E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-Tek Inc., Norcross USA	TUD
GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	TUD
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	TUD
GeneJet Plasmid-Miniprep-Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich	BRAIN
Genomic DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg	BRAIN
Monarch Genomic DNA Purification Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
NEBExpress Cell-free <i>E. coli</i> Protein Synthesis System	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	TUD
Genomic DNA Preparation Kit 100/G Säulen Midi Prep	Qiagen GmbH, Hilden	BRAIN

Material & Methoden

2.1.6. Medien

2.1.6.1. Allgemeine Medien

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
LB-Medium		
LB, granuliert	20 g	
Agar (Festmedium) mit NaOH	15 g	
dH ₂ O	pH 7,2 ad 1 l	autoklavieren
Glycin-Methionin Lösung für Induktionsmedien		
Glycin	40 g	
L-Methionin	40 g	
dH ₂ O	ad 1 l	sterilfiltrieren
Thioglykolat-Medium		
Thioglykolat-Medium	3 % (w/v) in dH ₂ O	aufgekocht, auf Reagenzgläser verteilt, autoklaviert
0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10	bei Bedarf, siehe 2.1.6.4. Natriumcarbonatpuffer	

2.1.6.2. Kultivierung von *E. coli*

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
LB-HD-Medium + Kupfer		
Trypton	1 % (w/v)	
Hefeextrakt	0,4 % (w/v)	
NaCl	1 % (w/v)	
D-Glucosemonohydrat mit NaOH	0,0125 % (w/v)	
dH ₂ O	pH 8 ad 1 l	autoklavieren
Kupferchlorid (Kapitel 2.1.7.8.)	0,75 mM	
M9-Medium		
5x M9 Salze	200 ml	
1 M MgSO ₄ (in dH ₂ O)	2 ml	autoklavieren
1 M CaCl ₂ (in dH ₂ O)	0,1 ml	autoklavieren
1 mg/ml Thiamin (in dH ₂ O)	1 ml	sterilfiltrieren
1 mg/ml Biotin (in dH ₂ O)	1 ml	sterilfiltrieren
20 % Glucose ([w/v] in dH ₂ O)	20 ml	autoklavieren
dH ₂ O	ad 1 l	
5x M9 Salze		
Natriumhydrogenphosphat	37,6 g	
Kaliumhydrogenphosphat	15 g	
Ammoniumchlorid	5 g	
NaCl	2,5 g	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren
SOB-Medium		
Bacto-Trypton	20 g	
Hefeextrakt	5 g	
Natriumchlorid	0,5 g	
Kaliumchlorid	0,20 g	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren
1 M Magnesiumchlorid (in dH ₂ O, autoklaviert)	10 ml	

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
PSI-Medium		
Bacto-Hefeextrakt	5 g	
Bacto-Trypton	20 g	
Magnesiumsulfat mit KOH	5 g pH 7,6	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren

2.1.6.3. Kultivierung von *Pseudomonas*

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
0,5x HD-Medium		
Trypton-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat	0,5 g	
Bacto Agar (Festmedium) mit NaOH	15 g pH 8-12 (je nach Bedarf)	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren

0,5x HD Induktionsmedium		
Trypton-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat mit NaOH	0,5 g pH 8-12	
dH ₂ O	ad 875 ml	autoklavieren
Glycin-Methionin Lösung (Kapitel 2.1.6.1.)	125 ml	

Regenerations-Medium		
Trypton	20 g	
Natriumchlorid	0,6 g	
Hefeextrakt	5 g	
Kaliumchlorid	0,2 g	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren

M9-Medium		
10x M9 Salze	100 ml	
1 M MgSO ₄ (in dH ₂ O)	1 ml	autoklavieren
0,1 M CaCl ₂ (in dH ₂ O)	1 ml	autoklavieren
1 M Thiamin (in dH ₂ O)	1 ml	sterilfiltrieren
20 % Glucose ¹ ([w/v] in dH ₂ O)	10 ml	autoklavieren
dH ₂ O	ad 1 l	

¹Für den Test auf Arabinoseabbau wurde Glucose durch L-Arabinose im gleichen Massenverhältnis ersetzt.

10x M9 Salze		
Natriumhydrogenphosphat	60 g	
Kaliumhydrogenphosphat	30 g	
Ammoniumchlorid	10 g	
NaCl	5 g	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren

Material & Methoden

2.1.6.4. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Neuisolaten

Zur Isolierung der Cyanidproduzenten enthielten die Festmedien 3 mM KCN (Kapitel 2.1.7.8.) und 0,02 % (w/v) Nystatin (Kapitel 2.1.7.6.).

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
Natriumcarbonat basierte Medien		
0,5x HD NaCO₃		
Trypton-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat	0,5 g	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
mit NaOH	pH 10	
dH ₂ O	ad 900 ml (775 ml Induktionsmedium)	autoklavieren
1,89 M Natriumcarbonatpuffer (s. u.)	100 ml	
Glycin-Methionin Lösung (Induktionsmedium, 2.1.6.1.)	125 ml	
GHD10: 0,5x HD 0,1 M NaCO₃ pH 10		
Bacto-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat	0,5 g	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
mit NaOH	pH 10	
dH ₂ O	ad 900 ml (775 ml Induktionsmedium)	autoklavieren
1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10 (s. u.)	100 ml	
Glycin-Methionin Lösung (Induktionsmedium)	125 ml	
Bei Bedarf Zugabe von 0,05 mM AgNO ₃ , 1 mM CuCl ₂ , 5 mM CuCl ₂ (Wahl der Konzentrationen in Zusammenarbeit mit Sabrina Völkel [TU Darmstadt], Abkürzung: AgNO ₃ , 1Cu, 5Cu, siehe 2.1.7.8.). Bei Festmedien wurde die benötigte Menge für eine Agarplatte (20 ml) nach dem Aushärten auf dem Festmedium verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert, damit sich die Metalle im Festmedium gleichmäßig verteilen.		
0,5x HD 0,5x HD 0,1 M NaCO₃ pH 9-11		
NaCO ₃ :		
gleich wie GHD10, Natriumcarbonatpuffer mit entsprechendem pH-Wert wurde verwendet		
Na11: 0,5x HD 0,5 M NaCO₃ pH 11		
gleich wie GHD10, Natriumcarbonatpuffer mit pH 11 wurde verwendet (5x Menge), dH ₂ O entsprechend angepasst		
Na10: 0,5x HD 1 M NaCO₃ pH 10		
Bacto-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat	0,5 g	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
mit NaOH	pH 10	
dH ₂ O	ad 480 ml (355 ml Induktionsmedium)	autoklavieren
1,83 M Natriumcarbonatpuffer (s. u.)	520 ml	
Glycin-Methionin Lösung (Induktionsmedium)	125 ml	

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
Natriumcarbonat basierte Medien		
HSal: 0,5x HD 1 M NaCO₃ + 1 M NaCl pH 10		
Bacto-Pepton	2,5 g	
Hefeextrakt	1,25 g	
D-Glucosemonohydrat	0,5 g	
Natriumchlorid	58,44 g	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
mit NaOH	pH 10	
dH ₂ O	ad 480 ml (355 ml Induktionsmedium)	autoklavieren
1, 83 M Natriumcarbonatpuffer (s. u.)	520 ml	
Glycin-Methionin Lösung (Induktionsmedium)	125 ml	
LB NaCO₃: LB 0,1 M NaCO₃ pH 9-11		
LB-Granulat	20 g	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
dH ₂ O	ad 900 ml (775 ml Induktionsmedium)	
mit NaOH	pH 9-11	autoklavieren
1 M Natriumcarbonatpuffer in entsprechendem pH-Wert	100 ml	
LB-Medium Bestimmung der optimalen NaCO₃ Konzentration		
LB 0 mM NaCO₃ pH 10		
LB-Granulat	20 g	
dH ₂ O	ad 1 l	
mit NaOH	pH 10	autoklavieren
LB 0,05 mM NaCO₃ pH 10		
wie LB 0 mM NaCO ₃ pH 10, außer Zugabe 50 ml 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10 nach autoklavieren, dH ₂ O entsprechend angepasst.		
LB 0,5 mM NaCO₃ pH 10		
wie LB 0 mM NaCO ₃ pH 10, außer Zugabe 500 ml 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10 nach autoklavieren, dH ₂ O entsprechend angepasst.		
Natriumcarbonatpuffer (alle in dH₂O und sterilfiltriert)		
1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9 (1 l)		
Natriumcarbonat	10,8 g	
Natriumhydrogencarbonat	75,6 g	
für pH 8 pH-Wert mit HCl einstellen		
1 M Natriumcarbonatpuffer pH 10 (1 l)		
Natriumcarbonat	64,85 g	
Natriumhydrogencarbonat	32,38 g	
1,83 M Natriumcarbonatpuffer pH 10 (1 l)		
Natriumcarbonat	119 g	
Natriumhydrogencarbonat	59,2 g	
1,89 M Natriumcarbonatpuffer (1 l)		
Natriumcarbonat Decahydrat	200 g	
Natriumhydrogencarbonat	100 g	
1 M Natriumcarbonatpuffer pH 11 (1 l)		
Natriumcarbonat Decahydrat	234,8 g	
Natriumhydrogencarbonat	14,9 g	
für pH 12 pH-Wert mit NaOH einstellen		

Material & Methoden

Medium	Mengen/Konzentrationen	Sterilisierung
Weitere Medien		
MBN: Mineral Base Medium mit Nährstoffen		
Mineralisches Basismedium		
Mineral Base (2x)	500 ml	
Spurenelementlösung	2 ml	
200 g/l Magnesiumchlorid-Lösung ([w/v] in dH ₂ O)	1 ml	autoklavieren
Flüssigmedium mit Nährstoffen	500 ml (375 ml Induktionsmedium)	
Bacto Agar (Festmedium)	15 g	
dH ₂ O	ad 1 l	
Glycin-Methionin-Lösung (Induktionsmedium)	125 ml	
Flüssigmedium mit Nährstoffen (500 ml/375 ml Induktionsmedium)		
Hefeextrakt	0,2 g	
Brenztraubensäure	5 mM	
2-Oxoglutarinsäure mit NaOH	5 mM pH 10	
dH ₂ O	ad 500 ml/375 ml	autoklavieren
Mineral Base (2x)		
Natriumcarbonat	40 g	
Natriumhydrogencarbonat	20 g	
Natriumchlorid	10 g	
di-Kaliumhydrogenphosphat	1 g	
Ammoniumsulfat	0,1 g	
dH ₂ O	ad 1 l	sterilfiltrieren
Spurenelementlösung		
EDTA	5 mg	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mg	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg	
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg	
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg	
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg	
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg	
H ₃ BO ₃	300 mg	
dH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren
OF Oxidations-Fermentations-Medium (in dH₂O)		
Pepton aus Casein	1 % (w/v)	
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
D-Glukose Monohydrat	0,5 % (w/v)	
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,03 % (w/v)	
Natriumchlorid mit NaOH	0,5 % (w/v) pH 7,0	
Bacto Agar	0,9 % (w/v)	
Bromkresolpurpur	0,0042 % (w/v)	autoklavieren
GYT (in dH₂O)		
D-Glukose Monohydrat	0,5 % (w/v)	
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
Trypton-Pepton	0,5 % (w/v)	
L-Tryptophan	0,1 % (w/v)	
Bacto Agar (Festmedium)	1,5 % (w/v)	autoklavieren

2.1.6.5. Medien für die Biolaugung

Medium/Bestandteile	Menge	Sterilisierung
LB-Medium		
Bacto Trypton	5 g	autoklavieren
NaCl	2,5 g	
Hefeextrakt	2,5 g	
mit NaOH	pH 7,2	
dH ₂ O	ad 500 ml	
0,5x HD-Medium pH 9	Siehe 2.6.1.3	
0,5x HD-Medium/LB mit 0,1 M NaCO ₃	Siehe 2.6.1.4	
2 M L-Glycin (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren

2.1.6.6. Medien für die Statistische Versuchsplanung

Hefeextrakt 350 g/l ([w/v] in dH ₂ O)		autoklavieren
2x LB-Konzentrat		
Bacto Trypton	5 g	autoklavieren
NaCl	2,5 g	
Hefeextrakt	2,5 g	
dH ₂ O	ad 200 ml	
500 mM Tris	50 ml	
500 mM Tris pH 7,2		
Tris HCl	7,02 g	autoklavieren
Tris Base	0,67 g	
dH ₂ O	ad 100 ml	
500 mM Tris pH 7,6		
Tris HCl	6,06 g	autoklavieren
Tris Base	1,3 g	
dH ₂ O	ad 100 ml	
500 mM Tris pH 8		
Tris HCl	4,44 g	autoklavieren
Tris Base	2,65 g	
dH ₂ O	ad 100 ml	
500 mM Tris pH 9		
Tris HCl	0,76 g	autoklavieren
Tris Base	5,47 g	
dH ₂ O	ad 100 ml	
456 mM L-Glutamat (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren
300 mM L-Methionin (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren
150 mM L-Phenylalanin (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren
390 mM L-Serin (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren
650 mM L-Threonin (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren

Material & Methoden

2.1.7. Puffer und Lösungen

2.1.7.1. Klonierung

10 mM ATP	Zusammensetzung
ATP	10 mM
Tris-HCl pH 8,0	100 mM

10x Oligo Annealing Puffer	
Tris HCl pH 8,0	100 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
NaCl	1 M

2.1.7.2. Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese	
10x DNA – Auftragspuffer (TUD)	
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Saccharose	50 % (w/v)
EDTA	100 mM
TE pH 8,0	lösen in

TE-Puffer	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
mit HCl	pH 8,0

6x DNA – Auftragspuffer (BRAIN Biotech AG)	
EDTA	55 mM
Glycerin	30 %
Orange G	≥0,35 %

50x TAE Puffer	
Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM
mit Essigsäure	pH 8,0

Ethidiumbromidlösung (0,02 % [v/v] in dH₂O)

SDS-Gelelektrophorese	
10x Anodenpuffer	
Tris/HCl	2 M
mit HCl	pH 8,9

10x Kathodenpuffer	
Tris/HCl	1 M
Tricin	1 M
SDS	1 % (w/v)
mit HCl	pH 8,45

3x Schagger Puffer (Schagger <i>et al.</i> , 1987)	
Tris HCl pH 8,45	3 M
SDS	0,3 % (w/v)

SDS-Gelelektrophorese

SDS-Auftragspuffer	
Tris/HCl pH 6,8	125 mM
Glycerin	20 % (w/v)
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

Coomassie-Lösung	
Roti Blue	20 ml
Methanol	20 ml
ddH ₂ O	100 ml

10 % APS ([w/v] in dH₂O)

2.1.7.3. *semi-dry* Western Blot

Kathodenpuffer	
ε-Aminocapronsäure	40 mM
SDS	0,05 % (w/v)
Methanol	10 % (v/v)

Anodenpuffer 1	
Tris	0,3 M
Methanol	10 % (v/v)

Anodenpuffer 2	
Tris	25 mM
Methanol	10 % (v/v)

10x PBS	
KCl	27 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	1,37 M
Na ₂ HPO ₄	100 mM

Waschpuffer	
PBS	1x
Tween 20	0,1 % (v/v)

Puffer 1. Antikörper	
PBS	1x
Tween 20	0,2 % (v/v)

Puffer 2. Antikörper	
PBS	1x
Tween 20	0,2 % (v/v)
SDS	0,01 % (w/v)

2.1.7.4. Genexpression und Proteinreinigung

Anhydrotetrazyklin-Lösung (2 mg/ml in DMF)	
Eisen-(III)-citrat	
Eisen-(III)-chlorid x 6 H ₂ O	1,35 g
Citronensäure	0,96 g
dH ₂ O	ad 50 ml
Puffer W	
Tris HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
Puffer R	
Tris HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
HABA	1 mM
Puffer E	
Tris HCl	100 mM (pH 8,0)
NaCl	150 mM
D-Desthiobiotin	2,5 mM
SMALP Puffer	
NaCl	200 mM
Tris mit NaOH	50 mM pH 8
1 mg/ml DNaseI	
DNaseI	1 mg
1 M Tris HCl pH 7,5	2 µl
100 mM MgCl ₂	10 µl
Glycerin	500 µl
20 mg/ml Lysozymlösung	
Lysozym	200 mg
TE Puffer pH 8	ad 10 ml

2.1.7.5. Cyanidnachweis: Methämoglobintest

Methämoglobinreagenz	
Rinderhämoglobin	85 mg
4 mM Natriumnitrit	12,5 ml
Kaliumphosphatpuffer	12,5 ml
1 M Kaliumphosphatpuffer (100 ml)	
Dikaliumhydrogenphosphat	1,07 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,52 g
4 mM Natriumnitritlösung (in dH₂O)	

2.1.7.6. Antibiotika

Ampicillin	
Stammlösung	100 mg/ml
Endkonzentration	100 µg/ml
Gentamycin	
Stammlösung	20 mg/ml
Endkonzentration	10 µg/ml
Kanamycin	
Stammlösung	25 mg/ml
Endkonzentration	25 µg/ml
Nystatin	
Nystatin	1 mg
50 % DMSO	ad 10 ml

2.1.7.7. Puffer für Rubidiumchlorid kompetente *E. coli* Zellen

TFB1	Zusammensetzung	Sterilisierung
Kaliumacetat	1,18 g	sterilfiltrieren
Rubidiumchlorid	5 g	
Calciumchlorid	0,6 g	
Manganchlorid	4 g	
Glycerin	15 % (v/v)	
mit Essigsäure	pH 5,8	
dH ₂ O	ad 410 ml	
TFB2		
MOPS	0,29 g	sterilfiltrieren
Calciumchlorid	1,1 g	
Rubidiumchlorid	0,12 g	
Glycerin	15 % (v/v)	
mit KOH	pH 6,5	
dH ₂ O	ad 100 ml	

Material & Methoden

2.1.7.8. Weitere Lösungen

Bradford-Reagenz (Bradford, 1976)		Zusammensetzung
Coomassie G250		0,01 % (w/v)
Ethanol		4,75 % (v/v)
o-Phosphorsäure		8,5 % (v/v)
Carrierlösung (für ICP-Messungen)		
Salzsäure		0,5 % (v/v)
Salpetersäure		2 % (v/v)
300 mM Kaliumcyanid		
Kaliumcyanid	1,95 g	
30 mM Kaliumhydroxid	ad 100 ml	sterilfiltrieren
Safranin-Lösung		
Safranin O	1 % (w/v)	
3 M Natriumacetatpuffer		
Natriumacetat mit HCl	4,08 g	
dH ₂ O	pH 4,8	
	ad 100 ml	
100 mM Magnesiumsulfat (in dH ₂ O)		autoklavieren
0,3 M Saccharose (in dH ₂ O)		autoklavieren
3 M Kupferchlorid (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren
1 M Silbernitrat (in dH ₂ O)		sterilfiltrieren

2.1.8. Substrate für die Biolaugung

Laugungs-material	Fe [μg/g]	Cu [μg/g]	Ag [μg/g]	Au [μg/g]	Pd [μg/g]	Pt [μg/g]	Pb [μg/g]	Co [μg/g]	Ni [μg/g]
Filterstaub <250 μm, w. magnetisch	58 496	4 296	238	20,3	6,1	0,5	39 806	732	1 594
Elektroschrott Staub <125 μm, w. magnetisch	104 416	36 866	1 181	515,6	84,9	5,3	25 188	799,5	6 125
Schlamm aus der Aufbereitung von Müllverbrennungsasche	64 600	72 911	425	9,3	n.B.	n.B.	7 408	n.B.	n.B.
Schmelztiegel-partikel	4 088	n.B.	44	67	284	256	n.B.	n.B.	n.B.
Flugasche Edelmetallrecycling	12 161	3 394	3 394	842	20,8	45,1	662	n.B.	n.B.
Asche Verbrennung Elektroschrott 1	12 746	316 998	2 139	406	122,4	0,67	2 316	n.B.	n.B.
Asche Verbrennung Elektroschrott 2	9 776	342 036	2 938	1 074	61,8	0,19	7 282	n.B.	n.B.
Filterstaub mechanische Vorbereitung Elektroschrott <250 μm	31 371	6 058	374	17,5	7,9	0,5	8 847	436	829
Schleifstaub Gold Politur	161	321	4,4	102	10,8	0,4	1,8	4,5	8 929

n.B.: Werte wurden nicht bestimmt; w.: weniger.

2.1.9. Genomische DNA

gDNA	Referenz	Verwendung
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf01	Robert M. Q. Shanks, University of Pittsburgh	Amplifizierung Xylose-induzierbarer Promotor

2.1.10. Verwendete Software

Software	URL	Referenz
CCTop	https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/ ¹	Stemmer <i>et al.</i> , 2015
DesignExpert 8.0	-	Stat-Ease, Minneapolis, USA
FAST ANI	https://github.com/ParBLISS/FastANI	Jain <i>et al.</i> , 2018
I-TASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/	Yang <i>et al.</i> , 2015a, Yang <i>et al.</i> , 2015b
MEGA11	-	Tamura <i>et al.</i> , 2021
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index	Kelley <i>et al.</i> , 2015
PyMOL	-	Schrödinger, 2015
Stand-alone BLAST+	-	Camacho <i>et al.</i> , 2009

¹CCTop Standalone wurde für die Analysen verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von *E. coli* Top10/DH10β/Bl21 Kulturen in LB-Medium pH 7,2 erfolgte bei 37 °C aerob schüttelnd (180 rpm). Die Agarmedien wurden ebenso bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Selektion wurden bei Bedarf Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) zu den Medien gegeben.

Ps. donghuensis G2#25 wurde bei 30 °C kultiviert, sonst erfolgte die Kultivierung wie bei *E. coli* angegeben. Zur Selektion wurde bei Bedarf Kanamycin (25 µg/ml) zugegeben. Es lag eine Resistenz gegen Ampicillin vor (Kapitel 5.2.1.).

2.2.1.2. Isolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien

Probennahme und Aufbereitung der Proben

Zur Isolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien wurden Boden- und Sedimentproben an verschiedenen Standorten gesammelt. Mittels eines Spatels wurde Probenmaterial entnommen und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Reduktion der Probenanzahl wurden einige Proben anschließend vermischt (Tabelle 1). Zur Vermeidung von Pilzwachstum wurde zu jedem Isolationsmedium Nystatin gegeben (0,02 % [v/v]).

Kultivierung und Isolierung

Neusolierte Cyanid-produzierende Bakterien wurden aerob für zwei Tage bei 30 °C inkubiert (OS1 und NSS einen Tag). Als Medium wurde GHD10 oder LB 0,1 M NaCO₃ pH 10 verwendet. Flüssigkulturen wurden schüttelnd (180 rpm) bei 30 °C inkubiert. Die Inkubation der primären Agarmedien erfolgte teils über mehrere Tage, bis Kolonien sichtbar waren.

Tabelle 1 Übersicht über die Wasser- und Sedimentproben.

Standort Probennahme	Beschreibung Probe	Proben- kürzel	Entnahme durchgeführt von	Isolationsme- dium (jeweils 3 mM KCN)
Neusiedler See, Österreich	Seewasser + Pflanzen bei Badestelle	NSS	Kletzin (2018)	0,5x HD NaCO ₃
Oberer Stinkersee, Österreich	Halophyt	OS1		
Herrnsee, Illmitz, Österreich	Wasser + Sediment, Beginn See, pH 9,5-10	IHS1 → H	Kletzin und Schuster (August 2019)	GHD10 Na11 MBN
Fuchslochlacke, Apetlon, Österreich	gleiche Probenstelle wie AFL1, tiefere Erdschicht	AFL2 → F	Kletzin und Schuster (August 2019)	AgNO ₃ 1Cu GHD10 Na11
Waldboden, Nähe TU Darmstadt, Standort botanischer Garten, Deutschland	Rhizosphäre Waldboden	W2	Schuster (2020)	1Cu AgNO ₃

Standort Probennahme	Beschreibung Probe	Proben- kürzel	Entnahme durchgeführt von	Isolationsme- dium (jeweils 3 mM KCN)
Probenmischung SL1				
Herrnsee, Illmitz, Österreich	Schilf Sediment	IHS3		
Herrnsee, Illmitz, Österreich	Wasser + Sediment, Beginn See, pH 9,5-10	IHS1		
Obere Höllacke, Illmitz, Österreich	ausgetrocknetes Sediment, <i>Crypsis aculeata</i>	IOH1		1Cu
Fuchslochlacke, Apetlon, Österreich	noch etwas feucht/ Schlamm, pH 9,5-10	AFL1	Kletzin und Schuster (August 2019)	5Cu
Lacken bei Aba, Ungarn	pH 9,5-10	AST		AgNO ₃
Oberer Stinkersee, Illmitz, Österreich	feuchte Schlammprobe	IOS3		GHD10
Fuchslochlacke, Apetlon, Österreich	gleiche Probenstelle wie AFL1, tiefere Erdschicht	AFL2		Na11
Probenmischung SL2				
Obere Höllacke, Illmitz, Österreich	Rhizosphäre der Pflanzen der Salzacke	IOH2		
Lacken bei Sárkeresztúr, Ungarn	Schlamm	SST1		
Lacken bei Sárkeresztúr, Ungarn	Schlamm 2	SST2		
Badelacke, Sankt Andrä am Zicksee, Österreich	Sediment	SÄB2	Kletzin und Schuster (August 2019)	5Cu
Oberer Stinkersee, Illmitz, Österreich	1-jährig verrottete Pflanze	IOS4		HSal
Lacke bei Sárkeresztúr, Ungarn	pH 9,5	SSS		
Lacken bei Sárszentágota, Ungarn	Randbereich, schlammig	SSO		

Plattierung der Wasser- und Sedimentproben

Alle Isolierungen von Cyanid-produzierenden Bakterien erfolgten in Anwesenheit von 3 mM KCN und 0,02 % Nystatin.

Die Proben OS1 und NSS wurden 1:100 in 1,83 M Natriumcarbonatpuffer verdünnt und auf cyanidhaltigem Isolationsmedium ausplattiert.

Bei den Probengemischen SL1 und SL2 wurden jeweils 500 µl bzw. 500 mg mit der zehnfachen Menge Na11 vermischt und 1 h über Kopf bei Raumtemperatur rotiert. Serielle Verdünnungsreihen mit Na11 (bis 1:10 000) wurden erstellt und die entsprechenden Verdünnungen auf Medien ausplattiert.

Für die Aufschlammung von IHS1 (H) wurden 500 µl Probe mit 500 µl GHD10 vermischt und 1 h auf dem Überkopffrotator bei RT inkubiert. 5 g des Fuchslochlacken Schlamms (AFL2) wurde ebenfalls mit 500 µl GHD10 vermischt und auf dem Überkopffrotator 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Aufschlammern der Proben wurde je eine

1:10³ Verdünnung auf dem jeweiligen Medium ausplattiert.

500 mg der entnommenen Waldbodenprobe wurde mit 500 µl GHD10 1 h bei RT auf dem Überkopffrotator aufgeschlämmt. Eine 1:10³ Verdünnung wurde jeweils auf GHD10 mit 1 mM CuCl₂/0,05 mM AgNO₃ ausplattiert.

Isolierung von Cyanid-produzierenden Reinkulturen

Einzelkolonien von den cyanidhaltigen primären Agarmedien wurden mittels steriler Zahnstocher auf Gridplatten des verwendeten Isolationsmediums übertragen und bei 30 °C inkubiert. Für den qualitativen Cyanidtest wurde je 1 ml des Isolationsmediums in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit den Kolonien der primären Agarmedien separat beimpft. Bei schwermetallhaltigen Isolationsmedien wurde GHD10-Medium ohne Schwermetalle verwendet. Der qualitative Cyanidtest erfolgte als Einfach-

bestimmung. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, 450 rpm auf einem Thermoschüttler (Eppendorf, Wessling-Berzdorf) für zwei Tage. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und in 1 ml des entsprechenden Isolationsmediums mit 5 g/l Glycin-Methionin resuspendiert (Induktionsmedium). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 6 h bei 30 °C und 450 rpm. Für den Cyanidnachweis wurden die Kulturen abzentrifugiert (13 000 rpm, 3 min) und nur der Überstand verwendet.

Von den im Cyanidtest positiven Isolatzen wurden sukzessive drei Reinigungsausstriche angefertigt. Mit den Reinkulturen wurden Cyanidtests als Triplikate durchgeführt (siehe oben). Für alle Neuisolate auf Mineral Base Medium (MBN) wurde für die Kultivierung GHD10 (auch GHD10-Induktionsmedium) verwendet, da für MBN keine lineare oder polynome Kalibrierreihe erstellt werden konnte. Auch für einige Isolate von dem Na11-Medium wurden auf Grund eines kleinen Messbereichs (10 mg/l = OD_{427 nm} 0,06, 0,1 mg/l = OD_{427 nm} 0,02) die Kultivierungen in GHD10 durchgeführt. Die anschließenden Cyanidtests wurden in GHD10-Induktionsmedium durchgeführt.

2.2.1.3. Wachstumskurven

Für Wachstumskurven in Abhängigkeit des pH-Werts wurden verschiedene Verfahren angewendet. Für die klassischen Wachstumskurven wurde 0,5x HD-Medium mit den jeweiligen pH-Werten verwendet. Für die Vorkulturen wurden die gleichen Medien wie für die Hauptkulturen verwendet. Die *Ps. donghuensis* G2#25 Vorkulturen wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium für einen Tag bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die OD_{600 nm} wurde bestimmt und die Hauptkulturen in 300 ml Erlenmeyerkolben (30 ml Medium) mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 angeimpft. Die Hauptkulturen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen inkubiert.

Zusätzlich wurden Wachstumskurven im 96 Well-Format mit Hilfe des Synergy H1 microplate readers (BioTek Instruments) durchgeführt. Diese dienten auch zur Bestimmung der NaCO₃-Toleranz. Die Start-OD_{580 nm} betrug 0,1 in 200 µl. Es wurden mindestens fünf Replikate in 96 Well Platten durchgeführt. Die Platten

wurden schüttelnd inkubiert. Als Medium diente LB-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 9, 10 und 11 und LB-Medium mit 0-0,5 M NaCO₃ pH 10.

Zu den auf der Messung der OD beruhenden Wachstumskurven wurden sauerstoffabhängige Wachstumsanalysen durchgeführt. Hier wurde nicht die OD, sondern die Sauerstoffkonzentrationen in den Kulturen automatisiert gemessen. Die Vorkulturen wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben (25 ml GHD10) zwei Tage schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde 0,5x HD-Medium als Basis verwendet. Hierzu wurden jeweils 0,1 M NaCO₃ Puffer des entsprechenden pH-Wertes zugegeben. Die Kulturen wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 in 2,5 ml in einer Deep Well OxoDish OD24-DW Platte (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 250 rpm.

Die Wachstumskurven zur Bestimmung der Verdopplungszeit/Wachstumsdauer von ausgewählten Neuisolaten fand in LB-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 10 statt (*Ps. donghuensis* G2#25 LB-Medium pH 7,2). Auch der Vergleich des Wachstums der CRISPR/Cas9-Mutanten wurde wie folgt durchgeführt. Für die Vorkulturen wurden 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Kulturvolumen verwendet. Die Vorkulturen wurden schüttelnd (180 rpm) bei 30 °C inkubiert (Tabelle 2). Für die Hauptkulturen wurden 300 ml Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 50 ml verwendet. Die Start-OD_{600 nm} betrug 0,05. Die Hauptkulturen wurden bei 30 °C und 180 rpm inkubiert (Ausnahme: *Ps. donghuensis* G2#25, *Ni. alkalilacustris* 200B1, *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17 und *Sa. aurantiacus* AFL_Na11 F6 bei 160 rpm). Für die schwermetallabhängigen Wachstumskurven wurden Vorkulturen ohne die entsprechenden Metalle verwendet. Diese wurden dann in Hauptkulturen mit den entsprechenden Schwermetallen überimpft.

Die Steigung der exponentiellen Wachstumsphase ergab die Verdopplungszeit.

Tabelle 2 Inkubationszeiten der Vorkulturen für die Wachstumskurven mit LB-Medium 0,1 M NaCO₃/LB-Medium pH 7,2.

Neuisolat	Inkubation Vorkultur
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	1 Tag
<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD F21	1 Tag
<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	1 Tag
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	2 Tage
<i>Je. campisalis</i> NSS K18	2 Tage
<i>Mo. roseus</i> AFL_1Cu F5	3 Tage
<i>Mongoliococcus</i> sp. AFL_1Cu F2	3 Tage
<i>Mongoliococcus</i> sp. AFL_1Cu F12	2 Tage
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	1 Tag
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	1 Tag
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6	1 Tag
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	1 Tag (AgNO ₃ -Wachstumskurve)
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22	2 Tage
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	2 Tage
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1	2 Tage

Für die Wachstumskurven der Medienoptimierung von *E. coli* Bl21 pASK-HCN.dong (Kapitel 7, Abb. 57) wurden 5 ml ÜNK in dem jeweiligen Medium schüttelnd bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die 50 ml Hauptkulturen (300 ml Schikanekolben) wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 beimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

2.2.1.4. Bestimmung der Cyanidproduktion in Bakterienkulturen

In Abhängigkeit der Zeit

Vorkulturen zur Bestimmung der Cyanidproduktion wurden in LB pH 7,2 über Nacht inkubiert. Die OD_{600 nm} wurde bestimmt und als Start-OD_{600 nm} wurde 1 eingestellt. Dazu wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 5000 rpm) und in LB pH 8 oder LB pH 8 mit Glycin-Methionin resuspendiert. Von der Suspension wurden pro Zeitpunkt je 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden bei 30 °C und 450 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert und alle 2 h wurden Reaktionsgefäße entnommen. Das Cyanid wurde pro Reaktionsgefäß mit 8 µl 10 M NaOH stabilisiert und die Zellen wurden 4 min bei 13 000 rpm sedimentiert. Das Volumen an NaOH wurde von David Rivic im Rahmen seiner Bachelor-Thesis bestimmt. Der

Überstand wurde für den Methämoglobintest verwendet. In späteren Tests wurde ein Einfluss für die Fixierung der Proben mit NaOH gezeigt, ab einer 1:8 Verdünnung war dieser vernachlässigbar. Da die Verdünnungen bis Stunde zwei bzw. vier geringer als 1:8 waren, sind die Cyanidproduktionswerte nicht genau, sondern höher als die dargestellten Werte. Das Verhältnis bleibt jedoch gleich, da die Proben gleich verdünnt wurden. Für die Kalibrierreihen wurde LB pH 8 mit bzw. ohne Glycin-Methionin verwendet.

In Abhängigkeit von Aminosäureaustauschen, der Position des Strep-tags und des Maltosebindeproteins

Durch diese Cyanidtests sollte überprüft werden, welche Aminosäuren der Cyanidsynthese essentiell für die Aktivität sind. Auch der Einfluss der Position des Strep-tags und von *mbp* an den Untereinheiten wurde untersucht. *E. coli* Bl21 wurde mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert (Kapitel 2.1.3.: Plasmide 2-24).

Für die Cyanid-Messungen, durchgeführt von Lara Södler, wurde 1 ml LB pH 8 ohne Glycin-Methionin mit einer Kolonie beimpft (Durchführung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 450 rpm auf einem Thermoschüttler. Der Überstand wurde für den Cyanidnachweis eingesetzt. Das Vorgehen zur Untersuchung des Einflusses des Strep-tags/MBP war identisch wie eben beschrieben.

Für die Cyanid-Messungen, durchgeführt von Nadja Peric, wurden 20 ml LB pH 7,2 Übernachtskulturen schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Für die 20 ml Hauptkulturen in LB pH 7,2 wurde eine Start-OD_{600 nm} von 0,6 eingestellt und 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Cyanidproduktion wurde durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin und Glycin-Methionin Lösung (Endkonzentration 5 g/l) induziert. Nach 24 h Inkubation erfolgte der Cyanidnachweis mit dem Kulturüberstand.

Während der Wachstumskurve

Zeitgleich zur Probenentnahme der OD_{600 nm} Messung wurden weitere Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (2 min, 13 000 rpm) und der Überstand

zur Cyanidmessung mit dem Methämoglobintest eingesetzt.

Die folgenden Tests (2.2.1.5.-2.2.1.8.) wurden von Sven Schladerbeck durchgeführt.

2.2.1.5. Hitzetoleranztest

Agarmedien, angepasst an die jeweiligen Bakterienstämme, wurden für sechs Tage bei 30 °C inkubiert. In Reagenzgläser wurde je 1 ml dH₂O vorgelegt. Es wurde so viel Zellmaterial in die Reagenzgläser überführt, bis eine leichte Trübung entstand. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Nach 0 min, 5 min, 15 min, 30 min und 45 min erfolgte die Probenentnahme mit einer Einweg-Impföse (10 µl). Hiermit wurden die Zellsuspension auf LB mit 0,1 M NaCO₃/LB pH 7,2 Agarmedien ausgestrichen. Als Positivkontrolle diente *Bacillus subtilis* DSM347.

2.2.1.6. Gram-Färbung

Etwas Zellmasse wurde in wenig dH₂O auf einen Objektträger aufgetragen und hitzefixiert. Es folgte die Färbung mit Kristallviolett für 2 min. Danach wurde das Kristallviolett mit Lugol'scher Lösung abgespült und 2 min gefärbt. Der Objektträger wurde in 96 %igem Ethanol entfärbt und mit dH₂O gespült. Anschließend wurde er mit Safraninlösung für 2 min überschichtet. Diese wurde mit dH₂O abgespült. Die Auswertung erfolgte durch Mikroskopie bei einer 1 000-fachen Vergrößerung ohne Phasenkontrast. Als Positivkontrolle (Gram-positiv) diente *Bacillus populi* und als Negativkontrolle (Gram-negativ) *E. coli* Bl21.

2.2.1.7. Cytochrom-c-Oxidase Test, Katalase Test und OF-Test

Für den Cytochrom-c-Oxidase Test wurde etwas Zellmaterial auf Filterpapier übertragen. Dieses wurde mit dem Oxidase-Reagenz beträufelt. Als Negativkontrolle diente *E. coli* Bl21.

Zum Nachweis von Katalase Aktivität wurden die Bakterienkolonien mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung beträufelt.

Das OF-Medium wurde nach dem Autoklavieren in einem Wasserbad auf ca. 40 °C abgekühlt. Der OF-Test wurde nur für Pseudomonaden durchgeführt, *E. coli* Bl21 diente als Kontrolle. Mittels Einwegimpföse wurden die Medien mit Zellmasse beimpft. Die Pseudomonaden wurden bei 30 °C inkubiert, die Negativ-Kontrolle *E. coli* Bl21 bei 37 °C.

2.2.1.8. Wachstum in Abhängigkeit von Sauerstoff

Zur Beurteilung des Wachstums unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen wurde Thioglykolat-Medium verwendet. 20 ml Kulturen in Reagenzgläser wurden mit Einzelkolonien beimpft und bei 30 °C nicht schüttelnd zwei bis fünf Tage inkubiert.

Mit Isolat, welche im Thioglykolat-Test als fakultativ anaerob eingestuft wurden, wurden Wachstumskurven unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde LB mit 0,1 M NaCO₃-Puffer pH 10 verwendet. Dieses wurde entgast und die Gasphase durch eine Stickstoff-Atmosphäre ersetzt. Die Serumflaschen wurden 2-3 Tage bei 30 °C und 160 rpm inkubiert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Polymerase Ketten Reaktionen (PCR)

Identifikation der isolierten Bakterien und Überprüfung der konstruierten Plasmide

Zur Identifikation von isolierten Cyanidproduzierenden Bakterien wurde eine 16S rDNA-Analyse durchgeführt. Ein Teil des 16S rDNA-Gens wurde mit spezifischen Primern durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (PCR, Tabelle 3, Primer siehe 2.1.4.).

Zur Überprüfung von konstruierten Plasmiden wurde die Insertion der DNA-Fragmente mit Primern, die auf dem *backbone* des Plasmides binden, überprüft. Als *template* wurde jeweils etwas Zellmaterial einer Einzelkolonie direkt in den PCR-Ansatz gegeben. PCR-Ansätze wurden in 50 µl Reaktionsvolumen (Kolonie-PCR 25 µl) angesetzt und die Reaktion in einem PCR-Thermocycler durchgeführt (peqSTAR, Peqlab VWR, Erlangen, Tabelle 4).

Tabelle 3 DreamTaq PCR-Ansatz zur Plasmidüberprüfung und zur Analyse der 16S rDNA.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
DreamTaq DNA-Polymerase	0,31 μ l	1,6 U
DreamTaq Puffer	5 μ l	1x
25 mM dNTPs	0,4 μ l	0,2 mM
10 mM BAC 27F	2,5 μ l	0,5 μ M
10 mM BACT 1309R	2,5 μ l	0,5 μ M
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

Tabelle 4 PCR-Programm DreamTaq DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	
<i>Annealing</i>	55-72	30	30
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	300	1

Je 5 μ l der PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.2.) analysiert und der Rest mittels des GenElute PCR Clean-Up Kits nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution erfolgte in dH₂O. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem Nanodrop Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen). Anschließend wurden die PCR-Produkte der 16S rDNA-Analyse mit je einem der Amplifikationsprimer (Tabelle 3) sequenziert (Eurofins Genomics, Ebersberg) und durch eine lokale BLAST Analyse gegen die 16S rRNA-Daten Bank von *NCBI* ausgewertet (*National Center for Biotechnology Information*, Stand: 18.9.2021).

PCR-Amplifikationen und Konstruktion von Plasmiden

Zur Amplifikation von Fragmenten, die zur Konstruktion von Plasmiden dienen, wurden zwei verschiedene *High Fidelity* Polymerasen verwendet (Tabelle 5-8). Die Primerpaare wurden so

erstellt, dass die Fragmente jeweils überlappende identische DNA-Sequenzen von etwa 15 bp für das nachfolgende Gibson Assembly besaßen (Gibson *et al.*, 2009). Zur besseren Amplifikation von Fragmenten mit Überhängen wurden die ersten drei Zyklen der PCR mit einer niedrigeren *Annealing*-Temperatur durchgeführt. Anschließend wurden die restlichen Zyklen mit der bestimmten *Annealing*-Temperatur durchgeführt. Die Phusion Flash DNA-Polymerase wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die pCas9 Plasmide bei der BRAIN Biotech AG verwendet.

Das von Amberger, 2016a erstellte Expressionsplasmid pASK-HCN.dong diente als *template* für die ortsgerichtete Mutagenese-PCR. Mittels inverser PCR-Amplifikation des Plasmids mit den jeweiligen *back-to-back* Mutagenese Primern wurden die jeweiligen Basenveränderungen realisiert (Kapitel 2.1.4 pASK75, Hemsley *et al.*, 1989). Für die Amplifikation wurde die Q5 DNA-Polymerase verwendet.

Tabelle 5 PCR-Ansatz Q5 DNA-Polymerase.

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Q5 DNA-Polymerase	0,5 μ l	0,02 U/ μ l
5x Q5 Reaction Buffer	10 μ l	1x
10 mM dNTPs	1 μ l	200 μ M
10 μ M <i>Forward</i> Primer	2,5 μ l	0,5 μ M
10 μ M <i>Reverse</i> Primer	2,5 μ l	0,5 μ M
<i>template</i> DNA	variabel	1-10 ng
5x Q5 High GC Enhancer	10 μ l	1x
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

Tabelle 6 PCR-Programm Q5 DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	5	
<i>Annealing</i>	50-72	30	30
Elongation	72	20-30 s/kb	
Finale Elongation	72	120	1

Tabelle 7 PCR-Ansatz Phusion Flash DNA-Polymerase (Verwendung bei BRAIN Biotech AG).

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
2x Phusion Flash High-Fidelity PCR Mastermix	10 μ l	1x
10 μ M <i>Forward</i> Primer	1 μ l	0,5 μ M
10 μ M <i>Reverse</i> Primer	1 μ l	0,5 μ M
<i>template</i> DNA	variabel	1-10 ng
ddH ₂ O	ad 20 μ l	

Tabelle 8 PCR-Programm Phusion Flash DNA-Polymerase (Verwendung bei BRAIN Biotech AG).

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	5	
<i>Annealing</i>	50-72	5	30
Elongation	72	15 s/kb	
Finale Elongation	72	120	1

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.2.) analysiert. Anschließend wurden sie 1 h bei 37 °C mit *DpnI* (20 U) verdaut. Es folgte deren Reinigung mit dem Zymo DNA Clean and Concentrator Kit/ GenElute PCR Clean up Kit nach Angaben der jeweiligen Hersteller. Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte per Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen). Die Fragmente mit den überlappenden DNA-Sequenzen wurden mit dem NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit nach Angaben des Herstellers verbunden und Suspensionen kompetenter *E. coli*-Zellen mit den NEBuilder Reaktionsansätzen ohne weitere Vorbehandlung transformiert.

Bei ortsgerichteten Mutagenesen mit iPCR erfolgte die Elution der Produkte in 17 μ l dH₂O, anschließend wurden sie phosphoryliert und ligiert. Zu den 17 μ l wurden 2 μ l 10x DNA-Ligase-Puffer und 10 U T4 Polynukleotidkinase hinzugefügt und 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 μ l 10 mM ATP und 400 U T4 DNA Ligase hinzugegeben und erneut 1-2 h bei 37 °C inkubiert. 10 μ l der Ligationsprodukte wurden zu kompetenten *E. coli* Top10 Zellen für die Transformation gegeben.

2.2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen, gDNA-Isolationen und Restriktionen. Es wurden 1 %ige Agarosegele (Analyse PCR-Reaktionen, Restriktionen) bzw. 0,8 %ige Agarosegele (Analyse gDNA) gelöst in 1x TAE (Kapitel 2.1.7.2.) verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5x TAE. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Taschen des Gels überführt. GeneRuler DNA Ladder Mix/GeneRuler 1 kb DNA-Leiter wurden als Größenstandards verwendet. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit Ethidiumbromid (0,02 % [w/v]) 10 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit dH₂O für 10 min. Danach wurden die DNA-Signale mittels GelStick Imager (Intas, Göttingen, Verwendungsort: TU Darmstadt) oder mittels Quantum-ST4 1100/26MX (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Verwendungsort: BRAIN Biotech AG) detektiert. Agarose-Gele bei der BRAIN Biotech AG wurden mit Midori Green, nicht mit Ethidiumbromid, nach Angaben des Herstellers gefärbt.

2.2.2.3. Restriktion

Zur Analyse von Plasmiden wurden Restriktions-spaltungen durchgeführt. Hierfür wurden je 300 ng Plasmid-DNA in einem 20 μ l Ansatz mit je 1 μ l Restriktionsenzym in dem vom Hersteller angegeben Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min. Die Restriktions-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.4. Transformation von *E. coli*

Hitzeschock-Transformation

Für die Hitzeschock-Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen verwendet (siehe unten). 50 μ l Top10F[']/25 μ l NEB DH10 β /100 μ l Bl21 kompetenter *E. coli* Zellen wurden für die Transformation eingesetzt. Zu den Zellen wurden 10 μ l Ligationsansatz/3 μ l NEBuilder Hifi DNA Assembly Produkt/1 bzw. 100 ng Plasmid gegeben und das Zell-DNA-Gemisch 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Es folgte eine Inkubation für 2 min auf Eis und anschließend wurden 900 μ l LB-Medium hinzugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen 30 min bei 37 °C schüttelnd (450 rpm) in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Wessling-Berzdorf) inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen pelletiert (5000 rpm, 5 min), das Pellet im Rücklauf resuspendiert und auf selektive Agarmedien ausplattiert.

Herstellung kompetenter *E. coli* Top10F['] Zellen-Rubidiumchloridmethode

Eine *E. coli* Top10F['] SOB-Übernachtskultur (2,5 ml) wurde beimpft und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 250 ml PSI-Medium überführt und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4-0,5 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellernte erfolgte für 5 min 400 rpm bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min auf Eis gestellt und anschließend erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im Anschluss in 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert und in flüssigem

Stickstoff gefroren. Bis zur Verwendung wurden sie bei -80 °C gelagert.

Herstellung kompetenter *E. coli* Bl21 Zellen-Calciumchloridmethode

100 μ l einer Übernachtskultur wurden in 40 ml LB-Medium überführt. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C schüttelnd (150 rpm) bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei 5000 g, 5 min, 4 °C sedimentiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 2,7 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 2,3 ml eiskalter 50 %iger Glycerin-Lösung, die Suspension wurde durch schwenken vermischt. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Plasmidisolierung

Aus 5 ml (10 ml für pCas9 und pBBR1 Plasmide) einer Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA isoliert. Hierzu wurde die ÜNK sedimentiert (13 000 g, 2 min) und die Plasmid-DNA mittels des E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I/GeneJET Plasmid-MiniPrep Kit nach Angaben der Hersteller isoliert. Der DNA-Gehalt wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen). Bereiche der isolierten Plasmide wurden bei LGC Genomics/Eurofins Genomics sequenziert.

2.2.2.5. Elektroporation von *Ps. donghuensis* G2#25

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden die Plasmide pBBR1MCS-2 oder pBBR1_TTH1_Sp1 verwendet. Diese besaßen Replikationsursprünge für *E. coli* und *Pseudomonas spp.* und eine Kanamycin-Resistenzgenkassette.

Eine *Ps. donghuensis* G2#25 Übernachtskultur in LB-Medium wurde schüttelnd bei 30 °C inkubiert. 400 μ l der Übernachtskultur wurden in 30 ml LB-Medium überimpft und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD_{600 nm} von 0,4-0,5 (2-3 h) erreichte, wurde ein OD-Volumen von 5 für 10 min bei 4 °C und 5 000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit

10 ml kalter 0,3 M Saccharose gewaschen und erneut zentrifugiert, gefolgt von einem erneuten Waschschritt mit 1 ml 0,3 M Saccharose. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 μ l Saccharose resuspendiert und in eine 2 mm Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) überführt. 100 ng Plasmid-DNA wurden hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F (Gene Pulser und Pulse Controller, BioRad, Hercules, USA). Es folgte die Zugabe von 900 μ l vorgewärmtem Regenerations-Medium (30 °C). Nach 2 h Inkubation bei 30 °C schüttelnd auf einem Heizblock (450 rpm) wurde die Kultur für 5 min und 5 000 rpm sedimentiert und in ca. 100 μ l Rücklauf resuspendiert. Die Suspension wurde auf vorgewärmten selektiven LB-Agarmedien ausplattiert. Die Inkubation der Agarmedien erfolgte 1-2 Tage bei 30 °C. Die Mutationen wurden durch Kolonie-PCRs überprüft und anschließend wurde das amplifizierte DNA-Fragment sequenziert. Das Plasmid *Curing* wurde durch mehrmaliges Überimpfen (15-30x) in LB-Medium ohne Selektionsdruck erreicht. Nach dem *Curing* wurde erneut die Mutation durch eine PCR überprüft und sequenziert. Auch das *Curing* wurde durch eine PCR überprüft. Wachstumskurven aller CRISPR/Cas9-Mutanten wurden mit der *Curing* Kultur direkt durchgeführt, diese wurde auf das Vorhandensein der Mutation und die Abwesenheit des Plasmids überprüft. Wachstum auf Kanamycin war nicht möglich. Auch für die Biolaugungsexperimente der Promotormutanten wurden Flüssigkulturen verwendet, keine Einzelkolonien. Für alle Cyanidtests und Biolaugungsexperimente der $\Delta hcnABC$ -, $\Delta hcnCAB$ - und $\Delta gacA$ -Mutanten wurden Einzelkolonien verwendet.

2.2.2.6. gDNA-Isolation

Die gDNA von mehreren Cyanid-produzierenden Neuisolaten wurde zur Sequenzierung isoliert. Hierfür wurde entweder das Monarch Genomic DNA Purification Kit oder das GenElute Bacterial Genomic DNA Kit nach Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet (Tabelle 9). Die Elution der gDNA erfolgte in dH₂O. Die Isolation der gDNA von AFL_AgNO₃ F17 erfolgte mit dem Genomic DNA Preparation Kit 100/G Säulen Midi Prep nach Angaben des Herstellers. Nach der

Lysozymbehandlung von AFL_AgNO₃ F17 wurden erneut 200 μ l Lysozymlösung für 1 h bei 30 °C zugegeben. Da der Zellaufschluss nicht erfolgreich war, wurde die Suspension bei -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut, danach war der Zellaufschluss erfolgreich. Nach der gDNA-Reinigung erfolgte eine zweite Reinigung der gDNA mit dem Genomic DNA Clean & Concentrator Kit nach Angaben des Herstellers.

Für einige der Neuisolate wurde eine klassische gDNA-Isolation mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Die Zellvorbereitungen wurden, wie in dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit beschrieben, durchgeführt (Schritte bevor die Suspension auf die Säule gegeben wird). Anschließend wurde ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol (25:24:1) zugegeben und 20 s mittels Vortexer gemischt. Die Gemische wurden für 5 min zur Phasentrennung bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen Chloroform-Isoamyl Alkohol (24:1 [v/v]) wurde hinzugegeben. Es wurde wieder 20 s mittels Vortexer gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Die oberen Phasen wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu den überführten aquatischen Phasen wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben und durch invertieren vermengt. Zur Fällung der DNA wurden die Proben 45 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden sie 15 min bei 4 °C und 15 000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurde verworfen. Die Pellets wurden mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen und anschließend wieder 5 min bei 15 000 g, 4 °C zentrifugiert. Nachdem die Überstände verworfen wurden, wurden die Pellets in der Vakuum Zentrifuge getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in dH₂O gelöst.

Nach den gDNA-Isolationen erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop Photometer. Die gDNAs wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (0,8 %iges Agarosegel). Zur Verbesserung der Reinheit wurden manche gDNAs nach der Isolation mit dem GenElute PCR Clean-Up Kit gereinigt.

Die endgültige Konzentrationsbestimmung fand mit dem DeNovix dsDNA Broad Range Kit nach Angaben des Herstellers bei der BRAIN Biotech AG statt.

Tabelle 9 Übersicht über die verwendete gDNA-Isolierungsmethode und die DNA-Konzentrationen.

Neuisolierter Cyanidproduzent	gDNA-Isolierung	DNA-Konzentration ³
1K3	GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	71,5 ng/μl
2OB3	Monarch Genomic DNA Purification Kit ¹	39,1 ng/μl
20OB1	Monarch Genomic DNA Purification Kit	134,5 ng/μl
AFL_1Cu F2	GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	202,0 ng/μl
AFL_1Cu F5	GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	145,6 ng/μl
AFL_1Cu F6	Monarch Genomic DNA Purification Kit ^{1,2}	102,1 ng/μl
AFL_1Cu F12	Monarch Genomic DNA Purification Kit ¹	39,6 ng/μl
AFL_Na10 F22	Phenol-Chloroform ¹	69,5 ng/μl
AFL_AgNO ₃ F17	Genomic DNA Preparation Kit 100/G Säulen Midi Prep	62,2 ng/μl
AFL_GHD10 F21	Monarch Genomic DNA Purification Kit ^{1,2}	80,2 ng/μl
AFL_Na11 F6	Phenol-Chloroform	37,3 ng/μl
AFL_Na11 F1	Phenol-Chloroform ^{1,2}	64,7 ng/μl
GYT6	Monarch Genomic DNA Purification Kit	277,5 ng/μl
MG#27	GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	93,8 ng/μl
NSS K18	Monarch Genomic DNA Purification Kit ¹	42,3 ng/μl
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	Monarch Genomic DNA Purification Kit	77,7 ng/μl
W2_1Cu K2	Phenol-Chloroform ¹	55,7 ng/μl
W2_AgNO ₃ K1	GenElute Bacterial Genomic DNA Kit ^{1,2}	82,6 ng/μl

¹Durch GenElute PCR Clean-Up Kit gereinigt.

²Mehrere gDNA-Isolationen (AFL_1Cu F6: vier, W2_AgNO₃ K1: drei, AFL_GHD10 F21 und AFL_Na11 F1 zwei) wurden vereinigt und mit der Vakuum Zentrifuge aufkonzentriert.

³Fluoreszenz-basierte Messung mit DeNovix dsDNA Broad Range Kit.

2.2.2.7. Genomsequenzierung mittels Nanopore Technologie

Die isolierte gDNA wurde mit der Oxford Nanopore Technologie sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von Almut Kohl (BRAIN Biotech AG) durchgeführt. Hierfür wurden 800 ng gDNA vorbereitet. Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem *Native barcoding genomic DNA Protocol* (Oxford Nanopore Technologies). Das Gesamtvolumen betrug 24 μl. Zunächst wurde die DNA repariert und die DNA-Enden präpariert. Damit mehrere Proben gleichzeitig sequenziert werden konnten, wurden diese mit Barcodes versehen. Anschließend erfolgten die Adapterligation und die Reinigung. Die MinION *Flow Cell* wurde wie vom Hersteller beschrieben beladen. Die Sequenzierung wurde durch die Software MinKNOW gesteuert. Die gDNAs wurden in drei Läufen sequenziert (Kapitel 10, Tabelle S 1).

2.2.2.8. CRISPR/Cas9 in *Ps. donghuensis* G2#25

Die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems, die Erstellung von Spacer-Sequenzen und die Konstruktion von CRISPR/Cas9-Vektoren fand unter Anleitung von Christian Zurek (BRAIN Biotech AG) statt.

Test auf L-Arabinose Abbau

Je drei Reagenzgläser mit 5 ml M9-Medium (C-Quelle: Glucose oder Arabinose) wurden mit *Ps. donghuensis* G2#25 inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 180 rpm und 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die OD_{600 nm} bestimmt.

Design Spacer-Sequenzen für die CRISPR/Cas9-Vektoren

Es wurden zunächst manuell mehrere DNA-Abschnitte gesucht, die die *protospacer adjacent motif* (PAM)-Sequenz NGG besitzen und in der Nähe des jeweils zu verändernden Bereichs lagen. Die Länge der Spacer sollte 20 Nukleotide plus PAM-Sequenz betragen. Falls der DNA-Abschnitt nicht mit Guanin anfangt, wurde ein Guanin vor die Sequenz gesetzt (21 Nukleotide + PAM-Sequenz). Zum Ausschluss von unspezifischen Schnittstellen wurde die Software CCTop verwendet und die gewählten Spacer-Sequenzen mit dem Genom von *Ps. donghuensis* G2#25 verglichen. Die Core Region, die Nukleotide unmittelbar vor der PAM-Sequenz, wurde als 12 Nukleotide definiert.

Je unterschiedlicher ein ähnlicher DNA-Abschnitt im Genom zu den definierten Spacer-Sequenzen ist, desto unwahrscheinlicher ist ein Schnitt der Cas9 in diesem DNA-Abschnitt. Je unterschiedlicher die Nukleotide der Core Region zu der

Spacer-Sequenz sind, oder falls die PAM-Sequenz nicht vorhanden ist, desto unwahrscheinlicher ist ein Schnitt der Cas9.

Es wurden Spacer-Sequenzen ausgewählt, bei denen möglichst wenige weitere Schnittstellen im Genom identifiziert wurden oder bei denen die weiteren Schnittstellen aufgrund von Sequenzunterschieden unwahrscheinlich waren.

Konstruktion der Cas9-Vektoren

Zur Isolation des Ursprungsplasmids pB5_ara_Cas9delBbsI_PsacB_sgRNA (pCas9, Abb. 4) wurde eine Midi Prep mit dem Nucleo Bond Xtra Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde das klassische DNA-Reinigungsprotokoll ohne Finalyzer verwendet. Plasmidisolierungen aus *E. coli* und *Ps. donghuensis* G2#25 wurden mit dem GeneJet Plasmid-Mini-prep-Kit/E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I nach Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

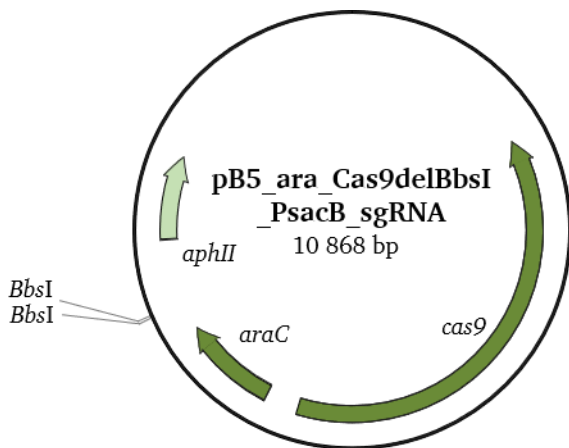


Abbildung 4 Plasmidkarte pCas9. pCas9 enthält Replikationsursprünge für *E. coli* und *Pseudomonas*. Die *cas9* Transkription steht unter der Kontrolle von *P_{BAD}*. *BbsI* Schnittstellen: Insertion der Spacer-Sequenzen sgRNA. *cas9*: für die Cas9 codierender Genbereich aus *Streptococcus pyogenes*; *araC*: Transkriptionsaktivator von *P_{BAD}*; *aphII*: Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase.

Spacer-Sequenzen mit keinen/unwahrscheinlichen weiteren Schnittstellen wurden ausgewählt und in pCas9 ligiert. Die Spacer-Sequenzen wurden ohne PAM-Sequenz und mit *BbsI* Schnittstellen erstellt (Fwd: GGTC, Rev: AAAC). Zunächst wurden die Spacer verbunden (Tabelle 10), hierfür wurden sie 5 min bei 98 °C inkubiert und dann 1 h langsam auf RT abgekühlt.

Tabelle 10 Spacer Annealing.

Komponente	Menge
Spacer Fwd (100 µM)	2 µl
Spacer Rev (100 µM)	2 µl
10x Oligo Annealing Puffer	2 µl
dH ₂ O	14 µl

pCas9 wurde mit *BpiI* oder *BbsI* verdaut (Tabelle 11). Die Restriktion wurde 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend folgte die Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min. Der Erfolg der Restriktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Der linearisierte Vektor wurde durch ein PCR Clean Up Kit gereinigt.

Tabelle 11 Restriktion pCas9 für die Spacer Klonierung.

Komponente	Menge
10x FastDigest-Buffer/CutSmart	2 µl
pCas9	2 µg
<i>BpiI/BbsI</i>	2 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Die Spacer und der linearisierte Vektor wurden ohne vorherige Phosphorylierung ligiert (Tabelle 12). Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

Tabelle 12 Ligation von pCas9 und Spacern.

Komponente	Menge
pCas9 (linearisiert)	50-100 ng
Hybridisierte Oligos	0,5 µl
2x T4 Quick Ligase Puffer/ 2x T4 Ligase Puffer	10 µl
T4 Quick Ligase/T4 Ligase	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

E. coli NEB DH10β/*E. coli* Top10F' Zellen wurden mit den Ligationsprodukten transformiert. Nach der Isolierung und Sequenzierung wurde *Ps. donghuensis* G2#25 mit den fertigen pCas9_Spacer Plasmiden transformiert. Je weniger Kolonien auf den Agarmedien vorhanden waren, desto effektiver waren die Spacer. Das pCas9 Plasmid mit dem Spacer, bei dem möglichst wenige Kolonien auf dem Agarmedium vorhanden waren, wurde für weitere Versuche verwendet. Zudem wurde die Position der Schnittstelle in der DNA-Sequenz beachtet, da sie möglichst nahe an der zu verändernden Stelle liegen sollte, oder im

Fall von Deletionen mittig in dem zu deletierenden Bereich.

Für Veränderungen im Genom musste ein Reparaturfragment erstellt werden, um die Reparatur des Doppelstrangbruchs zu ermöglichen. Das Reparaturfragment umfasst den vorderen und hinteren flankierenden Bereich und bei Bedarf die Punktmutationen oder Insertionen (Abb. 5). Der vordere und hintere flankierende (vfB/hfB) Bereich war 500 bp (Deletionen, Veränderung -10 Box) bzw. 750 bp (Insertion von anderen Promotoren) lang. Im Falle einer Deletion wurden nur die flankierenden Bereiche des zu deletierenden DNA-Abschnitts verwendet.

Verschiedene *templates* wurden für die unterschiedlichen flankierenden Fragmente und Insertionssequenzen des Reparaturtemplates verwendet (Tabelle 13).

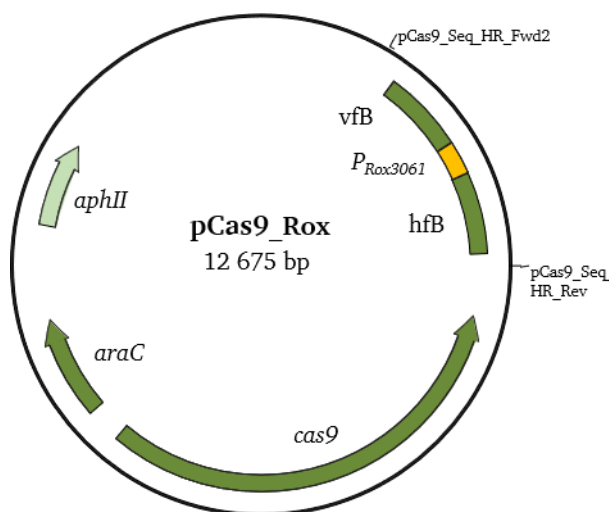


Abbildung 5 pCas9 mit Reparaturfragment. Vordere und hintere flankierende Bereiche von 750 bp. Zwischen den flankierenden Bereichen liegt beispielhaft der Rox Promotor ($P_{Rox3061}$). Die beiden Primer zur Amplifizierung des Reparaturfragments sind eingezeichnet.

Tabelle 13 Übersicht über *template*-DNAs zur Assemblierung von pCas9 mit Reparaturfragment.

Fragment	<i>template</i> DNA
<i>backbone</i> ¹	pCas9 mit Spacer Sequenz
vfB + hfB	Genomische DNA <i>Ps. donghuensis</i> G2#25
$P_{Rox3061}$	gDNA <i>Ps. putida</i> KT2440
P_{BAD}	pCas9
P_{TAC}	pET28
P_{Xut}	gDNA <i>Ps. fluorescens</i> Pf01
P_{RhaB}	PMQ688

¹Für P_{BAD} , P_{TAC} , P_{Xut} und P_{RhaB} wurde pCas9_Rox (Plasmid 37) als *backbone* verwendet, dabei wurde nur die Promotorregion ausgetauscht.

Die einzelnen Fragmente wurden mit der Phusion Flash Polymerase/Q5 Polymerase amplifiziert. Bevor die einzelnen Fragmente mit dem NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit zusammengefügt wurden, wurden die flankierenden Bereiche und gegebenenfalls das zu inserierende DNA-Fragment mit der *circular polymerase extension cloning* (CPEC) Methode verbunden (Quan *et al.*, 2009). Für die CPEC-Reaktion wurde die Q5 Polymerase und eine Primer-Anlagerungstemperatur von 55 °C verwendet. Statt Primern wurden je 100 ng der zu verbindenden DNA-Fragmente eingesetzt. Es wurden 20 statt 30 Zyklen durchgeführt. Nach der Reinigung wurde das Produkt mit den jeweiligen flankierenden Primern amplifiziert. Das pCas9 *backbone* und das Insert wurden mit dem NEBuilder Hifi DNA Assembly Kit assembliert und *E. coli* mit dem Produkt transformiert. Für die Assemblierung von pCas9_Rox wurden drei Fragmente in pCas9 inseriert. Es war nicht erfolgreich diese durch CPEC zu verbinden und in pCas9 zu inserieren. Auch eine direkte Assemblierung aller vier Fragmente scheiterte. Aus diesem Grund wurden vfB, $P_{Rox3061}$ und hfB in das Plasmid pASK75 inseriert (Plasmid 25). Anschließend wurden die Fragmente als ein DNA-Fragment amplifiziert und mit Hilfe des NEBuilder Hifi DNA Assembly Kits in pCas9 inseriert.

Bei induzierbaren Promotoren wurden sowohl der Promotorbereich als auch der entsprechende Operator und das Regulatorgen *upstream* von *hcnA* anstelle des nativen Promotor-/Operatorbereichs eingefügt (Tabelle 14).

Tabelle 14 Übersicht über die inserierten induzierbaren Promotoren und entsprechende Regulatorgene.

Promotor	Regulatorgen	Gesamtlänge DNA-Fragment
P_{BAD}	<i>araC</i>	1242 bp
P_{RhaB}	<i>rhaS</i> und <i>rhaR</i>	2129 bp
P_{TAC}	<i>lacl</i>	1624 bp
P_{Xut}	<i>xutR</i>	1429 bp

2.2.2.9. Proteinproduktion in *Ps. donghuensis* G2#25

Um die Cyanidsynthase nativ aus *Ps. donghuensis* G2#25 zu reinigen, wurde zunächst das *hcnC*-Gen im Genom von *Ps. donghuensis* G2#25 durch das

CRISPR/Cas9-System C-terminal mit Strep-tag-Codons markiert (Kapitel 7.2.2.2.). Hierfür wurde der StrepSpacer 9 verwendet. Ein Reparaturfragment (flankierende Bereiche + Strep-tag-Codons) wurde in das pCas9 Plasmid inseriert. Nach der Transformation wurde das Vorhandensein der Streptag-Codons mittels Kolonie-PCR (Primer: Seq_dsHCNC_Rev + Seq Hcn B 2 For) und anschließender Sequenzierung bestätigt. Mit der Mutante wurden Wachstumskurven (Kapitel 2.2.1.3.) und Cyanidtests durchgeführt (Kapitel 2.2.1.4.). Anschließend wurde eine Proteinanreicherung durchgeführt (Kapitel 2.2.3.2.).

2.2.2.10. Heterologe Genexpression in *E. coli* BL21

Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Für die Vorkulturen wurde LB-HD-Medium mit Kupfer zur Reduktion der Cyanidproduktion verwendet, da die Vorkulturen nicht in M9-Medium wuchsen. Die 500 ml Expressionskulturen wurden mit einer Start-OD_{600 nm} 0,05 inokuliert. Es folgte die Zugabe von ca. 50 µl Silikon-Antischaum. Die Expressionskulturen wurden bei einer OD_{600 nm} von 0,6-0,9 mit Anhydrotetrazyklin (AHT, 200 µg/l Kultur) induziert. Auch ohne Zugabe von AHT zeigte *E. coli* pASK.HCN_dong Cyanidproduktion. Zur Vermeidung von Cyanidproduktion während der Zellanzucht wurde M9-Medium für die Hauptkulturen verwendet. Die Inkubation der Expressionskulturen erfolgte bei 37 °C über Nacht.

2.2.2.11. Genexpression in *Ps. donghuensis* G2#25

Vorkulturen in M9-Medium wurden über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Expressionskulturen (500 ml) wurden mit einer Start-OD_{600 nm} 0,05 inokuliert. Es folgte die Zugabe von ca. 50 µl Silikon-Antischaum. Die Kulturen wurden über Nacht schüttelnd (130 rpm) bei 30 °C inkubiert.

Erstellung Komplementierungsplasmide

Die Deletionsmutante *Ps. donghuensis* ΔABC wurde mit den *hcnABC*-Genen im pBBR1MCS-2 Vektor komplementiert. Es wurden zwei

Plasmide erstellt, einmal war die Transkription unter Kontrolle des konstitutiv aktiven lacZ Promotors (Abb. 6, Plasmid 46), einmal wurde sie durch den nativen Promotor reguliert (Plasmide 47).

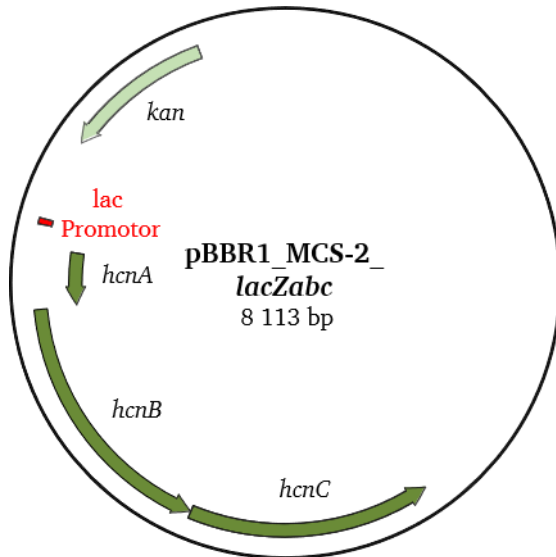


Abbildung 6 pBBR1MCS-2 Expressionsplasmid mit *hcnABC*-Genen für Komplementierung von *Ps. donghuensis* G2#25 Deletionsmutanten.

Nach der Transformation wurden die Komplementierungsmutanten mit Hilfe von PCRs überprüft. Zum einen wurde die Deletion im Genom überprüft, zum anderen das Vorhandensein der jeweiligen pBBR1MCS-2_ABC-Plasmide. Die Komplementierungsmutante mit dem nativen Promotor wurden auch zur Proteinproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25 verwendet. Durch den Strep-tag wurden eine Detektion und Reinigung der Cyanidsynthese ermöglicht. Zur gezielten Steuerung der Proteinproduktion wurde der Wildtyp mit dem Plasmid 47 transformiert.

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Cyanidnachweis

Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest

Der Nachweis von Cyanid erfolgte durch den Methämoglobintest (Baumeister *et al.*, 1971, Rudolf von Rohr *et al.*, 2009). Die Durchführung erfolgte wie von Fester, 2016 beschrieben. In Küvetten wurde je 560 µl dH₂O und 40 µl Methämoglobinreagenz vorgelegt. Zum Nachweis von Cyanid wurden die Proben pelletiert

und 200 μl des Überstands zu den Küvetten hinzugefügt. Die Küvetten wurden 30 min bei RT inkubiert und anschließend wurden die Absorptionen bei 427 nm gegen den Reagenzienleerwert bestimmt. Die Bestimmung der Kalibriergerade erfolgte auf Basis einer Kaliumcyanid-Kalibrierreihe. Für die Kalibrierreihe wurde Cyanid in LB pH 8 verdünnt. Das Medium/der Puffer, in dem Cyanid verdünnt wurde, beeinflusste die Kalibriergerade. Dies war zum Zeitpunkt von einigen Cyanidmessungen nicht bekannt (angegeben bei den entsprechenden Experimenten). Daher wurden erneut Kalibrierreihen mit den entsprechenden Medien durchgeführt und aus den vorher gemessenen $\text{OD}_{427\text{ nm}}$ Werten die Cyanidproduktion bestimmt. Hierbei war zu beachten, dass für die Kalibrierreihen und die Messungen der Cyanidproduktion nicht das gleiche Methämoglobinreagenz verwendet wurde. Daher sind die angegebenen Werte nicht exakt.

Cyanidtest Proteinfraktionen *Ps. donghuensis* G2#25

Die Zelltrümmer- und Membranpellets wurden in je 5 ml Puffer W resuspendiert. Für den Cyanidtest wurden die resuspendierten Proben, die ganzen Zellen und die Überstände jeweils 1:5 in Puffer W verdünnt. 1 ml dieser Verdünnungen wurde in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu den Reaktionsansätzen wurden 0,36 mM Eisen-(III)-citrat, 2 μM PMS und 5 mg Glycin-Methionin hinzugegeben. Bei Bedarf wurde anaerobisierter Puffer W, anaerobisiertes Eisen-(III)-citrat, PMS gelöst in anaerobisiertem Puffer W und anaerobisiertes Glycin-Methionin verwendet. Die Arbeiten fanden soweit möglich in einer anaeroben Kammer statt (Kapitel 2.2.3.2. Native Proteinanreicherung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25). Außerdem wurden jeweils Ansätze ohne Glycin-Methionin mitgeführt. Die Ansätze wurden mehrere Stunden (genaue Angabe bei jeweiligem Ergebnis) bei 30 °C und 450 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert. Vor den Messungen wurde das Cyanid mit 8 μl 10 M NaOH stabilisiert. Das Volumen an NaOH wurde von David Rivic im Rahmen seiner Bachelor-Thesis bestimmt. Die Ansätze wurden bei 21 382 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Messung der Cyanidkonzentration verwendet. Eine Lagerung der

Überstände ohne Verlust von Cyanid war nicht erfolgreich, sodass die Messung und gegebenenfalls Verdünnungen, direkt erfolgten. Von den Messwerten wurden dann die Messwerte der Ansätze ohne Glycin-Methionin abgezogen.

In späteren Tests wurde ein Einfluss der Fixierung der Proben mit NaOH auf den Methämoglobintest gezeigt. Für die Kalibrierreihen wurde Puffer W mit bzw. ohne Glycin-Methionin verwendet. Der Einfluss von Lysozym, DNaseI, DTT, PMS und Eisencitrat auf die Kalibrierreihen wurde nicht getestet. Daher sind die Cyanidproduktionswerte nicht genau.

2.2.3.2. Proteinanreicherungen der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25

Proteinanreicherung aus *E. coli* Bl21

Zunächst wurden die *E. coli* Bl21 pASK-HCN.dong Expressionskulturen sedimentiert (10 000 g, 10 min, 4 °C) und mit je 100 ml Puffer W gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellpellets in 20 ml Puffer W aufgenommen. Die Zellen wurden mittels Ultraschallbehandlung auf Eis aufgeschlossen (Branson Sonifier 250, Stufe 5, Mikrospitze [5 mm], 100 % Arbeitszyklus, 2x 5 min oder 60 % Arbeitszyklus 4x 1 min, siehe Tabelle 15). Die Zelltrümmer wurden sedimentiert (10 000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden die Membranbestandteile von den löslichen Zellbestandteilen durch Ultrazentrifugation getrennt (100 000 g, 30 min, 4 °C, 55.2 Ti, Beckman Instruments, Brea, USA). Durch Strep-tag-Säulenaffinitätschromatographie sollte die Cyanidsynthase gereinigt werden. Die Überstände nach der Ultrazentrifugation wurden auf je eine 1 ml Strep-Tactin Superflow Tropfsäule (IBA, Göttingen) gegeben. Die Säulen wurden 5x mit 1 Säulenvolumen (CV) Puffer W gewaschen. Die Proteinelution erfolgte 6x mit 0,5 CV Puffer E. Die Säulen wurden 3x mit 5 CV Puffer R regeneriert, 2x mit 5 CV 100 mM Tris-Lösung gewaschen und 2x mit 4 CV Puffer W äquilibriert. Bei Proteinanreicherungen zur Überprüfung von *inclusion bodies* (durchgeführt nach *Screening Detergents for Optimal Solubilization and Purification of Membrane Proteins*; https://cube-biotech.com/media/pdf/8e/24/f8/Screening_Detergents.pdf [Aufruf: 11/2022], Cube Biotech

GmbH, Monheim) wurde vor der Ultraschallbehandlung eine Spatelspitze Lysozym zur Lösung gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Die Ultraschallbehandlung wurde auf Stufe 5 mit der Mikroschallspitze, 100 % Arbeitszyklus, 2x 3 min durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 900 g, 4 °C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand erneut bei 10 000 g, 10 min, 4 °C zentrifugiert.

Aufkonzentrieren von Proteinen

Proteine wurden durch Zentrifugationen bei 2 000 g, 4 °C mit Proteinfiltern (Pierce Protein Concentrator PES, 30K MWCO, 2-6 ml)

aufkonzentriert. Die Zentrifugation erfolgte solange bis das benötigte Volumen erreicht war.

Solubilisierung der Cyanidsynthase aus *E. coli*

Zur Solubilisierung der Cyanidsynthase wurden verschiedene Detergenzien und Chemikalien verwendet (Tabelle 15). Vor der Ultraschallbehandlung wurde immer 10 mg Lysozym zu den Zellen gegeben. Nach der Detergenzienbehandlung wurde ein Ultrazentrifugationsschritt wie oben beschrieben durchgeführt. Der Erfolg der Solubilisierungen wurde jeweils per Western Blot beurteilt (Kapitel 2.2.3.4.).

Tabelle 15 Übersicht über verwendete Detergenzien/Änderungen des Protokolls zur Solubilisierung der Cyanidsynthase.

Detergenz/Behandlung	Zugabe zu Fraktion	Inkubationsbedingungen	Weitere Zugaben vor Ultraschall
Detergenzien			
6,5 mM CHAPS ¹	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	1 mg DNaseI
1 % CTAB ¹	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	1 mg DNaseI
0,8 % DDM	Zelltrümmer Pellet	1,5 h und 24 h, 4 °C, rührend	-
1,5 % DDM	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
2 % DDM	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
39 mM DDM ¹	Vor Ultraschall	30 min vor US, nach Ultraschall 20 h, RT, Überkopffrotator	1 mg DNaseI cComplete
2,5 % DIBMA ¹	Vor Ultraschall	30 min vor US, nach Ultraschall 20 h, RT, Überkopffrotator	1 mg DNaseI cComplete
5 % DIBMA ¹	Vor Ultraschall	20 h, 30 °C, Überkopffrotator	-
4 mM Natriumdesoxycholat ¹	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	1 mg DNaseI
207 mM Natriumdesoxycholat	Vor Ultraschall	3 h vor Ultraschall, Überkopffrotator	-
1 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
2 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
5 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
10 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
SMA 2:1 ¹	Vor Ultraschall	20 h, 30 °C, Überkopffrotator	-
5 % Triton	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
1 % Triton + 0,1 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
2 % Triton + 0,1 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
2 % Triton + 0,5 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
5 % Triton + 10 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-
10 % Triton + 10 % SDS	Zelltrümmer Pellet	20 h, 4 °C, Überkopffrotator	-

Detergenz/Behandlung	Zugabe zu Fraktion	Inkubationsbedingungen	Weitere Zugaben vor Ultraschall
Änderung des Reinigungsprotokolls			
cOmpete Protease Inhibitor ¹	Vor Ultraschall	20 min RT	1 mg DNaseI
4x EmulsiFlex statt Ultraschall	-	-	1 mg DNaseI
0,5 mg/ml Lysozym	Vor Ultraschall	3 h und 20 h, RT, Überkopffrotator	-
1 M NaCl Puffer W ¹	-	-	1 mg DNaseI cOmpete
Zellsuspension vor Ultraschall einfrieren + auftauen	-	-	-
Zellernte nach 1 h Induktion	-	-	-

¹Ultraschallbehandlung: 4x 1 min (in Anlehnung an Wissing *et al.*, 1981), 60 % Arbeitszyklus, sonst 2x 5 min, 100 % Arbeitszyklus.

Konzentration: CHAPS und 4 mM Natriumdesoxycholat anhand der kritischen Micellenkonzentration bestimmt; CTAB: Literatur zwischen 0,1 und 2 % (Polati *et al.*, 2009, Stresser *et al.*, 2000); DDM: Literatur zwischen 1 und 2 % (Bhatt *et al.*, 2010, Kotov *et al.*, 2019); DIBMA und SMA 2:1: nach Sandro Keller und Eugenio Pérez Patallo; 207 mM Natriumdesoxycholat nach Lin *et al.*, 2014; SDS: Literatur Solubilisierung *inclusion bodies* bis 2 % (He *et al.*, 2017); 2 % Triton + 0,1 % SDS nach Angaben des Herstellers IBA der Strep-Tactin Säulen (maximale tolerierte Konzentrationen); andere SDS und Triton Konzentrationen selbst gewählt. Durchführung Hochdruck Zellaufschluss nach Protokoll AG Stein TU Darmstadt.

Solubilisierung der Cyanidsynthase mit *styrene-maleic acid copolymers lipid particles* (SMALPs) – Protokoll von Sandro Keller (TU Kaiserslautern) bereitgestellt

Als SMALPs wurden SMA2:1 und DIBMA verwendet (Danielczak *et al.*, 2019, Grethen *et al.*, 2017, Oluwole *et al.*, 2017). Die SMALPs wurden vor der Zugabe zu den Zellpellets in SMALP Puffer gelöst (Kapitel 2.1.7.4., je 1 g in 10 ml) und durch vortexen und Ultraschallbehandlung feinverteilt (1 min, 60 % Arbeitszyklus, Microtip). Nach dem Waschen der sedimentierten Zellen (500 ml Kultur) wurden sie in 10 ml SMALP Puffer resuspendiert und die feinverteilten SMALPs hinzugegeben (10 ml, Gesamtvolumen: 20 ml). Anschließend wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt (4x 1 min, 60 % Arbeitszyklus, Microtip), gefolgt von einer Inkubation über Nacht auf dem Überkopffrotator bei 4 °C bzw. 30 °C. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 10 000 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde mit den Überständen eine Ultrazentrifugation bei 45 000 g, 4 °C für 30 min durchgeführt.

Zur Analyse der solubilisierten Proteingemische mittels Western Blot wurden Proteinfällungen und ein Polymerabbau durchgeführt. Hierzu wurden die Proben, Methanol, Chloroform und dH₂O auf Eis gekühlt. Je 200 µl Probe wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 800 µl Methanol wurde zugefügt. Durch Vortexen wurde gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von

Chloroform, wieder wurde durch vortexen gemischt. 600 µl dH₂O wurde hinzugegeben und wieder wurde 30 s durch vortexen vermischt. Die Proben wurden 3 min bei 14 000 g und 4 °C zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden entfernt ohne die Interphase, in der sich die Proteine befanden, zu zerstören. 800 µl Methanol wurden zugegeben und durch 30 s vortexen vermischt. Es wurde für 1 min bei 5 000 g, 4 °C und anschließend für 4 min bei 20 000 g, 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt, ohne die Pellets zu zerstören. Die Pellets wurden in der Vakuumentrifuge getrocknet und in SDS-Auftragspuffer gelöst.

Native Proteinanreicherung der Cyanidsynthase aus *Ps. donghuensis* G2#25

Die Hauptkulturen wurden wie bei *E. coli* beschrieben sedimentiert und gewaschen. Bei Bedarf fanden folgende Schritte unter anaeroben Bedingungen statt. Es wurde eine anaerobe Kammer mit 96 % Stickstoff und 4 % Wasserstoff Atmosphäre verwendet (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA). Puffer W wurde entgast und anaerobisiert. Zentrifugationsschritte und der Zellaufschluss durch Ultraschall fanden immer unter aeroben Bedingungen statt. Die sedimentierten Zellen wurden in 20 ml Puffer W resuspendiert. Es wurden 10 mg Lysozym, 1 mg DNaseI und cOmpete Proteaseinhibitor hinzugegeben und die Zellsuspension 15 min bei RT inkubiert. Bei Cyanidtests wurde vor dem

Ultraschall 1 mM DTT hinzugegeben (Kapitel 2.2.3.1. Cyanidtest Proteinfraktionen *Ps. donghuensis* G2#25). Nach der Ultraschallbehandlung (10x 1min, je 1 min Pause, 100 % Arbeitszyklus, Microtip) wurde der Zellaufschluss mikroskopisch kontrolliert. Zelltrümmer wurden bei 10 000 g, 4 °C für 10 min sedimentiert. Zur Abtrennung von Membranbestandteilen erfolgte die Ultrazentrifugation des Überstands bei 100 000 g, 4 °C für 45 min.

In vitro Protein Synthese

Für die *in vitro* Protein Synthese von HcnABC wurde das NEBExpress Cell-free *E. coli* Protein Synthesis System nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur *in vitro* Expression wurden die *hcnABC*-Gene (Strep-tag HcnC C-Terminus) in das DHFR-Plasmid mittels NEBuilder inseriert (Plasmid 49). Der Erfolg der Proteinproduktion wurde durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

Proteingehaltsbestimmung mittels Bradford-Test

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). 980 µl Bradford-Reagenz wurde in eine Küvette vorgelegt und mit 20 µl Probe vermischt. Das Gemisch wurde 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen den Reagenzienleerwert bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte auf Basis einer Kalibrierreihe mit Rinderserumalbumin.

2.2.3.3. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer apparenten Molekülmasse wurden 12 %ige Acrylamid Tris-Tricin Gele verwendet (Schägger *et al.*, 1987, Tabelle 16).

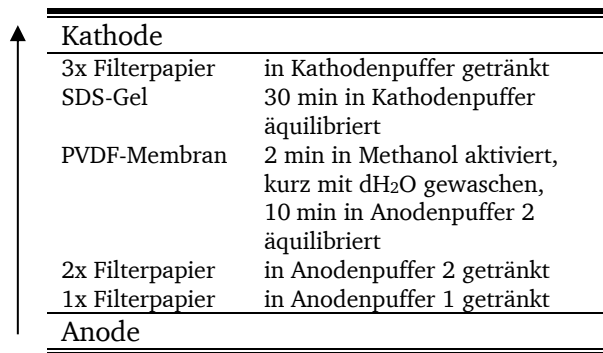
Tabelle 16 Zusammensetzung Acrylamid Tris-Tricin Gele.

Chemikalie	4 % Sammelgel	12 % Trenngel
Rotiphorese Gel 30	2 ml	10,8 ml
3x Schägger Puffer 60 % (w/v)	3,5 ml	9 ml
Glycerin	-	3 ml
ddH ₂ O	9 ml	4,2 ml
TEMED	40 µl	40 µl
10 % (w/v) APS	200 µl	200 µl

Zur Auftragung wurden die Proben mit 3x SDS-Auftragspuffer vermischt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden auf die Gele aufgetragen und elektrophoretisch mit dem Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad, Hercules, USA) aufgetrennt. Hierbei wurde eine konstante Spannung von 110 V verwendet (*peqPOWER E250*, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Mit den SDS-Gelen wurden anschließend Coomassie-Färbungen oder *semi-dry* Western Blots durchgeführt. Für Coomassie-Färbungen wurden die SDS-Gele mit Coomassie-Lösung (Kapitel 2.1.7.2.) überschichtet und schwenkend über Nacht bei RT inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit dH₂O.

2.2.3.4. semi-dry Western Blot

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel 30 min in Kathodenpuffer inkubiert. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Roti-Fluoro PVDF, Carl Roth) mittels PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter (Peqlab, Erlangen) übertragen. Die Stromstärke betrug 2 mA/cm² Gel. Der Aufbau des Blots ist folgend dargestellt.



Nach dem abgeschlossenen Transfer wurde die Membran zur Trocknung bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie 2 min mit Methanol reaktiviert, in dH₂O gewaschen und 2 min in PBS inkubiert. Das Blocken erfolgte 1-2 h mit *Odyssey Blocking Buffer* (LI-COR, 1:1 mit PBS verdünnt) bei RT. Bei Bedarf wurde *Biotin Blocking Buffer* (1:1 000, IBA Lifesciences, Götting) hinzugegeben (Western Blots *Pseudomonas*). Streptavidin wurde 1:5 000 in PBS mit 0,2 % (v/v) Tween 20 und 0,01 % (w/v) SDS verdünnt und zu der Membran gegeben. Anschließend wurde die

Membran viermal 5 min mit Waschpuffer und abschließend mit PBS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran zunächst vollständig getrocknet. Hierbei erfolgte die Lagerung im Dunkeln. Für die Detektion von Streptavidin bei 800 nm wurde der Odyssey Fc Imager (LI-COR, USA) verwendet.

2.2.4. Biolaugungsversuche

Der Großteil der Biolaugungsversuche fand bei der BRAIN Biotech AG in Zwingenberg statt. Die Vorkulturen mit den Cyanid-produzierenden Neuisolaten wurden zwei Tage in LB 0,1 M NaCO₃ pH 9/10 oder in 0,5x HD 0,1 M NaCO₃ pH 8/9/10 inkubiert. Für Pseudomonaden wurde LB pH 7,2 verwendet. Pseudomonaden und *Ni. alkalilacustris* 20OB1 wurden über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle wurde *Pseudomonas metallosolvens* verwendet (BRAIN Biotech AG). Die ICP-MS Messungen wurden von Annabelle Klämke durchgeführt.

2.2.4.1. Biolaugungen in Schüttelkolben

Das zu laugende Material wurde in Schüttelkolben abgewogen (2,5 % oder 1 % [w/v]), mit dH₂O angefeuchtet und die Kolben autoklaviert. Das entsprechende Medium mit 115 mM Glycin wurde zugegeben und die Laugungskolben mit einer OD_{600 nm} von 1 angeimpft. Bei den Biolaugungen von AFL_1Cu F12 und 20OB1 wurde aufgrund des langsameren Wachstums eine niedrigere Start-OD verwendet (Tabelle 17). Die Metallkappen der Schüttelkolben wurden durch Silikonschwammfilter ersetzt (alle Experimente bei BRAIN Biotech AG, TU Darmstadt: Zellstoff-Stopfen [Abb. 34 unten, Abb. 46]). Die

Inkubation erfolgte bei 30 °C und 170 rpm (Änderungen bei jeweiligem Experiment angegeben) für mehrere Tage. Die Inkubation der Biolaugungen der Deletionsmutanten mit/ohne Komplementierung und von *P_{BAD}* (Schleifstaub Goldpolitur) erfolgte für 48 h bei 30 °C und 170 rpm. Anschließend wurden die Kolben weiter bei 25 °C schüttelnd unter dem Abzug inkubiert (Kapitel 5 Abb. 34 links unten, Kapitel 6 Abb. 46). Die Inkubation von der *P_{BAD}*-Mutante mit dem Filterstaub erfolgte bei 26 °C und 180 rpm unter dem Abzug (Kapitel 5 Abb. 34 rechts unten).

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Metallkonzentrationen im Überstand mittels ICP-MS Messung entnommen. Zur Einschätzung der Vitalität wurden je 100 µl der Proben unverdünnt auf LB-Agarmedien ausplattiert. Der pH-Wert zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten wurde mit pH-Teststreifen bestimmt.

2.2.4.2. Biolaugungen im 24 Well Format

Für Biolaugungen im 24 Well Format wurden Deep Well Mikrotiterplatten verwendet. Ein Duetz-System von Kuhner shaker, Birsfelden, wurde verwendet. Das Laugungssubstrat wurde zunächst mit dH₂O gemischt und unter Rühren in die Wells gegeben (1 % [w/v]). Auch hier betrug die Start-OD_{600 nm} 1. Das Kulturvolumen betrug 3 ml. Die Platten wurde in die Duetz-System Halterungen eingespannt und bei 300 rpm und 30 °C für mehrere Tage inkubiert. Proben der Überstände wurden mittels ICP-MS Messungen analysiert. Für die DoE-Experimente (2.2.4.5.) wurden die ÜNK am Versuchstag nochmals überimpft, da die Biolaugungen nachmittags angesetzt wurden.

Tabelle 17 Übersicht über die eingesetzte Start-OD für Biolaugungen in Schüttelkolben.

Cyanidproduzent	Laugungssubstrat	Start-OD _{600 nm}
AFL_1Cu F12	Elektroschrott Staub	0,35
	Asche aus der Verbrennung von Elektroschrott	0,85
	Filterstaub <250 µm, weniger magnetisch	0,43
20OB1	Asche aus der Verbrennung von Elektroschrott 1	0,6
	Asche aus der Verbrennung von Elektroschrott 2	1
	Filterstaub <250 µm, weniger magnetisch	1
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 und <i>Ps. metallosolvens</i>	Alle Substrate	1

2.2.4.3. Vorbehandlung von der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1

12 g des Feststoffs wurden mit 100 ml 10 % Säure/Lauge für 24 h/48 h rührend bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. Die Rückstände wurden mehrmals mit dH₂O gewaschen und anschließend bei 80 °C über Nacht getrocknet. Da der säurebehandelte Rückstand einen pH von 4,5 hatte, wurde NaOH bis zu einem pH-Wert von 8 hinzugegeben, dies entsprach dem pH-Wert der alkalischen Vorbehandlung.

2.2.4.4. Mahlen der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1

Die unbehandelte Asche wurde 10 min bei 500 rpm in der Planeten-Kugelmühle PM 100 (Retsch, Haan) gemahlen.

2.2.4.5. Biolaugungen zur Medienoptimierung durch statistische Versuchsplanung

Bei der ersten Durchführung wurde ein 2-Level faktorieller Versuchsplan verwendet, welcher durch die Software DesignExpert 8.0 erstellt wurde. Die Biolaugungseffizienz wurde in Abhängigkeit von sieben Medienkomponenten untersucht (Tabelle 18). Als Basismedium diente LB. Die Konzentrationen der Medienkomponenten richteten sich nach der bisherigen Literatur (Glycin: Famarazi *et al.*, 2004, Gorji *et al.*, 2020; L-Serin und L-Threonin: Castric, 1977; L-Phenylalanin in Anlehnung an L-Serin und L-Threonin; Methionin: Famarazi *et al.*, 2004; L-Glutamat: Nazly *et al.*, 1981).

Jede Medienkombination wurde in den pH-Werten 7,2, 8 und 9 getestet. Der pH-Wert wurde durch 50 mM Tris stabilisiert. Die Biolaugungen wurden im 24 Well Format mit 1 % alkalisch vorbehandelter Asche 1, wie oben beschrieben, durchgeführt (siehe Vorbehandlung von der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1). Der Versuchsplan wurde randomisiert (Kapitel 10, Tabelle S 2). Die einzelnen Medienkomponenten wurden durch einen Opentrons-Pipettierroboter (OT-2, Opentrons, Long Island City, USA) zusammengefügt. Die Zugabe von *Ps. donghuen-sis* G2#25 erfolgte manuell, die Start-OD_{600 nm} von 1 wurde eingestellt.

Tabelle 18 Medienzusätze für einen 2-Level faktoriellen Versuchsplan.

Mediums-zusatz	1. Konzentration	2. Konzentration
Hefeextrakt	0 g/l	5 g/l
Glycin	10 mM	100 mM
L-Serin	0 mM	15 mM
L-Phenylalanin	0 mM	15 mM
Methionin	0 mM	15 mM
L-Threonin	0 mM	15 mM
L-Glutamat	0 mM	27 mM

In einem zweiten Experiment sollte das Medium weiter optimiert werden, andere Konzentrationen (aufbauend auf dem 1. Experiment) und Medienbestandteile wurden gewählt (Tabelle 19; Konzentrationen Eisen-(III)-citrat und Magnesiumsulfat nach Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Ein *optimal design* Versuchsplan wurde verwendet. Die gemahlene Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 diente als Laugungsmaterial. Die pH-Werte 7,2, 7,6 und 8 wurden getestet. Der Versuchsplan wurde randomisiert (Kapitel 10, Tabelle S 3).

Tabelle 19 Medienzusätze für den *optimal design* Versuchsplan.

Mediums-zusatz	minimale Konzentration	maximale Konzentration
Hefeextrakt	3 g/l	7,5 g/l
Glycin	50 mM	150 mM
L-Serin	0 mM	5 mM
L-Phenylalanin	0 mM	17,5 mM
Eisen-(III)-citrat	0 mM	1,5 mM
L-Threonin	15 mM	15 mM
L-Glutamat	9 mM	36 mM
Magnesiumsulfat	0 mM	1 mM

2.2.4.6. Königswasseraufschluss und ICP-MS Messung

Der Metallgehalt der verwendeten Laugungssubstrate wurde durch Königswasseraufschlüsse bestimmt. Je 0,1-0,2 g Substrat wurde in ein Glasgefäß eingewogen. Es wurden 7,5 ml 35 %ige Salzsäure und 2,5 ml 69 %ige Salpetersäure hinzugegeben. Die Hohlräume der Aufschlussgefäße wurden mit 3 ml dH₂O befüllt. Die Gefäße wurden mit Schraubdeckeln verschlossen und die Laugungsrückstände in der Mikrowelle Mars 6 (CEM Corporation, Stallings, USA) aufgeschlossen. Zunächst wurden die mit Königswasser

versetzten Rückstände 15 min auf 180 °C aufgeheizt und bei dieser Temperatur 15 min inkubiert. Anschließend wurden sie 15 min gekühlt. Die aufgeschlossenen Proben wurden durch einen mit Reinstwasser angefeuchteten Filter in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert. Das Volumen wurde dann mit Reinstwasser auf 40 ml aufgefüllt. Zuletzt wurden die Proben in Carrierlösung für die ICP-MS Messung 1:300 und 1:1 000 verdünnt. Ein Großteil der Königswasseraufschlüsse wurde von André Clauß (BRAIN Biotech AG) durchgeführt.

2.2.4.7. Probenvorbereitung für die ICP-MS Messung

Die entnommenen Überstände der Biolaugungen wurden abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Biolaugungsüberstände wurden in Carrierlösung für die ICP-MS Messung je nach Material verdünnt.

2.2.5. Bioinformatische Methoden

2.2.5.1. Genom-BLAST

Die Genomsequenzen der Isolate wurden mit der Nucleotide Collection Datenbank von *NCBI* verglichen. Die Genomsequenz der Datenbank mit der längsten *coverage* wurde zur Identifizierung des Eigenisolats verwendet. Der Genom-BLAST und die Bestimmung der ANI-Werte wurden von Jan Ziegler (BRAIN Biotech AG) durchgeführt.

2.2.5.2. Bestimmung der ANI-Werte

ANI-Werte der Genome wurden mit der Software FastANI bestimmt. Die ANI-Werte der sequenzierten Genome untereinander, der Genome der nächstverwandten Bakterienspezies der 16S rDNA-Analyse und der Ergebnisse des Genom BLASTs wurden bestimmt.

2.2.5.3. Identifizierung der Cyanidsynthasegencluster in Cyanid-produzierenden Neuisolaten

Zunächst wurde eine BLASTP-Suche der drei Untereinheiten HcnABC gegen die *NCBI*-nr Datenbank durchgeführt, um die entsprechenden Gencluster zu identifizieren.

Aus 1 000 Treffern wurden Aminosäuresequenz Alignments der drei Untereinheiten erstellt (bereitgestellt durch A. Kletzin), in denen konservierte Aminosäuresequenzmotive identifiziert wurden, im Idealfall mit einer Häufigkeit von $\geq 99\%$. Diese Motive dienten als *input* für den Algorithmus *Pattern Hit-Initiated BLAST* (PHI-BLAST), bei dem eine Motiv-abhängiger BLASTP erfolgt: Treffer werden nur dann angezeigt, wenn sowohl das eingegebene Motiv als auch BLAST-typische signifikante Sequenzübereinstimmungen vorliegen. Treffer wurden stichprobenartig daraufhin überprüft, ob die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der benachbarten kodierten ORFs Ähnlichkeiten zu den jeweils anderen HCN-Untereinheiten aufweisen, was als Hinweis auf ein vollständiges *hcn*-Gencluster gewertet wurde. Als konserviertes Aminosäuresequenzmotiv für HcnB wurde CRCE identifiziert und verwendet, für HcnA das Motiv C-X(2)-G-X-C-X(2)-C.

Außerdem wurde eine TBLASTN Analyse von *Ps. donghuensis* G2#25 HcnABC gegen die erstellte Nukleotiddatenbank aus den 18 Genomen durchgeführt.

Anschließend wurden die jeweiligen identifizierten Untereinheiten mit Phyre² modelliert und mit dem erstellten 3D-Strukturmodell der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 verglichen und die RMSD-Werte bestimmt.

Die Annotation der *hcn*-Gene der Eigenisolate beruht auf einer TBLASTN Analyse mit einer lokalen BLAST+ Installation (Camacho *et al.*, 2009) und einer Nukleotid-Datenbank generiert aus den Sequenzdaten der 18 Genome. Ein Teil der BLAST-Analysen und 3D-Strukturmodellierungen wurden von Masterstudenten im Rahmen des Moduls MB 03 unter meiner Anleitung durchgeführt bzw. erstellt.

2.2.5.4. 3D-Strukturmodellierungen

Die Proteinsequenzen der zu modellierenden Untereinheiten wurden entweder bei dem I-Tasser (Yang *et al.*, 2015a, Yang *et al.*, 2015b) oder bei dem Phyre² (Kelley *et al.*, 2015) Webserver hochgeladen. Jede Untereinheit wurde einzeln modelliert. Die Analyse und die Assemblierung der Untereinheiten erfolgten mit PyMOL (Schrödinger, 2015).

Kapitel 3

Cyanid-produzierende Neuisolate

Beiträge anderer

ICP-MS Messung	Annabelle Klämke	BRAIN Biotech AG
gDNA Sequenzierung mit der Nanopore Technologie	Jan Ziegler, Almut Kohl,	
Probenentnahme Nationalpark Neusiedlersee	Roland Albert	Universität Wien
Isolation Cyanidproduzenten IHS und AFL	Mitarbeiter Informationszentrum	Nationalpark Neusiedlersee
Teile Charakterisierung Neuisolate	Marina Burgio	TU Darmstadt
Bestimmung NaCO ₃ Toleranz auf Agarmedien (Tabelle 27) + Primäre Plattierungen SL1 und SL2	Sven Schladerbeck	
Auswahl Schwermetallkonzentrationen für primäre Plattierungen in Zusammenarbeit mit	Renate Fröhlich	
	Sabrina Völkel	



3. Isolierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Bakterien

3.1. Einleitung

In diesem Kapitel werden die Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen Cyanidproduzenten aus alkalischen Gewässern beschrieben. Das Ziel war es, alkali- und halotolerante Bakterien der Risikostufe 1, die gleichzeitig eine Schwermetall-Resistenz aufwiesen, zu isolieren. Die Eigenschaften liegen in dem Anwendungsgebiet der Biolaugungsexperimente begründet, da Laugungssubstrate oft eine hohe Salzfracht und hohe Konzentrationen an Schwermetallen aufweisen. In dem pK_S -Wert von Cyanid (9-9,4, Referenz S. 4, Fußnoten 1, 2) liegt die Alkalitoleranz begründet, da bei alkalischen pH-Werten mehr Cyanid in Lösung vorliegt und damit für die Biolaugung zur Verfügung steht. Hier wird die Isolierung von 55 Cyanid-produzierenden Bakterien beschrieben, von denen 17 eine Schwermetallresistenz aufwiesen. Zusätzlich wird die Genomsequenzierung von ausgewählten Cyanidproduzenten und abschließend Biolaugungsexperimente mit diesen Isolaten beschrieben.

3.1.1. Vorarbeiten

In der Arbeitsgruppe Kletzin (TU Darmstadt) wurden vor dieser Arbeit eine Reihe Cyanidproduzierender Bakterien im Rahmen von Abschlussarbeiten isoliert. Die neuisolierten Bakterien stammten aus Erd- und Gewässerproben rund um den Standort Botanischer Garten TU Darmstadt (Amberger, 2016b, Fester, 2016, Popova, 2017). Zudem wurden Proben aus Sodaseen in Österreich und aus zwei Seen in Hessen zur Neuisolation von Bakterien gesammelt (Sluka, 2018). Die Verwendung von Cyanidhaltigen Festmedien stellte eine Isolation von cyanidresistenten Bakterien sicher. Isolate wurden, wie auch in dieser Arbeit beschrieben, sowohl qualitativ als auch quantitativ auf Cyanidproduktion getestet (Kapitel 2.2.1.2. Isolierung von Cyanidproduzierenden Reinkulturen). Eine erste Isolierung aus Erdproben im Rahmen einer Masterarbeit führte zu 109 qualitativ positiv getesteten Cyanidproduzenten, von denen 40 auch im quantitativen Test Cyanidproduktion zeigten

(Fester, 2016). Diese wurden auf Agarmedien mit neutralem pH-Wert isoliert. Aufgrund des pK_S -Werts von Cyanid wurden für weitere Isolierungen Medien mit alkalischen pH-Werten (pH 9) verwendet. Die folgenden beschriebenen Anzahlen der Neuisolate beruhen auf einer erneuten Sequenzanalyse, bei der Bakterien mit ähnlicher Cyanidproduktion und identischer Sequenz nicht beachtet wurden. Die angegebenen Zahlen stimmen folglich nicht mit denen in den Abschlussarbeiten angegebenen Werten überein. Es wurden elf Pseudomonaden mit einer Cyanidproduktion von 0,5-9,2 mg/l aus Waldbodenproben aus Darmstadt isoliert, zwei waren der Risikostufe 2 zuzuordnen (Amberger, 2016b). Aus dieser Isolierung stammten die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien *Ps. donghuensis* G2#25 und *Ps. hutmensis* MG#27.

In weiteren Abschlussarbeiten wurden Erdproben aus der Rhizosphäre von Pflanzen, die alkalische pH-Werte bevorzugen, aus dem botanischen Garten der TU Darmstadt verwendet. Es wurden 23 Cyanidproduzenten mit einer Cyanidproduktion von 0,3-4,3 mg/l isoliert (Popova, 2017), in der Mehrzahl Enterobakterien. Das Isolat GYT6, welches hier verwendet wurde, wurde in dieser Arbeit aus Gartenerde isoliert. Zuletzt wurden Cyanidproduzenten aus Sodaseen und alkalischen Seen in Hessen auf Agarmedien pH 10 isoliert (Sluka, 2018). 24 Neuisolate, vorwiegend Firmicutes, zeigten eine Cyanidproduktion von 0,8-7 mg/l Cyanid. Die drei Isolate 1K3, 2OB3 und 20OB1 stammten aus dieser Isolierung.

Insgesamt wurden bei den vier Abschlussarbeiten 98 Cyanidproduzierende Bakterien isoliert, von denen der Großteil zu den Gammaproteobacteria gehörte (Abb. 7). Außerdem gehörten einige Isolate zu den Phyla Firmicutes, Actinobacteria und Proteobakterien. Nur wenige Bakterien gehörten zu den Flavobacteria.

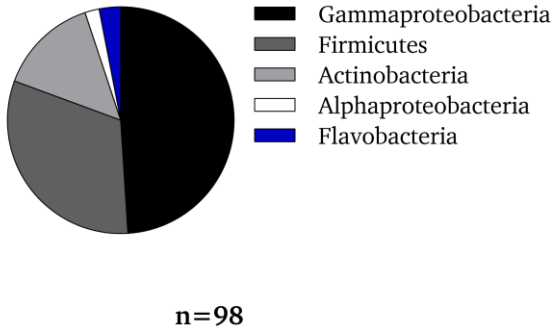


Abbildung 7 Überblick über die taxonomische Verteilung der isolierten Cyanidproduzenten.

Von den jeweils fünf Isolaten mit der höchsten Cyanidproduktion aus den vier Abschlussarbeiten gehörten vier der Risikogruppe 2 an, drei stammten aus einer Isolation bei neutralem pH-Wert (Abb. 8). Die Cyanidproduktion lag zwischen 2,4 mg/l und 13 mg/l. Die höchste Cyanidproduktion zeigte das Risikostufe 2-Isolat *Citrobacter gillenii* F2-21 mit 13 mg/l. Ein Großteil der Isolate produzierte in etwa 5 mg/l Cyanid.

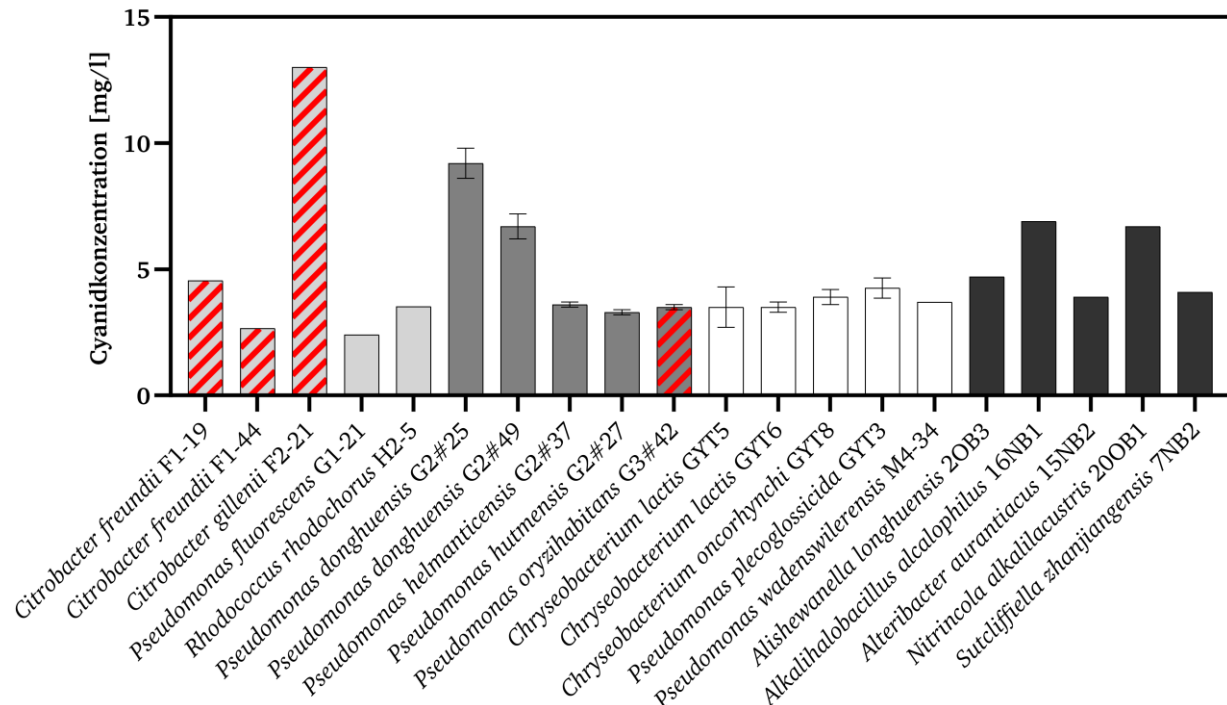


Abbildung 8 Cyanidproduktion der Isolate mit der höchsten Cyanidproduktion der jeweiligen Abschlussarbeiten. Hellgrau: Isolate aus Erdproben in Darmstadt (Fester, 2016); Dunkelgrau: Isolate aus Waldbodenerde in Darmstadt (Amberger, 2016b); Weiß: Isolate aus der Rhizosphäre von Pflanzen im botanischen Garten der TU Darmstadt (Popova, 2017); Schwarz: Isolate aus Sodaseen in Österreich (Sluka, 2018); Rot: Isolate der Risikostufe 2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3; Fester, 2016: keine Angabe der Standardabweichung und Sluka, 2018: einfache Messung).

3.1.2. Sodaseen

Die in dieser Arbeit beprobten Sodaseen besitzen meist einen alkalischen pH-Wert, das ist jedoch jahreszeitabhängig (Boros *et al.*, 2017). Die Seen („Lacken“) sind meist flach, die Wassertemperatur ähnelt der Außentemperatur und ist damit Schwankungen im Jahresverlauf unterworfen (Boros *et al.*, 2017). Viele trocknen im Sommer aus.

Für diese Arbeit wurden Lacken und Seen aus der Pannonischen Tiefebene beprobt. Verschiedene Salinitätstypen sind vorherrschend (Boros *et al.*, 2014). Die Autoren zeigten, dass der häufigste Salinitätstyp der Seen in diesem Gebiet nach deren Ionenzusammensetzung der basisch alkalische Typ ist (Na-HCO₃), der zweithäufigste ist der Chlorid Subtyp und danach der Sulfat Subtyp. Dies sind Subtypen des basisch alkalischen Typs (Boros *et al.*, 2014).

Die Salinität dieser Seen unterscheidet sich teils stark, sie variiert zwischen oligohalinen Bedingungen (0,5-3 g/l) und metahalinen Bedingungen mit bis zu 70 g/l (<https://www.freshwater-inflow.org/salinity/> [Aufruf: 11/2022], Boros *et al.*, 2014), wobei Salzkrusten im späten Frühjahr und frühen Sommer vorkommen können. Der durchschnittliche pH-Wert liegt bei 9,4 und die durchschnittliche Wassertiefe beträgt nur 25,6 cm (Boros *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit wurden Schlammproben der beiden Lacken Herrnsee und Fuchslochlacke für gezielte Isolierungen verwendet. Der Herrnsee zählt aufgrund seines hohen Sulfatgehalts nicht zu den typischen Sodalacken (Krachler *et al.*,

2012). Der pH-Wert schwankt zwischen 7,7 und 9 und die Salinität beträgt durchschnittlich 6 g/l (Boros *et al.*, 2017). Bei der Fuchslochlacke liegt der pH-Wert mit 9-10,4 stärker im alkalischen Bereich (Boros *et al.*, 2017, Krachler *et al.*, 2012). Die vorherrschenden Ionen sind hier Natrium und Hydrogencarbonat und die Salinität ist mit 2 g/l geringer (Boros *et al.*, 2017).

Bisher wurde eine Vielzahl von Sulfatreduzierern, Acetogenen Bakterien und Schwefel oxidierenden Bakterien aus Sodaseen isoliert (Sorokin *et al.*, 2011a, Sorokin *et al.*, 2012, Sorokin *et al.*, 2011b), aber es sind keine Berichte von Cyanidproduzierenden Isolaten bekannt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Isolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien

Zur Isolierung von alkaliphilen/alkalitoleranten, halophilen/halotoleranten und Cyanid-produzierenden Bakterien wurden verschiedene Sediment- und Schlammproben von Sodaseen/Lacken in Österreich und Ungarn entnommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahmen waren die meisten Seen nahezu ausgetrocknet (Abb. 9). Für die Isolierung wurden Proben mit ähnlichem pH-Wert und ähnlicher Beschaffenheit (Schlamm/trocken) vermischt, um die Anzahl von Ansätzen zu begrenzen. Die Probenmischung SL1 beinhaltete überwiegend schlammige Proben, während SL2 hauptsächlich aus trockenen Sedimentproben bestand (Kapitel 2.2.1.2, Tabelle 1).



Abbildung 9 Aufnahmen der Sodaseen Fuchslochlacke in Apetlon und Herrnsee in Illmitz zum Zeitpunkt der Probenahme (August 2019).

Nach der Aufschlammung wurden die Proben auf alkalischen Cyanid-haltigen Medien mit Natriumcarbonat ausplattiert (0,1-1 M, pH 10-12). Zusätzlich sollten schwermetallresistente Mikroorganismen isoliert werden. Hierzu wurde Cyanid-haltiges 0,5x HD-Medium mit 0,1 M NaCO_3 pH 10 mit Cu^{2+} (1 bzw. 5 mM) oder Ag^+ (0,05 mM) versetzt. Die Agarplatten mit Schwermetallen zeigten

weniger Kolonien als das metallfreie Medium (Abb. 10, Tabelle 20).

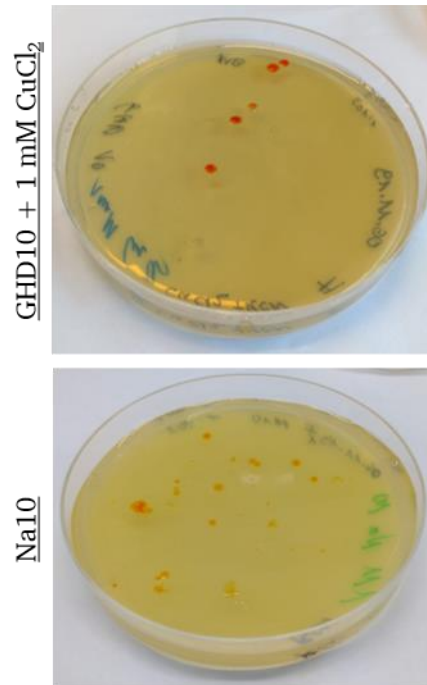


Abbildung 10 Beispielhafte Bilder von Agarmedien der primären Plattierungen. Aufgeschlammte Probe der Fuchslochlacke 1:1 000 verdünnt und auf KCN-haltige Agarmedien ausplattiert. Plattierungen durchgeführt und Bilder aufgenommen von Marina Burgio.

Ein Unterschied in der Kolonienzahl zwischen pH 10 (GHD10) und pH 11 (Na11) wurde nicht festgestellt (Abb. 11, Tabelle 20). Ein direkter Vergleich der Kolonienzahlen der schlammigen (SL1) und der trockenen Sedimentmischung (SL2) war nicht möglich, da teils unterschiedliche Isolierungsmedien verwendet wurden.

Die Gesamtsumme aller getesteten Kolonien betrug 407, von denen 219 Cyanidproduktion im qualitativen Test zeigten ($n = 1$, Kolonien von primären Platten). Alle Neuisolate waren alkalitolerant, der pH-Wert der Isolierungsmedien betrug mindestens 10.

Die Waldbodenprobe wurde nur auf metallhaltigen Medien ausplattiert, drei Reinkulturen wurden isoliert.

Aus der Fuchslochlacke wurden insgesamt 135 Cyanid-resistente Kolonien auf Cyanidproduktion getestet und 13 aus Herrnsee-Proben. 22 Cyanid-produzierende Reinkulturen, neun davon schwermetallresistent, wurden aus Proben der Fuchslochlacke isoliert, sechs aus dem

Tabelle 20 Übersicht über die Anzahl von Cyanid-produzierenden Bakterien in Abhängigkeit der Herkunft und des Isolierungsmediums.

Probenbezeichnung	Isolierungsmedium	Anzahl getesteter Kolonien	Positiv im qualitativen Cyanidtest ¹	Positiv im quantitativen Cyanidtest ²	Anzahl Reinkulturen
OS1	0,5x HD NaCO ₃	21	5	2	1
NSS1	0,5x HD NaCO ₃	64	8	5	2
Probenmischung SL1	GHD10	24	15	12	6
	Na11	41	34	32	5
	1Cu	25	3	1	1
	5Cu	5	3	3	2
	AgNO ₃	14	5	2	1
Probenmischung SL2	HSal	50	18	18	5
	5Cu	4	4	2	1
	AgNO ₃	6	3	1	0
Waldboden	1Cu	2	2	2	1
	AgNO ₃	3	3	3	2
Herrnsee (IHS1)	GHD10	7	5	4	2
	Na11	4	2	2	2
	MBN	2	2	2	2
Fuchslochlacke (AFL2)	GHD10	27	19	17	3
	Na11	10	10	9	3
	Na10	26	25	9	4
	HSal	20	7	6	0
	MBN	21	21	21	3
	1Cu	12	11	8	7
	AgNO ₃	19	14	10	2
Summe	-	407	219	171	55

¹Positiv im qualitativen Cyanidtest: Die Kolonien von den Isolierungsplatten wurden in einfacher Bestimmung auf Cyanidproduktion getestet.

²Positiv im quantitativen Cyanidtest: Reinkulturen wurden in Triplikaten auf Cyanidproduktion getestet.

1Cu = GHD10 + 1 mM CuCl₂; 5Cu = GHD10 + 5 mM CuCl₂; AgNO₃ = GHD10 + 0,05 mM AgNO₃; Für nicht angegebene Medienabkürzungen siehe Kapitel 2.1.6.4..

Herrnsee.

Zehn der Neuisolate wurden auf pH 11 Agarmedien isoliert. Außerdem wurden neun natron-tolerante Cyanidproduzenten isoliert, diese zeigten bei 1 M NaCO₃ Wachstum. Fünf der neun Neuisolate schienen halophil zu sein, da sie bei zusätzlich hinzugefügtem 1 M NaCl Wachstum zeigten. 21 Isolate, die auf Mineral Base Medium wuchsen (Elektronenakzeptor: Pyruvat, -donor: Oxoglutar säure), zeigten Cyanidproduktion im qualitativen und quantitativen Cyanidtest. 17 Isolate wurden von schwermetallhaltigen Medien gewonnen, sie waren gegen Cu²⁺ bzw. Ag⁺-resistent.

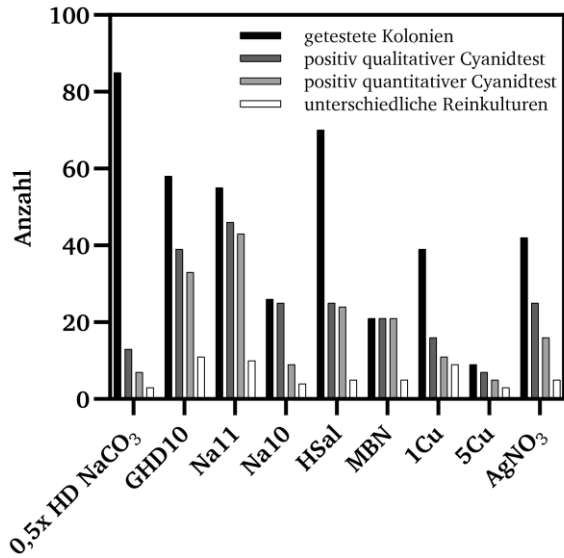


Abbildung 11 Übersicht über die Anzahl isolierter Cyanid-produzierender Bakterienkolonien in Abhängigkeit vom Medium. Dargestellt sind die Anzahlen: der auf Cyanidproduktion getesteten Kolonien; der Isolate, die Cyanidproduktion bei dem qualitativen Cyanidtest zeigten; positiver Isolate im quantitativen Cyanidtest und an unterschiedlichen Reinkulturen (Unterschied der 16S rDNA >1 Nukleotid, vgl. Tabelle 20).

Die nächstverwandten Bakterienspezies der Neuisolate wurde durch eine 16S rDNA-Analyse bestimmt, kein Isolat der Risikostufe 2 wurde identifiziert (TRBA, 2020, 16S rDNA-Sequenzen im elektronischen Anhang, siehe Kapitel 11). Sobald sich die 16S rDNA-Gensequenz um ein Nukleotid

oder weniger unterschied und die Cyanidproduktion um maximal 0,1 mg/l abwich, galten die Isolate als identisch. Auf diese Weise wurde die Zahl auf 55 verschiedene Cyanid-produzierende Neuisolate reduziert (vgl. Tabelle 21). 45 der 55 Neuisolate gehörten dem Phylum Firmicutes an (Abb. 12). Zudem wurden Cyanid-produzierende Bakterien der Phyla Bacteroidetes (acht, Gattung *Mongoliicoccus*) und Proteobacteria (zwei, Gattung *Halomonas*) isoliert. Insgesamt zeigten die Neuisolate Verwandtschaft zu 17 verschiedenen Bakterienspezies. Eine Übersicht über die Verwandtschaft der Bakterienspezies ist in Kapitel 10 Abb. S 1 dargestellt. Am häufigsten war die Gattung *Salipaludibacillus* mit 19 Neuisolaten und die Art *Alteribacter lacisalsi* mit 12 Neuisolaten vertreten. Die acht *Mongoliicoccus* Stämme wurden ausschließlich auf Kupfer-haltigem Medium isoliert.

Die 16S rDNA-Sequenzen der nahe verwandten Eigenisolate wurden verglichen, um die Verwandtschaft der Eigenisolate zu bestimmen (Abb. 13). Die Eigenisolate *Alteribacter lacisalsi* SL1_GHD(2) K12 und AFL_MBN F19 zeigten eine identische 16S rDNA-Sequenz, trotzdem war die Cyanidproduktion unterschiedlich (2,7 mg/l bzw. 5,1 mg/l). Die Cyanidproduktion war auch bei anderen Isolaten mit ähnlicher bzw. identischer Sequenz unterschiedlich. Es wurden zwei Gruppen von *Alt. lacisalsi* Isolaten identifiziert.

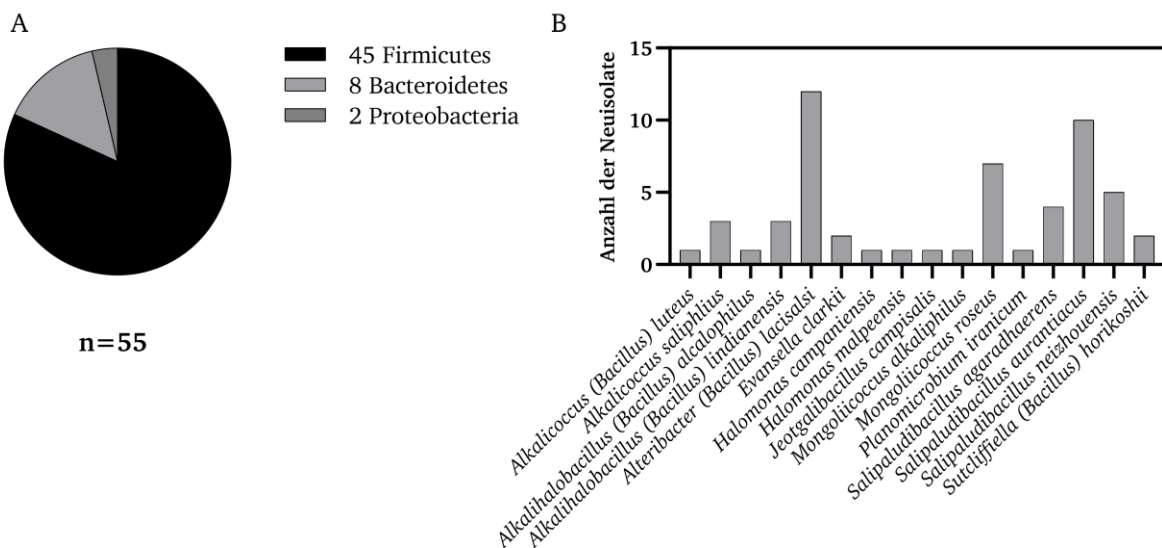
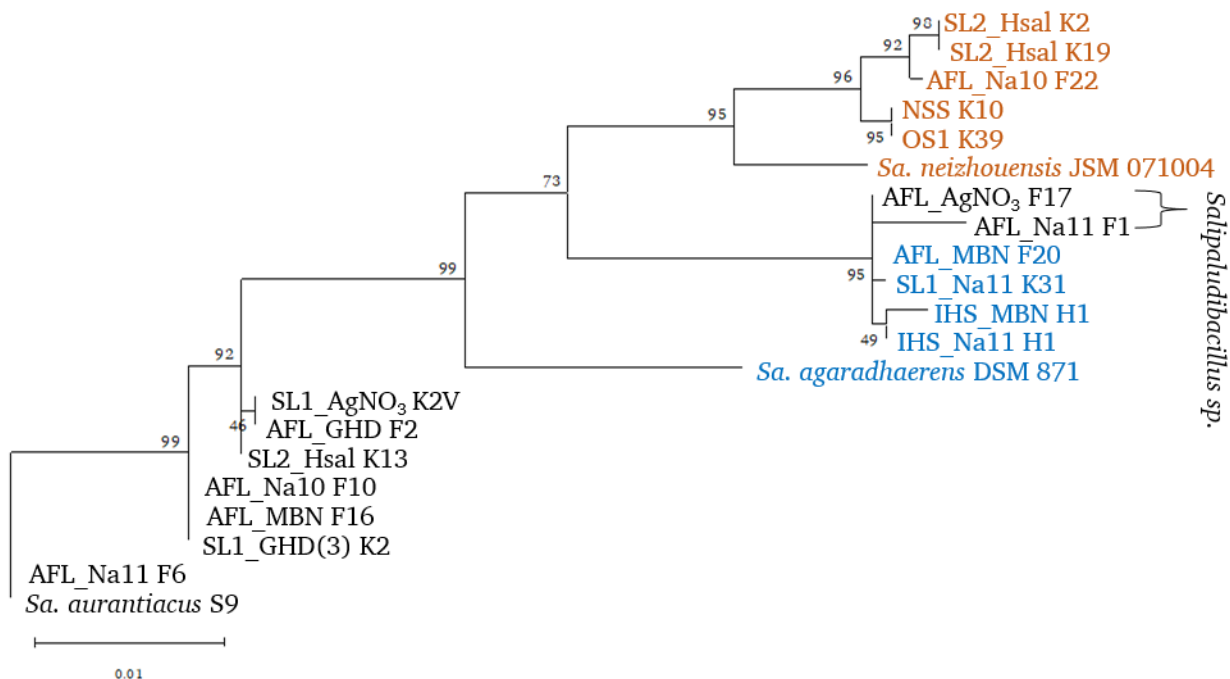
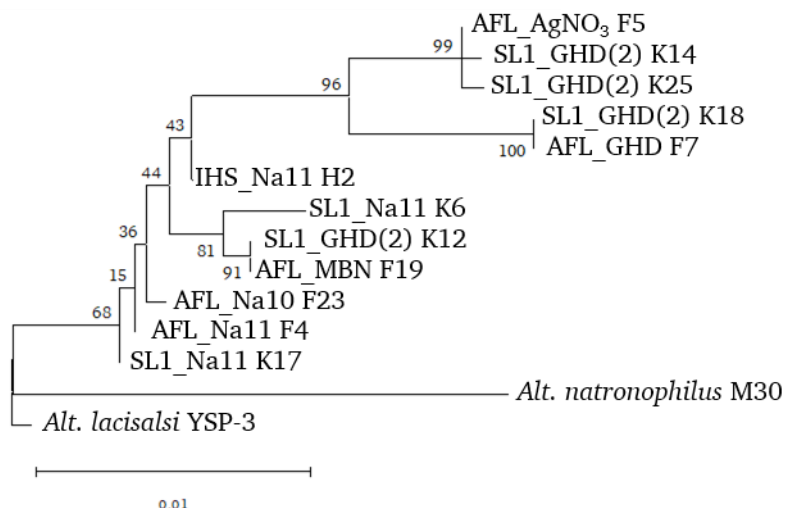
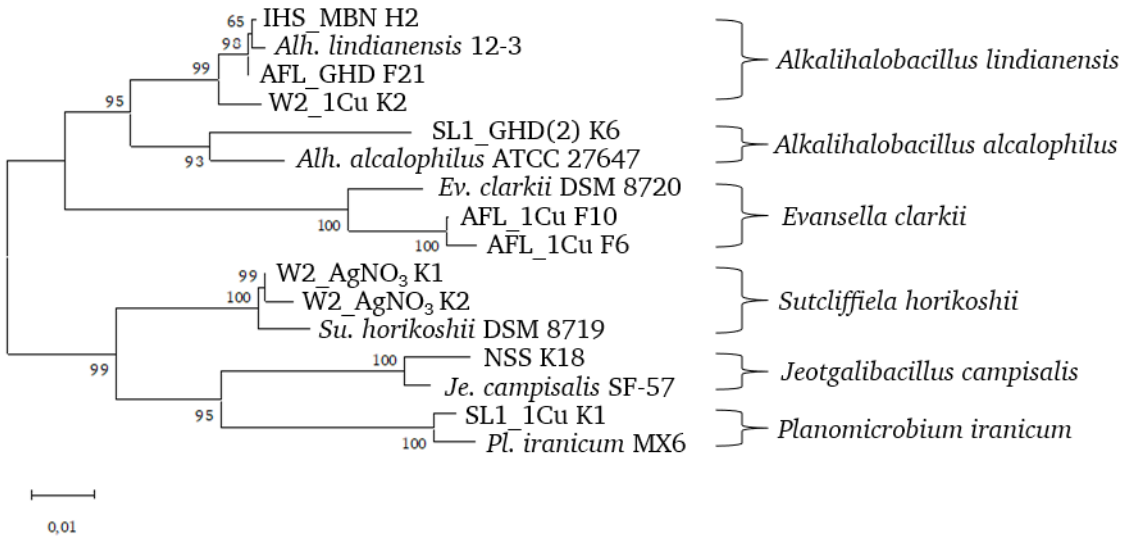
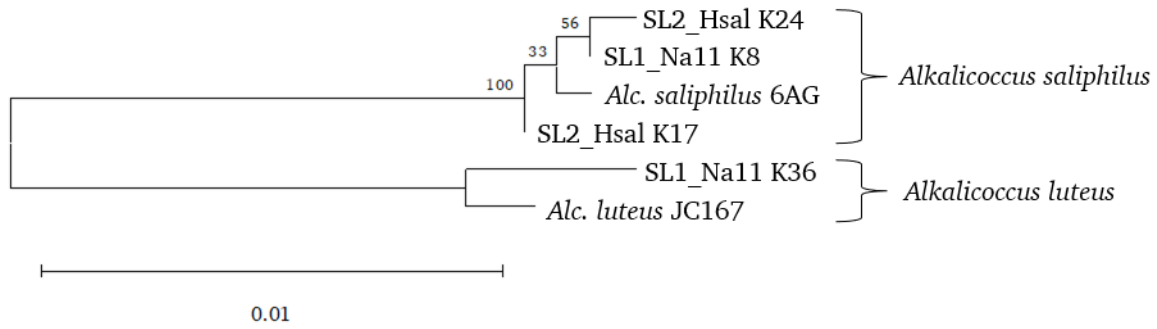


Abbildung 12 Übersicht über die taxonomische Zuordnung der Neuisolate. A: Phyla der Neuisolate basierend auf 16S rDNA-Analyse. B: Anzahl der Neuisolate mit gleicher nächstverwandter Bakterienspezies.

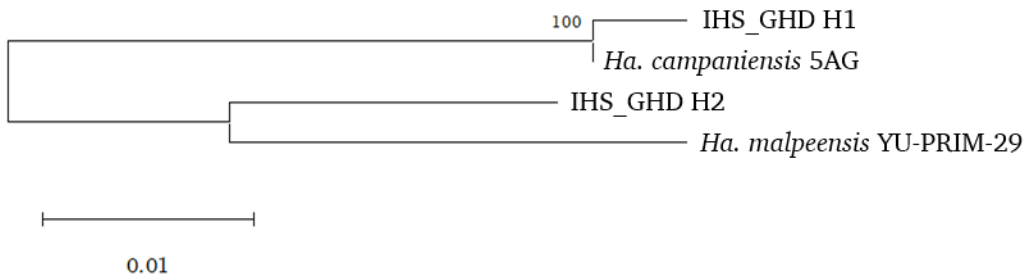
Sa. aurantiacus Eigenisolate zeigten auch zwei unterschiedliche Gruppen. AFL_AgNO₃ F17 und AFL_Na11 F1 zeigten eine nähere Verwandtschaft zu den *Sa. agaradhaerens* Eigenisolaten als zu den anderen *Sa. aurantiacus* Eigenisolaten. Das Eigenisolat AFL_1Cu F2, welches nahe verwandt zu *Mo. alkaliphilus* ist, zeigte auch eine nahe Verwandtschaft zu dem Eigenisolat

AFL_1Cu F12 (nächstverwandte Bakterienspezies: *Mo. roseus*). Die *Mo. roseus* Eigenisolate, welche aus der Probenmischung SL1 isoliert wurden, sind nicht eng verwandt mit den Isolaten aus anderen Probeentnahmen, auch wenn in der Probenmischung SL1 Proben des Herrnsees und der Fuchslochlacke vorhanden waren (Kapitel 2.2.1.2., Tabelle 1).





Phylum Proteobacteria – *Halomonas* spp.



Phylum Bacteroidetes

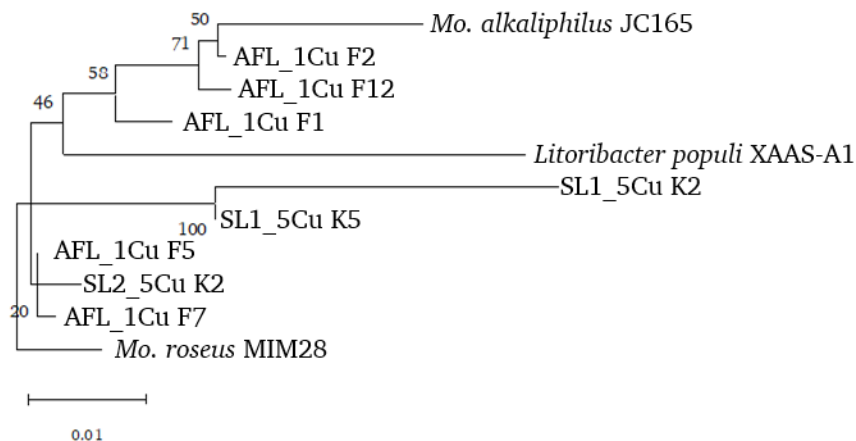


Abbildung 13 Phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Sequenzen der Eigenisolate. Phylogenetischer Baum der 55 Eigenisolate, basierend auf einem Maximum-Likelihood Algorithmus. Die Bootstrap Werte basieren auf 1 000 Replikaten sind in Prozentwerten an den Verzweigungspunkten angegeben. Der Balken steht für die Anzahl an Nukleotid Substitutionen pro Nukleotid Position. Von den Genom-sequenzierten Isolaten wurde die 16S rDNA-Sequenz aus dem Genom verwendet. Die nächstverwandten Bakterienspezies, beruhend auf der 16S rDNA-Analyse der Eigenisolate, sind dargestellt. *Sa. aurantiacus* AFL_Na10 F14 wurde aufgrund der kurzen Sequenzlänge von 629 bp nicht für die phylogenetische Einordnung berücksichtigt. Phylogenetische Analyse *Salipaludibacillus*. Stämme mit naher Verwandtschaft zu *Sa. neizhouensis* JSM 071004 (Orange), *Sa. agaradhaerens* (Blau) und *Sa. aurantiacus* S9 (Schwarz). Die zugrundeliegenden Alignments sind im elektronischen Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 11). Die Dendogramme wurden mit MEGA11 erstellt (Tamura *et al.*, 2021).

20 der 55 Neuisolate besaßen eine Sequenzidentität von <98,5 %, diese wurden als neue Spezies der jeweiligen Gattung eingestuft (Tabelle 21, unterstrichen). Davon gehörten zwölf zu der Gattung *Salipaludibacillus*. Ausgenommen von der Einteilung sind Neuisolate, deren lesbare 16S rDNA-Länge unter <1 000 bp lag (sechs Neuisolate). Die niedrigste Sequenzidentität der 16S rDNA hatte SL1_GHD(2) K6 mit 95,8 % zu *Alh. alcalophilus* ATCC 27647. IHS_GHD H2 besaß eine Sequenzidentität von 96,2 % zu *Halomonas malpeensis* YU-PRIM-29, AFL_1Cu F6 von 96,6 % zu *Evansella clarkii* DSM 8720. Alle Neuisolate der Gattungen *Alkalicoccus*, *Alkali-halobacillus*, *Alteribacter* und *Sutcliffiella* zeigten eine Übereinstimmung von über 98,5 % (ausgenommen SL1_GHD(2) K6). Die hier gewählten Bedingungen eigneten sich, um unterschiedliche Stämme dieser Gattungen zu isolieren. Auffällig war, dass alle Neuisolate mit der nächstverwandten Bakterienspezies *Salipaludibacillus neizhouensis* eine Sequenzübereinstimmung von unter 98 % besaßen.

Die Cyanidproduktion der Neuisolate wurde durch den Methämoglobintest 6 h nach Induktion mit Glycin und Methionin bestimmt (Tabelle 21; Kapitel 10, Abb. S 2). Da erst bei

späteren Experimenten ein Einfluss von Methionin bzw. Abbauprodukten hiervon auf den Methämoglobintest gezeigt wurde, ist es möglich das eine Reihe Falsch-Positiver Isolate hier dargestellt sind (Kapitel 6.2.4.). Die tatsächliche Cyanidproduktion ohne Methionin sollte nochmals bestimmt werden. Neuisolate, die nach der 16S rDNA-Analyse der gleichen Bakterienspezies zugeordnet wurden, zeigten oft unterschiedliche Cyanidproduktions-Werte. Die höchste Cyanidproduktion zeigte *Alt. lacisalsi* IHS_Na11 H2 mit 18 mg/l, jedoch zeigte dieses Neuisolat eine hohe Standardabweichung. Die zweithöchste Cyanidproduktion zeigte *Sa. aurantiacus* AFL_Na10 F10 mit 14,7 mg/l, wohingegen *Salipaludibacillus sp.* AFL_Na11 F1 eine Cyanidproduktion von 2,2 mg/l zeigte (97,9 % Sequenzidentität zu AFL_Na10 F10). Geringe Cyanidproduktionen von ca. 0,5 mg/l zeigten die beiden *Halomonas* Isolate IHS_GHD H1 und H2, *Je. campisalis* NSS K18, *Salipaludibacillus sp.* SL2_HSal K2 und *Alt. lacisalsi* SL1_Na11 K6 (99,47 % Sequenzidentität zu IHS_Na11 H2). In einem späteren Cyanidtest zeigte *Je. campisalis* NSS K18 keine Cyanidproduktion. Es wurde als Cyanid-resistentes Isolat weiter mitgeführt.

Cyanid-produzierende Neuisolate

Tabelle 21 Übersicht über die nächstverwandten Bakterienspezies der Cyanid-produzierenden Neuisolate.

Neuisolat	Nächstverwandte Bakterien- spezies und Stamm	Sequenzüberein- stimmung der 16S rDNA [%]	Medium Cyanid- produktion ¹	Cyanid- produktion Neuisolat [mg/l] ²
2OB3 ³	<i>Alishewanella longhuensis</i> LH2-2	<u>98,2</u>	0,5x HD NaCO ₃	4,7
SL1_Na11 K36 ⁴	<i>Alkalicoccus luteus</i> JC167	99,8	GHD10	4,9
SL1_Na11 K8 ⁵	<i>Alkalicoccus saliphilus</i> 6AG	99,9	Na11	>10
SL2_HSal K17	<i>Alkalicoccus saliphilus</i> 6AG	99,7	HSal	4,7
SL2_HSal K24 ⁶	<i>Alkalicoccus saliphilus</i> 6AG	99,6	HSal	3,7
SL1_GHD(2) K6	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i> ATCC 27647	<u>95,8</u>	GHD10	5,5
AFL_GHD F21 ^{7,8}	<i>Alkalihalobacillus lindianensis</i> 12-3	99,7	GHD10	1,0
IHS_MBN H2 ⁸	<i>Alkalihalobacillus lindianensis</i> 12-3	99,7	GHD10	1,0
W2_1Cu K2 ⁷	<i>Alkalihalobacillus lindianensis</i> 12-3	98,5	GHD10	7,6
AFL_AgNO ₃ F5 ⁸	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	98,8	GHD10	1,8
AFL_GHD F7 ⁸	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	98,6	GHD10	1,4
AFL_MBN F19 ⁸	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,6	GHD10	5,1
AFL_Na10 F23 ⁸	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,8	Na10	2,3
AFL_Na11 F4 ^{6,8}	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,9	Na11	9,0
SL1_GHD(2) K12	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,6	GHD10	2,7
SL1_GHD(2) K14	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	98,8	GHD10	4,3
SL1_GHD(2) K18	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	98,6	GHD10	4,5
SL1_GHD(2) K25	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	98,9	GHD10	5,1
SL1_Na11 K6 ⁴	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,5	GHD10	1,4
SL1_Na11 K17	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,7	Na11	12,4
IHS_Na11 H2 ⁸	<i>Alteribacter lacisalsi</i> YSP-3	99,8	Na11	18,2
GYT6	<i>Chryseobacterium lactis</i> KC1864	98,2	GYT	3,5
AFL_1Cu F6 ^{7,8}	<i>Evansella clarkii</i> DSM 8720	<u>96,6</u>	GHD10	1,5
AFL_1Cu F10 ^{6,8}	<i>Evansella clarkii</i> YN-1	<u>96,6</u>	GHD10	0,9
1K3 ³	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> NBRC 14763	99,8	0,5x HD NaCO ₃	2,3
IHS_GHD H1 ^{6,8}	<i>Halomonas campaniensis</i> 5AG	99,4	GHD10	0,7
IHS_GHD H2 ⁸	<i>Halomonas malpeensis</i> YU-PRIM-29	<u>96,2</u>	GHD10	0,8
NSS K18 ⁷	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i> SF-57	98,6	0,5x HD NaCO ₃	0,2
AFL_1Cu F2 ^{7,8}	<i>Mongoliicoccus alkaliphilus</i> JC165	<u>98,2</u>	GHD10	6,1
AFL_1Cu F1 ⁸	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	<u>97,2</u>	GHD10	5,3
AFL_1Cu F5 ^{7,8}	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	99,4	GHD10	6,8
AFL_1Cu F7 ⁸	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	98,8	GHD10	7,5
AFL_1Cu F12 ^{7,8}	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	<u>97,0</u>	GHD10	6,6
SL1_5Cu K2 ¹⁰	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	87,8 bzw. 99,3	GHD10	11,4
SL1_5Cu K5	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	99,5	GHD10	4,3
SL2_5Cu K2	<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	99,3	GHD10	7,1
20OB1 ³	<i>Nitrincola alkalilacustris</i> ZV-19	99,9	0,5x HD NaCO ₃	6,7
SL1_1Cu K1	<i>Planomicrobium iranicum</i> MX6	99,2	GHD10	0,7
G2#25 ^{7,11}	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> ID2	100	0,5x HD pH 9	9,2
MG#27 ^{7,11}	<i>Pseudomonas hutmensis</i> XWS2	99,5	0,5x HD pH 9	3,3
AFL_MBN F20 ⁸	<i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> DSM 8721	<u>97,7</u>	GHD10	3,2
SL1_Na11 K31	<i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> DSM 8721	<u>97,6</u>	Na11	2,5
IHS_MBN H1 ⁸	<i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> DSM 8721	<u>97,8</u>	GHD10	1,0
IHS_Na11 H1 ^{5,8}	<i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> DSM 8721	<u>97,7</u>	Na11	>10
AFL_AgNO ₃ F17 ^{7,8}	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<u>97,9</u>	GHD10	5,5
AFL_GHD F2 ⁸	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,5	GHD10	7,4
AFL_MBN F16 ⁸	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<u>97,7</u>	GHD10	6,5
AFL_Na10 F10 ⁸	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,7	Na10	14,7
AFL_Na10 F14 ^{6,8}	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<u>97,8</u>	Na10	10,9
AFL_Na11 F1 ^{4,7,8}	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<u>97,4</u>	GHD10	2,2
AFL_Na11 F6 ^{4,7,8}	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,9	GHD10	11,5
SL1_AgNO ₃ K2V	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,3	GHD10	9,2

Neuisolat	Nächstverwandte Bakterien- spezies und Stamm	Sequenzüberein- stimmung der 16S rDNA [%]	Medium Cyanid- produktion ¹	Cyanid- produktion Neuisolat [mg/l] ²
SL1_GHD(3) K2	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,9	GHD10	12,5
SL2_HSal K13	<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	99,6	HSal	6,6
AFL_Na10 F22 ^{7,8}	<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM 071004	<u>98,4</u>	Na10	7,9
SL2_HSal K2	<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM 071004	<u>98,1</u>	HSal	1,0
SL2_HSal K19	<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM 071004	<u>98,0</u>	HSal	3,1
NSS K10	<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM 071004	<u>98,4</u>	0,5x HD NaCO ₃	14,7
OS1 K39	<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM 071004	<u>98,1</u>	0,5x HD NaCO ₃	13,3
W2_AgNO ₃ K1 ⁷	<i>Sutcliffiella horikoshii</i> DSM 8719	99,3	GHD10	5,7
W2_AgNO ₃ K2	<i>Sutcliffiella horikoshii</i> DSM 8719	98,9	GHD10	3,8

¹Für die Vorkulturen wurde das jeweils angegebene Medium verwendet, zur Induktion der Cyanidproduktion wurde dasselbe Medium mit 5 g/l Glycin-Methionin verwendet. Medienabkürzungen siehe Kapitel 2.1.6.4..

²Die Korrektur aller Werte der Cyanidproduktion fand nachträglich statt, um den Einfluss des Mediums auf die Messung auszugleichen (Kapitel 2.2.3.1 Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest).

³Isoliert von Jan Sluka (Sluka, 2018). ⁴Cyanid-Messung in GHD10 + Glycin-Methionin.

⁵Die Cyanidproduktion wurde nicht genau bestimmt, da die gemessenen OD_{427 nm} Werte über dem höchsten Wert der Kalibrierreihe (10 mg/l) lagen. Die Cyanidproduktion wurde mit >10 mg/l angegeben.

⁶Die Länge 16S rDNA-Sequenz war <1 000 bp.

⁷Die Berechnung beruht auf den 16S rDNA-Genen aus den Genomsequenzierungen.

⁸Isolierung, 16S rDNA-Sequenzierung und Cyanidmessungen wurden von Marina Burgio durchgeführt (Burgio, 2020).

⁹Isolierung und Cyanidmessungen wurden von Ekatarina Popova durchgeführt (Popova, 2017).

¹⁰Ein ca. 40 bp langes DNA-Stück dieser *Mongoliicoccus* 16S rDNA konnte wiederholt nicht mittels Sanger-Sequenzierung aufgelöst werden. Daher ist Sequenzidentität der umgebenden DNA-Bereiche des nicht aufgelösten DNA-Abschnitts angegeben (368 bp bzw. 893 bp).

¹¹Isolierung und Cyanidmessungen wurden von Max Amberger durchgeführt (Amberger, 2016b).

Unterstrichen: Sequenzübereinstimmung von unter 98,5 %. Neue Spezies nach Kim *et al.*, 2014.

3.2.2. Charakterisierung der Cyanid-produzierenden Neuisolate

Eine Auswahl der isolierten Bakterienstämme und zuvor isolierter Cyanidproduzenten (Amberger, 2016b, Popova, 2017, Sluka, 2018) wurden näher charakterisiert. Hierbei wurden Isolate mit hoher Cyanidproduktion ausgewählt und ein möglichst breites Spektrum an Bakterien-spezies abgedeckt. Die Genome von 18 Isolaten wurden sequenziert. Dies und weitere Charakterisierungen dienten zusätzlich zu der 16S rDNA-Analyse zur Einordnung der Neuisolate, deren Beschreibung und zur Eignungsanalyse der Bakterien für Biolaugungsexperimente.

3.2.2.1. Genomsequenzierung

Zur Identifizierung der *hcn*-Gencluster und zur näheren Charakterisierung der Eigenisolate wurde die gDNA von 18 Cyanid-produzierenden bzw. cyanidresistenten (NSS K18) Neuisolaten aus dieser und aus vorangegangenen Arbeiten

isoliert, mit Barcodes markiert und in drei Läufen mittels Nanopore Technologie sequenziert (Tabelle 22 und Kapitel 10, Tabelle S 1).

Hierbei wird eine Flow-Cell verwendet, welche Nanoporen enthält. Die DNA wird durch die Nanopore gezogen und bewirkt eine Veränderung des angelegten Stroms. Die Veränderung ist je nach Base spezifisch. Bis zu 400 Basen in der Sekunde werden in Echtzeit sequenziert (Absatz nach <https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing>, Aufruf Dezember 2023). Anders als bei der Illumina Sequenzierung werden hierbei lange Reads mit teils über 4 Mb erzeugt (<https://nanoporetech.com/products/sequence/promethion>, Aufruf Dezember 2023). Daher eignet sich diese Methode für die *de novo* Genomassemblierung (Lu *et al.*, 2016).

Für die Sequenzierungen wurde ein möglichst breites Spektrum an Bakterien-spezies ausgewählt. Von 13 der 18 Neuisolaten konnten vollständige Genome assembliert werden, während die Sequenzen von *Ps. donghuensis* G2#25 und *Alh. lindianensis* W2_1Cu K2 zu jeweils 5 Contigs

Tabelle 22 Sequenzierung der gDNA von 18 Cyanid-produzierenden Neuisolaten.

Cyanid-produzierendes Neuisolat	Übersicht Contigs [n]	Zirkulär	Größe [bp]	Coverage ¹	Menge der sequenzierten Basen [Mb]
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	17	n.a.	n.a.	n.a.	25
<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD10 F21	1	ja	3 606 556	133	560
<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	5: 1	nein	3 434 807	115	480
	7	nein	253 214	132	
	2	ja	61 719	239	
	6	ja	52 563	202	
	5	ja	3 728	638	
<i>Chryseobacterium</i> sp. GYT6	1	ja	5 058 974	14	80
<i>Evansella</i> sp. AFL_1Cu F6	1	ja	4 531 902	286	1 200
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	1	ja	2 921 723	44	130
<i>Je. campisalis</i> NSS K18	1	ja	4 056 718	65	230
<i>Mo. roseus</i> AFL_1Cu F5	1	ja	4 761 448	30	140
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	1	ja	4 846 468	21	113
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12	21	n.a.	n.a.	n.a.	17
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	1	ja	4 041 416	63	250
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	5: 1	nein	5 788 463	14	100
	2	nein	21 734	15	
	3	nein	18 817	14	
	4	nein	13 359	13	
	5	nein	4 468	12	
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	1	ja	5 569 229	35	200
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6	1	ja	4 343 526	136	570
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	90	n.a.	n.a.	n.a.	108
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22	1	ja	4 745 567	511	2 200
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	2: 1	ja	4 130 186	184	720
	2	ja	5 980	206	
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1	3: 2	ja	4 316 021	28	125
	3	ja	12 215	49	
	1	ja	5 963	25	

¹Durchschnittliche Anzahl an Reads, die den Bereich abdecken.

n.a.: Auf Grund der großen Anzahl an Contigs werden die Werte für die einzelnen Contigs nicht angegeben.

assembliert wurden, davon 3 Plasmide bei W2_1Cu K2.

Salipaludibacillus sp. AFL_Na11 F1 besaß ebenfalls ein Plasmid. Für die Neuisolate *Alishewanella* sp. 2OB3, *Mongoliicoccus* sp. AFL_1Cu F12 und *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17 lagen zwischen 17 und 90 Contigs pro Assembly vor.

Die 16S rDNA-Sequenz aus den sequenzierten Genomen wurde zur Identifizierung der nächstverwandten Bakterienspezies verwendet. Zudem wurden die Genomsequenzen gegen die *nucleotide collection* Datenbank von NCBI geblattet und die *average nucleotide identity* (ANI) Werte bestimmt (Tabelle 23). Frühere Publikationen zeigten, dass sich der ANI-Wert genauso wie der klassische DNA-DNA Hybridisierungswert zur Speziesdefinition eignete (Goris *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2014). Sie zeigten, dass ein ANI-Wert von 94 % dem klassischen 70 % Wert entspricht. Zwei Bakterienstämme der gleichen

Spezies besitzen einen ANI-Wert von über 92 %, der gleichen Gattung 83,6 % und der gleichen Familie 78,9 % (Zhang *et al.*, 2014).

Ps. donghuensis G2#25 besitzt einen ANI-Wert von 99,6 % zu *Ps. wadenswilerensis* CCOS 864 und 93,4 % zu *Ps. donghuensis* SVBP6, die gDNA des Neuisolats war nahezu identisch zu *Ps. wadenswilerensis*. Die Benennung *Ps. donghuensis* G2#25 erfolgte bevor die Sequenz von *Ps. wadenswilerensis* in die Datenbank aufgenommen worden war, weshalb das Isolat im Folgenden weiter als *Ps. donghuensis* G2#25 geführt wird. Auch *Ni. alkalilacustris* 20OB1 besaß einen ANI-Wert von 98,8 % zu *Ni. alkalilacustris* NCAIM B.02612. Die *Mongoliicoccus* Neuisolate besaßen untereinander die höchste Ähnlichkeit (94,6 bzw. 98,2 %), jedoch ist noch keine Genomsequenz dieser Gattung veröffentlicht. Die nächstverwandte Bakterienspezies aus der Genomdatenbank war *Litoribacter*

populi (ANI-Wert 79 %), sie gehören der gleichen Familie aber unterschiedlichen Gattungen an. *Evansella* sp. AFL_1Cu F6 zeigte keine Ähnlichkeit zu den Genomsequenzen in der Datenbank oder den anderen sequenzierten Genomen, wenn die gesamte Genomsequenz betrachtet wurde. Die ANI-Werte lagen unter 75 %. Es zeigte auch bei der 16S rDNA-Analyse nur eine Sequenzidentität von 96,6 % zu *Ev. clarkii* DSM 8720. *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17 und *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na11 F1 zeigten eine hohe Ähnlichkeit, die beiden Neuisolate gehören zur

gleichen Bakterienspezies (*Salipaludibacillus* sp.). Die 16S rDNA-Analyse ergab, dass *Chryseobacterium* sp. GYT6 am nächsten verwandt zu *Chryseobacterium lactis* ist (98,2 % Sequenzidentität). Das Isolat *Chryseobacterium* sp. GYT6 hatte als dritthöchste Übereinstimmung bei der 16S rDNA-Analyse *Chryseobacterium joostei* LMG18212 (Wirbeltierpathogen nach TRBA, 2020). Auch der BLAST des Genoms gegen die Datenbank ergab als nächstverwandte Spezies *Ch. indologenes* 42552-F01 (Risikostufe 2).

Tabelle 23 Genom-BLAST und Bestimmung der ANI-Werte der sequenzierten Genome.

Cyanid-produzierendes/resistentes Neuisolat	16S rDNA-Kopien [n]	Genom-BLAST ¹	ANI-Wert ²			
			Datenbank		Neuisolat	
			Bakterium	%	Bakterium	%
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	3	<i>Rheinheimera</i> sp. D18	<i>Alishewanella tabrizica</i> KCTC 23723	80,2	-	-
<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD10 F21	8	<i>Alkalihalobacillus pseudofirmus</i> OF4	<i>Alh. pseudofirmus</i> OF4	81,0	<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	80,4
<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	9	<i>Alh. pseudofirmus</i> OF4	<i>Alh. pseudofirmus</i> OF4	80,5	<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD10 F21	80,6
<i>Chryseobacterium</i> sp. GYT6	6	<i>Chryseobacterium indologenes</i> 42552-F01	<i>Ch. indologenes</i> AA5	87,6	-	-
<i>Evansella</i> sp. AFL_1Cu F6	10	<i>Evansella cellulolytica</i> DSM 2522	-	-	-	-
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	9	<i>Ex. mexicanum</i> A-EM	<i>Ex. mexicanum</i> A-EM	91,5	-	-
<i>Je. campisalis</i> NSS K18	9	<i>Jeotgalibacillus malaysiensis</i> D5	<i>Je. campisalis</i> SF-57	78,8	-	-
<i>M. roseus</i> AFL_1Cu F5	5	<i>Echinicola rosea</i> ASM528147v1	<i>Litoribacter populi</i> XAAS-A1	79,6	<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	94,6
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	5	<i>Ec. rosea</i> ASM528147v1	<i>Li. populi</i> XAAS-A1	79,4	<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12	98,2
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12	1	<i>Salinibacterium amurskyense</i> ASM279768v1	-	-	<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	98,2
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	5	<i>Nitriicola</i> sp. KXZD1103	<i>Ni. alkalilacustris</i> NCAIM B.02612	98,8	-	-
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	6	<i>Pseudomonas</i> sp. R32	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i> CCOS 864	99,4	<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	85,9
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	6	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> Neo	<i>Ps. alkylphenolica</i> Neo	87,8	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	86,0
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6	7	<i>Evansella cellulolytica</i> DSM 2522	<i>Sa. aurantiacus</i> S9	93,8	-	-
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	4	<i>Ev. cellulolytica</i> DSM 2522	<i>Sa. aurantiacus</i> S9	78,2	<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	99,0
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	8	<i>Ev. cellulolytica</i> DSM 2522	<i>Sa. aurantiacus</i> S9	78,2	<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	98,9
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22	7	<i>Ev. cellulolytica</i> DSM 2522	-	-	<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	80,0
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1	10	<i>Bacillus</i> sp. THAF10	<i>Su. horikoshii</i> 20a	84,1	-	-

¹Das Bakterium mit der längsten Sequenz-Übereinstimmung ist dargestellt.

²Wenn kein Wert angegeben ist (-), lag der ANI-Wert unter 75 %.

Aufgrund dieser Einstufungen wurden keine weitergehenden Experimente mit *Chryseobacterium* sp. GYT6 durchgeführt.

Die Genome von 15 der 18 ausgewählten Cyanid-produzierenden/resistenten Neuisolaten wurden nahezu vollständig assembliert. Außerdem wurden zwei vollständige Genomsequenzen der Gattung *Mongoliicoccus* sequenziert, von der es bislang keine veröffentlichte Genomsequenz gibt.

In beiden Pseudomonaden wurden putative *hcn*-Operons identifiziert, in *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC* und *hcnCAB*, in *Ps. hutmensis* nur ein Gencluster der Anordnung *hcnCAB*. Außerdem wurde in zwei weiteren Eigenisolaten Gencluster für die Cyanidsynthese identifiziert, jedoch ohne *hcnA* Homolog. In den anderen 14 Neuisolaten wurden keine Cyanidsynthesegencluster identifiziert (genauere Beschreibung siehe Kapitel 6).

3.2.2.2. Terminale cyanidinsensitive Oxidasen

Eine Resistenz gegen Cyanid kann durch die cyanidinsensitiven terminalen Oxidasen *cioA* und *cioB* erreicht werden (Cunningham *et al.*, 1997). Durch einen Vergleich der *Ps. aeruginosa* CioA und CioB Aminosäuresequenzen mit den sequenzierten Genomen mittels TBLASTN wurden in *Ps. donghuensis* G2#25 zwei *cioAB* Genbereiche identifiziert. Die Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gencluster zu *Ps. aeruginosa* lagen zwischen 61 und 88 %

(Tabelle 24). Auch bei *Ps. hutmensis* MG#27 lagen die Sequenzidentitäten jeweils über 80 %, beide Eigenisolate besitzen vermutlich terminale cyanidinsensitive Oxidasen. In den Eigenisolaten *Ni. alkalilacustris* 20OB1, *Alishewanella* sp. 2OB3 und *Chryseobacterium* sp. GYT6 lag die Identität immer ≤ 60 %. Bei diesen Isolaten ist fraglich, ob es sich um cyanidinsensitive terminale Oxidasen oder andere Typen handelt. In den anderen Neuisolaten wurden keine Ähnlichkeiten mit CioA oder CioB festgestellt.

3.2.2.3. Charakterisierung und phänotypische Beschreibung der sequenzierten Neuisolate

Die Neuisolate zeigten in LB-Medium mit 0,1 M NaCO₃ (G2#25 und MG#27 ohne) eine höhere Zelldichte als in den ursprünglichen Isolationsmedien (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das LB-basierte Medium für alle weiteren Versuche verwendet. Von den verbleibenden 17 Neuisolaten hatten die meisten Kolonien eine gelb/orange Färbung und bildeten runde Kolonien (Tabelle 25). Alle Neuisolate außer *Mongoliicoccus* spp. waren Stäbchen, die teils Ketten bildeten. Die beschriebenen Eigenschaften stimmen mit den Erstbeschreibungen für die nächstverwandten Bakterienspezies überein. Nur das Neuisolat *Su. horikoshii* W2_AgNO₃ K1 zeigte eine Hitzetoleranz, mikroskopisch waren Sporen sichtbar (Tabelle 26).

Tabelle 24 Vergleich der cyanidinsensitiven terminalen Oxidasen CioA und CioB von *Ps. aeruginosa* und den Cyanid-produzierenden Eigenisolaten.

Cyanid-produzierendes Neuisolat	Untereinheiten Terminale Oxidase ¹	Aminosäuresequenzidentität [%]
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	CioA1	83
	CioB1	85
	CioA2	70-88 ²
	CioB2	61
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	CioA	83
	CioB	85
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	CioA	58
	CioB	44
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	CioA	60-50-56-31 ²
	CioB	60-41-54 ²
<i>Chryseobacterium</i> sp. GYT6	CioA	37-33 ²
	CioB	33

¹Das Ergebnis des TBLASTNs und die Sequenzen von G2#25 und MG#27 CioAB sind im elektronischen Anhang angegeben (Kapitel 11).

²Es liegen Leserastershifts in der Sequenz vor, daher sind mehrere Aminosäuresequenzidentitäten angegeben.

Tabelle 25 Makroskopische und mikroskopische Beschreibung der Cyanid-produzierenden Neuisolate. Durchführung: Sven Schladerbeck.

Cyanid-produzierendes Neuisolat	Kolonie-Farbe	Kolonie-Form	Mikroskopische Untersuchung	Beweglichkeit
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	Farblos	Unregelmäßig, schleimig	Stäbchen	ja
<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD10 F21	Hellgelb	Rund	Stäbchen	ja
<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	Hellgelb	Rund	Stäbchen	ja
<i>Evansella</i> sp. AFL_1Cu F6	Orange	Rund	Stäbchen, Kettenbildung	nein
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	Gelb	Rund	Stäbchen	ja
<i>Je. campisalis</i> NSS K18	Gelb	Rund	Stäbchen	ja
<i>Mo. roseus</i> AFL_1Cu F5	Rot	Rund	Kokken	nein
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	Rot	Rund	Kokken	nein
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12	Rot	Rund	Kokken	nein
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	Gelb	Rund	Stäbchen, Kettenbildung	ja
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	Beige	Rund	Stäbchen	ja
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	Beige	Unregelmäßig, schleimig	Stäbchen	ja
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6	Gelb	Rund	Stäbchen	nein
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	Gelb	Rund	Stäbchen	nein
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22	Orange	Rund	Stäbchen	nein
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	Orange	Rund	Stäbchen	nein
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1	Gelb	Unregelmäßig, schleimig	Stäbchen	ja

15 der 16 (*Mo. roseus* AFL_1Cu F5 wurde nicht getestet) getesteten Neuisolate zeigten im Hitzetoleranztest bereits nach 5 min kein Wachstum und auch mikroskopisch waren keine Sporen nach 120 h Inkubationszeit erkennbar. Jedoch ist für die meisten Neuisolate der Familie Bacillaceae in der Literatur Sporenbildung beschrieben (Dong *et al.*, 2020, Nielsen *et al.*, 1995, Sultanpuram *et al.*, 2016).

Tabelle 26 Hitzetoleranztest von *Su. horikoshii* W2_AgNO₃ K1. Durchführung: Sven Schladerbeck.

Inkubation 80 °C [min]	W2_AgNO ₃ K1 [Anzahl an Kolonien]	<i>Bacillus subtilis</i> DSM347 ¹
5	8	Dicht bewachsen
15	2	Dicht bewachsen
30	0	Dicht bewachsen
45	0	Dicht bewachsen

¹*Ba. subtilis* DSM347 diente aufgrund bekannter Endosporenbildung als Positivkontrolle.

Ps. donghuensis G2#25 und *Ps. hutmensis* MG#27 waren Oxidase positiv und wuchsen aerob und nicht fermentativ. Auch alle anderen Neuisolate

wuchsen aerob und nicht fermentativ (OF-Test). Jedoch wurde hierfür LB 0,1 M NaCO₃ pH 10 Medium verwendet. Da keine Positivkontrolle für das Medium vorhanden war, ist nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse aufgrund des verwendeten Mediums zustande kamen.

Die Isolate *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na10 F22, *Ex. mexicanum* 1K3, *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17, *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na11 F1 und *Sa. aurantiacus* AFL_Na11 F6 zeigten fakultativ anaerobes Wachstum in Thioglykolat Medium. Das anaerobe Wachstum wurde in anaerobisiertem LB-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 10 bestätigt.

Alle Neuisolate waren Katalase-positiv. Die Gram-Färbung stimmte mit der Literatur, der aus den 16S rDNA-Daten abgeleiteten nächstverwandten Bakterienspezies, überein (Tabelle 27). Alle Neuisolate, außer die beiden Pseudomonaden, zeigten Wachstum bei 0,1 M NaCO₃ bis 1 M NaCO₃, sie waren tolerant gegenüber NaCO₃. Die Neuisolate *Alh. lindianensis* AFL_GHD F21, *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na11 F1 und *Sa. aurantiacus* AFL_Na11 F6 waren resistent gegen NaCO₃, die optimalen NaCO₃-Konzentrationen lagen zwischen 0,05 und 0,1 M.

Tabelle 27 Charakterisierung der Neuisolate und deren Wachstum in Abhängigkeit des pH-Wertes und der NaCO₃-Konzentration.

Cyanid-produzierendes Neuisolat	Gram-Färbung ¹	NaCO ₃ -Toleranz ^{1,2}		Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert ¹	
		Bereich [M]	Optimum [M]	pH-Bereich	pH-Optimum
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3	-	n.b.		9-10	9
<i>Alh. lindianensis</i> AFL_GHD10 F21	+	0-0,5	0-0,05 ³	9-11	9-10
<i>Alh. lindianensis</i> W2_1Cu K2	+	n.b.		9-11	9-10
<i>Evansella</i> sp. AFL_1Cu F6	+	n.b.		9-11	9-10
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	+	n.b.		9-10	9
<i>Je. campisalis</i> NSS K18	+	n.b.		9-10	9
<i>Mo. roseus</i> AFL_1CuF5	-	n.b.		n.b.	
<i>Mongoliococcus</i> sp. AFL_1Cu F2	-	n.b.		n.b.	
<i>Mongoliococcus</i> sp. AFL_1Cu F12	-	0,1-1	n.b.	9-10	10 ³
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1	-	0-1	0	9-11 8-10	10 9 ³
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	-	n.b.		7,9-9,6	7,9 ⁵
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	-	n.b.		n.B.	
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6	+	0,05-1	0,05-0,1	9-10	10
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17	+	0,1-1	n.b.	9-11	9-10
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22	+	n.b.		9-11	9
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1	+	0,05-0,5	0,1 ⁴	9-11	10
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1	+	n.b.		9-11	n.b.

n.B.: nicht bestimmt.

¹Durchführung: Sven Schladerbeck.

²Zunächst wurden die Bakterien auf 0,5x HD-Medium pH 10 mit 0,1 M-1 M NaCO₃ ausplattiert (Durchführung: Renate Fröhlich). Die Bestimmung des Optimums wurde durch eine Wachstumskurve mit einem *micro plate reader* durchgeführt (2.2.1.3 Wachstumskurven, Sven Schladerbeck).

³Das pH-Optimum wurde mit dem PreSens System bestimmt (2.2.1.3 Wachstumskurven, selbst durchgeführt).

⁴Die Toleranz gegenüber NaCO₃ wurde nur bis 0,5 M NaCO₃ bestimmt.

⁵Die Bestimmung erfolgte durch klassische Wachstumskurven in HD-Medium (selbst durchgeführt).

Alle neu isolierten Bakterien waren alkalitolerant, die drei Neuisolate *Mongoliococcus* sp. AFL_1Cu F12, *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na11 F1 und *Sa. aurantiacus* AFL_Na11 F6 waren mit einem pH-Optimum von 10 alkaliphil. Wachstum bei neutralen pH-Werten wurde nicht untersucht (Minimum pH 9).

Für alle Neuisolate, außer *Ps. hutmensis* MG#27 und *Ev. clarkii* AFL_1Cu F6, wurden Wachstumskurven aufgenommen (Abbildung 14). Diese dienten zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit und somit zur Überprüfung der Eignung der Isolate für den industriellen Einsatz in der Biolaugung. *Ps. donghuensis* G2#25 und *Alishewanella* sp. 2OB3 zeigten in den ersten 12 h die höchste Zelldichte im Vergleich zu den anderen Isolaten. *Je. campisalis* NSS K18 und

Alh. lindianensis AFL_GHD F21 zeigten erst nach 24 h Wachstum, die lag-Phase war am längsten. Keines der Cyanid-produzierenden/resistenten Neuisolate erreichte in den stündlichen Messungen (11 bzw. 12 h) die stationäre Wachstumsphase. Außerdem zeigten vier Neuisolate nur in den ersten fünf Stunden exponentielles Wachstum, das Wachstum war biphasisch.

Alishewanella sp. 2OB3, *Ni. alkalilacustris* 20OB1, *Ps. donghuensis* G2#25 und *Su. horikoshii* W2_AgNO₃ K1 zeigten die geringsten Verdopplungszeiten und die höchsten Zelldichten, sie eignen sich somit für eine industrielle Anwendung. Auf Grund des langsamen Wachstums nach über 12 h sind *Alh. lindianensis* AFL_GHD F21 und *Je. campisalis* NSS K18 nicht für eine industrielle Anwendung geeignet.

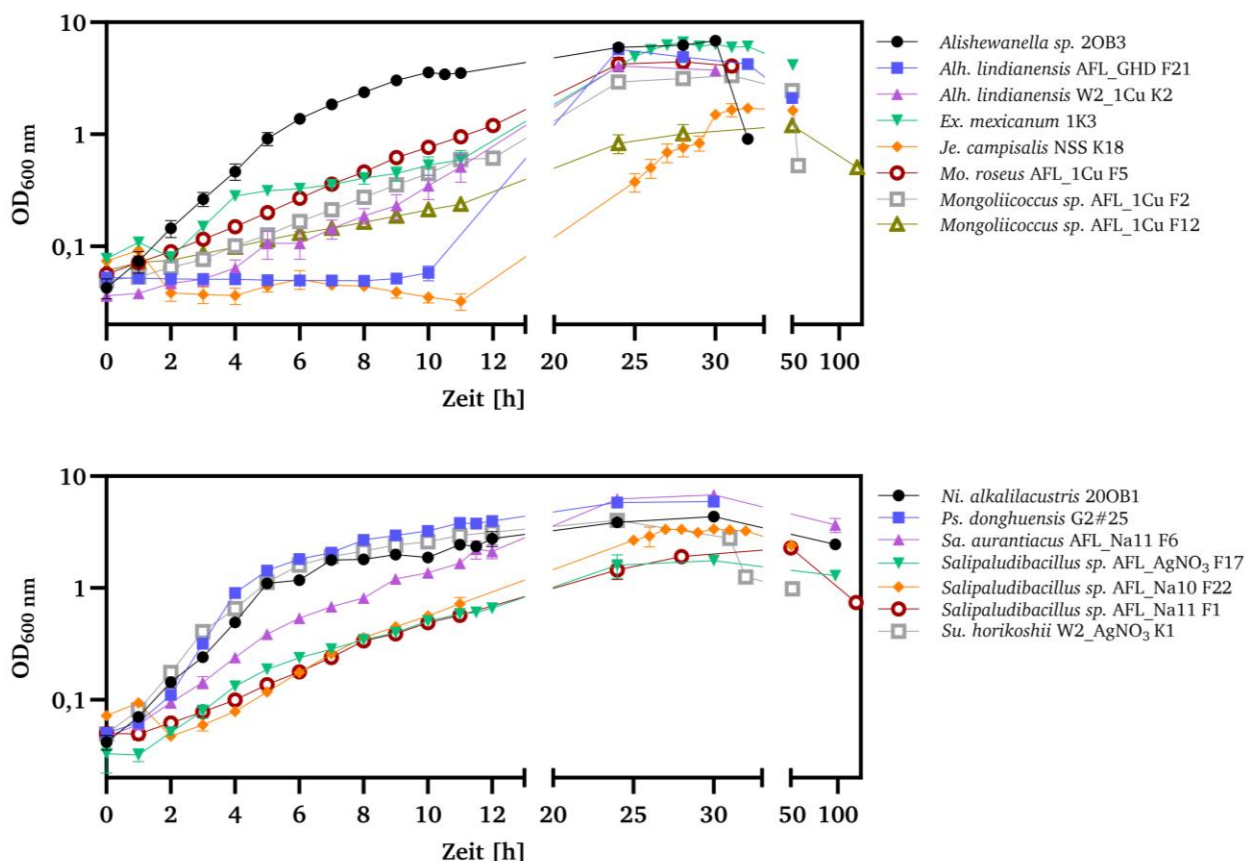


Abbildung 14 Wachstumskurven der neuisolierten Bakterien. Für die Wachstumskurven wurde LB-Medium mit 0,1 M NaCO_3 pH 10 verwendet. Für *Ps. donghuensis* G2#25 wurde LB pH 7,2 verwendet. Die Inkubation erfolgte jeweils bei 30 °C. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

3.2.2.4. Schwermetallresistenz der Cyanidproduzierenden Mikroorganismen

Für Biolaugungsversuche werden beispielsweise Verbrennungsaschen, Stäube, gemahlene Elektro-/Elektronikschrotte und andere Zivilisationsabfälle mit teils hohen Schwermetallkonzentrationen verwendet (hier verwendete Substrate bis zu 40 000 ppm Pb, 340 000 ppm Cu, 800 ppm Co, 3 400 ppm Ag, Kapitel 2.1.8.). Daher war eine Schwermetallresistenz bei der Isolation neuer Cyanidproduzenten gewünscht. Einige der Neuisolate wurden daher auf Medien mit Cu^{2+} oder Ag^+ isoliert. Die schwermetallresistenten und sequenzierten Isolate *Alh. lindianensis* AFL_GHD10 F21, *Mo. roseus* AFL_1Cu F5, *Mongoliococcus* sp. AFL_1Cu F12, *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17 und *Su. horikoshii* W2_AgNO₃ K1 wurden auf ihre Resistenz gegen das entsprechende Schwermetall hin untersucht. Aufgrund der hohen Cyanidproduktion wurde auch

Ps. donghuensis G2#25 auf Resistenz gegen Cu^{2+} oder Ag^+ untersucht.

Zunächst wurde in Vorversuchen die maximale Metallkonzentration, bei der Wachstum möglich war, bestimmt (Daten nicht gezeigt). Der auf Cu^{2+} -haltigem Medium isolierte Stamm W2_1Cu K2 zeigte ohne Kupferchlorid nach 24 h eine $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von 2,3, mit 1 mM Cu^{2+} nur eine $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von 0,5. Höhere Cu^{2+} -Konzentrationen führten zu geringerem Wachstum und auch nach späteren Zeitpunkten wurde keine Erhöhung der $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ beobachtet. Aufgrund des schlechteren Wachstums mit Kupferchlorid wurden keine Wachstumskurven für *Alh. lindianensis* W2_1Cu K2 aufgenommen. Das Isolat war tolerant, nicht aber resistent gegen Kupfer.

Ps. donghuensis G2#25 tolerierte bis zu 5 mM CuCl_2 (Abbildung 15, Tabelle 28), die Verdopplungszeit wurde bis zu einer Konzentration von 2,5 mM kaum beeinflusst. Das Neuisolat *Mongoliococcus* sp. AFL_1Cu F2 zeigte eine höhere Kupfertoleranz bis zu 10 mM Cu^{2+} . Es war kein Wachstums-Unterschied zwischen 0 und 2,5 mM

Cu²⁺ zu erkennen. 5 mM Cu²⁺ führte dazu, dass erst nach 7 h ein Anstieg der OD_{600 nm} messbar war. *Mo. roseus* AFL_1Cu F5 zeigte eine geringere Resistenz. Es zeigte schon bei 2,5 mM Cu²⁺ eine Erhöhung der Verdopplungszeit von 1,6 h auf 10,2 h. *Mongoliicoccus* sp. AFL_1Cu F12 tolerierte bis zu 10 mM Cu²⁺ und zeigte die geringste Verdopplungszeit bei 2,5 mM Cu²⁺ von 9,9 h. Ab 5 mM Cu²⁺ war ein verlangsamtes Wachstum zu beobachten.

In dem Genom von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden die für die Kupferresistenz codierenden Gene *copA* und *copB* identifiziert (Brown *et al.*, 1992). Nicht gefunden wurden die durch Kupfer induzierten Gene *copC* und *copD*, die in *Pseudomonas syringae* und in weiteren Pseudomonaden identifiziert worden waren (Brown *et al.*, 1992). Für die Familie der Cyclobacteriaceae, zu der die *Mongoliicoccus* Neuisolate gehören, sind bisher keine Kupferresistenzgene beschrieben worden.

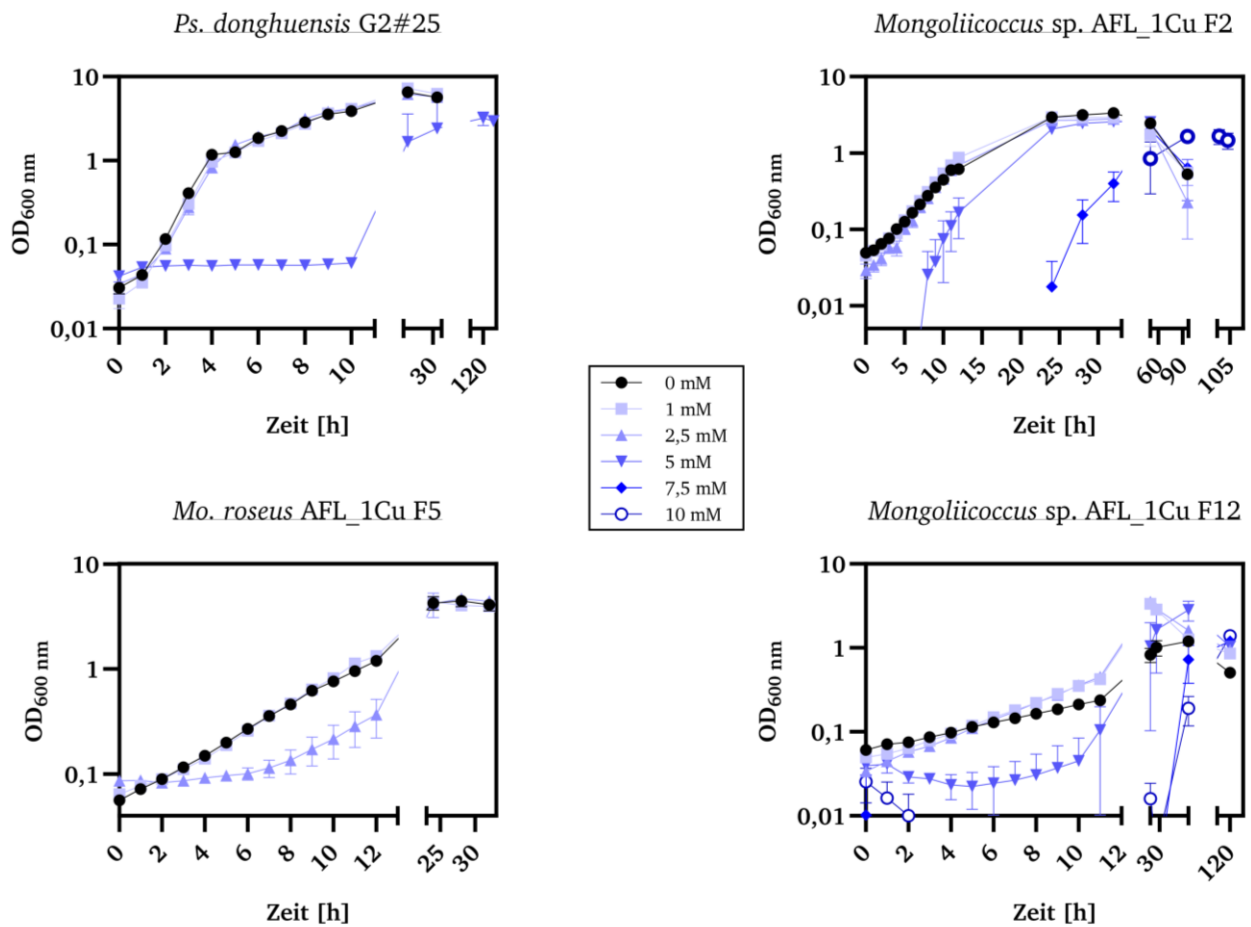


Abbildung 15 Halblogarithmische Auftragung der Wachstumskurven in Abhängigkeit der Cu²⁺-Konzentrationen. Die Vorkulturen enthielten kein Kupferchlorid. Für *Ps. donghuensis* G2#25 wurde LB-Medium pH 7,2 verwendet. Für die anderen Wachstumskurven wurde LB-Medium pH 10 mit 0,1 M NaCO₃ verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Tabelle 28 Verdopplungszeiten der Cyanid-produzierenden Neuisolate in Abhängigkeit der Cu²⁺-Konzentrationen.

Kupferchlorid [mM]	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2	<i>Mo. roseus</i> AFL_1Cu F5	<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12
0	2,1 h ¹	9,8 h	8,8 h	18,5 h
1	1,9 h ¹	8,8 h	8,6 h	11,3 h
2,5	2,5 h ²	7,9 h	10,2 h ³	9,9 h
5	ab 24 h Wachstum	ab 7 h Wachstum	-	ab 10 h Wachstum
7,5	-	ab 25 h Wachstum	-	ab 48 h Wachstum
10	-	ab 50 h Wachstum	-	ab 48 h Wachstum

¹Nur bis Stunde vier exponentielles Wachstum. ²Nur bis Stunde fünf exponentielles Wachstum. ³Erst ab 7 h Wachstum.

Die in der Literatur beschriebenen Kupferresistenz vermittelnden Gene *copA-D*, *pco* und *cueO/S* (Bondarczuk *et al.*, 2013, Brown *et al.*, 1992) wurden nicht in den Genomen identifiziert.

Die silberresistenten Neuisolate wurden auf 0,05 mM Ag^+ haltigen Agarmedien isoliert. Ag^+ ist toxischer als Cu^{2+} , niedrigere Konzentrationen führten zur Hemmung des Wachstums. Die Neuisolate waren sensitiver gegenüber Ag^+ als Cu^{2+} . Daher wurden zur primären Bestimmung der Silberresistenz geringere Konzentrationen eingesetzt (0,025 mM, 0,05 mM, 0,5 mM, 1 mM, 3 mM Ag^+ , Daten nicht gezeigt). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die Wachstumskurven nur mit maximal 0,05 mM Ag^+ aufgenommen, da höhere Konzentrationen zu keinem Wachstum in Vorversuchen führten. Bei *Ps. donghuensis* G2#25 war kein Unterschied im Wachstum zwischen 0-0,05 mM Ag^+ sichtbar (Abb. 16). Die Zugabe von 0,025 mM Ag^+ führte bei *Salipaludibacillus* sp. AFL_AgNO₃ F17 zu

einem verzögerten Wachstum, jedoch zu einer höheren Zelldichte von 1,6 als ohne Ag^+ (1,2). Das zweite silberresistente Neuisolat *Su. horikoshii* W2_AgNO₃ K1 zeigte bei Zugabe von Ag^+ ein verlangsamtes Wachstum, erst nach 24 h war ein Anstieg der OD_{600 nm} messbar.

3.2.2.5. Biolaugungsexperimente

Die Fähigkeit der neuisolierten Cyanidproduzenten, Metalle aus Substraten zu solubilisieren, wurde untersucht. Zunächst wurden Biolaugungsexperimente mit *Ni. alkalilacustris* 200B1 in 0,5x HD-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 8 (+ 115 mM Glycin) durchgeführt. 200B1 zeigte für eine Asche aus der Verbrennung von Elektroschrott (406 ppm Au, 2 139 ppm Ag) und für einen Filterstaub (20 ppm Au, 240 ppm Ag) keine Solubilisierung von Gold, Silber, Platin oder Palladium (Daten nicht gezeigt).

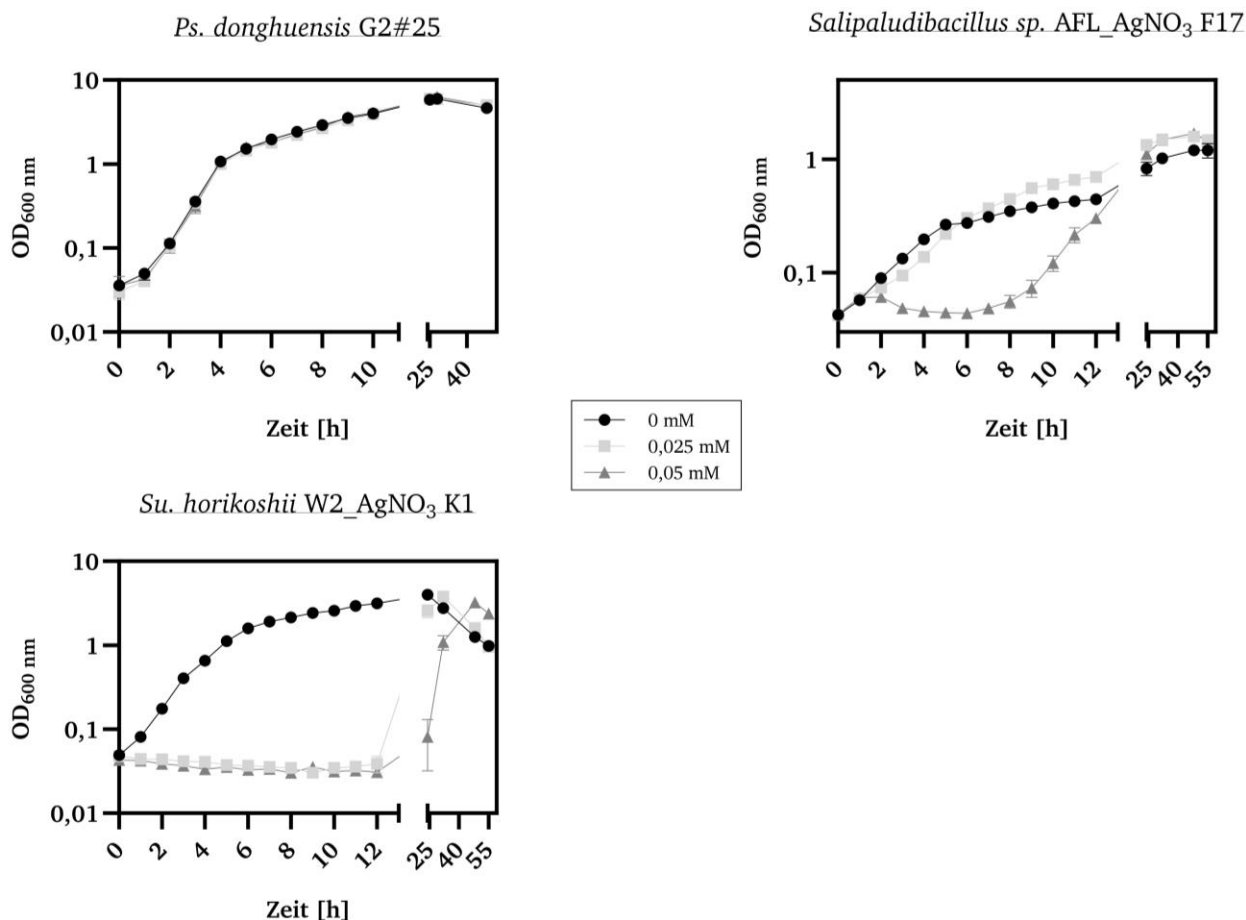


Abbildung 16 Wachstumskurven von ausgewählten Cyanid-produzierenden Neuisolaten in Abhängigkeit von Ag^+ . Nur die Hauptkulturen enthielten Ag^+ , Vorkulturen wurden ohne Ag^+ inkubiert. Als Medium wurde LB mit 0,1 M NaCO₃ pH10/LB pH 7,2 verwendet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Auch bei einem Ansatz in LB-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 9 mit dieser Asche zeigte sich keine Solubilisierung von Gold, Silber, Platin oder Palladium. *Mongoliicoccus* sp. AFL_1Cu F12 in 0,5x HD-Medium mit 0,1 M NaCO₃ pH 10 + 115 mM Glycin zeigte ebenfalls keine Solubilisierung von Edelmetallen mit einem Elektroschrott Staub (515 ppm Au, 1181 ppm Ag), der Asche aus der Verbrennung von Elektroschrott und mit dem Filterstaub (Kapitel 2.1.8).

Die Filterstaub Probe wurde für ein Biolaugungs-experiment mit allen Genom-sequenzierten Neuisolaten im 24 Well Format eingesetzt. Es wurde 1 % (w/v) Feststoff (0,5 µg Au) eingesetzt und das entsprechende LB-Medium mit 115 mM Glycin verwendet. Nur *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte Goldlaugung nach 48 und 120 h (2,3 %) und eine Laugungseffizienz für Palladium von 5,2 % nach 120 h. Die anderen Neuisolate zeigten keine Solubilisierung von Edelmetallen.

3.3. Diskussion

Bakterielle Cyanidproduzenten können für Biolaugungsverfahren verwendet werden (Faramarzi *et al.*, 2004, Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2014). Sie finden auch eine Anwendung bei dem Pflanzenschutz (Überblick in Zdor, 2015). Die meisten bisherigen Studien, die eine Neuisolierung von Cyanid-produzierenden Bakterien zum Inhalt hatten, zielten auf eine pflanzenwuchsfördernde Wirkung ab (Kalam *et al.*, 2020, Mahdi *et al.*, 2020). In vorherigen Abschlussarbeiten in der AG Kletzin und in dieser Arbeit wird erstmals eine Methode beschrieben, mit Selektivmedien gezielt Cyanid-produzierende Bakterien bei pH 7-11 zu isolieren (Amberger, 2016b, Fester, 2016, Popova, 2017, Sluka, 2018). Für die Isolierung werden Cyanid-haltige Agarmedien verwendet, um cyanidresistente Bakterien zu isolieren. Primäre Kolonien werden auf Cyanidproduktion getestet, bei positivem Ergebnis werden Reinigungsausstriche durchgeführt, bis Reinkulturen erhalten werden. Diese werden erneut auf Cyanidproduktion getestet.

In dieser Arbeit wurden 407 primäre cyanidresistente Kolonien getestet, 54 % der primären Einzelkolonien zeigten Cyanidproduktion. Der Fokus auf alkaliphile Bakterien wurde aufgrund des pK_s-Werts von Cyanid (ca. 9,3) gesetzt. Aus Sodaseen und Bodenproben wurden in dieser Arbeit 55 Cyanidproduzenten isoliert, 45 davon gehörten zum Phylum Firmicutes. Sodaseen eignen sich aufgrund ihres hohen pH-Werts zur Isolierung von haloalkaliphilen Mikroorganismen (Sorokin *et al.*, 2011b). Bisherige diesbezügliche Studien auf diesem Gebiet zielten auf die Isolierung von schwefeloxidierenden Bakterien ab (Sorokin *et al.*, 2011a, Sorokin *et al.*, 2012). Zudem wurde eine Reihe von alkali-toleranten/alkaliphilen Bakterien bereits aus Sodaseen bzw. anderen alkalinen Seen isoliert (Borsodi *et al.*, 2008, Dong *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2012, Subhash *et al.*, 2013, Sultanpuram *et al.*, 2016).

Da in Biolaugungssubstraten, wie z.B. Müllverbrennungssaschen, oft eine hohe Salzkonzentration vorliegt (Mitteilung BRAIN Biotech AG), war ein Ziel dieser Arbeit haloalkaliphile Bakterien zu isolieren. Die Sodaseen eignen sich aufgrund der vorherrschenden Bedingungen mit einer Salinität

von bis zu 27 g/l und einem pH-Wert von bis zu 10,3 zur Isolierung von haloalkaliphilen Bakterien (Boros *et al.*, 2017). Die Fokussierung auf Medien mit pH-Werten von 10-11 hatte den Vorteil, dass zudem ausschließlich Bakterien der Risikostufe 1 wuchsen. Bei niedrigeren pH-Werten bzw. ohne Zugabe von Natriumcarbonat war auch eine Reihe von potentiell pathogenen Bakterien isoliert worden (Amberger, 2016b, Fester, 2016, Popova, 2017). Bei pH 12 wurden keine Cyanidproduzenten aus den Umweltproben isoliert, von 39 primären Kolonien zeigten keine Kolonien Cyanidproduktion als Reinkulturen. Möglicherweise müssen alkalischere Habitats ausgewählt werden. Hierfür würde sich zum Beispiel der Tecuitlapa Norte See in Mexiko eignen, der in der Trockenzeit einen pH-Wert von bis zu 11,6 erreicht (Alcocer *et al.*, 1999). Auch während der Regenzeit weist er einen pH von >10 auf (Alcocer *et al.*, 1999). Aufgrund der Entfernung wurde dieser See nicht für die Isolierung verwendet.

Die bekanntesten Cyanidproduzenten sind *Ps. aeruginosa*, die *Ps. fluorescens/protegens* Gruppe und *Ch. violaceum*. In dieser Arbeit wurden keine Bakterien mit naher Verwandtschaft zu Pseudomonaden neuisoliert, die hier verwendeten *Ps. donghuensis* und *Ps. hutmensis* Isolate wurden bei pH 9 aus der Rhizosphäre von Waldböden in Darmstadt isoliert (Amberger, 2016b). *Ps. donghuensis* G2#25 bevorzugt den pH-Wert von 7,9 für optimales Wachstum (Tabelle 27) und zeigte kein Wachstum in Anwesenheit von Bicarbonat (Daten nicht gezeigt). *Ps. fluorescens* zeigt Wachstum bis pH 8 (Moore *et al.*, 2006) und *Ps. aeruginosa* bis 9,5 (Klein *et al.*, 2009), daher wurden in dieser Arbeit bei pH-Werten von 10 und höher keine Pseudomonaden isoliert.

In weiteren Veröffentlichungen wurden auch einige Cyanidproduzenten der Gattung *Bacillus* beschrieben (Kalam *et al.*, 2020, Mahdi *et al.*, 2020), wie auch das für Biolaugungsexperimente eingesetzte Bakterium *Priestia (Bacillus) megaterium* (Faraji *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020). Auch *Ba. licheniformis* zeigt Cyanidproduktion und eine hohe Salztoleranz bis 15 % NaCl (Bhutani *et al.*, 2022).

Die bakterielle Cyanidproduktion wird durch viele Faktoren beeinflusst (Aminian-Dehkordi *et*

al., 2020, Faraji *et al.*, 2020). Ein positiver Einfluss der Erhöhung des pH-Werts wurde für *Pr. megaterium* gezeigt (Faraji *et al.*, 2020). *Pr. megaterium* produziert bei angepassten Bedingungen über 60 mg/l Cyanid (Gorji *et al.*, 2020), die hier isolierten Firmicutes produzierten in den Isolierungsmedien mit Glycin und Methionin bis maximal 18 mg/l Cyanid (Tabelle 21). Eine Optimierung der Medien könnte daher auch bei den hier isolierten Cyanidproduzenten zu einer Steigerung führen. Zunächst müssten hier jedoch weitere Cyanidtests mit anderen Cyanidnachweismethoden durchgeführt werden, um die Cyanidproduktion zu bestätigen (vgl. Kapitel 6.2.4.). Pseudomonaden eignen sich für die pH-Wert Optimierung nur bedingt, da sie kein Wachstum in stark alkalischen Medien gezeigt haben (Klein *et al.*, 2009, Moore *et al.*, 2006). Eine Vielzahl von Medienzusätzen, insbesondere Aminosäuren, beeinflussen die Cyanidproduktion (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Darin ist auch der Effekt von verschiedenen Medien auf die Cyanidproduktion begründet. Der Einfluss der Glycin-Konzentration wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet und bietet ebenfalls Potential zur Erhöhung der Cyanidproduktion.

3.3.1. Genomsequenzierung Cyanid-produzierende Neuisolate

Für die Genomsequenzierungen wurde in dieser Arbeit die Oxford Nanopore Methode verwendet, da diese sich durch lange DNA-Sequenzen für die *de novo* Assemblierung von Genomen eignet (Lu *et al.*, 2016). Die Genauigkeit der Sequenzen ist jedoch geringer als bei der Illumina Technologie (Lu *et al.*, 2016, <https://nanoporetech.com/> [Aufruf: Dezember 2022]). Bei der Illumina Technologie werden nur kurze DNA-Sequenzen erhalten, diese sind aufgrund hoher Redundanz sehr genau (Schatz *et al.*, 2010, <https://www.illumina.com/> [Aufruf: Dezember 2022]). Zur Vermeidung von Leserastershifts bei den sequenzierten Genomen müsste zusätzlich eine Sequenzierung mit der Illumina Technologie durchgeführt werden und beide Sequenzierungen gemeinsam assembliert werden. Aus Kostengründen wurde nur eine Genomsequenzierung mit der Nanopore Technologie durchgeführt. Zur *de novo* Assemblierung von Genomen sollte die Read Coverage über 50 liegen (Lu *et al.*, 2016).

Sieben der 13 erhaltenen geschlossenen Genome weisen eine Coverage von über 50 auf (Tabelle 22). Zur Absicherung und zur Vermeidung von Leserastershifts der anderen Sequenzen sind weitere Sequenzierungen nötig. Insbesondere bei den Isolaten *Mongoliicoccus sp.* AFL_1Cu F2 und AFL_1Cu F12 sind erneute Sequenzierungen nötig, da hier kein Referenzgenom von nahen verwandten Bakterien in der Datenbank vorlag, und somit nicht zur Assemblierung genutzt werden konnte. Das Heranziehen von Referenzgenomen eignet sich jedoch nur bedingt, da Genomabschnitte nicht zwingend gleich oder ähnlich angeordnet sind.

3.3.2. Spezies-Einteilung und Phylogenie der Neuisolate

In dieser Arbeit wurden 55 Cyanid-produzierende Stämme isoliert, hervorzuheben sind die Stämme der Gattung *Mongoliicoccus*, die bis zu 11 mg/l Cyanid produzierten. Zu den nächstverwandten alkaliphilen Arten *Mo. alkaliphilus* und *Mo. roseus* gibt es bislang nur die Erstbeschreibungsliteratur (Liu *et al.*, 2012, Subhash *et al.*, 2013), sodass wenig über die Bakterien bekannt ist. Genomsequenzen lagen bislang nicht vor, diese wurden in dieser Arbeit erstmals sequenziert.

Anhand 16S rDNA-Datenbankvergleichen wurden 20 der isolierten Bakterien als neue Spezies definiert, die Übereinstimmung der 16S rDNA-Sequenz lag bei unter 98,5 % (Tabelle 21). Frühere Publikationen unterschieden zwischen zwei Spezies, wenn die Sequenzidentität unter 97 % lag (Johnson *et al.*, 2019, Stackebrandt *et al.*, 1994). Nach dieser Definition gehören fünf der Neuisolate neuen Spezies an. In neueren Arbeiten wurde diese Grenze auf 98,65 % erhöht (Kim *et al.*, 2014), darin liegt der hier gewählte Grenzwert von 98,5 % begründet. Auch der ANI-Wert dient zur Klassifizierung von Bakterien. Wenn der ANI-Wert über 92 % liegt, gehören Bakterien der gleichen Spezies an (Zhang *et al.*, 2014). Sechs der in dieser Arbeit isolierten und genomsequenzierten Isolate besaßen eine 16S rDNA-Sequenzidentität von <98,5 % und einen ANI-Wert von unter 92 % zu den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Genomsequenzen. Der Vergleich des ANI-Wertes ist jedoch weniger aussagekräftig als der Vergleich

der 16S rDNA-Sequenzen, da die Anzahl an hinterlegten Genomen geringer ist als die der 16S rDNA-Sequenzen. Von einigen nahe verwandten Bakterien, z.B. *Alkalihalobacillus lindianensis*, war kein Genom in der Datenbank hinterlegt, darin liegt ein niedrigerer ANI-Wert begründet. Der Vergleich eignet sich nur, wenn Genomsequenzen von den nächstverwandten Bakterien in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind. Die *Alc. saliphilus* Isolate zeigten eine hohe Sequenzidentität von über 99,6 %, die Cyanidproduktion unterschied sich (zwischen 3,7 und über 10 mg/l). Auch bei der phylogenetischen Analyse zeigten sie nahe Verwandtschaft zu der jeweils in der Datenbank hinterlegten Spezies, es handelt sich hierbei um neue Stämme und um keine neuen Spezies. Bei anderen Isolaten mit einer nahen Verwandtschaft (Abb.13, z.B. *Alt. lacisalsi* SL1_Na11 K17 und AFL_Na11 F4) ist die Cyanidproduktion vergleichbar mit 9 bzw. 12,4 mg/l. Die Verwandtschaft der Bakterien lässt keinen Rückschluss auf die Cyanidproduktion zu. Aufgrund der 16S rDNA-Sequenzidentität von über 98,5 % zu *Alt. lacisalsi* YSP-3 handelt es sich bei diesen Isolaten nicht um neue Spezies. Bei der phylogenetischen Analyse ist eine Aufteilung der *Alt. lacisalsi* Isolate in zwei Gruppen erkennbar (Abb. 13). Auch bei den Isolaten mit naher Verwandtschaft zu *Sa. neizhouensis* ist eine klare Trennung der Neuisolate zu der Bakterienspezies in der Datenbank erkennbar, diese bilden eine neue Spezies. Aufgrund der Phylogenie sind die Neuisolate vermutlich Stämme einer neuen

Spezies (Tabelle 29). Zwei *Salipaludibacillus sp.* Isolate stellen auch eine neue Spezies dar, diese sind phylogenetisch nicht mit den anderen *Sa. aurantiacus* Isolaten verwandt. Die *Salipaludibacillus sp.* Isolate zeigten Unterschiede zu *Sa. agaradhaerens* DSM 871, die 16S rDNA-Sequenzidentitäten liegen unter 98,5 %. Da die Isolate phylogenetisch eine Gruppe bilden, handelt es sich hier um unterschiedliche Stämme einer neuen Spezies. Zwei *Sa. aurantiacus* Isolate besitzen eine 16S rDNA-Sequenzidentität von unter 98,5 %, diese Stellen aufgrund der Phylogenie eine neue Spezies dar.

Das in der 16S rDNA-Analyse als *Mo. alkaliphilus* eingestufte Isolat gehört phylogenetisch nicht zu dieser Spezies (Abb. 13). Drei *Mongoliococcus sp.* Neuisolate besitzen eine Sequenzidentität von unter 98,5 % zu den in der Datenbank hinterlegten Spezies. AFL_1Cu F2 und AFL_1Cu F12 sind unterschiedliche Stämme einer neuen Spezies. Unklar bleibt aufgrund der teils nicht aufgelösten 16S rDNA-Sequenz, ob AFL_1Cu F1 auch ein Stamm dieser neuen Spezies ist oder ob dieses Isolat eine zusätzliche neue Spezies bildet.

Zudem stellen *Alh. alcalophilus* SL1_GHD(2) K6 und *Halomonas sp.* IHS_GHD H2 neue Spezies dar. Beide *Ev. clarkii* Isolate sind Stämme einer neuen Spezies.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit mindestens acht neue Spezies mit meist mehreren neuen Stämmen isoliert.

Tabelle 29 Einteilung der Cyanid-produzierenden Neuisolate in neue Stämme und/oder Spezies.

Nächstverwandte Bakterienspezies 16S rDNA-Analyse	Neue Spezies	Stämme der neuen Spezies	16S rDNA-Sequenzidentität zu nächstverwandten Bakterienspezies [%]	Cyanidproduktion [mg/l]
<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i> ATCC 27647	<i>Alkalihalobacillus carbonati</i>	SL1_GHD(2) K6	95,8	5,5
<i>Evansella clarkii</i>	<i>Evansella fuchslochii</i>	AFL_1Cu F10 AFL_1Cu F6	96,6 96,6	0,9 1,5
<i>Halomonas malpeensis</i> YU PRIM-29	<i>Halomonas herrnseeii</i>	IHS_GHD H2	96,2	0,8
<i>Mongoliicoccus sp.</i>	<i>Mongoliicoccus kupferii</i>	AFL_1Cu F2 AFL_1Cu F12	98,2 97	6,1 6,6
<i>Mongoliicoccus roseus</i> MIM28	unklar	AFL_1Cu F1	97,2	5,3
<i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> DSM 8721	<i>Salipaludibacillus saltii</i>	SL1_Na11 K31 IHS_Na11 H1 AFL_MBN F20 IHS_MBN H1	97,6 97,7 97,7 97,8	2,5 >10 3,2 1
<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<i>Salipaludibacillus cyanidii</i>	AFL_AgNO ₃ F17 AFL_Na11 F1	97,9 97,4	5,5 2,2
<i>Salipaludibacillus aurantiacus</i> S9	<i>Salipaludibacillus apetlonii</i>	(AFL_Na10 F14) AFL_MBN F16	97,8 ¹ 97,7	10,9 6,5
<i>Salipaludibacillus neizhouensis</i> JSM071004	<i>Salipaludibacillus schusterii</i>	OS1 K39 NSS K10 SL2_HSal K19 SL2_HSal K24 AFL_Na10 F22	98,1 98,4 98,0 98,1 98,4	13,3 14,7 3,1 1,0 7,9

¹Die Länge der 16S rDNA-Sequenz von *Sa. aurantiacus* AFL_Na10 F14 betrug nur 629 bp. Daher ist es fraglich, ob dieses Isolat einen Stamm einer neuen Spezies darstellt.

3.3.3. Cyanidinsensitive terminale Oxidasen und Schwermetallresistenz

Aufgrund der Cyanidproduktion der Isolate und der Tatsache, dass sie in Gegenwart von Cyanid isoliert worden waren, müssen sie Resistenzmechanismen gegen Cyanid, wie zum Beispiel cyanidinsensitive terminale Oxidasen, besitzen. Cyanidinsensitive terminale Oxidasen mit einer Aminosäuresequenzidentität von über 30 % wurden bei fünf Neuisolaten bioinformatisch identifiziert, bei den anderen war die AS-Sequenzidentität geringer (Tabelle 24). Da terminale cyanidinsensitive Oxidasen bisher nur in Proteobakterien identifiziert wurden (Cunningham *et al.*, 1997, Jackson *et al.*, 2007, Matsushita *et al.*, 1983, Mogi *et al.*, 2009), welche keine nahe Verwandtschaft zu Firmicutes besitzen, ist es möglich, dass die Neuisolate nicht verwandte terminale cyanidinsensitive Oxidasen mit einer anderen AS-Sequenz besitzen. Einige Bakterien können Cyanid auch durch Cyanidasen abbauen und dadurch eine Cyanidresistenz besitzen (Ingvorsen *et al.*, 1991, Meyers *et al.*, 1993, Watanabe *et al.*, 1998). Dies ist für *Alcaligenes xylosoxidans*, *Bacillus pumilus* und *Pseudomonas*

stutzeri beschrieben. Bei dieser Reaktion entsteht aus Cyanid Ammoniak und Formiat (Ingvorsen *et al.*, 1991, Meyers *et al.*, 1993, Watanabe *et al.*, 1998). Es gibt eine Vielzahl weiterer mikrobieller Abbauewege, bei denen jeweils mehrere Enzyme an der Reaktion beteiligt sind (Mahendran *et al.*, 2020).

Aufgrund des Schwermetallgehalts von Bio-laugungssubstraten sollten die Isolate Resistenzen dagegen aufweisen. Alle drei auf silberhaltigen Medien isolierten Bakterien waren nicht resistent gegen Silber. Eine Silberresistenz liegt vor, wenn Wachstum bei ≥ 3 mM Silber vorliegt (Hosny *et al.*, 2019).

Von Kupfermünzen isolierte Bakterien zeigten eine minimale inhibitorische Kupferchloridkonzentration von bis zu 4,5 mM (Santo *et al.*, 2010), daher wurden Neuisolate mit Wachstum bei ≥ 5 mM CuCl₂ als kupferresistent eingestuft. Von den vier untersuchten und genomsequenzierten Cyanidproduzenten (Tabelle 28) waren drei kupferresistent, sie zeigten teils Wachstum bis zu 10 mM.

Da in einigen Isolaten keine Gene für cyanidinsensitive Oxidasen bzw. für Schwermetall-

resistenz identifiziert wurden, könnte eine Transkriptomanalyse bei An-/Abwesenheit von Cyanid und/oder des entsprechenden Metalls erste Erkenntnisse über die Resistenzmechanismen ermöglichen. Dies wäre vor allem für die *Mongoliicoccus* Isolate interessant, da diese eine hohe Kupfertoleranz von bis zu 10 mM CuCl₂ zeigten. Einblicke über die Resistenzmechanismen könnten dann zur Erhöhung der Resistenz von geeigneten Biolaugungsbakterien genutzt werden.

Trotz der Schwermetallresistenz und der teils hohen Cyanidproduktion zeigte keins der in dieser Arbeit isolierten Bakterien Biolaugungsaktivität mit einem Filterstaub. Durch den Einfluss von Abbauprodukten von Methionin auf den

Cyanidtest, könnten einige Neuisolate falsch-positiv auf Cyanidproduktion getestet worden sein (vgl. Kapitel 6.2.4.). Ein weiterer Grund ist die Wahl des Laugungssubstrates, da die Biolaugungsaktivität hiervon stark beeinflusst wird (Kapitel 4.2.1., Abb. 17). Gegebenenfalls ist eine Medienoptimierung zur Erreichung von Biolaugungsergebnissen nötig (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020). Ein weiterer möglicher Grund ist die Toxizität der Substrate. Durch Vorbehandlungen der Substrate können die Biolaugungsaktivitäten durch eine Verringerung der Toxizität und einer Laugung von anderen Metallen, wie beispielsweise Kupfer, gesteigert werden (Kapitel 4: Tabelle 31, Natarajan *et al.*, 2014, Thakur *et al.*, 2021).

Kapitel 4

Biolaugungsexperimente mit Ps. donghuensis G2#25

Beiträge anderer

In Zusammenarbeit mit	Gina Kuippers	BRAIN Biotech AG
ICP-MS Messungen	Annabelle Klämke	
Königswasseraufschlüsse	André Claus, Annabelle Klämke	
Programmierung Pipettierrobotor	Gina Kuippers, Jan Ziegler	



Elektroschrott-Verbrennungsasche 1

4. Optimierung der Biolaugung durch das Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25

4.1. Einleitung

Das Ziel der Biolaugung ist es, mit Hilfe von Mikroorganismen, Edelmetalle aus Erzen, Abfällen und Schrotten zu recyceln. In dieser Arbeit steht die Laugung von Gold, Silber, Platin und Palladium im Fokus. Gold kann durch verschiedene chemische Reaktionen in Lösung gebracht werden, beispielsweise durch Cyanid oder Thio-sulfat (Überblick über Goldlaugungstechniken in Liu *et al.*, 2022). Diese Arbeit fokussiert sich auf die Solubilisierung von Gold durch Cyanid.

Bei der Solubilisierung von Gold mit Hilfe von Cyanid bilden sich Dicyanidoaurat(I)-Ionen (Binnewies *et al.*, 2016). Anschließend wird das Gold durch eine Zementation oder das *Carbon-in-Pulp*-Verfahren aus der Lösung extrahiert. Bei der Zementation erfolgt eine Reduktion mit Zinkpulver zur Extraktion. Bei dem *Carbon-in-Pulp* Verfahren werden die $[\text{Au}(\text{CN})_2]$ -Ionen an Aktivkohle adsorbiert. Die Trennung von Gold und Kohlenstoff erfolgt bei höheren Temperaturen. Zuletzt wird das Gold an der Kathode in der Elektrolysezelle abgeschieden (*Carbon-in-Pulp*-Verfahren, Binnewies *et al.*, 2016).

4.1.1. Bakterielle Biolaugung

Die bekannten Cyanidproduzenten *Chromobacterium violaceum*, *Priestia (Bacillus) megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida* können Metalle aus verschiedenen Substraten solubilisieren (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Faraji *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2020). Die Cyanidproduktion und die Biolaugung können dabei gleichzeitig durchgeführt werden, die Bakterien stehen hierbei in direktem Kontakt zu dem jeweiligen Laugungssubstrat (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020, Thakur *et al.*, 2021). Die Cyanidproduzenten werden hierfür bis zu einer festgelegten Zelldichte oder dem Zeitpunkt der maximalen Cyanidproduktion gezüchtet, dann erfolgt die Zugabe des Laugungsmaterials (Gorji *et al.*, 2020, Thakur *et al.*, 2021). Eine Trennung der Bakterien nach erfolgter Cyanidproduktion und der eigentlichen Laugungsreaktion ist möglich (Gorji *et al.*, 2020,

Natarajan *et al.*, 2015). Hierbei wird das verbrauchte Medium der Bakterienkulturen zur Metalllaugung verwendet. Der Vorteil hiervon ist, dass das jeweilige Laugungsmedium auf einen beliebigen pH-Wert eingestellt werden kann und die Bakterien ein dichteres Wachstum, also eine höhere Cyanidproduktion, zeigen, da sie nicht in direktem Kontakt zum Substrat stehen (Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2015). Eine nachträgliche Erhöhung des pH-Werts des zellfreien Laugungsmediums führt zu einer höheren Laugungseffizienz (Natarajan *et al.*, 2015). Als Laugungs-substrate dienen sowohl Zivilisationsabfälle, wie (Elektro)-Schrotte und Leiterplatten, als auch Erze (Gorji *et al.*, 2020, Natarajan *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2020). Durch eine gezielte Medienoptimierung durch statistische Versuchsplanung kann die Laugungseffizienz von Cyanidproduzenten verbessert werden (Gorji *et al.*, 2020). Der pH-Wert, die Konzentrationen verschiedener Aminosäuren, insbesondere von Glycin, sowie von Eisen- und Magnesiumsulfat, haben eine Auswirkung auf die Laugungseffizienzen (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020). Der Vorteil der bakteriellen Laugung gegenüber der chemischen Laugung ist eine 10-20-fach verringerte Cyanid-Konzentration bei der bakteriellen Laugung (Natarajan *et al.*, 2015, Oraby *et al.*, 2017).

4.1.2. Vorbehandlung der Substrate zur Erhöhung der Biolaugungseffizienz

Eine Vorbehandlung des Laugungssubstrates ist, neben der Medienoptimierung, eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Laugungseffizienz. Ziel einer Vorbehandlung ist es, Metalle, wie Kupfer, aus dem Ausgangsmaterial herauszulösen (Natarajan *et al.*, 2014, Thakur *et al.*, 2021). Hierdurch wird verhindert, dass das produzierte Cyanid Komplexe mit diesen Metallen eingeht und somit mehr Cyanid für die Edelmetalllaugung verfügbar ist. Die Konzentrationen von Gold im Laugungssubstrat werden hierbei nur gering beeinflusst. Zur Vorbehandlung des Substrates kann z.B. Salpetersäure oder Eisenchlorid verwendet werden. Beide Vorbehandlungen können zu einer höheren Solubilisierung von Edel-

metallen im nachfolgenden Biolaugungsversuch führen (Natarajan et al., 2014, Thakur et al., 2021).

4.1.3. *Ps. metallosolvens* BR11571

Ps. metallosolvens BR11571 wurde von der BRAIN Biotech AG in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kletzin von der TU Darmstadt als Biolaugungsorganismus isoliert und patentiert (Gabor et al., 2018). Er diente als Kontrolle für die Biolaugungsexperimente in dieser Arbeit. In Gabor et al., 2018 werden folgende Eigenschaften beschrieben. *Ps. metallosolvens* BR11571 gehört der Risikostufe 1 an und kann Edelmetalle aus Substraten extrahieren. In Anwesenheit von Glycin produziert er Cyanid, welches hauptsächlich für die Solubilisierung der Edelmetalle verantwortlich ist. Er zeigte Wachstum sowohl in LB-Medium als auch in M9-Minimalmedium. In Biolaugungsexperimenten zeigte der Stamm eine höhere Gold- (30 % erhöht) und Silberlaugungseffizienz (5-fach erhöht) als der Modellorganismus *Ch. violaceum* DSMZ 30191.

4.1.4. Statistische Versuchsplanung (nach Kleppmann, 2016)

Die statistische Versuchsplanung dient dazu, den richtigen Versuchsumfang für Optimierungsprozesse mit vielfältigen Parametern festzulegen, die Anzahl der Versuche dabei möglichst gering zu halten und trotzdem mehr Informationen zu erlangen. Die Vorgehensweise wird systematisch geplant. Meist resultiert hieraus eine Verkürzung der Projektlaufzeit und eine Senkung der Versuchskosten. Es bringt jedoch auch Nachteile mit sich, da der ermittelte Zusammenhang nur in dem untersuchten Bereich und unter der Berücksichtigung der Zufallsstreuung aussagekräftig ist (Kapitel 1 Einführung S. 1-8).

Parameter, die einen Einfluss auf das Ergebnis haben, werden als Faktoren bezeichnet. Man unterscheidet zwischen quantitativen (Zahlenwerte) und qualitativen Faktoren (z.B. Heizung an/aus, Kapitel 2 Ausgewählte Begriffe S. 11-15). Um eine Begrenzung der Versuchszahl zu erreichen, werden bei vielen Faktoren nur zwei Stufen pro Faktor getestet, in diesem Fall des ersten *Design of Experiments (DoE)* Versuchs zwei verschiedene Konzentrationen einer Medien-

komponente. Alle nicht untersuchten Faktoren, wie z.B. Temperatur, sollten konstant gehalten werden. Die verschiedenen Kombinationen aus Faktoren werden randomisiert getestet. Die Ergebnisse der Versuche werden anschließend statistisch ausgewertet. Aus diesen Ergebnissen können im Anschluss weitere Experimente zur Verbesserung der Prozesse/Versuche geplant werden (Kapitel 3 Vorgehensweise im Überblick S. 17-43).

Bei einem vollständigen faktoriellen Versuchsplan auf zwei Stufen wird jede mögliche Kombination der Faktoren getestet. Hieraus entsteht eine hohe Anzahl an Versuchen bei steigender Anzahl an zu testenden Faktoren (Kapitel 7 Vollständige faktorielle Versuchspläne S.101-120).

Screening Versuchspläne werden genutzt, wenn erst wenig über den Einfluss der Faktoren auf die Problemstellung bekannt ist. Ziel ist es, Faktoren zu identifizieren, die einen besonders großen Effekt auf das Ergebnis haben. Im ersten hier verwendeten *DoE*-Versuch wurde ein fraktioneller faktorieller Versuchsplan verwendet, um eine Reduktion der Experimente zu erreichen. Es wurden sieben Faktoren (Medienzusätze) mit jeweils drei Kombinationen ausgewählt. Je kleiner die Anzahl der Versuche ist, desto wahrscheinlicher ist eine Fehlinterpretation der Ergebnisse (Kapitel 8.2 Fraktionelle faktorielle Versuchspläne S. 130-147).

Für das zweite *DoE*-Experiment in dieser Arbeit wurde ein *Optimal Design* Versuchsplan auf Basis der Ergebnisse des ersten Experiments verwendet. Bei diesem Versuchsplan können verschiedene Stufen der Faktoren, also >2 Konzentrationen der Medienzusätze, getestet werden. Hier ist der Versuchsumfang frei festlegbar. Diese Pläne können nur durch die Verwendung einer Software realisiert werden. Diese Versuchspläne dienen dazu, vorhandene Ergebnisse zu ergänzen oder verschiedene Arten von Faktoren zu kombinieren (Kapitel 11.2.4 Optimale Pläne S. 227).

4.1.5. Zielsetzung

Das aus früheren Arbeiten stammende Isolat *Ps. donghuensis* G2#25 (Amberger, 2016b) sollte näher in Bezug auf dessen Biolaugungseigenschaften mit verschiedenen Materialien, wie Aschen und (Filter)-Stäube, untersucht werden. Als Vergleich dienten Biolaugungsversuche mit

Ps. metallosolvens BR11571. Es sollten Substrate identifiziert werden, in denen die Laugungseffizienzen von G2#25 höher sind als die des Vergleichsbakteriums. Anschließend sollten die

Laugungseffizienzen sowohl durch Vorbehandlungen des Laugungsmaterials als auch durch eine gezielte Medienoptimierung mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung gesteigert werden.

4.2. Ergebnisse

Das Cyanid-produzierende Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte eine Resistenz gegen Kupfer und Silber (Kapitel 3.2.2.4.). In dem Genom wurde das *hcnABC*-Operon für die Cyanidsynthese identifiziert (Kapitel 6). In dem ersten Biolaugungstest (Kapitel 3.2.2.5.) mit einem Filterstaub (Ausgangsmaterial: 20 ppm Au, 6 ppm Pd) zeigte das Isolat Laugung ausschließlich für Gold (2,3 %) und Palladium (5,2 %) nach 120 h. Da die Laugungseffizienzen gering ausfielen, sollten die Effizienzen gesteigert werden. Hierzu wurde ein besser geeignetes Substrat ausgewählt, anschließend Vorbehandlungen durchgeführt und abschließend wurde das Medium optimiert.

4.2.1. Biolaugungsexperimente mit verschiedenen Substraten

Eine Reihe von Substraten wurde in Biolaugungsexperimenten mit *Ps. donghuensis* G2#25 getestet (Tabelle 30). Die Substrate wurden anhand ihrer Edelmetallkonzentrationen und ihrer Beschaffenheit ausgewählt. Inhomogene Substrate mit einer großen Partikelgröße (sichtbare Schrottreste, wie Drähte, Platinen, usw.) wurden nicht verwendet. Als Referenzstamm wurde der bei der BRAIN Biotech AG etablierte Laugungsstamm *Ps. metallosolvens* verwendet.

Für einen Schlamm aus der Aufbereitung einer Hausmüllverbrennungasche und für eine Flugasche aus dem Edelmetall-Recycling wurden keine Biolaugungsaktivitäten mit *Ps. donghuensis* G2#25 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Ein Elektroschrott-Staub war nicht toxisch für beide Bakterien, da nach 96 und 120 h Biolaugungszeit noch Wachstum nach Kontrollausstrichen auf LB-Agarmedien zu beobachten war. Der pH-Wert stieg während des Biolaugungsexperimentes von 8,5 (24 h) auf 9,5 nach 120 h. Nach 24 h wurde kein gelöstes Gold im Überstand der beiden Pseudomonaden-Kulturen gemessen. Nach 120 h zeigte *Ps. metallosolvens* eine Goldlaugungseffizienz von 2,1 % (27 µg) und *Ps. donghuensis* G2#25 eine von 1,6 % (20 µg,

Abb. 17, Tabelle 30). Nach 96 h zeigten beide Pseudomonaden auch eine Solubilisierung von Palladium (*Ps. donghuensis* G2#25: 3,4 %, *Ps. metallosolvens*: 6,8 %; Daten nicht gezeigt). Nur *Ps. metallosolvens* zeigte eine Solubilisierung von Silber (1 % nach 96 h).

Mit einer Filterstaubprobe (Abb. 17) wurde bereits nach 48 h Goldlaugung gemessen. Die Effizienzen von *Ps. donghuensis* G2#25 und *Ps. metallosolvens* waren mit 38,6 % bzw. 46,5 % nach 120 h höher als für den Elektroschrott Staub. Dieses Substrat hat einen geringen Goldgehalt, trotz der Goldlaugungseffizienz von 46,5 % lag die Gesamtausbeute bei 19,8 µg Au. Zudem zeigten beide Bakterien Laugung von Silber (*Ps. donghuensis* G2#25 9,9 %, *Ps. metallosolvens* 32,6 % nach 120 h) und Palladium (je ca. 70 % nach 120 h). Wachstum wurde für beide Pseudomonaden bei allen Probenahmezeitpunkten nachgewiesen, der Filterstaub war also nicht toxisch.

Biolaugungsversuche mit Schmelzriegelpartikeln wurden nur mit *Ps. donghuensis* G2#25 durchgeführt (Abb. 17, unten links) und zeigten die höchste Goldlaugungseffizienz von 46 % nach 120 h (64 µg Au). Auch zeigte das Bakterium Laugung von Silber (24 %, 120 h) und Palladium (3 %, 120 h). Die Schmelzriegelpartikel waren im Wachstumsversuch nicht toxisch.

Zwei verschiedene Aschen aus der Elektroschrottverbrennung wurden getestet. Für Asche 2 wurde keine Edelmetalllaugung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte für die Asche 1 aus der Elektroschrott Verbrennung eine höhere Goldlaugungseffizienz (8,4 % nach 48 h) als *Ps. metallosolvens* (1,7 % nach 120 h, Abb. 17 rechts unten). Aufgrund der hohen Goldkonzentration von 406 µg/g in dem Material war die höchste Goldausbeute (71 µg) von allen Substraten im Laugungsüberstand trotz der geringeren prozentualen Effizienz zu beobachten. Nach 24 h und 48 h Laugungszeit war Wachstum auf Agarmedien nachweisbar, jedoch nicht nach 120 h.

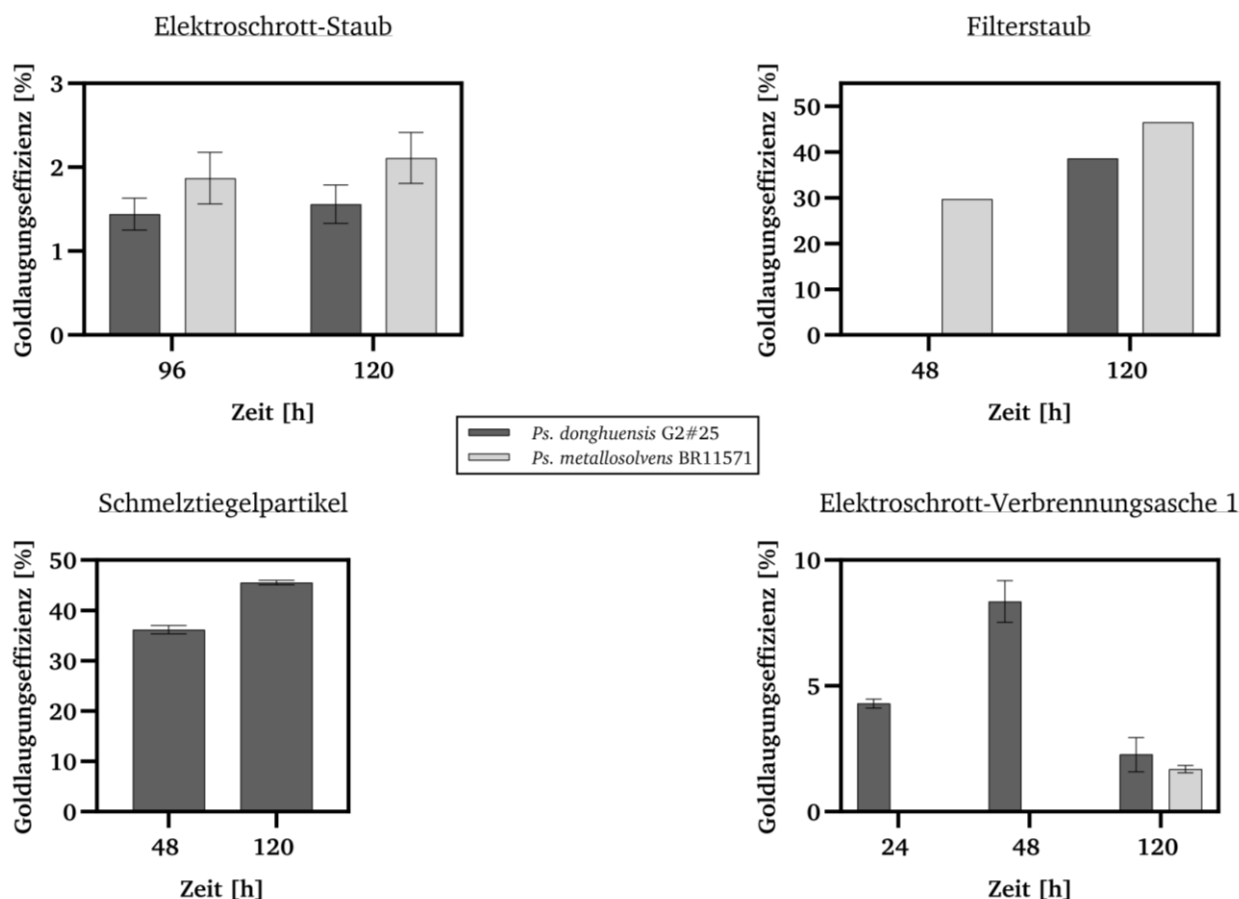


Abbildung 17 Goldlaugungseffizienzen für *Ps. donghuensis* G2#25 mit verschiedenen Substraten. Schüttelkolben ohne Schikane wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 in LB pH 7,2 mit 115 mM Glycin beimpft (2,5 % [w/v] Feststoff). Die Metallkonzentrationen in den Überständen und den Feststoffen wurden durch ICP-MS Messungen bestimmt, aus den Messwerten wurden die Laugungseffizienzen berechnet. Die Biolaugungen wurden als Triplikate durchgeführt, bis auf die Filterstaub Probe (einfach). Zudem wurden Mediumkontrollen mitgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Positivkontrolle: *Ps. metallosolvens* BR11571.

Tabelle 30 Übersicht über die Ausgangssubstrate und die gelaugten Mengen/Konzentrationen von *Ps. donghuensis* G2#25.

Material	Probe	Metall			
		Ag	Au	Pd	Pt
Filterstaub <250 μm , weniger magnetisch	Ausgangsmaterial [μg]	501	43	13	0,5
	Laugungsüberstand (120 h) [μg]	50	16,5	9,5	0
	Laugungseffizienz [%]	10	39	75	-
Elektroschrott-Staub <125 μm , weniger magnetisch	Ausgangsmaterial [μg]	2 954	1 289	212	64
	Laugungsüberstand (120 h) [μg]	0	20	7	0
	Laugungseffizienz [%]	-	1,6	3,2	-
Schlamm aus der Aufbereitung von Müllverbrennungsgaschen	Ausgangsmaterial [μg]	1 063	23	n.B.	n.B.
	Laugungsüberstand (48 h/120h) [μg]	0	0	0	0
	Laugungseffizienz [%]	-	-	-	-
Schmelztiegel-Partikel	Ausgangsmaterial [μg]	93	141	596	538
	Laugungsüberstand (120 h) [μg]	23	64	17	0
	Laugungseffizienz [%]	24	46	3	-
Flugasche Edelmetallrecycling	Ausgangsmaterial [μg]	8 485	2 105	52	113
	Laugungsüberstand (48 h/120h) [μg]	0	0	0	0
	Laugungseffizienz [%]	-	-	-	-

Material	Probe	Metall			
		Ag	Au	Pd	Pt
Elektroschrott- Verbrennungsasche 1	Ausgangsmaterial [μg]	4492	853	257	1,4
	Laugungsüberstand (48 h) [μg]	0	71	10	0
	Laugungseffizienz [%]	-	8,3	4	-
Elektroschrott- Verbrennungsasche 2	Ausgangsmaterial [μg]	6170	2255	155	0,4
	Laugungsüberstand (alle ZP) [μg]	0	0	0	0
	Laugungseffizienz [%]	-	-	-	-

ZP = Zeitpunkte

Die höchsten Goldlaugungseffizienzen zeigte *Ps. donghuensis* G2#25 mit einem Filterstaub und mit Schmelztiegelpartikeln. Eine Goldausbeute von 71 μg (8,3 % Effizienz) bzw. 64 μg (46 %) wurde mit der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 und Schmelztiegelpartikeln erreicht. Die Schmelztiegelpartikelprobe wurde nicht für weitere Experimente verwendet, da sie von der BRAIN Biotech AG als Nischenmaterial eingestuft wurde. Nur bei der Asche aus der Elektroschrott-Verbrennung zeigte *Ps. donghuensis* G2#25 eine höhere Goldlaugungseffizienz als der Referenzstamm. Dieser Elektroschrott enthielt hohe Edelmetallkonzentrationen (Ag: 2 139 ppm, Au: 406 ppm), daher führte eine Goldlaugungseffizienz von lediglich 8 % zu der höchsten Goldausbeute von 71 μg .

4.2.2. Optimierung der Biolaugungseffizienz mit der Asche aus der Elektroschrott-Verbrennung 1

Aufgrund der besseren Goldlaugungseffizienz als der Referenzstamm *Ps. metallosolvens* und der hohen Goldausbeute wurde die Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1 für weitere Biolaugungen verwendet.

4.2.2.1. Chemische Vorbehandlung der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1

Die hohen Metallkonzentrationen in Elektroschrotten können toxischere Wirkungen auf die Biolaugungsbakterien haben als gering-belastete Materialien. Deshalb sollte die Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 durch Lauge oder Säure vorbehandelt werden, um lösliche Übergangsmetalle aus dem Material zu entfernen, ohne dabei Edelmetalle, wie beispielsweise Gold und Silber, in Lösung zu bringen. Zudem soll eine höhere Cyanid-Verfügbarkeit durch Verminderung der

Komplexierung unerwünschter Metalle, wie zum Beispiel Kupfer, erreicht werden.

12 % (Feststoffgehalt) an Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 wurden mit je 10%iger Säure oder Lauge für 48 h bei RT gerührt.

Der Königswasseraufschluss der Rückstände mit nachfolgender ICP-MS-Messung zeigte, dass der Gehalt von Eisen und Kupfer, letzteres nur durch Säurebehandlung, durch die chemische Vorbehandlung verringert wurde (Tabelle 31).

Die Konzentration von Silber war von der Vorbehandlung nur gering beeinflusst. Die Goldkonzentration stieg, insbesondere bei der Vorbehandlung durch Säure, an. Dies lag darin begründet, dass weniger andere Metalle vorhanden waren und es so zu einer relativen Aufkonzentrierung von Gold kam.

Tabelle 31 Metallkonzentrationen der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 nach der chemischen Vorbehandlung.

Element	unbehandelt	Säure	Lauge
Fe [ppm]	15 291	u.B. ¹	3 433
Cu [ppm]	297 520	218 318	285 975
Ag [ppm]	2 110	2 203	1 825
Au [ppm]	406	873	443
Pd [ppm]	83	101	48
Pt [ppm]	0,4	0,3	0,5

¹u.B.: die Messung lag unterhalb der Bestimmungsgrenze.

Die chemisch vorbehandelte Verbrennungsasche 1 wurde für Biolaugungsexperimente mit *Ps. donghuensis* G2#25 verwendet (Abb. 18, Tabelle 32). Nach 48 h war die Goldlaugungseffizienz, also die Goldmenge im Überstand, bei allen Materialien höher als nach 120 h. Die Säurebehandlung führte zu einer Verringerung der Goldlaugungseffizienz im Vergleich zum unbehandelten Material, obwohl die Vorbehandlung zu einer Verringerung der Metallkonzentration von Kupfer und Eisen im Feststoff geführt hatte (vgl.

Tabelle 31). Somit sollte mehr Cyanid durch die Verminderung der unerwünschten Komplexbildung zur Verfügung stehen, also die Laugungseffizienzen steigen. Die alkalische Vorbehandlung der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 führte zu einer Verdopplung der Goldlaugungseffizienz in Biolaugungsexperimenten mit *Ps. donghuensis* G2#25 im Vergleich zu dem unbehandelten Material (16 % nach 48 h, 176 μg Au, vorher 63 μg Au unbehandelt). Außerdem wurde Palladium bei allen Proben gelaugt, auch hier war die Laugungseffizienz bei der alkalisch vorbehandelten Asche am höchsten (13,2 % nach 48 h, nicht gezeigt). Silberlaugung wurde nur bei den chemisch vorbehandelten Verbrennungsaschen gemessen (Lauge 3,2 %, Säure 0,8 % je nach 120 h). Die Medienkontrolle zeigte nur bei der alkalisch vorbehandelten Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 0,4 % Au-Laugung nach 120 h (nicht gezeigt). Zu beiden Zeitpunkten war kein Wachstum auf LB-Agarmedien nachweisbar.

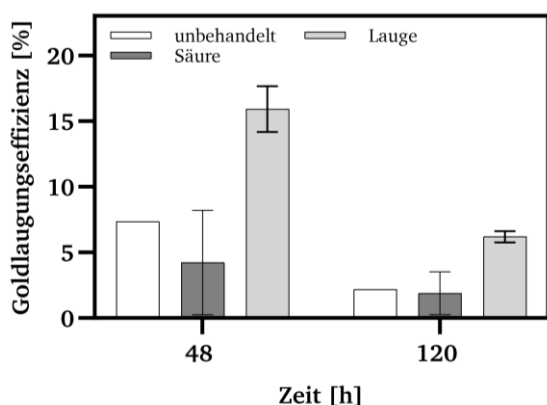


Abbildung 18 Biolaugungsexperiment *Ps. donghuensis* G2#25 mit chemisch vorbehandelter Elektroschrott-Verbrennungsasche 1. Die Elektroschrott-Verbrennungsasche wurde chemisch mit 10%iger Säure oder Lauge vorbehandelt, die Start-OD von *Ps. donghuensis* G2#25 betrug 1 (vorbehandelt) bzw. 1,2 (unbehandelt) in LB pH 7,2 mit 115 mM Glycin (2,5 % [w/v] Elektroschrott-Verbrennungsasche). Es wurden Kolben ohne Schikane verwendet, diese wurden bei 150 rpm inkubiert (unbehandelt 250 ml Kolben, behandelt 300 ml, die Volumina/Mengen wurden entsprechend angepasst). Die Goldlaugungseffizienz wurde durch ICP-MS Messungen des Überstands bestimmt. Die Solubilisierungswerte für das unbehandelte Material wurden einfach, für das Säure vorbehandelte Material als Duplikat und für die alkalisch vorbehandelte Asche als Triplikat bestimmt. Für alle Materialien wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt, die Werte der Medienkontrollen wurden von denen der Überstände abgezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Tabelle 32 Goldkonzentrationen/-mengen des Biolaugungsexperiments mit *Ps. donghuensis* G2#25 und der vorbehandelten Elektroschrott-Verbrennungsasche 1.

Material	Probe	Au
Unbehandelt	Ausgangsmaterial [μg]	853
	Laugungsüberstand (48 h) [μg]	63
	Laugungseffizienz [%]	7
Säure	Ausgangsmaterial [μg]	2 182
	Laugungsüberstand (48 h) [μg]	92
	Laugungseffizienz [%]	4
Lauge	Ausgangsmaterial [μg]	1 107
	Laugungsüberstand (48 h) [μg]	176
	Laugungseffizienz [%]	16

4.2.2.2. Medienoptimierung für die Biolaugung mit der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 durch *Design of Experiment*-Vorgehensweise

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Goldausbeute von *Ps. donghuensis* G2#25 mit der Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 durch eine alkalische Vorbehandlung von 63 μg auf 176 μg mehr als verdoppelt wurde. Zur weiteren Erhöhung der Laugungseffizienz wurde das Medium optimiert. Hierfür wurde ein 2-Level faktorieller Versuchsplan erstellt. LB diente als Basis-Medium für die Versuche. Die Einflüsse der An- oder Abwesenheit von Hefeextrakt, Serin, L-Phenylalanin, L-Methionin, L-Threonin, L-Glutamat und der pH-Werte 7,2, 8 und 9 auf die Biolaugungseffizienzen wurden verglichen. Für Glycin wurde der Effekt von zwei Konzentrationen (10 mM und 100 mM) untersucht. Die Kombinationen aus den verschiedenen Medienzusätzen wurden durch die Software DesignExpert 8.0 erstellt (Kapitel 10, Tabelle S 2). Der Versuch wurde in zwei 24-Deep Well Platten durchgeführt, 48 verschiedene Bedingungen wurden getestet mit je 1 % (w/v) Feststoff. Dies entspricht 15 μg Au/Ansatz. Das Ausgangsmaterial enthielt 508 $\mu\text{g}/\text{g}$ Au (Wiederholung alkalische Vorbehandlung des Ausgangsmaterials, 24 h rühren). Jede Kombination wurde bei den drei verschiedenen pH-Werten 7,2, 8 und 9 randomisiert getestet. Dabei zeigte sich, dass sich der pH-Wert durch die Zugabe der einzelnen Komponenten von dem vorgegebenen pH-Wert unterschied (pH 7,2: 6,93-7,17, pH 8: 7,72 – 7,98, pH 9: 8,46 – 8,7; Daten nicht gezeigt). Durch die Zugabe der Komponenten lag die maximale Goldlaugungseffizienz für die alkalisch vorbehandelte Elektroschrott-Verbrennungsasche 1

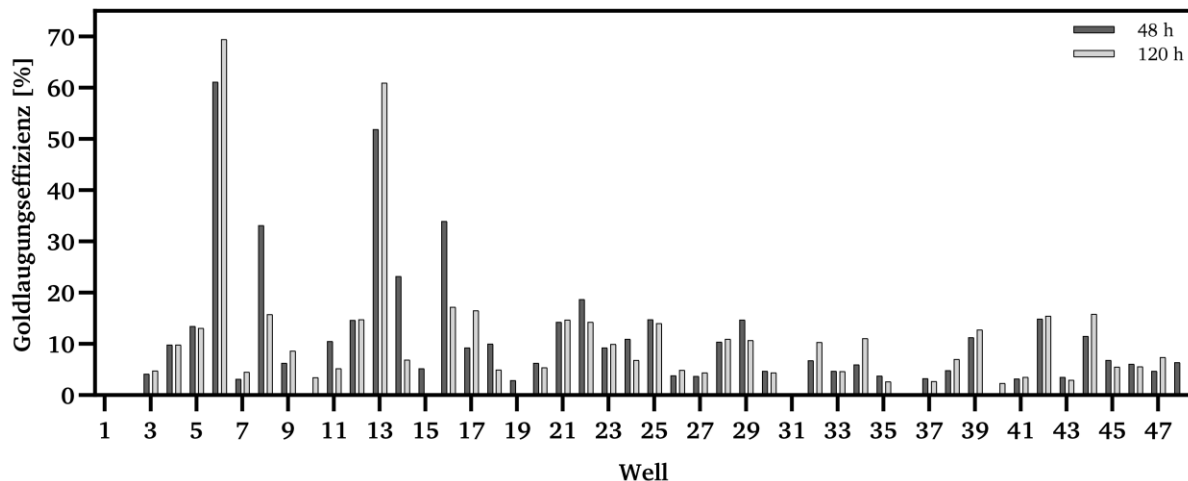


Abbildung 19 DoE Biolaugungsexperiment mit alkalisch vorbehandelter Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 nach einem 2-Level faktoriellen Versuchsplan (n = 1). Die Biolaugung mit *Ps. donghuensis* G2#25 wurde im 2x 24 Well Format mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 durchgeführt (Einsatzmenge: 30 mg Asche, was 15 µg Gold/Well entspricht). Die Goldkonzentration in den Überständen wurde nach 48 h und 120 h durch ICP-MS Messungen bestimmt. Hieraus wurde die Laugungseffizienzen berechnet. Eine Kontrolle mit LB-Glycin Medium wurde nicht mitgeführt. Medienkombinationen siehe Tabelle S 2.

bei 70 % (120 h, 11 µg Au, Well 6, Abb. 19). Die maximale Goldlaugungseffizienz wurde mit LB-Medium plus 50 mM Tris pH 7,2 und Zugabe von Hefeextrakt (5 g/l), 100 mM Glycin, 15 mM Threonin und 27 mM Glutamat erreicht. Eine Goldlaugungseffizienz von 60 % wurde in demselben Medium, pH 8, erreicht (Well 13), Medium mit pH 9 führte zu einer Verringerung der Goldlaugungseffizienz auf 18 % (Well 22 nach 120 h). Nur mit der Medienzusammensetzung aus Well 6 wurde Palladium im Überstand gemessen (Laugungseffizienz 24 %, 120 h). Zudem wurde mit diesem Medium die höchste Silberlaugungseffizienz von 6 % erreicht (3 µg Ag, Einsatzmenge 54 µg Ag, 120 h). Die Au-Konzentration in Lösung war mit 350 ppm höher als bei den vorherigen Experimenten mit 2,5 % (w/v) Verbrennungsasche (70 ppm Au, Kapitel 4.2.2.1). Zur Überprüfung der Ergebnisse des DoE Versuchs wurde das Biolaugungsexperiment mit Medium 6 und mit LB pH 7,2 + 115 mM Glycin als Kontrollmedium in Schüttelkolben durchgeführt. *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte mit dem optimierten Medium auch hier eine hohe Goldlaugungseffizienz von 95 % nach 120 h (445 µg Au, Einsatzmenge: 465 µg Au, Abb. 20). Die veränderte Einsatzmenge/Goldkonzentration ist durch eine Wiederholung der alkalischen Vorbehandlung des Ausgangsmaterials begründet. Bei Verwendung von LB-Medium mit Glycin lag die

Goldlaugungseffizienz bei 41 % (193 µg Au). Steriles optimiertes Medium zeigte keine Goldlaugungsaktivität.

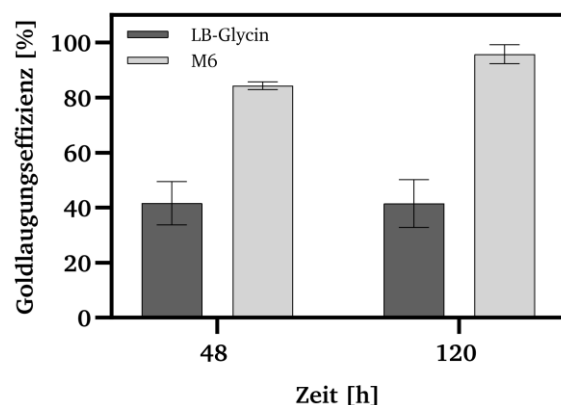


Abbildung 20 Verifizierung der Medienoptimierung durch DoE für die Biolaugung mit *Ps. donghuensis* G2#25. Biolaugungsexperiment mit alkalisch vorbehandelter Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 (1 % [w/v]) und einer Start-OD_{600 nm} von 1. Schüttelkolben mit Schikane wurden bei 160 rpm inkubiert. Um Laugungseffekte des Mediums auszuschließen wurde eine Kontrolle mit dem M6-Medium ohne Mikroorganismen mitgeführt (nicht gezeigt). Die Metallkonzentrationen in den Überständen wurden durch ICP-MS Messungen bestimmt, daraus resultieren die Laugungseffizienzen. Das Experiment fand im 100 ml Maßstab statt, 465 µg Au im Substrat wurden eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Auch die Laugung von Silber (M6: 9 %, LB-Glycin: 3 %) und Palladium (M6: 28 %, LB-Glycin: 7 %) war nach 120 h mit dem optimierten Medium erhöht. Bei dem Biolaugungsexperiment mit *Ps. donghuensis* G2#25 mit dem optimierten Medium wurde, wie mit LB-Medium + Glycin, kein Wachstum nach 48 h auf LB-Agarmedien beobachtet.

Die Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung wurden mit der Software DesignExpert 8.0 ausgewertet. Signifikanten positiven Einfluss nach einer Wurzeltransformation mit anschließender *Analysis of Variance* (ANOVA)-Analyse (p -value < 0,0001: signifikant) auf die Goldlaugungseffizienz hatten Glycin, Hefeextrakt und Glutamat. Methionin hingegen hatte einen negativen, Serin keinen Einfluss. Die pH-Werte wurden bei der Analyse nicht betrachtet, da sie nicht dem 2-Level faktoriellen Versuchsplan entsprachen und manuell zu dem Versuchsplan hinzugefügt wurden.

Die Medienoptimierung durch die statistische Versuchsplanung führte zu einer Verdopplung der Goldlaugungseffizienz (96 %) von *Ps. donghuensis* G2#25 gegenüber LB-Medium mit Glycin (41 %).

4.2.2.3. Zweite Medienoptimierung für die Biolaugung mit der Elektroschrott-Verbrennungssasche 1

In einem zweiten Schritt sollte die Biolaugung mit der unbehandelten Elektroschrott-Verbrennungssasche 1 verbessert werden, da der Prozess ohne Vorbehandlung wirtschaftlicher ist. Die Asche wurde hierfür mit einer Kugelmühle gemahlen (Kapitel 2.2.4.4. Mahlen der Asche aus der Elektroschrottverbrennung 1), da sich das Ausgangsmaterial nicht homogen in den 24 Well Platten verteilen ließ. Auch für diese Medienoptimierung wurden 48 Bedingungen in 24-Deep Well Platten getestet. Da in dem ersten Schritt

der Medienoptimierung höhere Goldlaugungswerte mit den pH-Werten 7,2 und 8 als bei pH 9 erreicht worden waren (Kapitel 4.2.2.2.), wurden für dieses Experiment die pH-Werte 7,2, 7,6 und 8 verwendet. Diesmal wurde ein *Optimal Design* Versuchsplan gewählt. Es gab somit nicht nur zwei Konzentrationen der Medienkomponenten, sondern auch Zwischenstufen (Kapitel 10, Tabelle S 3). Methionin wurde, aufgrund des zuvor beobachteten negativen Effektes auf die Goldlaugungseffizienz, nicht weiterverwendet. Die in dem vorherigen Kapitel beschriebenen Medienbestandteile mit positivem Effekt wurden erneut getestet, die Konzentrationsmaxima wurden erhöht. 15 mM Threonin wurde zu jedem Medium hinzugegeben. Zudem wurden der Einfluss von Eisen-(III)-citrat und Magnesiumsulfat auf die Biolaugung getestet.

Die Goldlaugungseffizienz war mit der unbehandelten gemahlene Elektroschrottassche 1 geringer als mit der alkalisch vorbehandelten (Abb. 21). Dies lag vermutlich an den niedrigeren Metallkonzentrationen der alkalisch vorbehandelten Asche (Tabelle 31), und einer gesteigerten Toxizität der Asche durch das Mahlen. Die höchste Goldlaugungseffizienz zeigte sich mit Medium 47 mit 31 % ($4,6 \mu\text{g Au}$, 72 h). Mit Medium 18 wurde die zweithöchste Goldlaugungseffizienz mit 21 % ($3,1 \mu\text{g Au}$, 72 h) erreicht. Zwischen 48 h und 72 h war bei keinem der Medien ein großer Unterschied erkennbar. Auch für Palladium zeigte sich mit M47 die höchste Laugungseffizienz von 75 % ($1,8 \mu\text{g Pd}$, 72 h). Die Laugungseffizienz für Silber war mit 20 % mit M28 am höchsten ($13,6 \mu\text{g Ag}$ nach 72 h), mit M47 zeigte sich jedoch nur eine Silberlaugungseffizienz von 12 % nach 72 h. Sechs Medienzusammensetzungen führten zu keiner Goldlaugung. Es wurden keine Gemeinsamkeiten der Medien festgestellt, die die Biolaugung negativ beeinflussten, wie das Vorhandensein/Abwesenheit/Konzentration von Medienkomponenten.

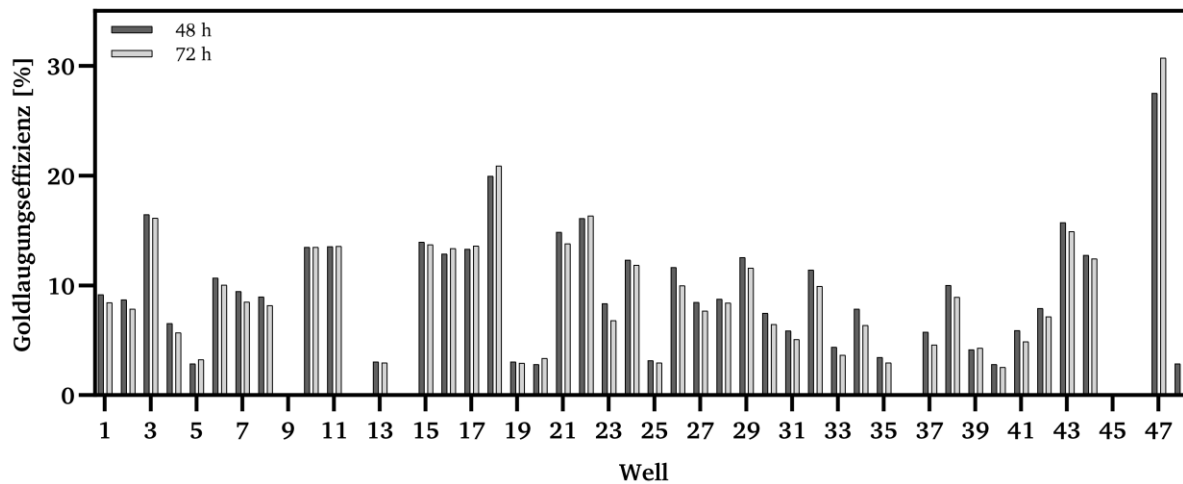


Abbildung 21 Medienoptimierung der Biolaugung mit der gemahlenelektroschrott-Verbrennungsgasche 1 (n = 1). Die Biolaugung wurde mit *Ps. donghuensis* G2#25 in 2x 24-Deep Well Platten mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 durchgeführt (Einsatzmenge: 37 mg Asche; 15 µg Au/Well). Das Kulturvolumen war auf 3,05 ml erhöht, da die Zellen nicht mitberechnet wurden. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf 3 ml. Die Elektroschrott-Verbrennungsgasche wurde vor der Biolaugung für 10 min gemahlen. Die Medienzusammensetzung wurde mit einem *Optimal Design* Versuchsplan bestimmt. Die Bestimmung der Goldkonzentration in den Überständen erfolgte durch ICP-MS Messungen, anschließend wurde die Goldlaugungseffizienz berechnet.

Die Auswertung mit DesignExpert ergab für Glycin und Glutamat einen positiven Effekt, deren Konzentration sollte zur Steigerung der Goldlaugungsaktivität erhöht werden. Hier wurden 150 mM (11 g/l) Glycin eingesetzt, für *Ps. aeruginosa* und *Pr. megaterium* ist ein negativer Effekt von hohen Glycin-Konzentrationen (bis 10 mg/l) auf das Wachstum beschrieben (Gorji *et al.*, 2020). Daher ist zu testen, wie weit die Glycin Konzentration noch gesteigert werden kann. Für dieses DoE-Experiment wurden maximal 36 mM Glutamat eingesetzt, bisherige Studien zeigten einen positiven Effekt auf die Cyanidproduktion bei Zugabe von 1 mM

(Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Aufgrund fehlender Referenzwerte ist die Konzentration langsam zu steigern, um toxische Effekte zu vermeiden. Eisen-(III)-citrat hingegen hatte einen negativen Einfluss auf die Biolaugungsaktivität von *Ps. donghuensis* G2#25. Serin, Phenylalanin und Magnesiumsulfat hatten keinen Effekt. Auch für den pH-Wert wurde keine Tendenz ermittelt. Die Zusammensetzung der beiden Medien mit der höchsten Goldlaugungseffizienz war unterschiedlich (Tabelle 33). Gemeinsam war die Glycin Konzentration (150 mM) und der pH-Wert von 8.

Tabelle 33 Überblick über die Medien (LB-Basis) mit den höchsten Goldlaugungseffizienzen nach der Medienoptimierung.

Medienbestandteil	Medium 6	Medium 18	Medium 47	
Bacto-Trypton	10 g/l	10 g/l	10 g/l	LB-Basis
NaCl	5 g/l	5 g/l	5 g/l	
Hefeextrakt	5 g/l	5 g/l	5 g/l	
Hefeextrakt	5 g/l	7,5 g/l	3,6 g/l	Medienzusätze
Glycin	100 mM	150 mM	150 mM	
Serin	-	-	0,3 mM	
Glutamat	27 mM	29,2 mM	24,2 mM	
Phenylalanin	-	7,5 mM	7,8 mM	
Eisen-(III)-citrat	-	0,42 mM	0,4 mM	
Magnesiumsulfat	-	-	1 mM	
L-Threonin	15 mM	15 mM	15 mM	
Tris pH 7,2	50 mM	-	-	
Tris pH 8	-	50 mM	50 mM	

Auch hier wurden die Laugungseffizienzen mit den optimierten Medien mit der gemahlenelektroschrott-Verbrennungsasche in einem Schüttelkolbenversuch (300 ml, 100 ml Medienvolumen) überprüft. Zusätzlich wurde das optimierte Medium aus dem ersten DoE-Versuch (M6, Tabelle 33) zum Vergleich in die Versuche eingeschlossen. Aufgrund einer geringen Materialverfügbarkeit wurden keine Experimente mit 1 % Feststoff durchgeführt. Es wurden nur Laugungsexperimente mit 2,5 % (w/v) gemahlener Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 durchgeführt, da diese Konzentration näher an der industriellen Anwendung ist. *Ps. donghuensis* G2#25 in M6 aus der ersten Medienoptimierung zeigte nur nach 24 h Goldlaugung (20,3 µg Au, Abb. 22). Wie auch in dem DoE-Experiment zeigte *Ps. donghuensis* G2#25 in M47 die höchste Effizienz von 7 % nach 72 h (65 µg Au). Auch mit M18 wurde Goldlaugung erzielt, diese war jedoch geringer als mit M47 (maximal 43 µg Au nach 48 h). Die Palladiumlaugung war ebenfalls mit M47 am höchsten (24 % nach 72 h). Ein Biolaugungsexperiment in LB-Medium mit Glycin mit *Ps. donghuensis* G2#25 führte zu keiner Goldlaugung (nicht gezeigt). Die Goldlaugungseffizienzen waren im Schüttelkolbenversuch geringer als in dem DoE Multiplex Experiment (M47 DoE 31 %, 7 % Schüttelkolben), was vermutlich durch die höhere Elektroschrott-Aschenkonzentration bedingt ist, welche zu einer höheren Toxizität führt. Dies gilt auch für M6, mit diesem Medium zeigte *Ps. donghuensis* nur eine Goldlaugungseffizienz von 2 %, mit der vorbehandelten Elektroschrott-Asche 1 und 1 % Feststoff zeigte *Ps. donghuensis* G2#25 in diesem Medium bis zu 95 % Effizienz.

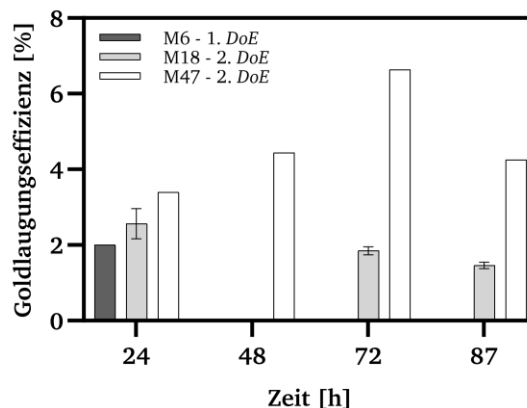


Abbildung 22 Biolaugungsexperiment mit der gemahlenelektroschrott-Verbrennungsasche 1 im Schüttelkolben Maßstab. Biolaugungen mit *Ps. donghuensis* G2#25 (Start-OD_{600 nm} 1) im 100 ml Maßstab (M18: Volumen 101,6 ml, M47 Volumen 103,8 ml, Kolben mit Schikane, 120 rpm) mit 2,5 % (w/v) Feststoff durchgeführt. Dies entspricht 2,5 g Feststoff, mit 1 015 µg Au pro Kolben. Die Goldkonzentration wurde mittels ICP-MS Messungen der Überstände bestimmt. Medienkontrollen für M6 und M18 wurden mitgeführt, diese zeigten keine Goldlaugungsaktivität (nicht gezeigt). M6, M47: einfache Bestimmung, M18: Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 2).

Das Mahlen des Elektroschrottes führte wahrscheinlich zu einer höheren Toxizität, vor dem Mahlen wurde für *Ps. donghuensis* G2#25 in LB mit Glycin Goldlaugung gezeigt, nach dem Mahlen nicht bei gleicher Feststoffmenge (Abb. 17, 22). Zudem waren alle Goldlaugungswerte geringer (4,6 µg Au, M47, DoE) als mit der alkalisch vorbehandelten Asche (445 µg Au, M6, Schüttelkolben) bei gleicher Feststoffkonzentration. Trotzdem wurde eine Steigerung der Goldlaugungseffizienz durch beide Medienoptimierungen für die gemahlene Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 gezeigt (LB+ Glycin 0 µg Au, M6 20 µg Au, M18 43 µg Au, M47 65 µg Au).

4.2.3. Übertragbarkeit der Medienoptimierung auf andere Laugungssubstrate

Für die Elektroschrott-Verbrennungsasche 1 wurde die Goldlaugungseffizienz von *Ps. donghuensis* G2#25 durch Medienoptimierungen gesteigert. Für zwei der optimierten Medien wurde getestet, ob diese auch für ein anderes Substrat eine gesteigerte Laugungsaktivität im Vergleich zu LB mit Glycin zeigten. Die Biolaugungen wurden mit

Ps. donghuensis G2#25 und einem Filterstaub aus der mechanischen Vorbereitung von Elektroschrott durchgeführt (Kapitel 2.1.8.). Die Biolaugungsexperimente mit *Ps. donghuensis* G2#25 in den Medien LB-Glycin, M6 und M18 und zeigten Goldlaugung (Abb. 23). Die höchste Goldlaugungseffizienz von 13 % ($5,5 \mu\text{g Au}$) wurde mit LB + Glycin nach 72 h erreicht. Biolaugungen mit M6 zeigten höhere Goldlaugungseffizienzen als mit M18.

Das Biolaugungsexperiment mit den optimierten Medien zeigte für den Filterstaub geringere Goldlaugungseffizienzen als LB-Glycin. Es war nicht möglich die Medienoptimierung auf andere Materialien zu übertragen. Für jedes Biolaugungs-substrat ist eine erneute Medienoptimierung nötig.

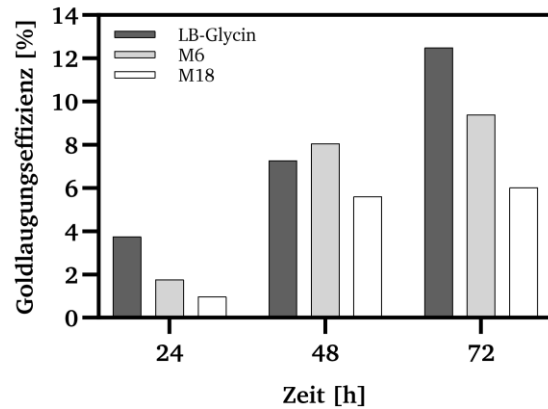


Abbildung 23 Übertragbarkeit der optimierten Medien auf die Biolaugung mit *Ps. donghuensis* G2#25 mit einem Filterstaub der mechanischen Vorbereitung von Elektroschrott (n = 1). Es wurden 300 ml Schüttelkolben mit 100 ml Laugungsreaktion bei 120 rpm inkubiert (2,5 % [w/v] Elektroschrott, $44 \mu\text{g Au/Kolben}$). Das Kulturvolumen war bei M18 um 1,56 ml erhöht. Die Goldkonzentrationen in den Überständen wurden durch ICP-MS Messungen bestimmt. Es wurden Medienkontrollen mitgeführt, diese führten zu keiner Goldlaugung (nicht gezeigt).

4.3. Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Biolaugungsaktivität von *Ps. donghuensis* G2#25 mit verschiedenen Substraten gezeigt. Diese wurde durch eine Substratvorbehandlung und Medienoptimierung gesteigert.

Die Biolaugungsaktivität ist nicht nur vom gewählten Material, sondern auch von dem Bakterium abhängig (Abb. 17). Nur bei der Elektro-schrott-Verbrennungsasche 1 zeigte *Ps. donghuensis* G2#25 eine höhere Biolaugungsaktivität als das Referenzbakterium *Ps. metallosolvens*. Die Biolaugungsexperimente in dieser Arbeit wurden jeweils nur mit einem Bakterium durchgeführt. Die Verwendung von mehreren Bakterien gleichzeitig kann die Goldgewinnung steigern, je nach ausgewählten Bakterien jedoch auch verringern (Natarajan *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2020). Auch der gewählte Feststoffgehalt beeinflusst die Aktivität (Natarajan *et al.*, 2015).

Eine geringere Feststoffkonzentration führte zu einer höheren Edelmetallausbeute (diese Arbeit, Caicedo *et al.*, 2022, Natarajan *et al.*, 2015). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Toxizität der Ausgangsmaterialien zurückzuführen, da eine Trennung von Bakterienwachstum und Goldkomplexierung zu einer erhöhten Goldausbeute geführt hatte, nachdem das verbrauchte Medium für Biolaugungsreaktionen eingesetzt worden war (Natarajan *et al.*, 2015).

Zur Verringerung der Konzentration von unerwünschten Metallen, wie beispielsweise Eisen und Kupfer, wurde das Laugungsmaterial chemisch vorbehandelt. Hierdurch wurde die Goldausbeute gesteigert. Frühere Studien hatten eine Erhöhung in der Wiedergewinnung von Gold bzw. Silber durch eine Vorbehandlung mit Salpetersäure oder Eisenchlorid gezeigt (Natarajan *et al.*, 2014, Thakur *et al.*, 2021). Verschiedene Konzentrationen der Chemikalien führten dabei zu unterschiedlicher Kupferrückgewinnung (Thakur *et al.*, 2021). In dieser Arbeit wurde jeweils nur eine Konzentration der Säure bzw. Lauge getestet, eine Ausweitung der Vorbehandlung dürfte Steigerungspotential in der Goldrückgewinnung bergen. Eine chemische Vorbehandlung führt allerdings dazu, dass der Edelmetallrückgewinnungsprozess nicht mehr als rein biologischer Prozess klassifiziert werden kann. Auch die Vorbehandlung kann biologisch durchgeführt

werden, verschiedene *Acidithiobacillus* Stämme werden hierbei in einem ersten Schritt zur Laugung von Kupfer aus dem Ausgangsmaterial eingesetzt (Caicedo *et al.*, 2022). Die Rückstände des Materials werden anschließend in einer zweiten Laugungsreaktion mit *Ps. putida* oder *Ps. fluorescens* zur Goldgewinnung genutzt (Caicedo *et al.*, 2022).

Um den Versuchsumfang möglichst gering zu halten und trotzdem eine Vielzahl von Informationen zu gewinnen, wurde die statistische Versuchsplanung zur Medienoptimierung angewendet (Kleppmann, 2016). Der faktorielle Versuchsplan wurde in dem ersten DoE Experiment verwendet, da wenig über den Einfluss der Medienkomponenten auf die Goldausbeute bekannt war. Der *Optimal Design* Versuchsplan diente dann dazu, die Experimente aus dem ersten Versuch zu ergänzen (Kleppmann, 2016).

Da Glycin das Substrat der Cyanidsynthese ist (Michaels *et al.*, 1965, Wissing, 1974), wurde es als Medienzusatz ausgewählt. Die Zugabe von höheren Glycin-Konzentrationen zu den Biolaugungsexperimenten führte zu einer Steigerung der Goldausbeute (Kapitel 4.2.2.2. und Kapitel 10, Tabelle S 2). Die maximale Glycin-Konzentration von 11 g/l (150 mM) führte zur höchsten Goldausbeute, auch wenn eine Verringerung der Cyanidproduktion bei über 8 g/l Glycin für *Ps. fluorescens* beschrieben ist (Caicedo *et al.*, 2022). Aufgrund der Toxizität von Glycin während der Biolaugungsexperimente führt eine weitere Konzentrationserhöhung vermutlich nicht zur Steigerung der Goldausbeute. Eine Balance zwischen Cyanidproduktion, welches für die Solubilisierung der Metalle nötig ist, und Vermeidung von toxischen Effekten muss gefunden werden (Caicedo *et al.*, 2022, Faramarzi *et al.*, 2004, Gorji *et al.*, 2020). Threonin kann statt Glycin als Substrat verwendet werden (Castric, 1977), die Zugabe führte zu einer optimalen Goldausbeute im ersten DoE-Experiment. Auch bei früheren Experimenten wurde ein positiver Effekt auf die Cyanidproduktion nachgewiesen (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Für Methionin ist eine stimulierende Wirkung auf die Cyanidproduktion beschrieben (Nazly *et al.*, 1981). Auch ist eine Steigerung der Metallsolubilisierung bei Biolaugungs-

experimenten mit einem *Bacillus* Isolat beschrieben, wenn zusätzlich zu Glycin 1 g/l Methionin zugegeben wird (Thakur *et al.*, 2023). In den hier durchgeführten Experimenten wurde die Goldausbeute jedoch nicht durch Methioninzugabe erhöht. In *in vivo* Experimenten mit *Pr. megaterium* wurde ebenso wenig eine Erhöhung bei der Cyanidproduktion nach Zugabe von Methionin festgestellt (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Serin kann als Ersatz für Glycin zur Cyanidproduktion bei *Ps. aeruginosa* verwendet werden (Castric, 1977), in *Ch. violaceum* kann es Glycin nicht ersetzen (Nazly *et al.*, 1981). In dem hier erhaltenen Medium 47 war Serin (0,3 M) neben 150 mM Glycin auch enthalten, was für eine Rolle von Serin bei der Cyanidproduktion/Biolaugung von Pseudomonaden spricht. Bei den hier erhaltenen Ergebnissen wurde die Cyanidproduktion nicht direkt bestimmt, es wurden nur die Laugungseffizienzen betrachtet. Da jedoch eine höhere Cyanidproduktion zu einer höheren Metallausbeute führt, hängen beide Werte zusammen. Ein direkter Rückschluss ist jedoch nicht möglich.

Für Phenylalanin ist eine Steigerung des Wachstums, jedoch nicht der Laugungseffizienz, beschrieben (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020). Die eigenen Ergebnisse der Biolaugungsexperimente erlauben keine eindeutigen Schlüsse, ob Phenylalanin einen Einfluss auf die Biolaugungsaktivität besitzt. Glutamat kann als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen und die Cyanidproduktion steigern (Nazly *et al.*, 1981), in dieser Arbeit zeigte sich ein positiver Effekt bei den Biolaugungsexperimenten auf die Goldausbeuten. Auch bei Zugabe von Hefeextrakt war eine Steigerung der Goldausbeute messbar, jedoch ist hier nicht klar welche Bestandteile des Hefeextrakts für die Wirkung verantwortlich sind, da eine Vielzahl von Aminosäuren, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und Vitaminen enthalten sind (<https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/hefeextrakt/31012>, Aufruf Dezember 2023). Für Eisen- und Magnesiumsulfat ist eine positive Wirkung auf die Cyanidproduktion und die Biolaugung beschrieben (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020). Auch das hier verwendete Fe-(III)-citrat war in beiden Medien mit der höchsten Goldausbeute enthalten (Tabelle 33). In dem ersten *DoE*-Experiment wurde Fe-(III)-citrat nicht betrachtet, daher ist es nicht

in M6 enthalten. Magnesiumsulfat zeigte keinen positiven Effekt auf die Goldausbeute.

Ps. donghuensis G2#25 besitzt ein pH-Optimum bei 7,9 (Kapitel 3.2.2.3., Tabelle 27). Die höchsten Goldausbeuten wurden bei pH 7,2 bzw. 8 erreicht, was mit dem Optimum übereinstimmt. Aufgrund des pK_s -Werts von Cyanid ist eine Biolaugung im alkalischen Bereich erfolgreicher, da mehr Cyanid in Lösung vorliegt. Durch eine Adaption an alkalische pH-Werte wurde die Goldausbeute in früheren Veröffentlichungen gesteigert (Natarajan *et al.*, 2014). Die Adaption kann durch eine willkürliche Mutation unter Verwendung eines Mutagens erreicht werden. Dies ermöglichte auch die Verwendung von alkalischen Laugungssubstraten (Natarajan *et al.*, 2014). Die Zugabe von Cystein steigerte die Cyanidproduktion von *Pr. megaterium* (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020), wurde hier jedoch nicht berücksichtigt und bietet Potential zur Verbesserung der Biolaugungsausbeuten.

Die Zugabe von Medienzusätzen, insbesondere Aminosäuren, erhöht die Kosten für das jeweilige Medium. Zur ersten Einschätzung wurden für diese Analyse die Preise für Laborchemikalien verwendet. Das Standard LB-Medium mit Glycin ist das günstigste Medium (Tabelle 34). Das in der Medienoptimierung mit alkalisch vorbehandelter Elektroschrottasche 1 optimale Medium M6 führte zu einer mehr als verdoppelten Goldausbeute, jedoch waren auch die Medienkosten nahezu verdoppelt. M47 aus der zweiten *DoE* Medienoptimierung und M6 verursachen ca. gleich hohe Kosten, M18 ist mit 8,50 €/l das teuerste Medium. Bei den hier angegebenen Preisen ist zu beachten, dass die Preise teils schwanken und je nach Hersteller variieren. Es handelt sich hierbei um Laborchemikalien, welche in geringen Mengen erworben wurden. Für die industrielle Nutzung werden üblicherweise größere Mengen mit geringeren Reinheitsgraden gekauft, woraus sich ein günstigerer Preis ergibt. Bei Verwendung von M47 ist die Goldausbeute im Vergleich zu M18 21,5 $\mu\text{g Au}$ höher, der Preis für M47 ist geringer. M6 und M47 verursachen ähnliche Kosten, M47 führte zu einer höheren Goldausbeute. Bei jeder Medienoptimierung müssen sowohl die Edelmetallausbeuten als auch die Kosten des Mediums berücksichtigt werden, um den Erfolg der Medienoptimierung zu beurteilen. In dieser Arbeit wurde der Gewinn aus der Gold-

Tabelle 34 Übersicht über die Kosten für 1 l Biolaugungsmedium.

Medienbestandteil	Preis/kg ¹	LB pH 8 + Glycin	M6	M18	M47
Bacto Trypton	131 €	1,63 €	1,63 €	1,63 €	1,63 €
Natriumchlorid	27,90 €	0,17 €	0,17 €	0,17 €	0,17 €
Hefeextrakt	198,9 €	1,24 €	1,24 €	1,24 €	1,24 €
Glycin	40,9 €	0,35 €	0,31 €	0,46 €	0,46 €
Tris	111,6 €		0,68 €	0,68 €	0,68 €
Hefeextrakt	198,9 €		0,99 €	1,49 €	0,72 €
L-Threonin	271,6 €		0,49 €	0,49 €	0,49 €
L-Glutamat ²	332 €		1,85 €	1,97 €	1,63 €
L-Phenylalanin	299 €			0,37 €	0,38 €
Eisen-(III)-citrat	104,5 €				0,01 €
L-Serin	319 €				0,01 €
Magnesiumsulfat	86 €				0,1 €
Kosten 1 l Medium		3,39 €	7,36 €	8,50 €	7,52 €
Goldausbeute		192,8 µg Au	445,2 µg Au		
1. Medienoptimierung ³					
Goldausbeute		-	20,3 µg Au (24 h)	43,4 µg Au (48 h)	64,9 µg Au (72 h)
2. Medienoptimierung ⁴					

Listenpreise von der ¹Firma Carl Roth (Karlsruhe), Stand 27.09.2022 und ²Firma Sigma-Aldrich (Merck), Stand 22.02.2023. Jeweils die größte Verpackungseinheit wurde gewählt.

³Schüttelkolben Versuch zur Verifizierung der *DoE*-Ergebnisse mit alkalisch vorbehandelter Elektroschrottasche 1 nach 120 h (1 % Feststoff).

⁴Schüttelkolben Versuch zur Verifizierung der 2. *DoE*-Ergebnisse mit gemahlener Elektroschrottasche 1 (2,5 % Feststoff).

ausbeute nicht berechnet, da nach der Solubilisierung weitere Reinigungsschritte nötig sind, um Gold aus der Lösung zu gewinnen, wie zum Beispiel durch das *Carbon-in-Pulp*-Verfahren (La Brooy *et al.*, 1994). Hierbei kommt es zu einer Verringerung der Goldausbeute.

Das Mahlen der Elektroschrott-Verbrennungasche führte zu einer Verringerung der Goldlaugungseffizienz. Dieser Effekt bleibt unklar, da frühere Studien einen gegenteiligen Effekt zeigten, durch das Mahlen von Erzen (Substrat der Biolaugung) wurde dort die Biolaugungseffizienz erhöht (Shin *et al.*, 2013). Ein Vergleich der Effekte ist schwierig, da die hier verwendete Asche einen Goldgehalt von 406 µg/g besitzt, während die von Shin *et al.* verwendeten Erze einen maximalen Goldgehalt von 21 µg/g aufwiesen. Auch für Silber ist der Gehalt deutlich

höher mit über 2 000 µg/g als in den Erzen mit maximal 177 µg/g. Aufgrund der hohen Metallkonzentrationen der Elektroschrottasche wird vermutet, dass durch das Mahlen eine bessere Verfügbarkeit der Metalle erreicht wird, welche zu einer höheren Toxizität führt.

Ps. donghuensis G2#25 eignet sich für die Solubilisierung von Edelmetallen aus Zivilisationsabfällen. Für die Mehrzahl an Laugungs substraten zeigte jedoch *Ps. metallosolvens* höhere Goldlaugungseffizienzen. Für jedes Material sollten mehrere Bakterien getestet werden, um optimale Laugungseffizienzen zu erreichen. Eine Steigerung der Goldlaugungseffizienz durch Medienoptimierung, wie schon für *Ps. aeruginosa* und *Pr. megaterium* beschrieben (Gorji *et al.*, 2020), ist möglich.

Kapitel 5

Erhöhung der Cyanidproduktion von Ps. donghuensis G2#25 durch gezielte Promotor-/Operatorveränderungen mittels CRISPR/Cas9

Beiträge anderer

In Zusammenarbeit mit	Christian Zurek	BRAIN Biotech AG
Biolaugungsexperimente, Abb. 34 oben	Annabelle Klämke, Gina Kuippers	
CCTop Spacer Analyse	Jan Ziegler	
ICP-MS Messungen	Annabelle Klämke	
Cyanidmessung <i>ΔgacA</i>	Kento Amann	TU Darmstadt

TGCTCCTCCCTTGTGCATTCAAATCGGGTCACCGATTTGAATGCACCTTTTCTAGA TCGC
 Terminator
 CCGTTGAC AACGTCGGCCAGATAAGCACAGGCCATCTGCCCTGTTTTGTCCGGT TGTC
 GGCAAGCA GACCATTAGCTGGCCTGGATCAAATAGACCAGGCGCGCCTTGGCATTAGTGT
anr-Box -10
 GCGCAGTCCATGTTTCTTTTTACGGACGAAAAGCTATGCAGACTCTGGAGCGAAAAGCTT
 +1 S/D M Q T L E R K L

5. Erhöhung der Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25 durch gezielte Promotor-/Operatorveränderungen mittels CRISPR/Cas9

5.1. Einleitung

5.1.1. Regulation der Expression des *hcn*-Gen-clusters

Die Expression der *hcn*-Gene wird durch verschiedene Mechanismen reguliert und unterscheidet sich teils bei den Cyanidproduzenten. Die Cyanogenese hängt bei allen bisher bekannten Cyanidproduzenten von dem anaeroben Regulator ANR ab (Blumer *et al.*, 2000a, Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000, Zimmermann *et al.*, 1991), einem Homolog zu dem *E. coli* Fumarat und Nitrat Reduktase Regulator FNR (Zimmermann *et al.*, 1991). Eine Deletion von ANR führt zu einer Verringerung der Cyanidproduktion (Blumer *et al.*, 2000a, Laville *et al.*, 1998, Zimmermann *et al.*, 1991). FNR ist ein Sauerstoffsensoren und wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff reguliert (Lambden *et al.*, 1976, Lazazzera *et al.*, 1996). Beide funktionieren ähnlich als Transkriptionsfaktoren und Regulatoren für eine Vielzahl von anaerob oder mikrooxygenen regulierten Genen (Unden *et al.*, 1991, Ye *et al.*, 1995, Zimmermann *et al.*, 1991). Die Funktion wurde bereits für Pseudomonaden gezeigt (Højberg *et al.*, 1999, Ye *et al.*, 1995). Bei der Regulation der Transkription des Cyanidsynthesegenclusters bindet ANR an die *anr*-Box in der Promotorregion von *hcnABC* (Pessi *et al.*, 2000, Winteler *et al.*, 1996). In der aktiven Form liegt ANR als Dimer vor und bindet an die DNA (Lazazzera *et al.*, 1996). ANR reguliert zudem die Expression von Genen für Cyanid-insensitive Oxidasen (CIO) und weiteren terminalen Oxidasen (Ugidos *et al.*, 2008). Eine geringe Sauerstoffverfügbarkeit führt zur Inaktivierung von *anr*, was zu einer Steigerung der Expression von CIO-Genen führt (Ugidos *et al.*, 2008).

Die Promotorregionen von *hcnA* in *Ps. fluorescens* und *Ps. aeruginosa* unterscheiden sich, gemeinsam ist jedoch die *anr*-Box (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Bei *Ps. aeruginosa* sind im Gegensatz zu *Ps. fluorescens* *lux*-Boxen vorhanden (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass die Sequenzen der *lux*-Boxen konserviert sind (Latifi *et al.*, 1995). Die beiden *quorum sensing* Regulatoren LasR und RhlR

binden an diese Boxen und regulieren dadurch die Genexpression (Pessi *et al.*, 2000, Abb. 24). Beide Regulatoren gehören zu LuxR Familie und sind für die Regulation von verschiedenen Virulenzfaktoren und sekundären Metaboliten zuständig (Latifi *et al.*, 1995). Die Regulatorproteine bestehen aus zwei Domänen. Ein für DNA-bindende Proteine charakteristisches *helix-turn-helix* Motiv ist am C-Terminus lokalisiert. Die andere Domäne stellt eine Bindestelle für einen Autoinducer da, diese ist am N-Terminus lokalisiert (Latifi *et al.*, 1995, Shadel *et al.*, 1990, Slock *et al.*, 1990).

Die drei Regulatoren LasR, RhlR und ANR agieren bei der Regulation der Cyanidproduktion abhängig voneinander (Pessi *et al.*, 2000). Für eine optimale Expression der Cyanidsynthesegene von *Ps. aeruginosa* ist die Anwesenheit aller drei Regulatoren nötig (Pessi *et al.*, 2000). In *Ps. fluorescens* werden die *quorum sensing* Regulatoren LasR und RhlR nicht für die Cyanogenese benötigt (Blumer *et al.*, 2000a, Pessi *et al.*, 2000). Die Cyanogenese ist in *Ps. aeruginosa* PA01 und *Ps. fluorescens* CHA0 von dem globalen Aktivator GacA abhängig (Laville *et al.*, 1992, Pessi *et al.*, 2001). Die Regulation findet über GacA-gesteuertes *quorum sensing* statt (Pessi *et al.*, 2001). Das GacS/A System ist ein 2-Komponenten System (Übersicht in Song *et al.*, 2023). GacA stellt hierbei den Antwort-Regulator dar und GacS ist eine komplex aufgebaute Sensorikine (Fadel *et al.*, 2022). GacS/A regulieren die Expression von sekundären Metaboliten, wie beispielsweise Siderophore und Virulenzfaktoren (Überblick in Song *et al.*, 2023). Hierzu zählt auch die Regulation der *hcnABC*-Expression. Zudem ist das System an der Regulation von beispielweise der Biofilmbildung und der Motilität beteiligt. Viele weitere Reaktionen und Produktionen werden hierdurch gesteuert (Überblick in Song *et al.*, 2023). Ein Beispiel ist die Kontrolle der Biofilmbildung in *Ps. aeruginosa*, wobei das sensierte Signalmolekül bislang unbekannt ist (Parkins *et al.*, 2001). GacA reguliert nach der Aktivierung unter anderem die Expression der Gene *rsmY* und *rsmZ*, zwei kleinen RNAs (Brencic *et al.*, 2009). Die

```

1   GAACGCGGGTAGACCTGGTAGATCACCGCGCGTTTCCACCAGGGCGGCTGGAAGGATTGC
      lux β
61  AGCATGGGGCCTCCACGGGTGAGCCGGCTTTGCTGCTTGGCACCCCTGGGGTAGGCGCGGG
121 TTCGACTTTTCCGCGCGAACGCCTGCACCCCACCTACCAGAATTGGCAGGGGAAGATACC
      lux α
181 CACCTGTCATGGATCAAATGTCCTCGCCCCGGCCCGACTCCTAGTGTGCGCCGGCTCCCGACT
      anr-Box   -10   T1   -10   T2
241 CTCTCTCACGGATGAAAGGGCAATGCACCTTCTTGAACGTCAACACGATATCCAGCCCCT
      S/D           M H L L E R Q H D I Q P L
  
```

Abbildung 24 *hcnA* Promotor- und Operatorbereich von *Ps. aeruginosa*. Die Transkription wird von ANR (Fett, Bindestelle *anr-box*) und den *quorum sensing* Regulatoren LasR und RhIR (Bindestellen *lux*-Boxen) reguliert. *Ps. aeruginosa* besitzt zwei *lux*-Boxen (Rot) und zwei Transkriptionsstarts (Türkis). Unterstrichen: -10 Box; Grün: Shine-Dalgarno Sequenz. Zeichnung der Promotor-/Operatorelemente nach Angaben von Pessi *et al.*, 2000.

kleinen RNAs aktivieren das RNA-Bindeprotein RsmA (*regulator of secondary metabolites*), dieses reguliert die Translation von der Ziel mRNA und beeinflusst somit die Proteinproduktion (Janssen *et al.*, 2018). In *Ps. aeruginosa* reguliert das GacS/A System auch die Produktion von N-butyryl-L-Homoserinlactonen, welche wiederum die Produktion von Cyanid beeinflussen (Reimann *et al.*, 1997).

Eine Deletion von GacA oder GacS in *Ps. fluorescens* CHA0 verhinderte die Cyanidproduktion nahezu vollständig (Blumer *et al.*, 2000a, Valverde *et al.*, 2003). Deletionsmutanten der jeweiligen *small regulatory* RNAs (sRNA) zeigten vergleichbare Cyanidproduktion wie der Wildtyp, nur die Deletion beider sRNAs führte zu einer Verringerung der Cyanidproduktion (Valverde *et al.*, 2003).

Die Transkription von *hcnABC* ist zusätzlich abhängig von Eisen, auch die Aktivität von ANR ist abhängig von Eisen (Blumer *et al.*, 2000a). Eine Deletion des *upstream* Bereichs der *hcnABC anr-Box* führte zu einer erhöhten Transkription. Eine Sequenzveränderung der -10 Box führte nur in Anwesenheit von Sauerstoff zu einer erhöhten Expression (Blumer *et al.*, 2000a).

5.1.2. Entkoppeln der *hcnABC*-Expression von der *quorum sensing* Regulation (nach Tay *et al.*, 2013)

Die Transkription des *hcn*-Operons kann von der nativen Regulation im Genom teilweise

entkoppelt werden. Der native *hcnABC*-Promotor kann durch exogene Promotoren ersetzt werden, um die Cyanidproduktion zu steigern. In *Ch. violaceum* wurde ein zweites *hcnABC*-Operon in das Genom eingeführt. Das zweite Operon wurde durch exogene Promotoren reguliert und lag neben dem nativen *hcnABC*-Operon vor. Als exogene Promotoren wurden hierbei *P_{BAD}* und *P_{TAC}* verwendet. Die Cyanidproduktion war induzierbar und höher als beim Wildtyp. Auch die Goldlaugungseffizienz wurde durch die veränderte Cyanidproduktion mehr als verdoppelt (Abb. 25).

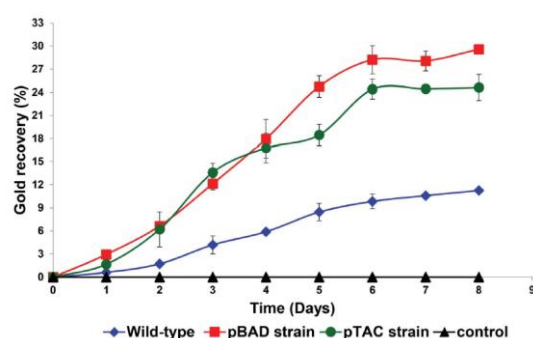


Abbildung 25 Goldlaugungseffizienz von *Ch. violaceum* mit einem zweiten durch exogene Promotoren regulierten *hcnABC*-Operon mit Elektroschrott. Die *P_{BAD}*-Mutante wurde mit 0,002 % L-Arabinose induziert, *P_{TAC}* mit 1 mM IPTG (Bild aus Tay *et al.*, 2013; „Diese Abbildung ist lizenziert unter der Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs 3.0 Unported Lizenz.“ Folgend ist eine Kopie der Lizenz einsehbar <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

5.1.3. Induzierbare und *quorum sensing* abhängige Promotoren in Pseudomonaden

Verschiedene funktionale Promotoren in Pseudomonaden wurden bereits beschrieben. Diese könnten sich zur Erhöhung der Transkriptmenge des *hcnABC*-Operons eignen.

Für die Expression von Genen durch induzierbare Promotoren wurden in *Ps. putida* die induzierbaren Promotoren P_{Sal} (induzierbar durch Salicylate), P_{RhaB} (induzierbar durch Rhamnose), P_{AlkB} (induzierbar durch Alkane), P_{Lac} (induzierbar durch Lactose), P_M (induzierbar durch 3-Methylbenzoate) und P_{AraB} (induzierbar durch Arabinose) erfolgreich verwendet (Calero *et al.*, 2016, Cook *et al.*, 2018). Der aus *E. coli* stammende Anhydrotetrazyklin-induzierbare Promotor P_{Tet} ist nicht funktional in *Ps. putida* (Cook *et al.*, 2018). P_{Xut} ist ein weiterer induzierbarer Promotor, der aus *Ps. fluorescens* Pf01 stammt (Callaghan *et al.*, 2020). Der Promotor ist durch kostengünstige Xylose induzierbar und wird durch XutR reguliert. In *E. coli* ist er jedoch nicht funktional (Callaghan *et al.*, 2020).

Das 2-Komponenten System RoxS/R aus *Ps. putida* KT2440 ist ein *quorum sensing* System (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004, Fernández-Piñar *et al.*, 2008). RoxS codiert für die Sensor Histidinkinase und RoxR für den Antwort-Regulator (Comolli *et al.*, 2002). Die *upstream* Regionen der von dem 2-Komponenten-System regulierten Gene *ddcA* und PP_3332 wurden unter der Bezeichnung P_{Rox} verwendet und ermöglichten eine Zelldichte-abhängige Expression von Genen (Meyers *et al.*, 2019). Die Veränderung der Pribnow Box zu einer σ^{70} -Konsensus Sequenz führt zu einer zusätzlichen Steigerung der Zelldichte-abhängigen Expression (Meyers *et al.*, 2019).

5.1.4. Das CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas-System kommt nativ nur in Prokaryoten vor (Jansen *et al.*, 2002). In 84 % der Archaea und 45 % der Bakterien ist das CRISPR/Cas-System wahrscheinlich vorhanden (Grissa *et al.*, 2007, Update 2015 der vorhergenannten CRISPR Datenbank, genannt in Rath *et al.*, 2015). Die Grundlage des Systems bildet eine charakteristische DNA-Region mit dem Namen *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*

Repeats, kurz CRISPR (zusammengefasst in Rath *et al.*, 2015). Diese Region besteht aus zwei charakteristischen Bereichen (Bolotin *et al.*, 2005, Jansen *et al.*, 2002). Ein Bereich besteht aus kurzen repetitiven Sequenzen, der andere Bereich aus DNA-Sequenzen mit spezifischen Sequenzen (Spacer). Die repetitiven werden von den spezifischen Sequenzen unterbrochen (Bolotin *et al.*, 2005, Jansen *et al.*, 2002). Die Spacer Sequenzen besitzen Ähnlichkeiten zu extrachromosomaler Fremd-DNA, hauptsächlich zu der DNA von Phagen und sorgen für die Immunität des Bakteriums gegen die Ziel-DNA (Bolotin *et al.*, 2005, Mojica *et al.*, 2005). Bei einem Einbau eines neuen Spacers, also von Fremd-DNA, kann neue Fremd-DNA erkannt werden und somit eine Resistenz erworben werden (Barrangou *et al.*, 2007). Das CRISPR/Cas9-System dient folglich zur Verteidigung gegen aufgenommene Fremd-DNA (Barrangou *et al.*, 2007). Die umliegenden Gene codieren teils für Nukleasen, die die Ziel-DNA schneiden (zusammengefasst in Barrangou, 2013). Dieser Schnitt der Cas9-Nukleasen ist Sequenz-spezifisch und durch kurze RNA geführt (Cong *et al.*, 2013). Dies ist auch in der DNA von Eukaryoten möglich (Cong *et al.*, 2013).

Zwei RNA-Abschnitte des CRISPR-Systems sind hierfür notwendig, die CRISPR RNA (crRNA) und die *trans-activating* crRNA (tracrRNA, Jinek *et al.*, 2012). Es ist möglich, beide RNAs als eine RNA-Chimäre zu transkribieren, die *single-guide* RNA (sgRNA). Die sgRNA führt die Cas9 zu der Ziel-DNA, dort interagiert Cas9 mit dem *Protospacer adjacent Motif* (PAM) und es kommt zu einem Schnitt beider DNA-Stränge, sodass ein Doppelstrangbruch entsteht (Jinek *et al.*, 2012).

5.1.5. CRISPR/Cas9 in Pseudomonaden

Das CRISPR/Cas9-System kann in Pseudomonaden angewendet werden (Chen *et al.*, 2018a, Chen *et al.*, 2018b, Ho *et al.*, 2020). Deletionen von einigen Genen sind mit einem Einplasmid-System möglich, welches das *cas9* Gen, die sgRNA und die Reparaturarme (je 1000 bp) enthält (Chen *et al.*, 2018b). Aufgrund der niedrigen intrinsischen homologen Rekombinationsfähigkeit von Pseudomonaden sind Deletionen nicht bei allen Genen erfolgreich. Ein 2-Plasmid System steigert die Anzahl an positiven Transformatanten. Auf einem Plasmid ist die Cas9-Nuklease

mit dem Lambda-Red System codiert, auf dem zweiten Plasmid die sgRNA mit Spacersequenzen und Reparaturfragmenten. Für ein schnelleres und gezieltes Plasmid-Curing sind auf beiden Plasmiden Gene für die Levansucrase vorhanden. Die Elektroporation findet in zwei Stufen statt, die Plasmide werden nacheinander in das Bakterium eingebracht. Mit dem 2-Plasmid System sind Deletionen bis 3 000 bp möglich (Chen *et al.*, 2018b). Die Transformation von Pseudomonaden ist sowohl mit Elektroporation als auch mit Konjugation möglich (Chen *et al.*, 2018a, Chen *et al.*, 2018b).

5.1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieses Kapitels ist es, durch gezielte Veränderungen im *hcnABC*-Promotor- und Operatorbereich von *Ps. donghuensis* G2#25 die Cyanidproduktion und damit auch die Laugungseffizienzen zu steigern. Bekannte Regulatoren sollten im Genom identifiziert werden, um den Operatoraufbau und die Regulation von *hcnABC* zu analysieren. Auf Grundlage der Promotorstrukturen sollten dann die Mutationen geplant werden. Die Promotor-/Operatormutationen sollten direkt im Genom vorgenommen werden. Hierfür sollte ein CRISPR/Cas9-System für *Ps. donghuensis* G2#25 etabliert werden.

5.2. Ergebnisse

Zur Verbesserung der Biolaugungseigenschaften sollte die Cyanidproduktion des Eigenisolats *Ps. donghuensis* G2#25 gesteigert werden. Hierfür wurden verschiedene heterologe und induzierbare Promotoren verwendet. Die Veränderungen des Promotor- und Operatorbereichs wurden mit dem CRISPR/Cas9-System durchgeführt.

5.2.1. Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in *Ps. donghuensis* G2#25

Ein in *E. coli* und *Pseudomonas* replizierendes Plasmid, optimiert für die CRISPR/Cas9-Klonierung, wurde von der BRAIN Biotech AG bereitgestellt. Das Plasmid pCas9 enthielt die Gensequenz für die Cas9-Nuklease und eine Kanamycin-Resistenzgenkassette (Kapitel 2.2.2.8., Abb. 4). Zudem wurde das Kontrollplasmid pBBR1MCS-2 zur Verfügung gestellt, was in *E. coli* und *Pseudomonas* repliziert (Kovach *et al.*, 1995). Ein Protokoll zur Elektroporation von Pseudomonaden wurde ebenfalls von der BRAIN Biotech AG bereitgestellt. Eigene Experimente zeigten, dass eine Anpassung der DNA-Menge zu einer erhöhten Transfomeffizienz führte (Tabelle 35). Außerdem wurde gezeigt, dass das Reparaturfragment auf dem Plasmid kodiert sein muss, um eine Reparatur des Doppelstrangbruchs zu gewährleisten. Eine Transformation von *Ps. donghuensis* mit 90 bp langen Oligos war nicht erfolgreich.

Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um zu testen ob *Ps. donghuensis* G2#25 transformierbar war. Zu Beginn wurde die Antibiotikaresistenz von *Ps. donghuensis* G2#25 bestimmt. G2#25 zeigte eine Resistenz gegenüber Ampicillin (100 µg/ml), war aber sensitiv gegenüber Kanamycin (25 µg/ml; Daten nicht gezeigt). Die Transkription von *cas9* auf pCas9 war durch den durch L-Arabinose induzierbaren *P_{BAD}*-Promotor reguliert. Ein Abbau von L-Arabinose durch G2#25 würde zu einer Steigerung der erforderlichen Induktionsmenge führen.

Ps. donghuensis G2#25 zeigte kein Wachstum mit 0,2 % L-Arabinose als einziger C-Quelle (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde getestet, ob *Ps. donghuensis* G2#25 durch Elektroporation transformierbar war. Die höchste Anzahl transformierter Kolonien nach Elektroporation traten bei 100 ng Plasmid-DNA auf, wobei auch bei 1 ng und 10 ng Kolonien auftraten (Tabelle 35). Die Kolonienanzahl war nach der Elektroporation mit pCas9 geringer als nach der Elektroporation mit pBBR1MCS-2. Die Transformation mit pCas9 schien mehr Stress in den Bakterien zu verursachen.

Tabelle 35 Anzahl der Kolonien nach der Transformation von *Ps. donghuensis* G2#25 in Abhängigkeit der DNA-Menge.

Plasmid	1 ng	10 ng	100 ng
pBBR1MCS-2	1 401	n.B.	nicht zählbar
pCas9	3	22	1 156

n.B.: nicht bestimmt.

Das Einfrieren der für die Elektroporation vorbereiteten *Ps. donghuensis* G2#25 Zellen bei -80 °C führte zu einer Verringerung der Transformationseffizienz um mehr als den Faktor 100 (pBBR1MCS-2: $8,3 \times 10^7$ CFU/µg*ml kompetenter Zellen, nach Einfrieren: $1,9 \times 10^5$ CFU/µg*ml kompetenter Zellen). Daher wurden für die Elektroporationen frisch hergestellte Zellen verwendet. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transformation von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden die Plasmide re-isoliert und *E. coli* damit retransformiert (Abb. 26 oben). Es zeigten sich bei der gelelektrophoretischen Analyse der Plasmid-isolationen aus *Ps. donghuensis* G2#25 DNA-Verunreinigungen, die auch bei dem nicht transformierten Wildtyp sichtbar waren.

Kontrollrestriktionen mit *Xba*I und *Xho*I ergaben das erwartete Bild (pCas9: 4 135 bp + 6 733 bp, pBBR1MCS-2: 5 081 bp; Abb. 26 unten). Aufgrund der geringen Größe war ein zweites Fragment von pBBR1MCS-2 (63 bp) nicht sichtbar.

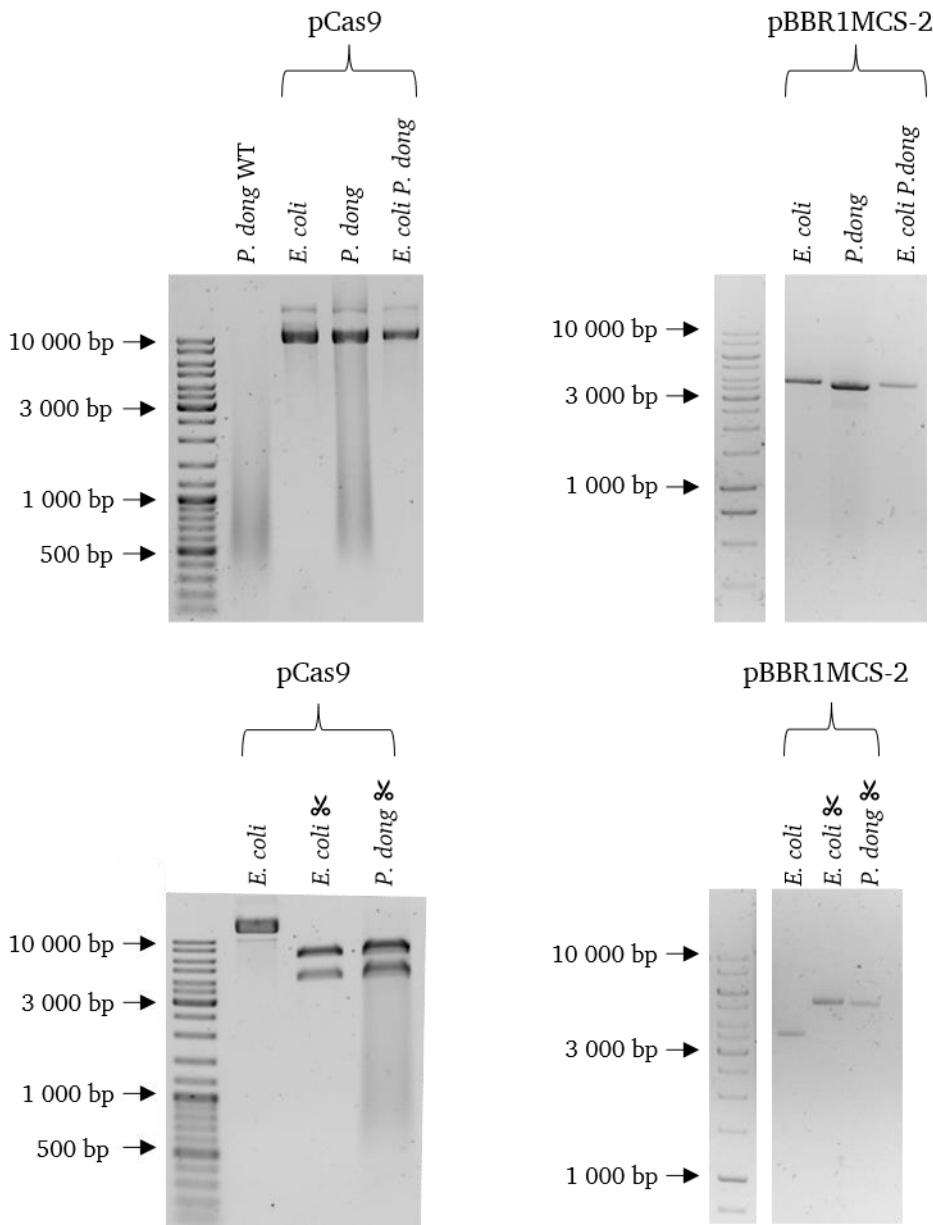


Abbildung 26 Gelelektrophoretische Analyse der Plasmide pCas9 und pBBR1MCS-2 isoliert aus *Ps. donghuensis* G2#25 und *E. coli*. Oben: Auftrag der Plasmidpräparationen ungeschnitten, unten mit *Xba*I und *Xho*I geschnitten. *Ps. dong* WT: Plasmidisolierung aus *Ps. donghuensis* G2#25 ohne vorheriges Einbringen eines Plasmides. *Ps. donghuensis* G2#25 wurde mit den aus *E. coli* isolierten Plasmiden transformiert, anschließend das Plasmid isoliert und *E. coli* damit re-transformiert. 1 %ige Agarosegele mit Ethidiumbromid (links) oder Midori Green (rechts) gefärbt. Marker: GeneRuler DNA Ladder Mix (jeweils links)/GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (jeweils rechts). *P. dong* = *Ps. donghuensis* G2#25.

5.2.2. Analyse der Genomsequenz von *Ps. donghuensis* G2#25 in Bezug auf Regulatorbindestellen und Regulatorgene

Da die Transformation von *Ps. donghuensis* G2#25 mit pCas9 und pBBR1MCS-2 erfolgreich verlaufen war, wurde die Promotor- und Operatorregion von *hcnA* analysiert. Die genomische DNA war zuvor durch die Nanopore

Technologie sequenziert und das *hcnABC*-Operon identifiziert worden (Kapitel 6.2.1.).

Im DNA-Bereich *upstream* von *hcnA* wurde, neben einer Shine-Dalgarno Sequenz, eine *anr*-Box und zwei -10 Boxen vorhergesagt (Abb. 27; vgl. Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Daher wurde auf Promotor- und Operatorebene geschlossen, dass das *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC*-Operon durch ANR reguliert wird. Ein bioinformatisch bestimmter Transkriptionsstart



Abbildung 27 *hcnA*-Promotor- und Operatorbereich von *Ps. donghuensis* G2#25. *anr*-Box (fett), zwei -10 Boxen (unterstrichen). Grün: Shine-Dalgarno Sequenz. Grau: vorhergesagte Terminatorsequenz *upstream* von *hcnA*. Blau: *stems* des *stemloop*. Rot: palindromische Sequenz, möglicherweise ein Operator. Türkiser Hintergrund: bioinformatisch vorhergesagte Transkriptionsstarts. **Fett-kursiv**: experimentell bestimmte Transkriptionsstarts (Kento Amann, persönliche Mitteilung). Der Anfang des *hcnA open reading frames* ist am Ende dargestellt.

wurde experimentell bestätigt. Der zweite bioinformatisch bestimmte Transkriptionsstart wurde experimentell nicht bestätigt (experimentelle Transkriptionsstarts: Kento Amann, persönliche Mitteilung). Eine palindromische Sequenz wurde zwischen der *anr*-Box und der S/D-Sequenz identifiziert, diese stellt womöglich eine Operatorsequenz vergleichbar einer *lux*-Box dar (Abb. 27, rot). Eine Regulation, wie bei *Ps. aeruginosa*, durch die *quorum sensing* abhängigen Regulatoren LasR und RhlR (Pessi *et al.*, 2000) ist folglich denkbar. *Upstream* von *hcnA* wurde ein *stemloop*, also eine mögliche Terminatorstruktur von einem Gen, welches für ein Protein der FUCS-Familie *upstream* von *hcnA* kodiert, vorhergesagt (Kapitel 6.2.2., Abb. 39).

Zur Vermeidung von polaren Effekten auf *hcnA* wurden der Terminator und dessen *upstream* Bereich nicht verändert (Abb. 27, 29).

Die palindromische Sequenz wurde mit bereits beschriebenen *lux*-Boxen verglichen (Latifi *et al.*, 1995, Pessi *et al.*, 2000). Die hier identifizierte Sequenz unterscheidet sich von den bisher bekannten Sequenzen (Abb. 28). Es ist fraglich, ob diese wirklich eine *lux*-Box darstellt. Das Grundprinzip mit *inverted repeats* ist jedoch vorhanden, Regulatorprotein-Dimere können dort binden. Das Regulatorprotein kann auch aus einer anderen Regulatorfamilie stammen, daher die unterschiedliche Sequenz.

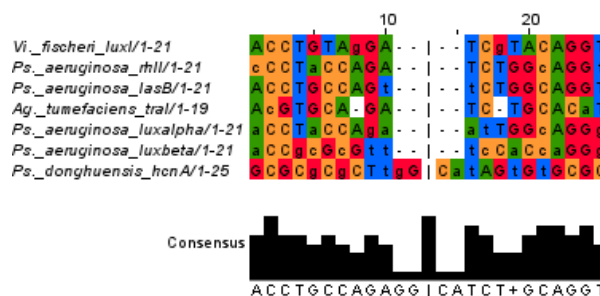


Abbildung 28 Vergleich bisher bekannter *lux*-Boxen mit der in *Ps. donghuensis* identifizierten palindromischen Sequenz. verändert nach Latifi *et al.*, 1995. Die Sequenzen der *lux*-Boxen von *Ps. aeruginosa hcnA* (Pessi *et al.*, 2000) und die in dieser Arbeit vorhergesagte *lux*-Box wurden ergänzt. Nicht symmetrische Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Darstellung aus JALVIEW.

Nach der Analyse der Promotor- und Operatorregion wurde das Genom hinsichtlich bekannter Regulatorgene von *hcnABC*-Operons analysiert (elektronische Anhang, Übersicht Kapitel 11). Die Aminosäuresequenzidentität von *Ps. aeruginosa* ANR mit *Ps. donghuensis* G2#25 lag bei 91 %, was bedeutet, dass das Eigenisolat auch das ANR-System besitzt (Tabelle 36, Sequenz *Ps. donghuensis* G2#25 ANR im elektronischen Anhang, Übersicht Kapitel 11). Die Gene des 2-Komponentensystems *gacSA* sind mit hoher Ähnlichkeit zu *Ps. fluorescens* in dem Eigenisolat vorhanden. Die *quorum sensing* Regulatoren LasR, RhlR und LuxR hatten eine niedrige Aminosäuresequenzidentität von 25 bis 35 % zu

entfernt ähnlichen Proteinen aus denselben Sequenzfamilien, was bedeutet, dass das Eigenisolat diese Regulatoren vermutlich nicht besitzt.

Zur Planung der Promotor-/Operatormutanten wurde das Vorhandensein von Regulatorgenen für verschiedene *quorum sensing* abhängige oder induzierbare Promotoren untersucht. Das *quorum sensing* System RoxS/R wurde erstmals in *Ps. putida* KT2440 identifiziert (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenzidentität von *Ps. putida* KT2440 mit *Ps. donghuensis* G2#25 betrug für RoxS 90 % und RoxR 94 % (Sequenz *Ps. donghuensis* G2#25 RoxS/R im elektronischen Anhang, Übersicht Kapitel 11). Die Gene sind folglich im Genom vorhanden. Ein Austausch des nativen Promotors von *hcnA* gegen den modifizierten Rox Promotor (Meyers *et al.*, 2019) ist folglich sinnvoll, da nur der Promotor und nicht die entsprechenden Gene inseriert werden müssen.

Die Aminosäuresequenzidentitäten von XutR (Regulator des Xylose induzierbaren Promotors) und RhaR (Regulator des Rhamnose induzierbaren Promotors) lagen bei 35 bzw. 29 %. Die Gene zur Regulation der induzierbaren Promotoren wurden nicht im Genom des Eigenisolats identifiziert. Zur Erstellung und Verwendung von XutR- oder RhaR-spezifischer Promotoren in *Ps. donghuensis* G2#25 musste somit auch das jeweilige Regulatorgen ins Genom oder auf einem Expressionsplasmid eingebracht werden.

Tabelle 36 Analyse der Genomsequenz von *Ps. donghuensis* G2#25 hinsichtlich bekannter Regulatoren des *hcnABC*-Operons und weiterer Regulatoren.

Regulator	Referenzsequenz	AS-Sequenzidentität [%]
ANR	AAA25713.1 <i>Ps. aeruginosa</i> PA01	91
GacA	BAB41136.1 <i>Ps. fluorescens</i>	93
GacS	AAT41590 <i>Ps. fluorescens</i>	79
LasR	WP_003082999.1 <i>Ps. aeruginosa</i> PA01	29
RhlR	ACI42868.1 <i>Ps. aeruginosa</i>	35
LuxR	EJZ57917.1 <i>Ps. fluorescens</i> R124	25
RoxR	WP_003255244.1 <i>Ps. putida</i> KT2440	93,6
RoxS	AAN66512.1 <i>Ps. putida</i> KT2440	89,9
XutR	ABA74047.1 <i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	35
RhaR	CAC9694820.1 <i>Ps. putida</i>	29

5.2.3. Erstellung und Charakterisierung der Promotor-/Operatormutanten

Zur Erhöhung der Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden Promotor-/Operatormutationen des *hcnABC*-Operons vorgenommen. Zunächst wurden Spacer-Sequenzen ausgewählt, die einen Schnitt der Cas9-Nuklease in dem zu verändernden Bereich ermöglichen (Kapitel 2.2.2.8. Design Spacer-Sequenzen). Spacer 9 wurde zur Deletion des Bereichs *upstream* der *anr*-Box verwendet, Spacer 14 zur Veränderung der -10 Box (Abb. 29).

Die Veränderung der -10 Box und die Deletion des *upstream* Bereichs der *anr*-Box hatten zu einer gesteigerten Transkription eines *hcnA* β -Galactosidase Fusionsgens in *Ps. fluorescens* CHA0 in Anwesenheit von Sauerstoff geführt (Blumer *et al.*, 2000a). Eine der vorhergesagten *Ps. donghuensis hcnA* -10 Boxen wurde, wie in Blumer *et al.*, 2000a beschrieben, verändert, um die Expression und somit die Cyanidproduktion zu steigern (Abb. 29). Zudem wurde das *protospacer adjacent motif* (PAM) des verwendeten Spacer 14 in ATG (vorher AGG) geändert, sodass nach erfolgreicher Mutation kein erneuter Schnitt im Genom mehr möglich war. Zur leichteren Identifizierung der Mutanten wurde eine *BspHI* Schnittstelle eingefügt.

```

1   CAAAGCGATCATGTGAGTACTCTGCTACAGACGCTAATCGCGGTTCTGAACAGACATAACG
61  TGCTCCTCCCTTGTGCATTCAAATCGGGTCACCGATTTGAATGCACTTTCTAGAATCGC
      Terminator
121 CCGTTGAGAAACGTCGGCCAGATAAGCACAGGCCATCTGCCCTGTTTTGTCGGTTTGTCC
      Spacer 9
181 GGCAAGCAGACCCATTAGCTGGCCTGGATCAATAGACCAGGCGCGCCTTGGCATAGTGT
      anr-Box   TCATGA   TATAAT
      -10
241 GCGCAGTCCCATGTTTCTTTTTACGGACGAAAGCTATGCAGACTCTGGAGCGAAAGCTT
      S/D           M Q T L E R K L
301 GATATCCAGCCCCTGTGCGGGCGGACATGACCATCGAACTCAACGGCCAGGCAGTCGCT
      D I Q P L S R A D M T I E L N G Q A V A

```

Abbildung 29 Übersicht über die Veränderungen des Promotor- und Operatorbereichs von *hcnA*. Spacer 9 wurde zur Deletion des Bereichs zwischen dem Terminator und der *anr*-Box verwendet. **Orange**: deletierter Bereich inklusive Spacer 9 bei der Mutante Δ *upstreamANR*, die *anr*-Box wurde hierbei nicht deletiert. Spacer 14 diente zur Veränderung der -10 Box. In **blau** sind die Punktmutationen, um die -10 Box und die PAM-Sequenz von Spacer 14 zu verändern, dargestellt. Zudem wurde eine *BspHI* Schnittstelle eingefügt. Die im Vergleich zur Genomsequenz unveränderten Basen sind jeweils in schwarz, rot oder lila über der Genomsequenz dargestellt. **Lila**: PAM-Sequenzen der Spacer. **Fett-kursiv**: Experimentell bestimmte Transkriptionsstarts (Kento Amann, persönliche Mitteilung).

In einem unabhängigen Experiment wurde der Bereich zwischen der *anr*-Box und dem möglichen Terminator in *Ps. donghuensis* G2#25 deletiert (Abb. 29, oranger Bereich).

Weitere Promotor-/Operatormutationen beruhen auf einem Austausch des Bereichs *upstream* von *hcnA* gegen induzierbare oder *quorum sensing* abhängige Promotoren (P_{BAD} , P_{TAC} , P_{RhaB} , P_{Xut} ,

und P_{Rox} ; Kapitel 2.2.2.8. Konstruktion der Cas9 Vektoren, Abb. 30).

Zunächst wurde die Funktionalität der Spacer *in vivo* getestet, um einen Schnitt im Genom sicherzustellen. *Ps. donghuensis* G2#25 wurde mit den Plasmiden transformiert, welche das *cas9*-Gen und die sgRNA mit den Spacer-Sequenzen enthielten (Kapitel 2.1.3. Plasmide 28+29).

```

1   CAAAGCGATCATGTGAGTACTCTGCTACAGACGCTAATCGCGGTTCTGAACAGACATAACG
61  TGCTCCTCCCTTGTGCATTCAAATCGGGTCACCGATTTGAATGCACGCCTCCTTTTCGTGT
      Terminator
121 TTCGCAGCGGCCTGAGCGAGTGCCGCTGATCACTGAAAAACAAAAGCCGGGACGGTAAT
181 GCGCCCCGGCTTTTGTTTGAGCCGATGAAAACCCTGCCAAGAGTAAAACACCGGATCAGC
      PRox3061
241 TTCAACGTAGCACGGCACCTGCAAGCCGCCACCCTGCGACGGTTCGCCGCACCCTGCCAG
      Rox RE
301 CCAGACCGGTAGATGAAGCCCTGACACCGCACATGCGTTCAGAACGTCGCACCTGACAGGG
      -35 Box
361 ATAACCAGGCTCTTATAATCTGCCTTCCAATAAAAAACCTGAGAGGTCGGTCATGCAGA
      -10 Box   +1           S/D           M Q T

```

Abbildung 30 Austausch des nativen *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnA* Promotor- und Operatorbereichs durch den *quorum sensing* abhängigen Rox Promotor/Operator (orange). $P_{Rox3061}$ aus Meyers *et al.*, 2019. **Blau**: Transkriptionsstart. **Grün**: Shine-Dalgarno Sequenz. **Pink**: RoxR Erkennungselement (Rox RE).

Ein Reparaturfragment war nicht enthalten. Beide Spacer führten zu einer Reduktion der Kolonienzahl (Daten nicht gezeigt), der Schnitt im Genom war also erfolgreich. Die Transkription des *cas9*-Gens ist durch AraC reguliert, sie wurde durch L-Arabinose induziert. Eine weitere Verringerung der Kolonienanzahl auf Agarmedium mit L-Arabinose wurde nicht festgestellt, daher wurde im Folgenden keine L-Arabinose im Medium verwendet. Der P_{BAD} -Promotor erlaubte eine *leaky transcription* von *cas9*, die ausreichend war für einen Schnitt im Genom. Durch die Zugabe von Arabinose erhöhte sich vermutlich die Transkriptmenge der Cas9, dies führte nicht zu einer verbesserten Wirkung.

Die Konstruktion der pCas9 Plasmide mit Reparaturfragmenten für P_{TAC} , P_{RhaB} und P_{Xut} in *E. coli* Top10 war erfolgreich, jedoch nicht die Transformation von *Ps. donghuensis* G2#25 (Plasmide 39-41). Es waren keine Kolonien nach der Elektroporation vorhanden. Bei diesen Plasmiden war zu beachten, dass hier zusätzlich zu dem Promotor auch das jeweilige Regulatorgen im Reparaturfragment enthalten war. Dadurch wurde das zu inserierende DNA-Stück über 1 400 bp lang (Kapitel 2.2.2.8., Tabelle 14). Auch wurde getestet, ob eine Zugabe von 0,2 % Arabinose im Festmedium nach der Elektroporation (bei anderen Promotor-/Operatormutationen ohne Zugabe) zu Kolonien führte, dies war nicht der Fall. In weiteren Versuchen wurden 300 und 500 ng Plasmid-DNA statt 100 ng für die Elektroporation verwendet, die flankierenden Bereiche auf 500 bp verkürzt (sonst 750 bp) und die Regenerationszeit nach der Elektroporation von 2 h auf 6 h erhöht. Auch diese Maßnahmen führten nicht zu einer Koloniebildung nach der Elektroporation. Dies ist vermutlich durch die Länge der zu inserierenden DNA-Stücke aufgrund der zusätzlich erforderlichen Regulatorgene begründet, Insertionen bis 1 200 bp waren erfolgreich. Der Austausch des *hcnA*-Promotor- und Operatorbereichs gegen P_{TAC} , P_{RhaB} oder P_{Xut} war somit nicht erfolgreich.

Die Transformationen mit den Plasmiden pCas9 -10 Box, $\Delta_{upstreamANR}$, P_{Rox} und P_{BAD} waren dagegen erfolgreich (Plasmide 35-38). Der Promotorbereich wurde zur Bestätigung der jeweiligen Promotormutation sequenziert. Auch nach dem Plasmid-*Curing* wurde der Promotorbereich nochmals sequenziert und das *Curing*

durch PCR und phänotypisch überprüft. Die PCRs werden beispielhaft für die P_{BAD} -Mutante dargestellt (Abb. 31). Durch den Austausch des nativen Promotors gegen das P_{BAD} -Fragment (Regulatorgen, Promotor, Operator) wurde das PCR-Produkt entsprechend vergrößert, der Austausch war somit erfolgreich. Vor der Transformation wurde kein pCas9-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert. Direkt nach der Transformation wurde das PCR-Fragment, welches die flankierenden Bereiche und das P_{BAD} -Fragment beinhaltet, mit einer Größe von 3 000 bp nachgewiesen. Nach dem abgeschlossenen *Curing* wurde das PCR-Produkt nicht mehr nachgewiesen. Zudem zeigte die Mutante kein Wachstum auf LB-Agarmedien mit Kanamycin. Das Plasmid-*Curing* war damit beendet.

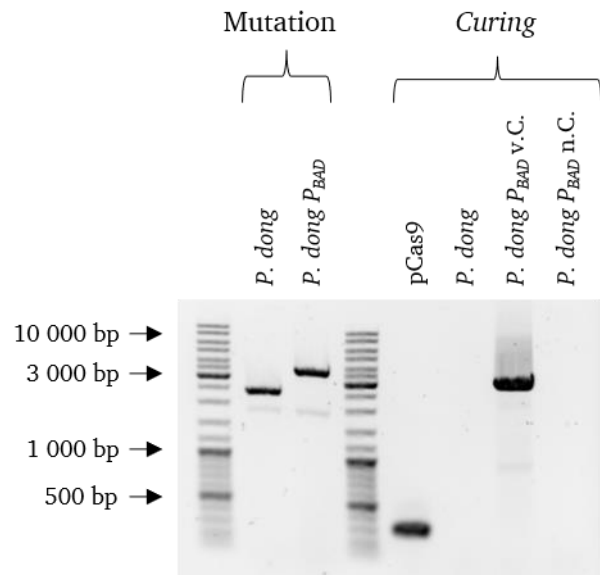


Abbildung 31 Beispielhafte Darstellung der gelelektrophoretischen Analyse der PCR-Überprüfungen von *Ps. donghuensis* P_{BAD} . Die PCR-Reaktionen wurden mit aufgeschlossenen Zellen durchgeführt, die Überprüfung der Mutation im Genom erfolgte mit den Primern Seq UpstHcnA Fwd und Seq_HcnB Rev, die im Wildtyp ca. 2 400 bp amplifizieren. Dies entspricht einem Teil des *upstream* gelegenen Gens welches für ein Protein aus der FUCS-Familie kodiert, dem *hcn*-Promotorbereich, *hcnA* und großen Teilen von *hcnB* (Kapitel 6.2.2., Abb. 39). Für die Überprüfung des Plasmid-*Curings* wurden die Primer pCas9_Seq_HR_Fwd2 und pCas9_Seq_HR_Rev verwendet, die auf pCas9 binden und das Reparaturfragment amplifizieren (Kapitel 2.2.2.8., Abb. 5). 1 %ige Agarosegele mit Ethidiumbromid gefärbt. Marker: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Nach der erfolgreichen Erstellung der Mutanten wurden die Auswirkungen der Mutationen auf das Wachstum gemessen (Abb. 32). *Ps. donghuensis* mit den jeweiligen Promotor-/Operatorveränderungen zeigte keine Veränderung des Wachstums im Vergleich zu dem Wildtyp. Nur der Austausch von dem nativen Promotor zu P_{BAD} führte zu einer leicht höheren Zelldichte ab Stunde neun. Auch nach 24 h zeigte diese Mutante eine höhere Zelldichte von 8,3 im Vergleich zum Wildtyp mit 5,9.

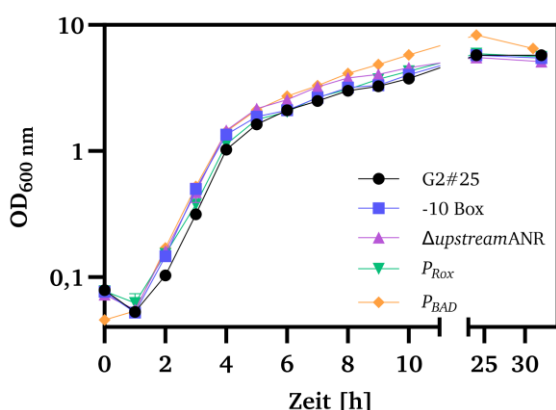


Abbildung 32 Auswirkungen der *hcnABC*-Promotor-/Operatormutationen auf das Wachstumskurven von *Ps. donghuensis*. Die Hauptkulturen in LB pH 7,2 wurden mit einer Start- $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft. Als Kontrolle diente *Ps. donghuensis* G2#25. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ($n = 3$).

Bei den folgenden Cyanidmessungen ist zu beachten, dass die realen Cyanidkonzentrationen vermutlich nicht den dargestellten Werten entsprechen, da sich herausstellte, dass Methionin

bzw. Abbauprodukte hiervon den Methämoglobintest beeinflussen (Kapitel 6.2.4.).

Der Effekt der Promotor- und Operatorveränderungen auf die Cyanidproduktion wurde mittels Cyanidkonzentrationsbestimmung nach Induktion mit Glycin-Methionin untersucht. Die Messung der Cyanidproduktion der *Ps. donghuensis hcnABC*-Promotor-/Operatormutanten und des Wildtyps 8 h nach Start und ohne Zugabe von Arabinose ergab zwischen 4 und 12 mg/l, nach 24 h zwischen neun und 24 mg/l Cyanid (Abb. 33A). Nach 24 h war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den -10 Box und P_{Rox} -Mutanten messbar. *Ps. donghuensis P_{Rox}* und -10 Box zeigten höhere Cyanidproduktionen als die $\Delta upstreamANR$ -Mutante. Die Cyanidproduktion wurde durch diese Promotor-/Operatormutationen nicht erhöht.

Der P_{BAD} -Promotor wird durch L-Arabinose induziert. In Vorversuchen (Kulturvolumen 1 ml, Messung nach 24 h) war mit 2 % L-Arabinose für die P_{BAD} -Mutante die höchste Cyanid-Konzentration von 5,2 mg/l gemessen worden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde bei der Bestimmung der Cyanidproduktion 0,2 % (Vergleich zu Tay *et al.*, 2013, optimale Konzentration dort 0,002 % Arabinose) und 2 % Arabinose zur Induktion des P_{BAD} Promotors verwendet. Ohne Induktion und mit 0,2 % Arabinose war die Cyanidproduktion ähnlich wie bei dem Wildtyp (Abb. 33B). *Ps. donghuensis* WT und P_{BAD} mit 2 % Arabinose zeigten in diesem Experiment mit 49 mg/l die höchsten Cyanidproduktionen nach 24 h (Abb. 33C). Die Zugabe von 2 % Arabinose hatte einen positiven Effekt auf die Cyanidproduktion.

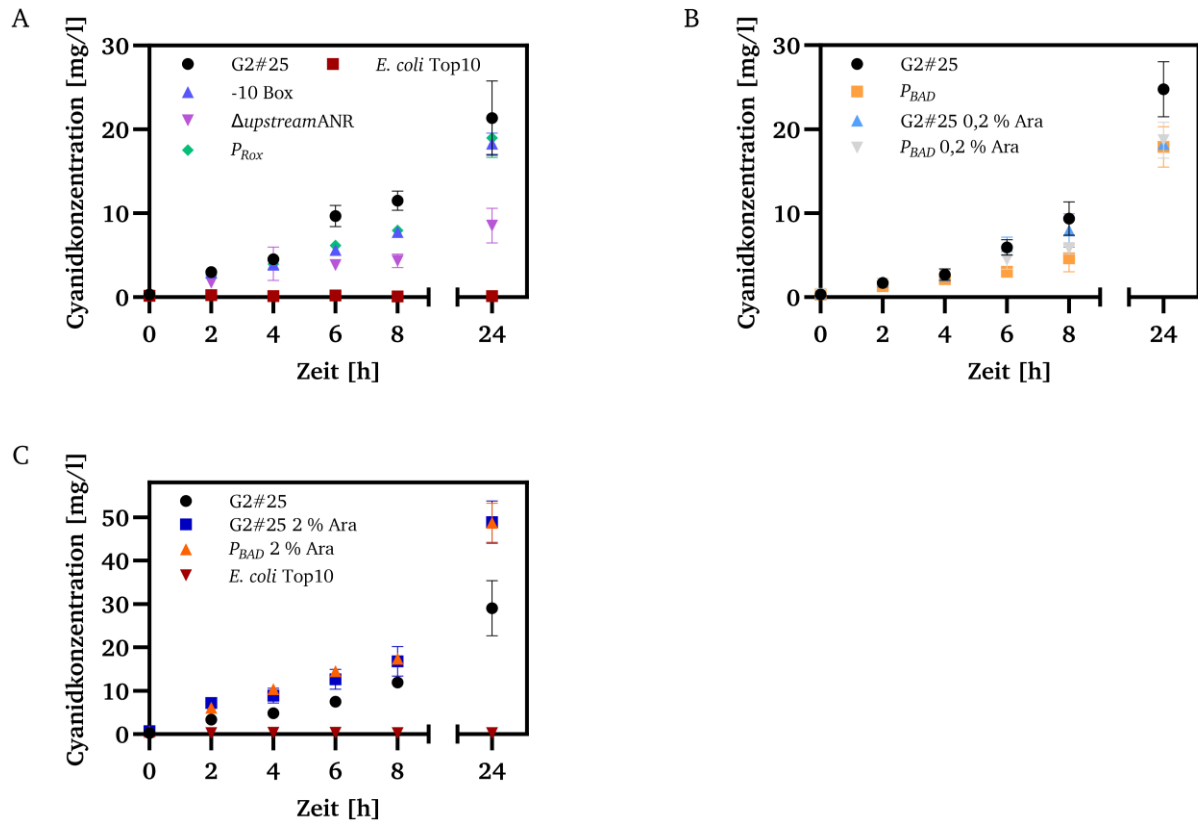


Abbildung 33 Auswirkung der *hcnABC*-Promotor-/Operatormutationen auf die Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion. Cyanidproduktion von **A** *Ps. donghuensis* -10 Box, Δ upstreamANR und P_{Rox} . **B** *Ps. donghuensis* P_{BAD} und Wildtyp mit 0,2 % Arabinose **C** *Ps. donghuensis* P_{BAD} und Wildtyp mit 2 % Arabinose. Die Bestimmung der Cyanidproduktion und die Wachstumskurven sind unabhängige Experimente. Übernachtskulturen wurden sedimentiert und in dem Induktionsmedium resuspendiert (LB pH 8 mit 5 g/l Glycin-Methionin). Die Hauptkulturen wurden mit einer Start $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 angeimpft. *E. coli* Top10 diente als Negativkontrolle. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Die Veränderungen des Promotor- /Operatorbereichs von *hcnA* führten zu einer geringfügig geringeren Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis*. Nur die P_{BAD} -Promotormutation mit 2 % Arabinose führte zu einer vergleichbaren Cyanidproduktion mit dem Wildtyp. Da nicht direkt von der Cyanidproduktion auf die Biolaugungseigenschaften geschlossen werden kann, wurden mit den Promotor-/Operatormutanten Laugungsexperimente durchgeführt. Als Material wurde ein Schleifstaub von der Goldpolitur (Kapitel 2.1.8.) verwendet, welcher wenig Schwermetalle (321 ppm Cu, 1,8 ppm Pb) und eine Goldkonzentration von 102 ppm enthielt. Der Wildtyp zeigte die höchste Goldlaugungseffizienz von 57 % nach 144 h im ersten Biolaugungsversuch (59 ppm Au im Überstand, Abb. 34). Die beiden Promotormutanten -10 Box und P_{Rox} zeigten eine leicht verringerte Gold-

laugungseffizienz zu allen Zeitpunkten (144 h: -10 Box: 52 %, Rox: 49 %) mit leichten Vorteilen für die -10 Box-Mutante. Da die Werte nur einfach bestimmt wurden, muss die Reproduzierbarkeit dieses Effekts in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Deletion der DNA upstream ANR führte zu einer Verringerung der Goldlaugungseffizienz auf <5 %. Für die P_{BAD} -Mutante wurden Laugungsexperimente mit dem Schleifstaub von der Goldpolitur und dem Filterstaub aus der mechanischen Vorbereitung von E-Schrott durchgeführt. Ohne Arabinose zeigte diese Mutante mit beiden Substraten nahezu keine Goldlaugung (<5 %). Bei Zugabe von Arabinose wurde für beide Materialien Goldlaugung nachgewiesen, die Induzierbarkeit der Mutante ist hierdurch gezeigt. Der Wildtyp zeigte bei Zugabe von 2 % Arabinose mit beiden Materialien eine stark verschlechterte

Laugungseffizienz, Arabinose selbst führte somit nicht zur Erhöhung der Laugungseffizienz. Die P_{BAD} -Promotormutante zeigte mit beiden Substraten mit 0,2 % Arabinose die höchste Goldlaugungseffizienz, auch gegenüber dem Wildtyp. Die Ergebnisse der Biolaugungen stehen nicht im

Einklang mit den Ergebnissen der Cyanidproduktion. Bei beiden Laugungen wurden mit 0,2 % Arabinose höhere Goldlaugungseffizienzen erzielt als mit 2 % Arabinose. Diese Konzentration führte in vorherigen Experimenten zur höchsten Cyanidproduktion.

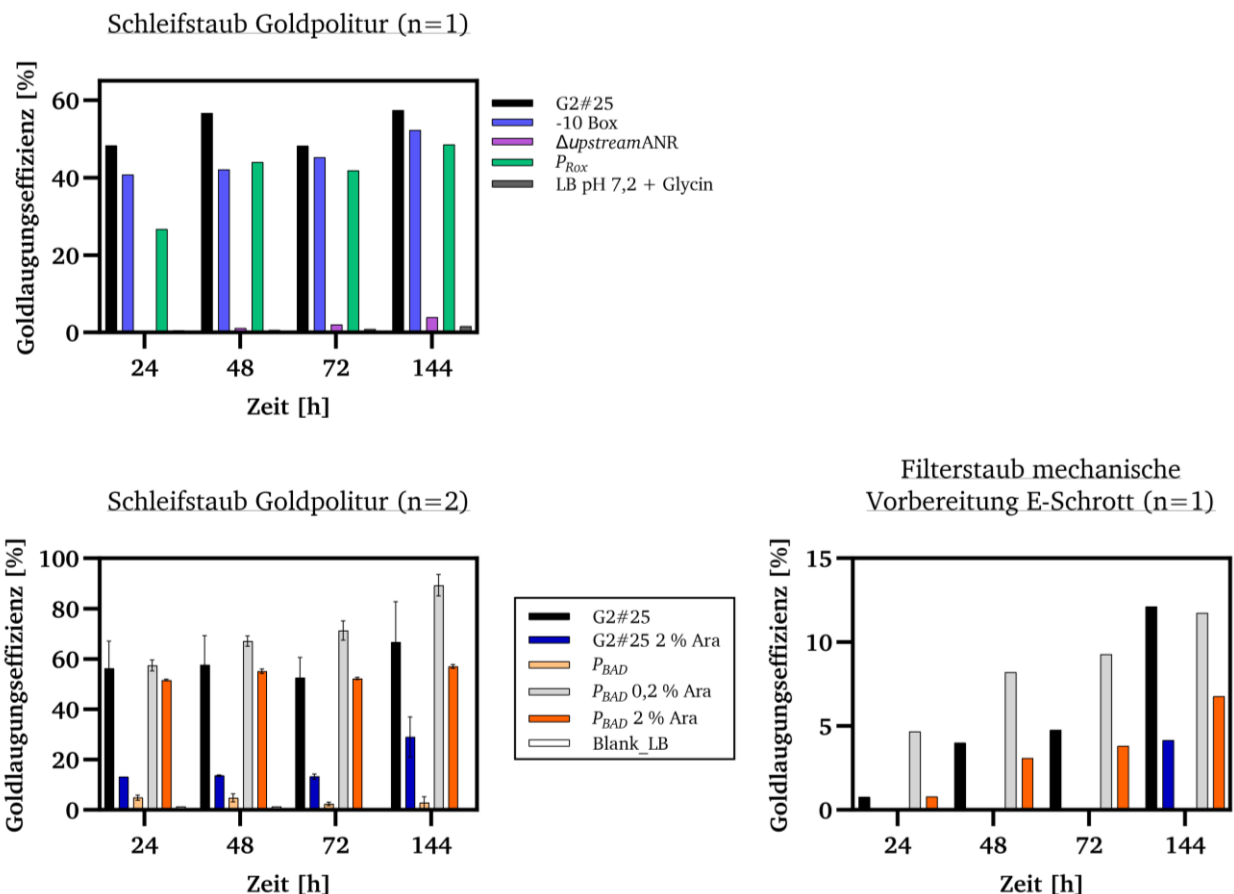


Abbildung 34 Goldlaugung durch die *Ps. donghuensis* Promotor-/Operatormutanten. Oben: Laugung mit dem Schleifstaub der Goldpolitur (2,5 g) und den Mutanten -10 Box, $\Delta_{upstreamANR}$ und P_{Rox} . Die Laugungen mit P_{Rox} und der Medienkontrolle wurden unabhängig von den anderen Mutanten durchgeführt. Das Kulturvolumen (inklusive Feststoff) war erhöht, da bei der Berechnung des Medienvolumens der Feststoff und die Zellen nicht beachtet wurden (G2#25: 120,9 ml; -10 Box + $\Delta_{upstreamANR}$: 119,1 ml; P_{Rox} : 113,8 ml; Blank: 102,5 ml). Unten: Laugungen mit den Materialien Schleifstaub der Goldpolitur und Filterstaub aus der mechanischen Vorbereitung von Elektroschrott (beide 2,5 g). Diese Laugungen wurden mit dem Wildtyp und der P_{BAD} -Mutante durchgeführt. Das Kulturvolumen (inklusive Feststoff) war erhöht, da bei der Berechnung des Medienvolumens der Feststoff und die Zellen nicht beachtet wurden (Schleifstaub Goldpolitur: Gesamtvolumen G2#25, P_{BAD} , P_{BAD} + 0,2 % Ara, P_{BAD} + 2 % Ara: 106,5 ml; G2#25 + 2 % Ara: 116,5 ml; Blank: 102,5 ml; Filterstaub Gesamtvolumen: 107 ml). Als Laugungsmedium diente LB pH 7,2 + 115 mM Glycin. Die Goldkonzentration im Überstand wurde durch ICP-MS Messung bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

5.2.5. Einfluss des Regulators GacA auf die Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25

Bei der Analyse der Operatorregion des *hcnABC*-Operons von *Ps. donghuensis* G2#25 wurde bioinformatisch eine *anr*-Box identifiziert. Die Gene der beiden *quorum sensing* Regulatoren LasR und RhlR, welche die Transkription von *hcnABC* in *Ps. aeruginosa* regulieren (Pessi *et al.*, 2000), wurden nicht im Genom identifiziert (Kapitel 5.2.2., Tabelle 36). Für *Ps. aeruginosa* und *Ps. fluorescens* ist zudem eine Regulation der Cyanidproduktion durch das 2-Komponenten System GacS/A beschrieben, beide Gene wurden in *Ps. donghuensis* G2#25 bioinformatisch identifiziert. Die Genomsequenzierung im Bereich von *gacA* wurde durch eine PCR-Amplifizierung des Gens und anschließender Sanger-Sequenzierung bestätigt. Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems wurde eine $\Delta gacA$ -Mutante erstellt (Plasmid 45). Zur Vermeidung von polaren Effekten auf umliegende Gene wurden jeweils die ersten und letzten 69 Basenpaare nicht deletiert. Diese Deletionsmutante wurde, wie bereits für die anderen Mutanten beschrieben (Abb. 31), durch PCRs überprüft. Nach erfolgreicher Erstellung der Deletionsmutante wurde die Auswirkung der Deletion auf das Wachstum und die Cyanidproduktion untersucht. Die gemessenen OD_{600 nm}-Werte unterschieden sich kaum zwischen Wildtyp und Deletionsmutante, in den ersten Stunden waren die OD_{600 nm}-Werte der Deletionsmutante nur leicht erhöht (z.B. nach 5 h OD_{600 nm}: WT 1,8; $\Delta gacA$ 2,3; Abb. 35). Nach 24 h war kein Unterschied in den OD-Werten messbar, die Deletion hatte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum.

Anschließend wurde die Cyanidproduktion gemessen. Aufgrund des Einflusses von Methionin bzw. von Abbauprodukten auf den Methämoglobintest wurde die Cyanidmessung ohne Methionin durchgeführt.

Die Deletionsmutante und *E. coli* Top10 wiesen lediglich eine Hintergrund Cyanidproduktion

auf. Der Wildtyp hingegen produzierte nach 7,5 h über 7 mg/l Cyanid. Die Deletion von *gacA* führte dazu, dass kein Cyanid mehr gebildet wurde.

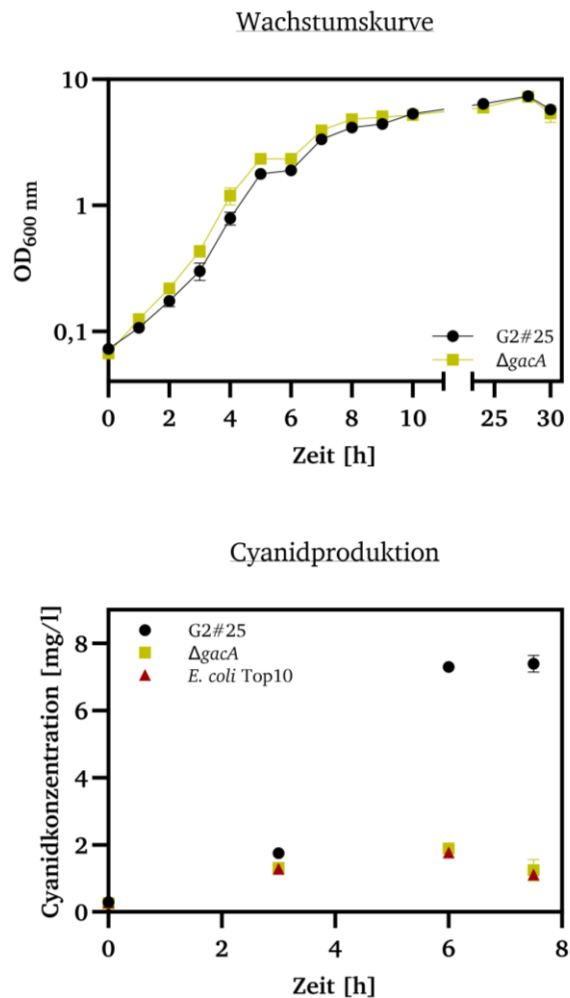


Abbildung 35 Wachstumskurve und Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* $\Delta gacA$. Für die Wachstumskurven und die Vorkulturen der Cyanidproduktion wurde LB pH 7,2 verwendet. Die Cyanidproduktion wurde mit LB pH 8 + 5 g/l Glycin induziert. Hauptkulturen der Wachstumskurve wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 beimpft, die der Cyanidproduktion mit einer OD von 1. Die Messung der Cyanidproduktion wurde wie in Kapitel 6.2.4. beschrieben von Kento Amann durchgeführt. Die Experimente fanden unabhängig statt. Es wurden separate Kulturen von unterschiedlichen Vorkulturen verwendet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (Wachstumskurve n = 3, Cyanidproduktion n = 2).

5.3. Diskussion

In diesem Kapitel ist beschrieben, wie das Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 durch die Anpassung eines CRISPR/Cas9-Systems genomisch verändert wurde und wie sich dies auf dessen Cyanidproduktion und Biolaugungseffizienz auswirkte. Außerdem ließ sich mit den Ergebnissen die Regulation der *hcnABC*-Gene besser verstehen.

Die Transformationseffizienz nach der Elektroporation war bei Verwendung der Cas9 Plasmide gering, mehr Kolonien waren nach Transformation mit pBBR1MCS-2 sichtbar (Tabelle 35). Ein möglicher Grund ist die Plasmidgröße von über 12 000 bp, da die Transformationseffizienz mit der Plasmidgröße abnimmt (Chan *et al.*, 2002). Möglicherweise ist dieser Effekt auch durch die Toxizität der Cas9-Nuklease bedingt (Rostain *et al.*, 2023).

Für *Ps. putida* UWC1 war gezeigt worden, dass eine Transformation durch Konjugation zu weniger positiven Kolonien führt als eine Elektroporation (Yoshida *et al.*, 2009). Eine Ultraschallbehandlung ermöglichte eine Steigerung der Transformationseffizienz um den Faktor vier, verglichen mit Elektroporation (Yoshida *et al.*, 2009).

Die Cas9-Endonuklease verursacht einen Doppelstrangbruch, der über homologe Rekombination repariert werden kann (zusammengefasst in Rath *et al.*, 2015). In Pseudomonaden ist die intrinsische Fähigkeit zur homologen Rekombination gering (Chen *et al.*, 2018b), was zur geringen Transformationseffizienz beiträgt. Zur Steigerung der Transformationseffizienz kann die homologe Rekombination in Pseudomonaden verbessert werden. Hierzu dienen Phagen Rekombinationssysteme, wie beispielsweise das λ -Red System (Chen *et al.*, 2018b). Hierfür wäre jedoch die Etablierung eines zwei Plasmid-Systems im Eigenisolat nötig gewesen, da aufgrund der Plasmidgröße von pCas9 (Kapitel 2.2.2.8., Abb. 4) nicht noch weitere genetische Elemente in das Plasmid integriert werden können. Zur Beschleunigung des *Curing* Prozesses sollte ein Marker zur Gegenselektion verwendet werden, wie zum Beispiel *sacB* (Chen *et al.*, 2018b).

5.3.1. Regulation der Produktion der Cyanidsynthese

Zur Planung der Promotor-/Operatormutationen wurde die *hcnA*-Promotorregion bioinformatisch untersucht, eine Verifizierung durch Experimente steht noch aus. Der Transkriptionsstart von *hcnABC* wurde experimentell von Kento Amann durch eine *ligated RNA-reverse transcriptase PCR* bestimmt (Durchführung nach Veith *et al.*, 2009). Der Start entspricht dem bioinformatisch vorhergesagten Transkriptionsstart, welcher näher an *hcnA* ist als der zweite vorhergesagte (Abb. 27). Auch drei weitere Basen *downstream* des vorhergesagten Transkriptionsstarts wurden experimentell als Transkriptionsstart identifiziert. Experimentell wurde kein zweiter Transkriptionsstart, wie bioinformatisch vorhergesagt, identifiziert. Folglich besitzt *Ps. donghuensis* G2#25, genauso wie *Ps. fluorescens* (Laville *et al.*, 1998), nur einen Transkriptionsstart und unterscheidet sich von *Ps. aeruginosa* mit zwei Transkriptionsstarts (Pessi *et al.*, 2000).

Ps. fluorescens und *Ps. aeruginosa* haben mit *Ps. donghuensis* G2#25 eine *anr*-Box gemeinsam, dort bindet der anaerobe Regulator ANR (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). *Ps. aeruginosa* besitzt im Promotorbereich zwei *lux*-Boxen, dort binden die *quorum sensing* Regulatoren RhIR und LasR (Pessi *et al.*, 2000, Tsai *et al.*, 2010). Im Promotorbereich von *Ps. donghuensis* G2#25 wurde eine *lux* ähnliche palindromische Box identifiziert. Die Sequenz der *lux*-Box unterschied sich jedoch von den bisher bekannten Sequenzen (Abb. 28). Auch die Gene für die Regulatoren LasR, LuxR und RhIR wurden nicht im Genom nachgewiesen (Tabelle 36), was für eine andere Regulation als bei *Ps. aeruginosa* spricht. Damit läuft die *hcnABC*-Transkription voraussichtlich ähnlich wie bei *Ps. fluorescens* ab, die nicht durch LasR und RhIR reguliert wird (Blumer *et al.*, 2000a, Laville *et al.*, 1998). Zusätzlich zu dem anaeroben Regulator ANR wird die Transkription bei *Ps. fluorescens* und *Ps. aeruginosa* durch den globalen Aktivator GacA reguliert (Laville *et al.*, 1992, Reimann *et al.*, 1997). GacA bindet nicht am Promotor, sondern wirkt posttranskriptional (Blumer *et al.*, 2000a). Die Gene für GacS/A

wurden in *Ps. donghuensis* G2#25 identifiziert (Aminosäuresequenzidentität: 79 bzw. 93 %). Die Deletion von *gacA* führte zu einem Verlust der Cyanidproduktion im Vergleich zum Wildtyp. Folglich wird die Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25 auch durch GacA reguliert, wie bei den bisher bekannten Cyanidproduzierenden Pseudomonaden (Laville *et al.*, 1992, Reimann *et al.*, 1997, Valverde *et al.*, 2003).

Das *quorum sensing* System von *Ch. violaceum* wird durch Acyl-Homoserinlactone (AHLs) kontrolliert (Mion *et al.*, 2021). Die Autoren zeigten, dass durch das System unter anderem die Exoproteaseproduktion und die Cyanidproduktion reguliert werden. Die Verwendung einer Lactonase, welche AHLs degradiert, führte folglich zu einer verringerten Cyanidproduktion (Mion *et al.*, 2021). Ein Rückgang der Cyanidproduktion nach der Behandlung von *Ps. donghuensis* G2#25 mit einer AHL degradierenden Lactonase würde eine *quorum sensing* abhängige Cyanidproduktion zeigen.

5.3.2. Promotor-/Operatorveränderungen von *Ps. donghuensis hcnABC*

Der Promotor/Operator sollte verändert werden, um die Cyanidproduktion zu steigern und die Regulation des Operons besser zu verstehen. Die Austausche des nativen Promotorbereichs gegen P_{BAD} und P_{TAC} wurden durchgeführt, um die Ergebnisse mit vorhandener Literatur zu vergleichen (Tay *et al.*, 2013). Die Verwendung von P_{Rox} hatte den Hintergrund, dass dieser durch *quorum sensing* reguliert ist (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004) und somit keine Induktor Zugabe nötig sein sollte. Zudem wurden die Gene *roxR* und *-S* in dem Eigenisolat nachgewiesen (Tabelle 36), weshalb keine Insertion der Gene, sondern nur die des Promotors, nötig war. Für die anderen induzierbaren Promotoren mussten nicht nur die Promotor- und Operatorbereiche, sondern auch die jeweiligen Regulatorgene in das Genom inseriert werden. Dies bedingte die Insertion eines DNA-Bereichs mit über 1 400 bp (Kapitel 2.2.2.8., Tabelle 14). Die Insertion dieser langen DNA-Bereiche war nicht erfolgreich, durch eine Anpassung des CRISPR/Cas9- Systems oder einer zweistufigen Insertion der DNA-Bereiche (jeweils nur

750 bp inserieren) könnten die hier nicht realisierten Promotormutanten erstellt werden.

Nur der Austausch des nativen Promotors gegen P_{BAD} hatte einen positiven Effekt auf das Wachstum von *Ps. donghuensis* G2#25, die anderen Mutanten zeigten vergleichbares Wachstum zum Wildtyp (Abb. 32). *Ch. violaceum* hatte kein verbessertes Wachstum bei der Insertion eines induzierbaren Cyanidgenclusters gezeigt (Tay *et al.*, 2013). Jedoch war in diesen Arbeiten ein zweites Gencluster zusätzlich zum nativen *hcn*-Gencluster eingebracht worden. Da hier der Wachstumsvorteil der *Ps. donghuensis* P_{BAD} -Mutante erst nach 9 h aufgetreten war, ist dieser Effekt womöglich durch die Cyanidproduktion bedingt, die beim Wildtyp vermutlich erst beim Übergang der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase beginnt (Askeland *et al.*, 1983). Ohne Zugabe von Arabinose produzierte die P_{BAD} -Mutante wahrscheinlich kein oder wenig Cyanid, der Wildtyp hingegen schon. Die Cyanidproduktion verschlechterte vermutlich das Wachstum des Wildtyps.

Bei den Experimenten zur Ermittlung der Cyanidproduktion muss berücksichtigt werden, dass die angegebenen Werte vermutlich nicht der Realität entsprechen, da Methionin bzw. Abbauprodukte hiervon die Methämoglobintest-Messungen beeinflusst haben (Kapitel 6.2.4.).

Die Deletion des *upstream* Bereichs der *anr*-Box und die Veränderung der -10 Box der *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC*-Gene führten zu keiner Verbesserung der Cyanidproduktion und der Goldausbeute in Biolaugungsexperimenten (Abb. 33, 34). In letzteren zeigte die *ΔupstreamANR* Deletionsmutante nahezu keine Goldausbeute (10 $\mu\text{g Au}$, WT ca. 150 μg). Da diese Mutante am wenigsten Cyanidproduktion und keine Goldlaugung zeigte, produziert sie vermutlich kein Cyanid. Die gemessene Cyanidproduktion ist auf den Einfluss von Methionin bzw. Abbauprodukten davon zurückzuführen (Kapitel 6.2.4.).

Für beide Veränderungen, die der -10 Box und der Deletion *upstream ANR*, war an einem *hcnA-lacZ* Fusionsmodell in *Ps. fluorescens* gezeigt worden, dass die β -Galactosidase Aktivität steigt, also eine Erhöhung der Transkriptmenge vorliegt (Blumer *et al.*, 2000a). Da bei den Experimenten von Blumer *et al.* keine Veränderungen im

Genom vorgenommen worden waren, sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar.

Die Zugabe von Eisen hat einen großen Einfluss auf die Cyanidproduktion (Askeland *et al.*, 1983, Blumer *et al.*, 2000a, Gorji *et al.*, 2020). In *Ps. fluorescens* Stämmen war über ein Plasmid ein *hcnA-lacZ* Fusionsgen eingebracht worden (Blumer *et al.*, 2000a). Die Sequenz der -10 Box ist von TAGATT zu TATAAT verändert worden. Bei Zugabe von Eisen (20 μM) war eine Steigerung der β -Galactosidaseaktivität um den Faktor 50 festgestellt worden, bei der veränderten -10 Box war dieser Effekt jedoch nicht messbar gewesen (Blumer *et al.*, 2000a). Da in dieser Arbeit für die Messungen der Cyanidproduktion ein LB-Komplexmedium verwendet wurde, sind die Effekte nicht vergleichbar. Bei Verwendung eines Minimalmediums kann die Auswirkung von Eisen auf die Cyanidproduktion in Zukunft untersucht werden.

Die Sequenz der -10 Box war zu dem σ^{70} -Konsensus verändert worden (TATAAT, Blumer *et al.*, 2000a), daher wurde diese Sequenz in den Experimenten hier verwendet. Diese Veränderung führte in *Ps. donghuensis* G2#25 jedoch zu einer leicht verringerten Cyanidproduktion.

Da an der Regulation der *hcn*-Expression in *Ps. donghuensis* G2#25 vermutlich mehrere Systeme wie ANR und *quorum sensing* abhängige Regulatoren beteiligt sind, wurde versucht die Regulation zu vereinfachen. Der native Promotor wurde gegen den *quorum sensing* abhängigen Rox Promotor ersetzt (Espinosa-Urgel *et al.*, 2004). Dieser ist autoinduzierbar und wurde in früheren Publikationen für die rekombinante Genexpression in *Ps. putida* verwendet (Meyers *et al.*, 2019). Der Promotoraustausch führte zu einer vergleichbaren Cyanidproduktion mit dem Wildtyp nach 24 h, die Goldausbeuten waren jedoch zu allen Zeitpunkten niedriger als die des Wildtyps und der -10 Box-Mutante (Abb. 33).

Für die P_{Rox} -Mutante wurden Cyanidproduktion und Goldlaugungsaktivität gemessen, daher war das *quorum sensing* System funktional in *Ps. donghuensis*. Ähnliche Promotor- und Operatorbereiche zu den von Meyers *et al.*, 2019 vorgestellten Bereichen P_{Rox306} und P_{Rox132} wurden nicht im Genom von *Ps. donghuensis* G2#25 identifiziert. Es bleibt unklar, welche Gene von dem RoxS/R System in *Ps. donghuensis* G2#25

reguliert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Regulation des Genclusters im Wildtyp durch ANR und möglicherweise weiteren Regulatoren zu einer gesteigerten Cyanidproduktion gegenüber der alleinigen Regulation über das *Rox quorum sensing* System führt.

Die P_{BAD} -Mutante war die einzige induzierbare Mutante, die erfolgreich erstellt wurde. Die Mutante ohne Induktion und mit 0,2 % Arabinose zeigte eine vergleichbare bis geringere Cyanidproduktion wie der Wildtyp. Die Induktion mit 2 % Arabinose führte zu einer gesteigerten Cyanidproduktion, sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der P_{BAD} -Mutante. Die Arabinosekonzentration war deutlich höher als bei den Experimenten von Tay *et al.*, 2013, die optimale Arabinosekonzentration betrug dort für *Ch. violaceum* 0,002 %. *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte kein Wachstum mit 0,2 % Arabinose als einzige C-Quelle, zeigte jedoch in LB-Medium bei Zugabe von 2 % Arabinose ein Wachstum auf eine höhere End-OD (7,9 nach 28 h, ohne Arabinose: 6; Daten nicht gezeigt). Dies spricht für eine Verstoffwechslung von Arabinose, darin liegt die deutlich höhere Arabinose Menge, die zur Induktion nötig ist, begründet. Bei den Biolaugungsexperimenten zeigte jedoch die mit 2 % Arabinose induzierte P_{BAD} -Mutante geringere Goldausbeuten als mit 0,2 %. Je nach verwendetem Laugungssubstrat zeigte *Ps. donghuensis* P_{BAD} mit 0,2 % Arabinose zu allen Zeitpunkten die höchsten Goldlaugungseffizienzen, oder bei den ersten Probenahmezeitpunkten bis 72 h. Der Widerspruch der optimalen Arabinosekonzentration bei der Cyanidproduktion und den Biolaugungsexperimenten bleibt unklar. Möglicherweise beeinflusst Arabinose ähnlich wie Methionin den Methämoglobintest. Zur Überprüfung sollte die Cyanidproduktion mit anderen Cyanidtests gemessen werden. Bei den Biolaugungsexperimenten sollten auch noch geringere Arabinosekonzentrationen getestet werden, da diese in *Ch. violaceum* zu einer höheren Cyanidproduktion und Goldausbeute führten (Tay *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit erhaltenen Goldausbeuten der P_{BAD} -Mutante sind prozentual geringer als die Vorherigen aus *Ch. violaceum*. Der geringere Effekt liegt vermutlich darin begründet, dass in den Experimenten von Tay *et al.*, 2013 sowohl das native als auch das induzierbare *hcn*-Gencluster im Genom vorlagen. Hierdurch

vervielfachte sich die Transkriptmenge, was wiederum zu einer höheren Cyanidproduktion führt. Die hier durchgeführten Untersuchungen können nicht zur Beurteilung der Transkriptmenge herangezogen werden, da jeweils nur die Cyanidproduktion bzw. die Goldausbeute in den Biolaugungsexperimenten gemessen wurde. Zur Untersuchung der Effekte der Mutationen bzw. der Zugabe von Arabinose in verschiedenen Konzentrationen bleibt eine qRT-PCR Analyse ausstehend (Wong *et al.*, 2005), in der die Transkriptmengen der *hcnABC* mRNA beurteilt werden können.

Bei den hier erstellten Mutanten wurde nur die Promotor-/Operatorstruktur verändert mit dem Ziel die Transkriptmenge von *hcnABC* zu erhöhen. Weitere Genomveränderungen sind denkbar, beispielsweise eine Erhöhung der Metallresistenz durch Einbringen von den jeweiligen Resistenzgenen bzw. eine Überproduktion dieser. Dies würde nicht zur Steigerung der Cyanidproduktion führen, jedoch zu einer potentiell höheren Goldausbeute bei toxischen Biolaugungssubstraten. Auch eine Überproduktion des vermutlichen Regulators GacA wäre eine

Ansatzstelle. Modifikationen der Cyanidsynthese sind durchaus denkbar, jedoch fehlen hier zu viele Grundlagen über den Aufbau und die Struktur des Enzyms, um gezielte Punktmutationen zu planen.

Ein weiterer Ansatzpunkt stellt die Optimierung der Translation da. Nicht bei allen Genen ist eine *Shine-Dalgarno* Sequenz zur Translationsinitiation nötig, womöglich spielt hier der Abstand der Ribosombindestelle und des Start-Codons eine Rolle (Omotajo *et al.*, 2015). Durch eine Veränderung der Länge dieses Bereichs kann die Translation beeinflusst werden (Omotajo *et al.*, 2015). Auch die Struktur der mRNA beeinflusst die Translation, durch eine Strukturanalyse und eine gezielte Strukturveränderung kann die Translationseffizienz womöglich erhöht werden (Überblick in Chiaruttini *et al.*, 2020, de Smit *et al.*, 1990).

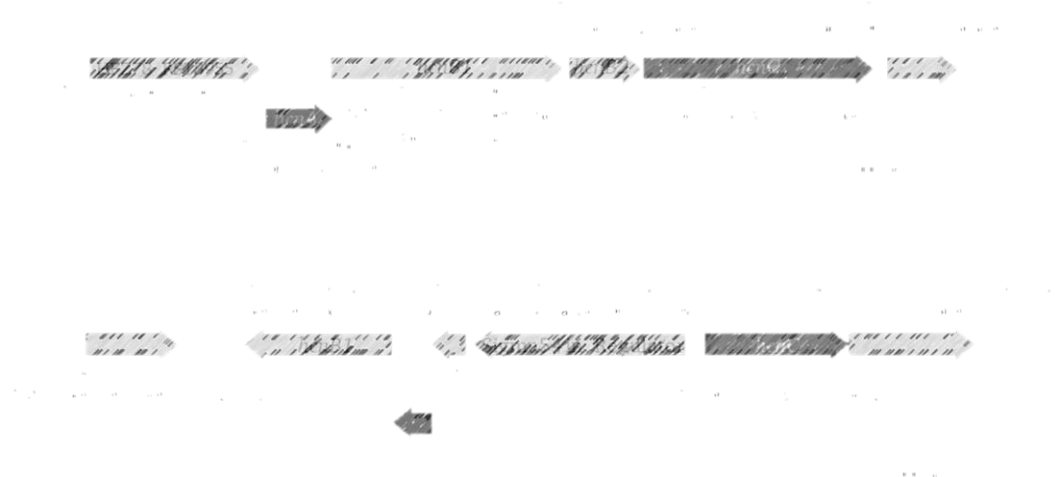
Dieses Kapitel zeigt erstmals eine Erhöhung der Biolaugungseffizienz *in vivo* durch gezielte Promotor-/Operatorveränderungen des nativen *hcnABC*-Operons.

Kapitel 6

Identifikation von hcn-Genclustern in Cyanidproduzenten und 3D-Strukturmodellierung der Proteine

Beiträge anderer

Genom-BLAST	Jan Ziegler	BRAIN Biotech
ICP-MS Messungen	Annabelle Klämke	AG
Einfluss von Methionin auf den Methämoglobintest, PCR-Überprüfung Deletionsmutanten, eine Cyanidmessung der Deletionsmutanten	Kento Amann	TU Darmstadt
Komplementierungsmutanten: Erstellung, Cyanidmessung und Biolaugungsexperiment	Elina Kim	
Funktionalität der Cyanidsynthese nach Aminosäureaustauschen	Nadja Peric, Lara Södler	
Identifizierung einiger Gencluster in weiteren Cyanidproduzenten	Studenten Mastermodul MB 03	



6. Identifikation der *hcn*- und *hcn*-ähnlichen Operons in Cyanid-produzierenden Neuisolaten und Strukturvorhersagen der Cyanidsynthese

6.1. Einleitung

Die Gene für die Cyanidsynthese sind bislang nur von Pseudomonaden und *Ch. violaceum* bekannt (Carepo *et al.*, 2004, Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). Für Pseudomonaden gibt es spezifische Primer, welche für die Identifikation und den Nachweis der *hcn*-Gene genutzt werden können (Ramette *et al.*, 2003, Svercel *et al.*, 2007). Bei anderen Cyanidproduzenten, wie zum Beispiel *Priestia (Bacillus) megaterium*, wurden bislang keine Cyanidsynthasegene identifiziert.

Bei den hier durchgeführten Genomsequenzierungen wurden zu dem klassischen *hcnABC*-Gencluster ein weiteres Gencluster mit der Genreihenfolge *hcnCAB* in *Ps. donghuensis* G2#25 und *Ps. hutmensis* MG#27 identifiziert. In letzterem wurde nur das *hcnCAB*-Gencluster identifiziert (Kapitel 3.2.2.1). In jeweils beiden HcnB und -C Untereinheiten sind FAD/NAD-Bindedomänen vorhanden. Im C-terminalen Bereich von HcnB und in HcnA sind jeweils Cystein-Cluster vorhanden, welche vermutlich je ein Eisen-Schwefel Cluster koordinieren (Kapitel 1.3.). Das Vorkommen von *hcnABC* und *hcnCAB* war in Pseudomonaden unterschiedlich. In *Ps. protegens* CHA0 kommen beide Gencluster vor, während in *Ps. aeruginosa* PA01 nur das klassische identifiziert wurde (Kapitel 6.2.6., Tabelle 40). Die detaillierten Ergebnisse zu beiden Genclustern sind in Kapitel 6.2 dargestellt.

6.1.1. Phylogenetische Einordnung der Cyanidsynthese

Die Cyanidsynthese und andere Dehydrogenasen sind von der Untereinheitenzusammensetzung, dem Cofaktorgehalt und auch phylogenetisch ähnlich (Watanabe *et al.*, 2012). In den Aminosäuresequenzen sind konservierte Motive für Cofaktor Bindungen vorhanden. Die Dehydrogenasen lassen sich aufgrund der Anzahl der Untereinheiten und des Vorkommens von Cofaktoren nochmals in Gruppen unterteilen (Watanabe *et al.*, 2012). Die Cyanidsynthese ist phylogenetisch ähnlich zur D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase (D-HypDH) aus *Ps. aeruginosa* und zur

D-Nopaline- und D-Octopine Oxidase aus *Agrobacterium tumefaciens* (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). Gemein ist allen Enzymen, dass ihre Substrate strukturell denen von sekundären Aminen ähneln (Watanabe *et al.*, 2012). Die N-terminalen Bereiche von HcnC und den entsprechenden Paralogen der Dehydrogenasen besitzen meist ein FAD-Bindemotiv und eine FMN-Bindestelle (vergleiche Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). Diese sind auch in den HcnB Paralogen vorhanden. In HcnA und -B und den entsprechenden Paralogen sind konservierte Cysteincluster vorhanden, wie sie für die Koordination von Eisen-Schwefel-Clustern typisch sind (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012).

6.1.2. Opin-Dehydrogenasen

Bereits die Erstbeschreiber der *hcnABC*-Gencluster bzw. Operons in Pseudomonaden fanden Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen der drei Untereinheiten zu ebenfalls heterotrimeren Octopin- und Nopalin-Dehydrogenasen (OoxBCA/NoxBCA), auch wenn die kleine OoxC/NoxC-Dehydrogenase Untereinheit (paralog zu HcnA) damals nicht identifiziert worden war (Blumer *et al.*, 2000b, Laville *et al.*, 1998). Es wurden weitere Nox/Oox ähnliche Gene identifiziert, diese wurden als Opin-Dehydrogenasen bezeichnet (*odh*, Watanabe *et al.*, 2015). Reihenfolge und Benennung der je drei Gene ist in *hcnABC*- und *ooxBCA/odhBCA*-Operons unterschiedlich, die Buchstaben sind im *hcn*-Operon nach der Genreihenfolge vergeben, in den *oox*- und *odh*-Operons nach Größe der jeweiligen Untereinheit (Abb. 36, Watanabe *et al.*, 2015). Auf das *hcn*-Operon übertragen ist die Genanordnung der jeweils paralogen Opin-Dehydrogenase-Untereinheiten von *Ps. putida* und *Ag. tumefaciens* CAB. Darüber hinaus unterscheiden sich die Opin-Dehydrogenasegene von *Bradyrhizobium diazoefficiens* und *Burkholderia thailandensis* in ihren Operonstrukturen von denen aus den eben genannten Bakterien (Watanabe *et al.*, 2015). Bei *Br. diazoefficiens* gibt es ein zweites funktionelles *hcnC* Paralog und die

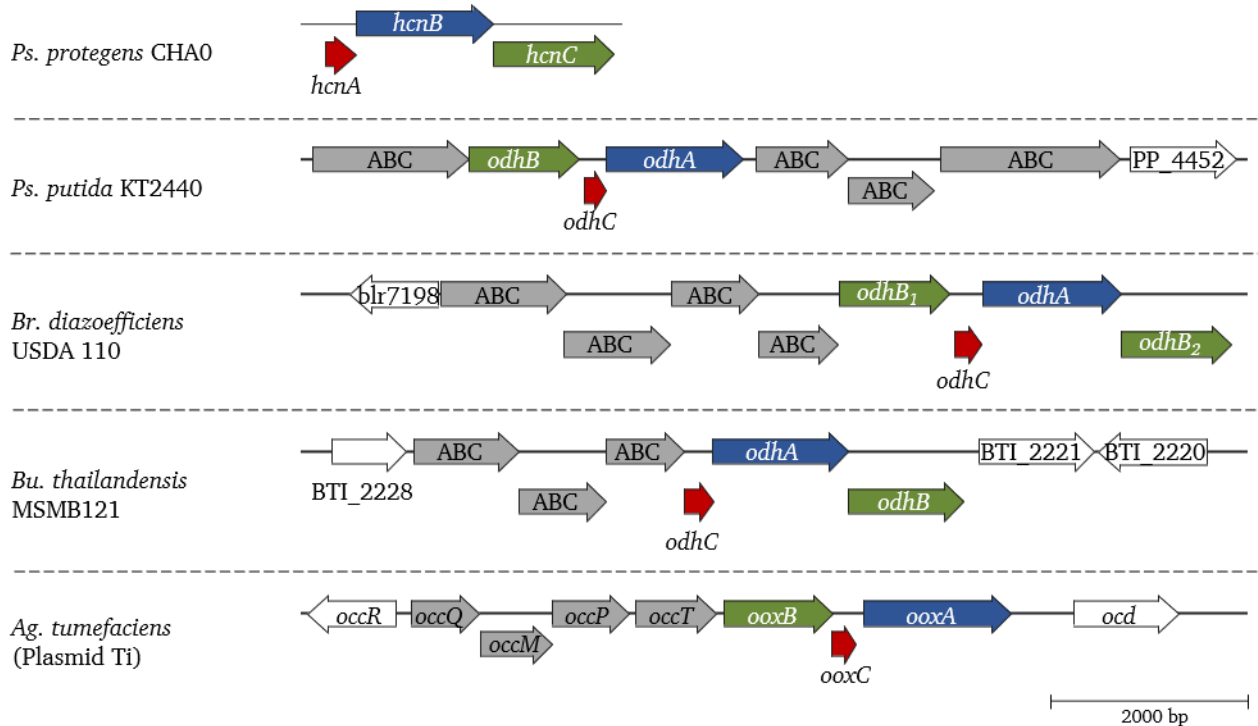


Abbildung 36 Übersicht über die Genanordnung von Opin-Dehydrogenasen und der Cyanidsynthese. ABC: Gene für ABC-Transporter; *occ* : Octopin ABC-Transporter, ausgenommen *occR*: Octopin Katabolismus Transkriptionsregulator; *odh*: Opin-Dehydrogenase; *oox*: Octopin-Dehydrogenase; *ocd*: Ornithin Cyclodeaminase. Grau: ABC-Transporter; Weiß: Gene mit weiteren Funktionen. Paraloge Gene sind jeweils in Rot, Blau und Grün dargestellt. Die Annotationen der Gene der Opin-Dehydrogenasen stammt aus Watanabe *et al.*, 2015.

Genreihenfolge von *Bu. thailandensis* entspricht der des *hcnABC*-Operons (Watanabe *et al.*, 2015). Die Genanordnung der Opin-Dehydrogenasen ist folglich nicht konserviert.

Die AS-Sequenzidentitäten der Cyanidsynthese und der Opin-Dehydrogenase-Untereinheiten sind mit ca. 30 % gering (Blumer *et al.*, 2000b, Laville *et al.*, 1998). Eine Ausnahme bildet hier *HcnA* mit 56 % (Blumer *et al.*, 2000b, Laville *et al.*, 1998). Auch in dieser Arbeit wurden weitere *hcn*-ähnliche putative Operons mit der Genanordnung CAB identifiziert, deren AS-Sequenzidentitäten zu Opin-Dehydrogenasen in ähnlich geringer Größenordnung liegen (Tabelle 38). Opin-Dehydrogenasen wurden ursprünglich in pflanzenpathogenen Agrobakterien entdeckt. Sie transferieren DNA über ein tumorinduzierendes (Ti)-Plasmid in die Pflanzenzellen. Teile des Plasmids werden in die chromosomale Pflanzen-DNA eingebaut (zusammengefasst in Pitzschke *et al.*, 2010). Auf diesem Plasmid sind Faktoren für die Tumorbildung codiert und Gene für Synthese und Abbau von Opinen, wobei der letzte Schritt der Synthese und der erste Schritt des Abbaus von unterschiedlichen Klassen von Opin-

Dehydrogenasen katalysiert wird (Übersicht in Vladimirov *et al.*, 2015). Durch die Opin-Synthesen, die ebenfalls Dehydrogenasen sind, produzieren die infizierten Pflanzen Opine und Hormone (zusammengefasst in Pitzschke *et al.*, 2010, Vladimirov *et al.*, 2015). Diese sind für das Tumorwachstum verantwortlich. Agrobakterien dienen die synthetisierten Opine, welche Aminosäure-2-Ketosäure Konjugate sind, als Kohlenstoff- und teilweise als Stickstoffquelle (zusammengefasst in Pitzschke *et al.*, 2010, Vladimirov *et al.*, 2015). Die Octopine-Synthese von *Ag. tumefaciens* ist ein Monomer (Hack *et al.*, 1980), während die Nopaline-Synthese aus dem gleichen Bakterium ein Homotetramer ist (Kemp *et al.*, 1979). Charakteristisch für Opin-Synthesen sind meist die Cofaktoren NADPH oder NADH (Hack *et al.*, 1980, Kemp *et al.*, 1979). Als Substrat verwenden Opin-Dehydrogenasen verschiedene Aminosäuren, wie beispielsweise Arginin oder Glycin (Übersicht in Telek *et al.*, 2023). Im Vergleich der Primärstrukturen sind nur die *HcnC* bzw. *OoxB/NoxB* Untereinheiten paralog zu den Opin synthetisierenden Dehydrogenasen (vergleiche 3D-Struktur PDB ID: 7fgp,

Homodimer). Eine neu entdeckte und nicht verwandte Klasse stellen Opinin-Metallophosphorylierende Opinin-Dehydrogenasen dar (Übersicht in McFarlane *et al.*, 2018). Deren Primär- und Quartärstrukturen weisen keine Ähnlichkeiten zu den Cyanidsynthasen oder Opinin-Dehydrogenasen auf (McFarlane *et al.*, 2019; PDB ID: 6pbm).

Opine werden durch die oben beschriebenen Opinin-Dehydrogenasen aus drei verschiedenen Untereinheiten metabolisiert (zusammengefasst in Vladimirov *et al.*, 2015). Diese Opinin-Dehydrogenasen kommen auch in Pseudomonaden vor, in *Ps. putida* haben sie eine heterododekamere Quartärstruktur (Watanabe *et al.*, 2015). Die gereinigten Opinin-Dehydrogenasen besitzen ein charakteristisches UV/Vis-Spektrum von Flavoproteinen (Watanabe *et al.*, 2015). Die Coenzyme sind folglich FAD, FMN und mindestens ein Eisen-Schwefel Cluster (Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016).

6.1.3. Die Sarcosin-Oxidase und die Prolin-Dehydrogenasen

Bei der ungezielten 3D-Strukturmodellierung der *hcn*-Untereinheiten waren heterotetramere Sarcosin-Oxidasen ($\alpha\beta\gamma\delta$) und heterooktamere L-Prolin-Dehydrogenasen ($\alpha_4\beta_4$) die besten *templates* (Kapitel 6.2.7.). Ähnlichkeiten zur Sarcosin-Oxidase wurden schon in früheren Publikationen festgestellt (Laville *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit erstellten 3D-Modelle der Cyanidsynthaseuntereinheiten lassen sich getrennt auf die 3D-Struktur der Sarcosin-Oxidase von *Stenotrophomonas maltophilia* alignieren (PDB-ID: 2gag und 2gah), inklusive der FeS-bindenden Domänen/Untereinheiten, obwohl die Sarcosin-Oxidase keine FeS-Cluster besitzt (Chen *et al.*, 2006). Es werden jedoch nicht alle Bereiche der Sarcosin-Oxidase abgedeckt, da die Cyanidsynthase kleiner ist (Kapitel 6.2.7.).

Die Funktion der Sarcosin-Oxidase ist die Oxidation von Sarcosin zu Wasserstoffperoxid, Glycin und Formaldehyd (Chen *et al.*, 2006). Das aktive Zentrum befindet sich bei der FAD-Bindestelle in der β -Untereinheit (Chen *et al.*, 2006), die homolog zu HcnC ist. Neben FAD besitzt sie zudem die Coenzyme FMN und NAD^+ (Abb. 37). Zwischen der α - und β -Untereinheit bindet FMN. In der α -

Untereinheit ist die NAD^+ -Bindestelle lokalisiert (Chen *et al.*, 2006).

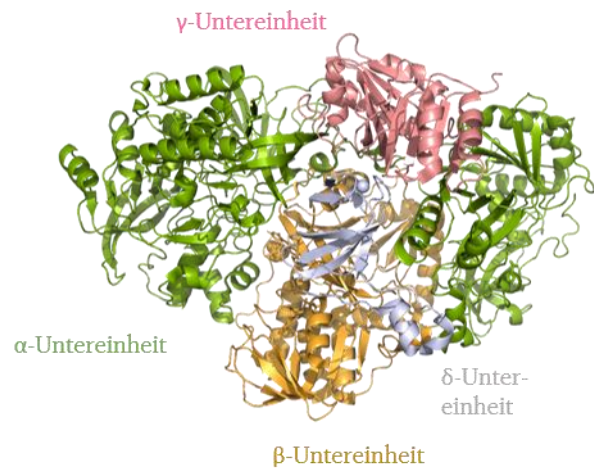


Abbildung 37 3D-Struktur der Sarcosin-Oxidase von *St. maltophilia* (PDB-ID: 2gag, Chen *et al.*, 2006).

Die L-Prolin-Dehydrogenase von *Pyrococcus horikoshii* ist von der Quartärstruktur und von der Untereinheitenzusammensetzung sogar noch ähnlicher zu der Cyanidsynthase als die Sarcosin-Oxidase (Kapitel 6.2.7.). Sie besteht aus zwei Untereinheiten, die als Heterooktamer angeordnet sind (Abb. 38, Tsuge *et al.*, 2005). Die L-Prolin-Dehydrogenase enthält die Coenzyme FAD, FMN und ATP und ein gebundenes Eisen, aber keine FeS-Cluster. Die FAD-Bindestelle befindet sich hierbei in der β -Untereinheit, die ATP-Bindestelle in der α -Untereinheit. Zwischen beiden Untereinheiten wird FMN gebunden, wie in der Sarcosin-Oxidase. Die Substratbindestelle befindet sich in der β -Untereinheit nahe der FAD-Bindestelle (Tsuge *et al.*, 2005).

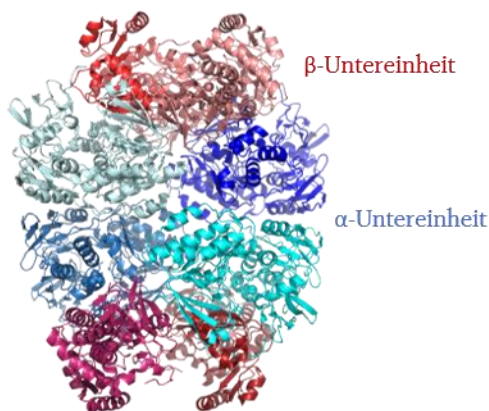


Abbildung 38 3D-Struktur der L-Prolin-Dehydrogenase von *Py. horikoshii* (PDB-ID: 1y56, Tsuge *et al.*, 2005).

Ähnlich, aber unterschiedlich in ihrer Untereinheiten- und Cofaktorzusammensetzung, zur L-Prolin-Dehydrogenase ist die D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Watanabe *et al.*, 2012). Sie besteht wie die Cyanidsynthase aus drei Untereinheiten, welche als Heterododekamer angeordnet sind. Das gereinigte Enzym besitzt eine orange-braune Farbe, was auf eine Mischung der Absorptionen von Flavinen und FeS-Clustern schließen ließ. Die Reihenfolge für die D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase (*lhpBFE*) entspricht *CAB* in der Cyanidsynthase Nomenklatur, was den heterotrimeren Opin-Dehydrogenasen entspricht (Watanabe *et al.*, 2012). Die paarweisen AS-Sequenzidentitäten zwischen Opin-Dehydrogenasen und

D-Hydroxyprolin-Dehydrogenasen sind jedoch mit 25 % (OoxB) bis 37 % (OoxC) gering.

6.1.4. Zielsetzung

In den neu isolierten Cyanidproduzenten sollten die Gene für die Cyanidsynthase identifiziert werden. Durch Sequenz- und Modellvergleiche sollte bioinformatisch vorhergesagt werden, ob das *hcnCAB*-Gencluster eine Rolle bei der Cyanidproduktion spielt. Ziel der Analysen war eine Zuordnung des Genclusters zu Sequenz-/Proteinfamilien, um dadurch dessen Funktion vorherzusagen.

In dem Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 sollten beide identifizierten Gencluster deletiert werden und die Auswirkungen auf die Cyanidproduktion und Biolaugungseffizienz gemessen werden.

Außerdem sollten 3D-Modelle der Untereinheiten erstellt werden. Durch die Modellierung von identifizierten möglichen Cyanidsynthasen sollte die Domänen- und Operonorganisation näher betrachtet werden. Außerdem sollten Vorhersagen für die Funktionen einzelner Aminosäuren der Cyanidsynthasen entwickelt werden. Anhand der Modellierung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden Aminosäureaustausche geplant, um das Enzym näher zu charakterisieren.

6.2. Ergebnisse

6.2.1. Identifikation des *hcn*-Genclusters in *Ps. donghuensis* G2#25

Das *hcnABC*-Gencluster war in den Modellorganismen *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* und *Ch. violaceum* identifiziert worden (Carepo *et al.*, 2004, Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000). In dem für Biolaugungen beschriebenen Modellorganismus *Ba. megaterium* (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020) wurde bislang kein für die Cyanidsynthese codierendes Gencluster beschrieben. Ziel war es nun, die Gencluster für die Cyanidsynthasen durch bioinformatische Analysen in den Eigenisolaten und in weiteren möglichen Cyanidproduzenten zu identifizieren. Der bereits früher beschriebene *Ps. donghuensis* Typstamm HYS war (Gao *et al.*, 2015), basierend auf 16S rDNA-Vergleichen, ursprünglich als nächstverwandtes Isolat zu dem hier beschriebenen *Ps. donghuensis* G2#25 identifiziert (Amberger, 2016b) und dessen *hcnABC*-Operon nach einer BLASTP Suche mit den Proteinsequenzen von *Ps. aeruginosa* PAO1 HcnABC identifiziert worden (Amberger, 2016a). Mit daraus abgeleiteten Oligonukleotiden wurde das G2#25 *hcn*-Operon amplifiziert und ein Expressionsplasmid konstruiert (Plasmid 2, Amberger, 2016a) und zu Beginn dieser Arbeit erneut sequenziert. Beim Vergleich der Nukleinsäuresequenzen der drei Strukturgene *hcnABC* (2 966 bp) zeigte sich, dass Stamm G2#25 mit 99,5 % Übereinstimmung fast identisch zu *Pseudomonas wadenswilerensis* B21-022 ist, während die Übereinstimmung mit mehreren Genomsequenzen von *Ps. donghuensis*, inklusive Stamm HYS, ca. 95 % betrug (Daten nicht gezeigt). Die 16S rDNA-Übereinstimmung zwischen beiden Stämmen betrug 99,8 %, die

average nucleotide identity (ANI) 92,4 % (vgl. Frasson *et al.*, 2017), weshalb beide Stämme in dieser Arbeit nicht als separate Spezies geführt wurden. Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten mit Cyanidsynthasen bekannter Modellorganismen und nächstverwandter Bakterienspezies ergaben, dass HcnC immer eine höhere Aminosäuresequenzidentität von ungefähr 80 % zu den Modellorganismen aufwies, während HcnA und -B mit ca. 70 % etwas niedriger lagen (Tabelle 37). Die Aminosäuresequenzidentitäten von HcnABC war zu *Ps. aeruginosa* PAO1 für alle drei Untereinheiten höher als zu den anderen drei Modellorganismen. Die HcnABC AS-Sequenzidentität von G2#25 und den nächstverwandten Bakterienstämmen war mit 98-100 % nahezu identisch.

6.2.2. Identifikation eines zweiten *hcn*-ähnlichen Genclusters in *Ps. donghuensis* G2#25

Die TBLASTN Analyse der *Ps. donghuensis* G2#25 HcnABC-Aminosäuresequenzen gegen die eigene Genomsequenz zeigte zu dem bekannten *hcnABC*-Gencluster noch einen weiteren paralogen Treffer, mit der Genreihenfolge *hcnCAB* (Abb. 39). Die einzelnen Gene bzw. die abgeleiteten Proteinuntereinheiten werden im Folgenden als *hcnAb* und HcnAb *etc.* bezeichnet. Durch die Genomsequenzierung mit der Nanopore-Technologie enthielt die Sequenz von *hcnCAB* Leserasterfehler nach der Assemblierung. Die Genomsequenz wurde durch eine Sangersequenzierung des *hcnCAB*-Genclusters überprüft und korrigiert. Die Analyse der umliegenden Gene zeigte, dass das Gen einer L-Hydroxyprolin Epimerase mit *hcnCb* überlappt, weshalb es zu

Tabelle 37 Aminosäuresequenzidentitäten der Cyanidsyntheseuntereinheiten von *Ps. donghuensis* G2#25 und den Modellorganismen/*Pseudomonas* verwandten Bakterien.

Bakterium	HcnA [%]	HcnB [%]	HcnC [%]
<i>Ch. violaceum</i> CV1192	67	66	79
<i>Ps. aeruginosa</i> PAO1	77	79	82
<i>Ps. fluorescens</i> Pf0-1	68	74	82
<i>Ps. protegens</i> CHA0	70	72	82
<i>Ps. donghuensis</i> HYS	98	99	99
<i>Ps. donghuensis</i> P482	99	99	99
<i>Ps. wadenswilerensis</i> ¹ CCOS 864	99	100	100

¹siehe Kapitel 3.2.2.1.

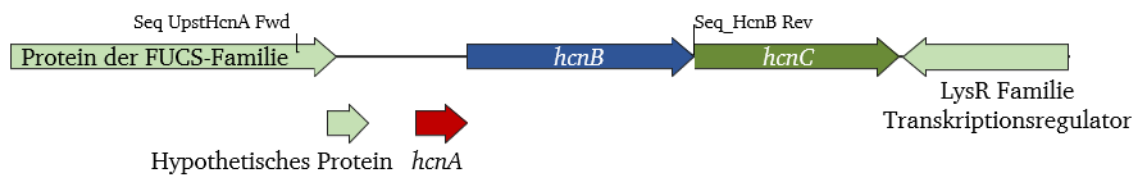
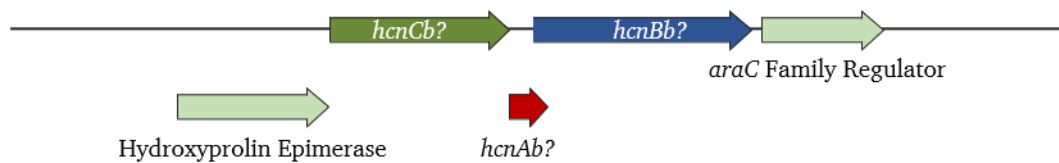
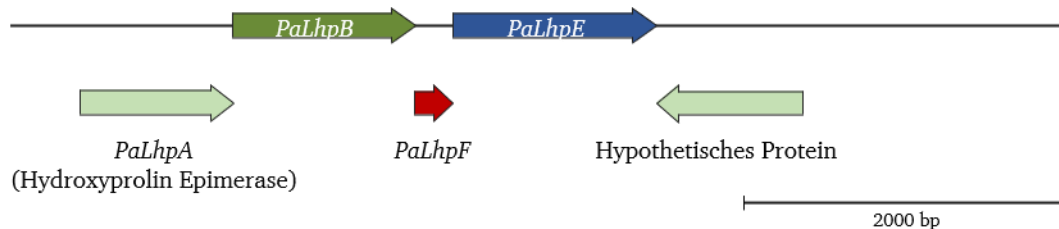
Ps. donghuensis G2#25 *hcnABC**Ps. donghuensis* G2#25 *hcnCAB**Ps. aeruginosa* PA01 *lhpBFE*

Abbildung 39 Vergleich der Genanordnung der *hcnABC*- und *hcnCAB*-Operons von *Ps. donghuensis* G2#25 mit *PaLhpBFE* von *Ps. aeruginosa* PA01. Primer zur PCR-Kontrolle der Promotor-/Operatormutation sind bei *hcnABC* eingezeichnet (Kapitel 5).

dem putativen *hcnCAB*-Operon gehören könnte. Das *hcnABC*-Gencluster steht hingegen separat von den benachbarten Genen.

Das *hcnCAB*-Gencluster weist eine hohe Ähnlichkeit mit dem Gencluster der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase aus *Ps. aeruginosa* PA01 auf (Watanabe *et al.*, 2012). Die Genreihenfolge und die Überlappung mit dem Gen einer L-Hydroxyprolin Epimerase ist beiden Stämmen gemeinsam (Genbezeichnung *lhpABFE*). Vermutlich handelt es sich bei dem hier *hcnCAB* bezeichneten Gencluster ebenfalls um die Gene einer D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase. Diese Ähnlichkeit fiel erst bei späteren Analysen auf, da das *lhpABFE*-Gencluster in den *NCBI*-Datenbankfiles nicht als solches annotiert ist. Deshalb wird das Gencluster hier weiter analog zu den Untereinheiten der Cyanidsynthese als *hcnCAB* benannt. Die Länge der paralogen *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC*- und *hcnCAB*-Gene ist zwar ähnlich, jedoch sind die *hcnCAB*-Gene zwischen 50 und

140 bp kürzer (Tabelle 38). Die Aminosäuresequenzidentitäten beim Vergleich der *hcn*-Gencluster untereinander und der Opin-Dehydrogenase waren bei HcnA mit 40 % am höchsten. Bei HcnB und -C lagen sie bei ca. 25 %, die Identitäten der jeweiligen paralogen Gene sind gering. Die AS-Sequenzidentitäten von HcnABC und HcnCAB zur Opin-Dehydrogenase lagen im gleichen Größenbereich.

Die Längen der Gene von *hcnCAB* und *Ps. aeruginosa* PA01 *lhpBFE* waren für -A und -C identisch. Alle Untereinheiten von HcnCAB weisen eine AS-Sequenzidentität von über 66 % mit der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase auf. Somit codiert das *hcnCAB*-Gencluster vermutlich für eine D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase und nicht für eine Cyanidsynthese oder Opin-Dehydrogenase. Die AS-Sequenzidentitäten der Untereinheiten der Cyanidsynthese mit der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase waren mit ca. 25 % gering. Eine Ausnahme bildete HcnA mit 66 % AS-Sequenzidentität.

Identifikation von *hcn*-Operons/Genclustern

Tabelle 38 Übersicht über die Genlängen und die Aminosäuresequenzidentitäten der abgeleiteten Proteine von *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC* und *hcnCAB* mit *Ps. putida* *odhBCA* und *Ps. aeruginosa* PA01 *LhpBFE*.

Gene/ Proteine	Länge der Gene [bp]		Aminosäuresequenzidentität [%]		
	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 <i>hcnABC</i>	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 <i>hcnCAB</i>	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnABC	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnABC	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnCAB
			<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnCAB	<i>Ps. putida</i> KT2440 Opin-Dehydrogenase	<i>Ps. putida</i> KT2440 Opin-Dehydrogenase
<i>hcnA</i>	315	237	43	38	39
<i>hcnB</i>	1 395	1 338	27	30	29
<i>hcnC</i>	1 257	1 116	24	27	24

Gene (Homo- log)/Proteine	Länge der Gene [bp]	Aminosäuresequenzidentität [%]	
	<i>Ps. aeruginosa</i> PA01 <i>LhpBFE</i>	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnABC	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 HcnCAB
		<i>Ps. aeruginosa</i> PA01 <i>LhpBFE</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> PA01 <i>LhpBFE</i>
<i>LhpB</i> (<i>hcnC</i>)	1 116	24	67
<i>LhpF</i> (<i>hcnA</i>)	237	66	75
<i>LhpE</i> (<i>hcnB</i>)	1 254	29	66

6.2.3. Die Rolle von *hcnABC* und *hcnCAB* von *Ps. donghuensis* G2#25 bei der Cyanidproduktion

Die *hcnABC*-Gene waren schon zuvor in *E. coli* Bl21 exprimiert und die Cyanidproduktion nachgewiesen worden (Amberger, 2016a). Zur Feststellung der Funktionen der Proteine in *Ps. donghuensis* G2#25 wurden beide Gencluster mit dem CRISPR/Cas9-System einzeln und als Doppelmutante deletiert. Bei der Deletion von *hcnABC* wurde zu dem Operon gleichzeitig dessen Promotorbereich inklusive der *anr*-Box

deletiert (Abb. 40). Die letzten 20 Codons von *hcnC* wurden nicht deletiert.

Bei der Deletion von *hcnCAB* wurde der Bereich ab Codon 25 von *hcnCb* bis zu der Position -91 bp vor dem Stoppcodon von *hcnCb* deletiert. Die ersten 24 Codons von *hcnCb* und die letzten 91 bp bei *hcnCb* wurden zur Vermeidung von polaren Effekten nicht deletiert. Durch die Genomsequenzierung mit der Nanopore Technologie enthielt die Sequenz Leserasterfehler nach der Assemblierung. Dies hatte zu einem Fehler bei der Annotation der Gene geführt. Daher war diese Deletion nicht *in frame*.

***hcnABC*-Deletion**

```

1   GTGCATTCAAATCGGGTCACCGATTTGAATGCACTTTTCTAGAATCGCCCGTTGAGAAAC
    upstream Terminator
61  GTCGGCCAGATAAGCACAGGCCATCTGCCCTGTTTTGTCGGTTTGTCCGGCAAGCAGACC
    Bereich upstream anr-Box von hcnA
    hcnC'
121 CATTAGTTCCTGGCCGAGCGTTTTGACTTGCTTGCTGTGGAAAACCAGCAGGCTGCCCTG
    F L A E R F D L L A V E N Q Q A A L
181 GCCTGATTGTGGATAAACC
    A *

```

***hcnCAB*-Deletion**

```

                Epimerase-ORF
                D P F A W G I R P *
1   GACCCGTTGCGCTGGGGCATTGCCCCGTGAGCGGCGCTGCCGTGGCCGATGTGATCGTGA
    M S G A A V A D V I V I
61  TCGGCGCCGGGATCATCGGCGGGCCTGCGCGCAGTCGGTTCGGCTGGCAACCTTCGGCG
    G A G I I G A A C A Q S
121 CCACGCCCGCCGTTTCAGCCCGGCGCGCATCGACACCCTGCTGAGCCTGGACGAAACCGGC
    hcnBb'
181 GACGCTTGAGATAAACGC
    * *

```

Abbildung 40 Übersicht über die DNA-Sequenzen der beiden Gencluster *hcnABC* und *hcnCAB* von *Ps. donghuensis* G2#25 nach der Deletion. In Grün sind jeweils *hcnC'* und *hcnCb'* dargestellt. Das Startcodon von *hcnCb'* ist GTG, daher wird es hier mit Methionin übersetzt. Für *hcnBb'* (Blau) wird aufgrund der Deletion, die nicht *in frame* war, keine AS-Sequenz angegeben. * = Stoppcodons, rotes Stoppcodon: Durch Leserastershift entstandenes Ende des Fusionsgens *hcnCbBb*.

Die Deletionen wurden mittels PCR und flankierenden Primern der jeweiligen Gencluster überprüft (Abb. 41). Die erhaltenen Fragmente waren nach erfolgreicher Deletion jeweils um die erwartete Differenz kürzer. Außerdem wurde überprüft, ob der zu deletierende Genabschnitt im Genom an einer anderen Stelle inseriert worden

war. Hierfür wurde jeweils eine weitere PCR mit intern bindenden Primern durchgeführt, was ergab, dass die beiden *hcn*-Gencluster bei den Deletionsmutanten nicht amplifiziert wurden. Sie wurden folglich nicht an anderer Stelle im Genom inseriert und die Deletionen waren erfolgreich.

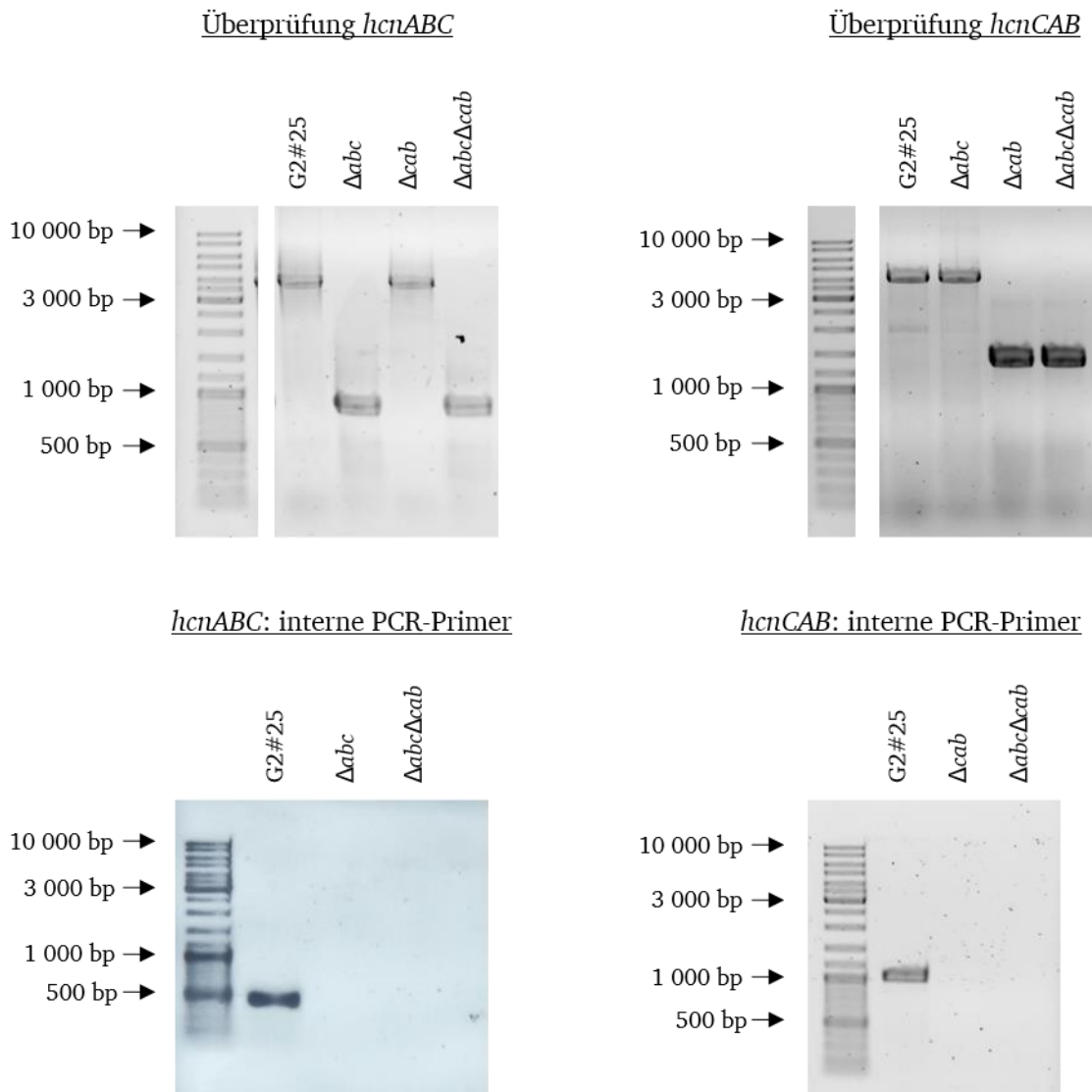


Abbildung 41 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Überprüfungen der *Ps. donghuensis hcnABC* und *hcnCAB*-Deletionsmutanten. Die PCR-Reaktionen wurden mit aufgeschlossenen Zellen durchgeführt, die Auftrennung erfolgte auf 1%igen Agarosegelen. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Marker: GeneRuler DNA Ladder Mix. Primer Überprüfung *hcnABC*: SeqUpstHCNA2_Fwd + Seq_dsHCNC_Rev; Überprüfung *hcnCAB*: Seq_PdongDelCAB_2_Fwd+ Seq_PdongDelCAB_2_Rev; Interne-PCR *hcnABC*: Seq Hcn B 2 For + HcnB Seq Rev; Interne-PCR *hcnCAB*: SeqCABintern_Fwd + Pdong_lang_Seq3. Obere PCR-Reaktionen: Durchführung von Kento Amann.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Deletionen auf *Ps. donghuensis* G2#25 wurden zunächst Wachstumskurven aufgenommen. Alle Deletionsmutanten und der Wildtyp zeigten ein biphasisches Wachstum (Abb. 42). Die *hcnCAB*-Deletionsmutante und die Doppelmutante zeigten leicht höhere $OD_{600\text{ nm}}$ -Werte in den ersten 10 h mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1,6 nach 4 h, während der WT und $\Delta hcnABC$ eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 zeigten. Die Deletionen hatten somit keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von *Ps. donghuensis* G2#25.

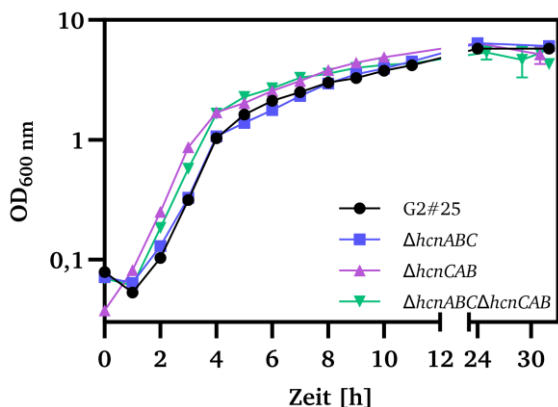


Abbildung 42 Einfluss der Deletionen auf das Wachstum von *Ps. donghuensis* G2#25. Die Hauptkulturen in LB pH 7,2 wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 angeimpft. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Die Deletion der Gencluster führte zu keiner messbaren Cyanidproduktion mit LB pH 8 (Abb. 43). Der Wildtyp zeigte eine Cyanid-

produktion von bis zu 5 mg/l nach 24 h. Zur Steigerung der Cyanidproduktion wurde LB-Medium pH 8 mit 5 g/l Glycin-Methionin verwendet. Der Wildtyp zeigte nach 24 h bis zu 21 mg/l Cyanidproduktion, paradoxerweise zeigten auch die Deletionsmutanten Cyanidproduktionen ($\Delta hcnABC$ 13 mg/l, $\Delta hcnCAB$ und $\Delta hcnABC\Delta hcnCAB$ ca. 7 mg/l). Zur Verifizierung wurde die Messung wiederholt. Die Cyanidproduktion vom *Ps. donghuensis* Wildtyp war mit 11 mg/l nach 24 h geringer als bei der ersten Messung. Auch bei der zweiten Messung zeigten die Deletionsmutanten Cyanidproduktion, jedoch in geringerem Maß als der Wildtyp. *Ps. donghuensis* $\Delta hcnABC$ produzierte mit 8 mg/l Cyanid die höchste Menge der Deletionsmutanten. Zwischen $\Delta hcnCAB$ und $\Delta hcnABC\Delta hcnCAB$ war nur ein geringer Unterschied in der Cyanidproduktion messbar (7 bzw. 5 mg/l nach 24 h).

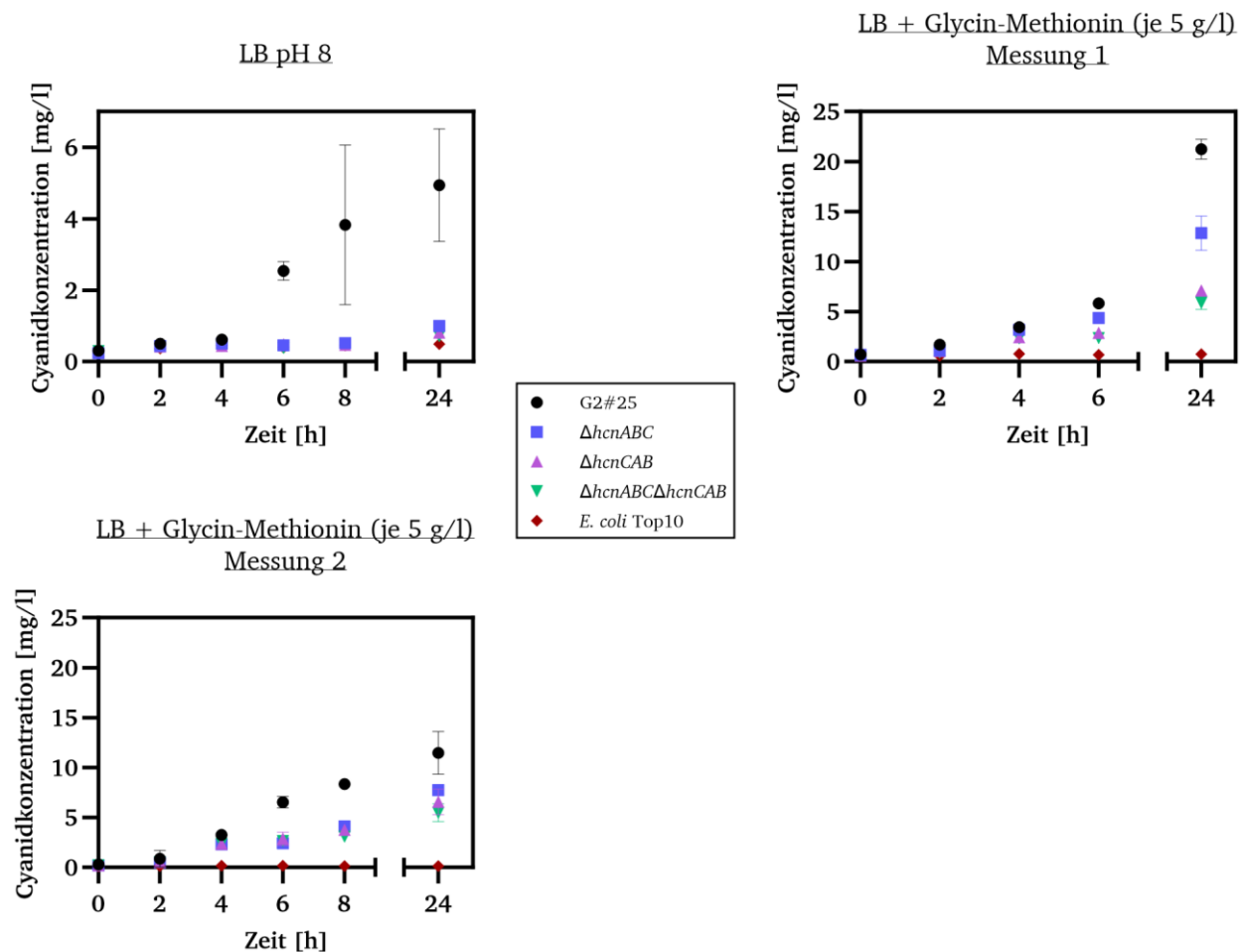


Abbildung 43 Cyanidproduktion der *Ps. donghuensis* G2#25 Deletionsmutanten. Für die Vorkulturen wurde LB pH 7,2 verwendet. Die Hauptkulturen wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 angeimpft. Die Cyanidkonzentration der Überstände wurde durch den Methämoglobintest ermittelt. Die erste Messung in LB pH 8 + Glycin-Methionin wurde von Kento Amann durchgeführt (Amann, 2023). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

6.2.4. Der Einfluss von Methionin auf den Methämoglobintest

Die folgenden Experimente wurden von Kento Amann durchgeführt (Amann, 2023). Zur Überprüfung der zuvor mit dem Methämoglobintest gemessenen Cyanidproduktion der Deletionsmutanten wurden die Cyanidmessungen mit zwei unterschiedlichen qualitativen Cyanidnachweismethoden durchgeführt. Dies waren der Pikrat-Test und der Feigl-Anger-Test (Brinker *et al.*, 1989, Castric *et al.*, 1983). Bei dem Pikrat-Test zeigte nur der Wildtyp *Ps. donghuensis* G2#25 Cyanidproduktion, bei den Deletionsmutanten und der Negativkontrolle *E. coli* Top10 war kein Farbumschlag erkennbar. Bei dem Feigl-Anger-Test war bei Vorhandensein von Cyanid eine Blaufärbung des Papiers zu erkennen (Castric *et al.*, 1983). Hier zeigten alle Kulturen (Wildtyp und Deletionsmutanten) eine gelbe und

keine blaue Färbung. Da die Gelbfärbung nicht der Erwartung entsprach, wurde der Einfluss des Mediums und der Zusätze von Glycin und Methionin auf die Ergebnisse des Feigl-Anger-Tests untersucht. Die Gelbfärbung trat bei *Ps. donghuensis* G2#25 Wildtyp in LB pH 8 mit Methionin und in LB pH 8 mit Methionin und Glycin auf. In LB-Medium, LB-Medium mit Glycin und LB-Medium mit Threonin trat keine Gelbfärbung, jedoch eine Blaufärbung auf. Bei den zum Ende beschriebenen Medienkombinationen bei dem Feigl-Anger Test zeigte der Wildtyp Cyanidproduktion, die Deletionsmutanten jedoch nicht, genauso wie beim Pikrat-Test. Die Ergebnisse dieser Tests deuten auf einen Einfluss von Methionin, bzw. Abbauprodukten davon, auf den Methämoglobintest hin. Obwohl keine Cyanidproduktion vorliegt, zeigten die Methämoglobintests falschpositive Ergebnisse. Nach diesen Erkenntnissen wurden erneut Cyanidtests der Deletions-

mutanten mit dem Methämoglobintest und verschiedenen Medienkombinationen in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Kulturvolumen bei 30 °C schüttelnd durchgeführt. Die sonstige Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.4. beschrieben. Die Absorptionen, umgerechnet in die Cyanidkonzentration, der Deletionsmutanten in LB-Medium + Glycin-Methionin ähnelten der Cyanidproduktion in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Abb. 43, 44), auch die Deletionsmutanten zeigten positive Absorptionen. Die Absorptionen umgerechnet in die Cyanidkonzentration waren mit 5 mg/l Cyanid niedriger als die des Wildtyps mit 12 mg/l nach 6 h. Auch in LB-Medium mit Methionin war eine positive Reaktion des Methämoglobintests nachweisbar. Nach 6 h zeigten die Deletionsmutanten Absorptionen, die einer Cyanidkonzentration von

4-5 mg/l entsprachen, während der Wildtyp Absorptionen, die 11 mg/l Cyanid entsprachen, zeigte. Wenn nur Glycin zu dem LB-Medium hinzugefügt wurde, zeigten die Deletionsmutanten vergleichbare Absorptionen wie *E. coli* Top10, welche einer Cyanidkonzentration von 2 mg/l entsprachen. Der Wildtyp zeigte hingegen wieder eine Cyanidproduktion von 11 mg/l.

Da die Deletionsmutanten sowohl im Pikrin- als auch im Feigl-Anger Test keine positiven Reaktionen zeigten, ist es wahrscheinlich, dass deren Cyanidproduktion mit Methionin ein falsch-positives Ergebnis darstellte. Diese Ergebnisse kamen jedoch zu spät, um sie bei den Messungen im restlichen Teil der Arbeit angemessen zu berücksichtigen.

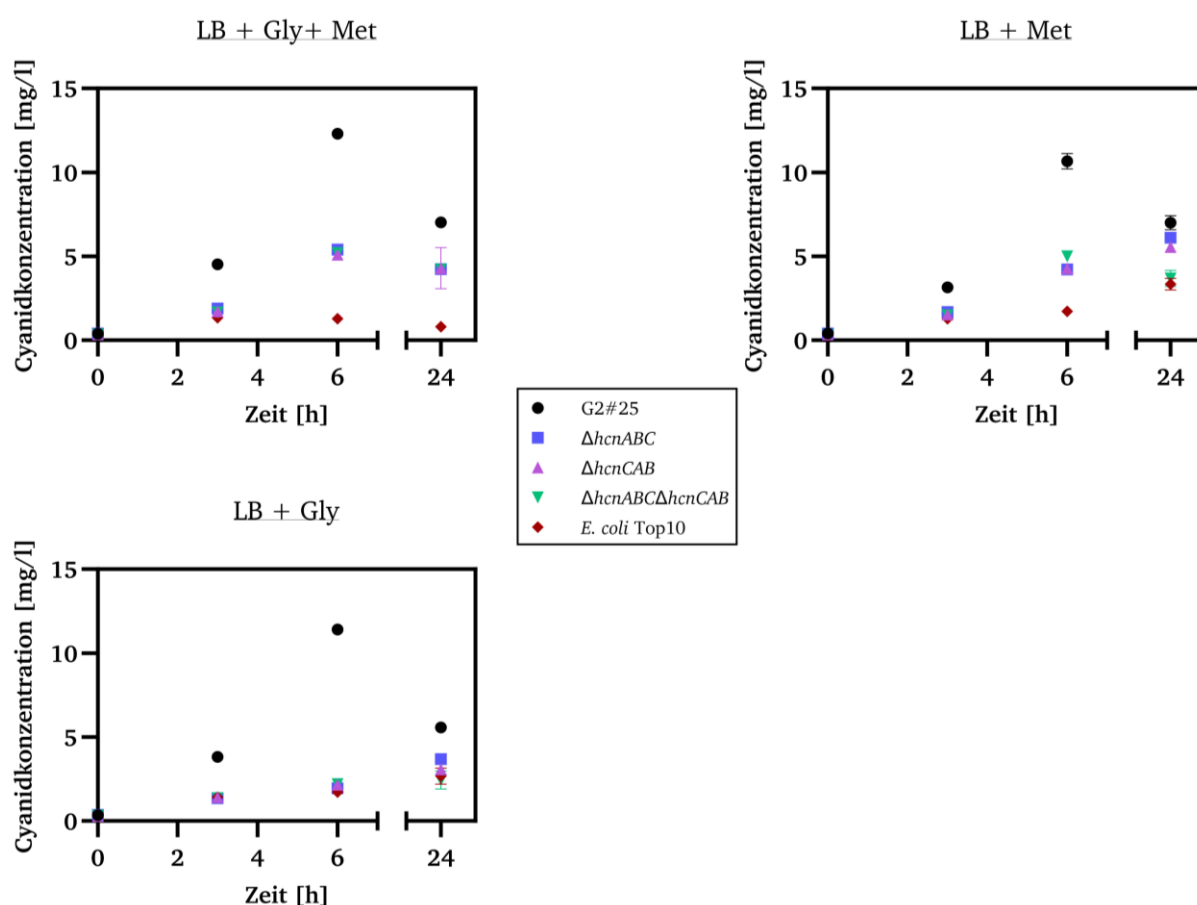


Abbildung 44 Cyanidgehaltsmessung der Deletionsmutanten in Abhängigkeit von Methionin, gemessen mit dem Methämoglobintest. 20 ml Hauptkulturen mit einer Start-OD_{600 nm} von 1, gemessen in Duplikaten (Fehlerbalken = Standardabweichung). LB = LB pH 8, Methionin und Glycin: je 5 g/l. Abbildung verändert nach Amann, 2023.

6.2.5. Funktion von HcnABC und HcnCAB bei der Cyanidproduktion nach Komplementation der Deletionsmutanten

Zur Untersuchung der Funktion von HcnABC und HcnCAB bei der Cyanidproduktion sollten die Deletionsmutanten komplementiert werden.

Das *hcnABC*-Operon wurde über die zwei Plasmide 46 und 47 (Kapitel 2.1.3.) in *Ps. donghuensis* $\Delta hcnABC$ exprimiert. Die *hcnABC*-Transkription stand entweder unter Kontrolle des ohne *lacI* konstitutiv aktiven P_{lacZ} -Promotors (Plasmid 46) oder des nativen *hcnABC*-Promotors (Plasmid 47).

Nach 24 h zeigten der Wildtyp und die durch P_{lacZ} gesteuerte komplementierte $\Delta hcnABC$ -Mutante eine vergleichbare Cyanidproduktion von 17 mg/l (Abb. 45). Die *hcnABC*-Deletionsmutante zeigte ebenfalls eine scheinbare Cyanidproduktion von 13 mg/l.

Nach Komplementation unter Kontrolle des nativen Promotors wurde eine höhere Cyanidproduktion von 44 mg/l nach 24 h erreicht. Auch in den ersten Stunden war die Cyanidproduktion dieses Stammes im Vergleich zum Wildtyp erhöht (11 mg/l bzw. 7 mg/l nach 6 h). Die Komplementation des *hcnABC*-Operons war somit erfolgreich. Die Cyanidproduktion wurde wiederhergestellt und gesteigert. Die scheinbare Cyanidproduktion von $\Delta hcnABC$ war durch das Vorhandensein von Methionin bedingt (siehe vorheriges Kapitel). Eine erneute Durchführung ohne Methionin würde eindeutigere Ergebnisse liefern.

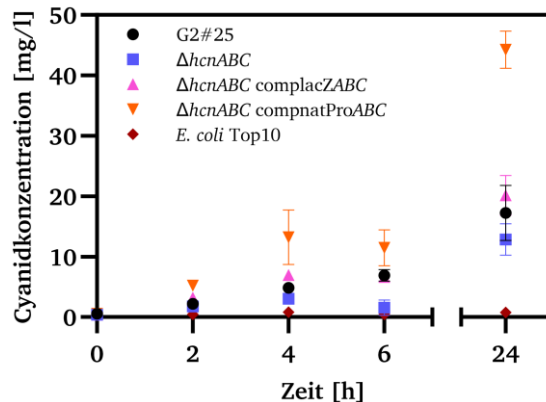


Abbildung 45 Wiederherstellung der Cyanidproduktion der *Ps. donghuensis* *hcnABC*-Deletionsmutante durch Komplementation. Die Vorkulturen wurden sedimentiert und in LB pH 8 mit 5 g/l Glycin-Methionin resuspendiert. Die Hauptkulturen wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 angeimpft. *E. coli* Top10 diente als Negativkontrolle. Der Kulturüberstand wurde zur Bestimmung der Cyanidkonzentration verwendet. complacZABC: Komplementation mit *hcnABC* unter Kontrolle von P_{lacZ} , compnatProABC: Komplementation mit *hcnABC* unter Kontrolle des nativen Promotors. Experimente wurden durchgeführt von Kim, 2022. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Für *hcnCAB* war trotz mehrerer Anläufe nur die Amplifikation der Fragmente zur Konstruktion eines pBBR1-basierten Expressionsplasmids erfolgreich, nicht aber deren Assemblierung, weder mit Gibson Assembly noch durch Phosphorylierung und Ligation der PCR-Produkte (Kim, 2022, andere Anläufe nicht gezeigt). Daher konnten die *Ps. donghuensis* Deletionsmutanten nicht mit *hcnCAB* komplementiert werden.

Die Biolaugungsfähigkeit der Deletionsmutanten mit und ohne Komplementation unter Kontrolle des nativen Promotors wurde mit Goldpolitur Schleifstaub getestet. Die *hcnABC*- und die *hcnCAB*-Deletionsmutanten zeigten eine Goldlaugungseffizienz von <2,5 % (entspricht < 6 μ g Au, Abb. 46). Die Goldlaugungseffizienzen der komplementierten *hcnABC*-Deletionsmutante und des Wildtyps lagen bei den ersten drei Zeitpunkten zwischen 40 und 60 % (110-140 μ g Au). Nach 144 h zeigte der Wildtyp eine gelaugte Goldmenge von 141 μ g, die komplementierte Deletionsmutante zeigte eine höhere Goldmenge von 217 μ g. Dies entspricht einer Goldlaugungseffizienz von 85 %. Die Goldlaugungsfähigkeit von *Ps. donghuensis* $\Delta hcnABC$ wurde durch die Komplementation wieder hergestellt.

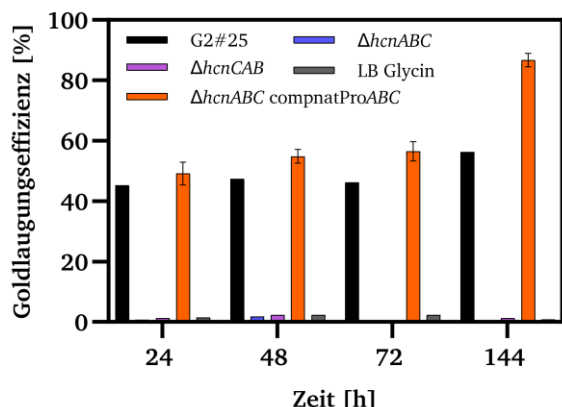


Abbildung 46 Goldlaugung durch die *Ps. donghuensis* Deletionsmutanten und der komplementierten Deletionsmutante. Laugungsmaterial: Schleifstaub von der Goldpolitur (2,5 g, 256 μ g Au/Kolben; n = 1, compnatProABC n = 2). Als Laugungsmedium diente LB pH 7,2 + 115 mM Glycin. Das Kulturvolumen war erhöht, da bei der Berechnung des Medienvolumens der Feststoff und die Zellen nicht beachtet wurden (Gesamtvolumen 104,5 ml). Die Goldkonzentration im Überstand wurde durch ICP-MS Messungen bestimmt (Annabelle Klämke). compnatProABC: Komplementierung mit *hcnABC* unter Kontrolle des nativen Promotors. Experimente durchgeführt von Kim, 2022. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

6.2.6. Vorkommen von *hcnABC* und *hcnCAB*-Genen in Pseudomonaden

Ein Ziel der Genomsequenzierung der Cyanidproduzierenden Neuisolate war die Identifizierung der jeweiligen *hcn*-Operons. Ein TBLASTN mit HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25 gegen die Genomsequenzen führte zu einer Übereinstimmung beim Isolat *Ps. hutmensis* MG#27. Das identifizierte Gencluster entsprach der Reihenfolge *hcnCAB*, ein *hcnABC*-Operon war nicht auffindbar. Die DNA-Sequenzidentitäten der putativen *hcnCAB*-Operons der beiden Isolate liegen zwischen 83 und 88 %, die entsprechenden Aminosäuresequenzidentitäten liegen zwischen 86 und 92 % (Tabelle 39). Auch dieses putative

hcnCAB-Operon wies hohe AS-Sequenzidentitäten von jeweils über 65 % zu der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase von *Ps. aeruginosa* auf. Aufgrund der AS-Sequenzidentitäten handelt es sich hierbei vermutlich um das putative Operon für das eben genannte Enzym.

Ps. fluorescens und *Ps. aeruginosa* sind fluoreszierende Pseudomonaden und bekannte Cyanidproduzenten. Deren Genome und die weiterer fluoreszierender Pseudomonaden (Rajwar *et al.*, 2016), wurden hinsichtlich des Vorkommens von *hcnABC* und *hcnCAB* analysiert. Hierfür wurden BLASTP und PHI-BLASTP (HcnB, Motiv CRCE) Analysen verwendet (Kapitel 2.2.5.3.). Von 41 sequenzierten Stämmen aus GenBank und den Eigenisolaten wurde in vier Pseudomonaden weder das *ABC*-Operon noch das putative *CAB*-Operon identifiziert (Tabelle 40). In 16 Spezies war nur das *ABC*-Operon und in sechs nur das putative *CAB*-Operon nachweisbar. In 14 Pseudomonaden wurden beide Gencluster nachgewiesen. Das *ABC*-Operon scheint in fluoreszierenden Pseudomonaden weiter verbreitet zu sein als das putative *CAB*-Operon. Bei fast allen putativen *hcnCAB*-Operons handelt es sich aufgrund einer AS-Sequenzidentität von über 64 % (HcnCb zu LhpB) und einer Genanordnung mit Hydroxyprolin Epimerase um das Gencluster einer D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase. Eine Ausnahme bildet hier das putative *hcnCAB*-Operon von *Ps. arsenicoxydans* ACM1, hier lag die AS-Sequenzidentität zu der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase nur bei 27 % (HcnCb). Auch zu der Opn-Dehydrogenase von *Ag. tumefaciens* und zur Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 betragen die AS-Sequenzidentitäten unter 42 %. Die Funktion dieses Genclusters bleibt unklar. Bei dem dargestellten Operon von *Ps. putida* KT2440 handelt es sich um das Operon der Opn-Dehydrogenase (vgl. Watanabe *et al.*, 2015).

Tabelle 39 Vergleich von *Ps. hutmensis* MG#27 *hcnCAB* mit *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnCAB* und *Ps. aeruginosa* PA01 *lhpBFE*.

Untereinheit	DNA-Sequenzidentität [%]		Aminosäuresequenzidentität [%]	
	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 <i>hcnCAB</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> PA01 <i>LhpBFE</i>	<i>Ps. donghuensis</i> G2#25 <i>hcnCAB</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> PA01 <i>lhpBFE</i>
<i>hcnAb</i>	88	77	90	79
<i>hcnBb</i>	83	64	86	65
<i>hcnCb</i>	85	74	92	68

Identifikation von *hcn*-Operons/Genclustern

Tabelle 40 Übersicht über die *hcn*-ähnlichen putativen Operons in fluoreszierenden Pseudomonaden.

fluoreszierende Pseudomonaden (Rajwar <i>et al.</i> , 2016)	Hinterlegtes Genom NCBI (Stammbezeichnung) ¹	<i>hcn</i> -ähnliches Gencluster	Cyanidsynthaseoperon bereits identifiziert (Flury <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ps. aeruginosa</i> PA01	PA01	ABC + <i>LhpBFE</i>	
<i>Ps. alkylphenolica</i>	Neo	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. arsenicoxydans</i> CECT 7543T	ACM1	CAB	
<i>Ps. asplenii</i>	ES-PA-B8	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. baetica</i> a390T	LMG 25716	ABC	
<i>Ps. brassicacearum</i> CFBP 11706T	38D4, S1, DF41, usw.	Je nach Stamm ABC oder <i>CAB</i>	x
<i>Ps. brenneri</i> DSM 15469T	DSM 15469	ABC	
<i>Ps. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> LMG 1245T	PCC 1606	ABC + <i>CAB</i>	x
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25	Eigenisolat	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. donghuensis</i>	B21-043 und P482	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. entomophila</i> BV-P13	2014	ABC	
<i>Ps. frederiksborgensis</i> DSM 13022T	ERDD5:01	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. fulva</i> NRIC 0180	MEJ086	CAB ²	
<i>Ps. fuscovaginae</i> MAFF 301177T	SE-1 345 CB98818	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. gessardii</i> CIP 105469T	-	kein <i>hcn</i> -Gencluster identifiziert	
<i>Ps. grimontii</i> CIP 106645T	DSM 17515	ABC	
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	Eigenisolat	<i>CAB</i>	
<i>Ps. jessenii</i> CIP 10574T	EC S101	ABC	
<i>Ps. kilonensis</i> 520-20T	S12	ABC + <i>CAB</i>	x
<i>Ps. koreensis</i> LMG 21318T	A9	ABC	
<i>Ps. lini</i> CIPR 107460T	DSM 16768	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. libanensis</i> CIP 105460T	-	kein <i>hcn</i> -Gencluster identifiziert	
<i>Ps. lundensis</i> ATCC 49968T	L1822	ABC	
<i>Ps. lutea</i> AGL 2	CFBP13723	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. mandelii</i> LMG 2210T	JR-1	ABC	
<i>Ps. migulae</i> CCUG 43165T	R1-9	<i>CAB</i>	
<i>Ps. mohnii</i> CCUG 53115T	DSM18327	<i>CAB</i>	
<i>Ps. monteilii</i> CIP 104883T	BCNJ	ABC	
<i>Ps. moorei</i> DSM 12647T	DSM 12647	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. moraviensis</i> DSM 16007T	N 20.18	ABC	
<i>Ps. mosselii</i> CIP 105259	BS011	ABC	
<i>Ps. oleovorans</i> RS1	P0-271	ABC + <i>CAB</i>	
<i>Ps. panacis</i> CG2016 1	WS 4668 7	ABC	
<i>Ps. plecoglossicida</i> FP20	-	kein <i>hcn</i> -Operon identifiziert	
<i>Ps. protegens</i> CHA0	CHA0	ABC + <i>CAB</i>	x
<i>Ps. putida</i>	KT2440	CAB	
<i>Ps. syringae</i> ICMP 3023T	inb918	ABC	
<i>Ps. taiwanensis</i> BCRC 17751	DSM 21245	Kein vollständiges Genom, kein <i>hcn</i> -Operon identifiziert	
<i>Ps. umsongensis</i> LMG 21317T	KCJK7865	ABC	
<i>Ps. veronii</i> LMG17761T	R4	ABC	
<i>Ps. wadenswilerensis</i>	CCOS 864	ABC + <i>CAB</i>	

¹Der jeweilige Stamm wurde für die BLAST Analyse verwendet, da teils kein Genom für den in der ersten Spalte angegebenen Stamm in der Datenbank hinterlegt war.

²Es handelt sich hierbei vermutlich um eine D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase, die HcnCb AS-Sequenzidentität lag bei 64 %, jedoch gab es kein überlappendes Hydroxyprolin Epimerase Gen.

CAB = bei diesen putativen Operons handelt es sich vermutlich um Operons der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase. Die AS-Sequenzidentität von *hcnC* und *lphB* beträgt ≥ 64 % und ein überlappendes Hydroxyprolin Epimerase Gen liegt vor.

6.2.7. 3D-Strukturmodellierungen von Cyanidsynthasen: *Ps. donghuensis* G2#25

Die zuvor veröffentlichten Enzymdaten der Cyanidsynthase stammen aus Experimenten mit Zellextrakten, ein gereinigtes Enzym lag nicht vor (Castric *et al.*, 1981). Daher gibt es auch keine Strukturaufklärung des Enzyms. Durch eine bioinformatische Modellierung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 sollten Erkenntnisse über die Struktur und mögliche Cofaktoren und deren Bindestellen gewonnen werden. HcnA besitzt wahrscheinlich ein Eisen-Schwefel Cluster (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). HcnB besitzt zum einen eine FAD/NAD-Bindedomäne und zum anderen am C-terminalen Ende ein Eisen-Schwefel Cluster Bindemotiv (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012, Kapitel 1.3., Abb. 3). Die Autoren zeigten durch Sequenzvergleiche, dass HcnC nur eine FAD/NAD-Bindedomäne besitzt.

Die 3D-Strukturen von HcnA, -B und -C von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden ausgehend von den Proteinsequenzen modelliert (Abb. 47). Für die drei Untereinheiten waren jeweils die Sarcosin-Oxidase von *Stenotrophomonas maltophilia* (PDB-ID: 2gag) und die Prolin-Dehydrogenase von *Py. horikoshii* (PDB-ID: 1y56) die besten Modellierungs-*templates*. Die HcnABC-Untereinheiten wurden auf Basis der heterotetrameren Sarcosin-Oxidase ($\alpha\beta\gamma\delta$) und der heterooktameren Prolin-Dehydrogenase ($\alpha_4\beta_4$) als Heterotrimer angeordnet.

Die 3D-Modelle von HcnA und -B alignieren strukturell an die N-terminale Hälfte der α -Untereinheit der Sarcosin-Oxidase (enthält eine NAD-Bindestelle). HcnC aligniert an die β -Untereinheit. Die C-terminale Hälfte der α -, die γ - und δ -Untereinheit der Sarcosin-Oxidase wurden nicht von der Cyanidsynthase abgedeckt. Die drei Modelle der Cyanidsynthaseuntereinheiten hatten RMSD-Werte von $< 2,3$ Å zu den Untereinheiten der Sarcosin-Oxidase, somit sind sie strukturell so ähnlich, dass das Alignment signifikant ist. HcnB besitzt die höchste Übereinstimmung mit $0,265$ Å (Tabelle 41).

Auch bei der Prolin-Dehydrogenase wurden die Modelle von HcnA und -B an die α -Untereinheit, HcnC an die β -Untereinheit aligniert, wobei die übrigen Teile der Sarcosin-Oxidase auch bei der Prolin-Dehydrogenase fehlten. HcnA, HcnB und HcnC waren mit RMSD-Werten von unter $2,8$ Å ähnlich zu den jeweiligen Strukturen der Untereinheiten der Prolin-Dehydrogenase.

Der *root-mean-square deviation* (RMSD)-Wert gibt den mittleren Abstand an, den die C-alpha Kette der jeweiligen Proteine im Strukturalignment aufweist. Je kleiner der RMSD-Wert, desto höher die Identität ($0 =$ identisch). Bei einem RMSD-Wert von über 3 Å sind die Abweichungen der räumlichen Anordnung erheblich, was aber nicht ausschließt, dass die Proteine eine grundsätzlich ähnliche Abfolge und Anordnung von Sekundärstrukturelementen haben, also strukturell ähnlich sind.

Tabelle 41 Übersicht über die *root-mean-square deviation*-Werte der Cyanidsynthaseuntereinheiten von *Ps. donghuensis* G2#25 zu der Sarcosin-Oxidase und der Prolin-Dehydrogenase.

Untereinheit	Sarcosin-Oxidase (PDB-ID: 2gag)		Prolin-Dehydrogenase (PDB-ID: 1y56)	
	RMSD [Å]	Untereinheit	RMSD [Å]	Untereinheit
HcnA	1,967	α	1,887	α
HcnB	0,265	α	2,726	α
HcnC	2,271	β	2,143	β

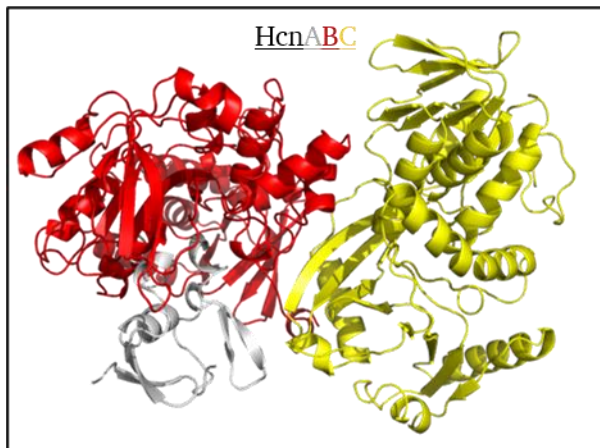


Abbildung 47 3D-Strukturmodell der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25. Die drei Untereinheiten HcnA (Grau), HcnB (Rot,) und HcnC (Gelb) wurden als Heterotrimer auf die Sarcosin-Oxidase von *St. maltophilia* (PDB-ID: 2gag) modelliert. Modellierung mit Phyre². Das 3D-Strukturmodell ist im elektronischen Anhang hinterlegt (Übersicht in Kapitel 11).

Die Anordnung einiger Cysteine in HcnA und in HcnB ähnelt derjenigen bei einem FeS-Cluster (Kapitel 6.2.8., Abb. 48), was die Sequenzbasierten Vorhersagen bestätigt (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). HcnC besitzt keine Cysteine, die vergleichbar angeordnet sind. Die Sarcosin-Oxidase besitzt keine FeS-Cluster und keine entsprechend angeordneten Cysteine (Chen *et al.*, 2006), während die Prolin-Dehydrogenase ein gebundenes Eisen besitzt, koordiniert von den Cysteinen aus der HcnB-paralogen Untereinheit (Tsuge *et al.*, 2005).

Für die Opin-Dehydrogenase von *Bradyrhizobium japonicum* war mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie gezeigt worden, dass sie je ein [4Fe-4S] Cluster in der HcnA-äquivalenten γ -Untereinheit und ein [2Fe-2S] Cluster in der HcnB entsprechenden α -Untereinheit koordiniert (Watanabe *et al.*, 2016).

Alle drei Cyanidsynthese-ähnlichen Enzyme besitzen Bindestellen für die Cofaktoren FAD und

FMN, während sich die Cofaktoren der HcnB-ähnlichen Untereinheiten unterscheiden (Chen *et al.*, 2006, Tsuge *et al.*, 2005, Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016, Tabelle 42). Es können NAD, FAD oder ATP sein. Auch für HcnB und -C wurden mögliche FAD- oder NAD-Bindestellen vorhergesagt (Rossmann *fold*; Laville *et al.*, 1998). Diese alignieren jeweils an den Untereinheiten der Enzyme mit der entsprechenden Bindestelle. Da für alle drei ähnlichen Enzyme an der Stelle, an der HcnC aligniert, FAD vorhanden ist, ist das Vorhandensein von FAD in HcnC wahrscheinlicher als von NAD. Bei HcnB ist nicht eindeutig geklärt, ob NAD oder FAD vorliegt. Für die Cyanidsynthese ist kein FMN vorhergesagt worden. Ein Vorhandensein ist jedoch wahrscheinlich, da die drei ähnlichen Enzyme jeweils FMN besitzen.

Bei allen Enzymen dieser Familie beherbergt die FAD-bindende Untereinheit oder Domäne das jeweilige aktive Zentrum (Chen *et al.*, 2006, Tsuge *et al.*, 2005), bei der Cyanidsynthese ist dies HcnC. Tatsächlich lässt sich das 3D-Modell von HcnC gut an experimentell bestimmte 3D-Strukturen vergleichbarer Enzyme alignieren. Dies gilt insbesondere für die Glycinoxidasen (GO), die nur aus einem Homodimer aus der HcnC-homologen Untereinheit besteht und Glycin zu Ammoniak, Glyoxalsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert (Shiono *et al.*, noch nicht veröffentlicht). Der RMSD-Wert des HcnC Modells beträgt 0,82 Å mit der GO aus *Geobacillus kaustophilus* (PDB-ID: 4ysh; Shiono *et al.*, noch nicht veröffentlicht), in 253 von 377 Aminosäuren. Der Hauptunterschied zwischen beiden Enzymen ist, dass die Cyanidsynthese eine Insertion von ca. 40 Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte von HcnC besitzt, die für diese Enzyme charakteristisch zu sein scheint (vgl. Kapitel 11, elektronischer Anhang: Sequenzalignement HcnC).

Tabelle 42 Übersicht über die Cofaktoren der ähnlichen Enzyme zu HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25.

Hcn- UE	Sarcosin-Oxidase		Prolin-Dehydrogenase		Opin-Dehydrogenase	
	UE	Cofaktor (nach Chen <i>et al.</i> , 2006)	UE	Cofaktor (nach Tsuge <i>et al.</i> , 2005)	UE	Cofaktor (nach Watanabe <i>et al.</i> , 2015, Watanabe <i>et al.</i> , 2016)
A	α		α		γ	[2Fe-2S]/[4Fe-4S]
B	α	NAD, FMN ¹	α	ATP, FMN, Fe	α	FAD, FMN, [2Fe-2S]
C	β	FAD, FMN	β	FAD, FMN	β	FAD, FMN

¹Alle angegebenen FMNs binden jeweils zwischen der α - und β -Untereinheit, daher sind sie bei beiden Untereinheiten angegeben.

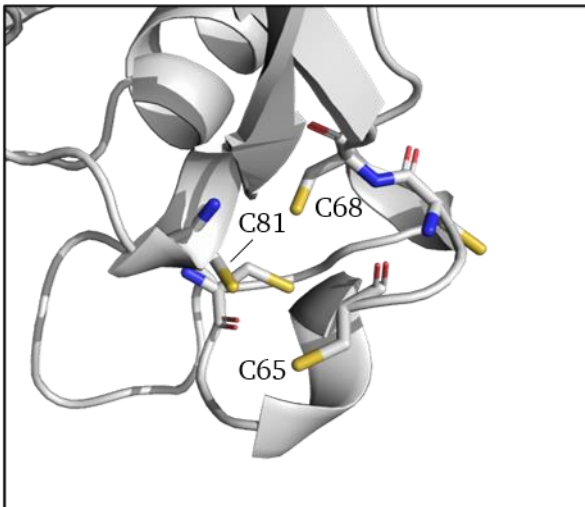
UE = Untereinheit.

6.2.8. Funktionalität der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 nach Aminosäureaustauschen

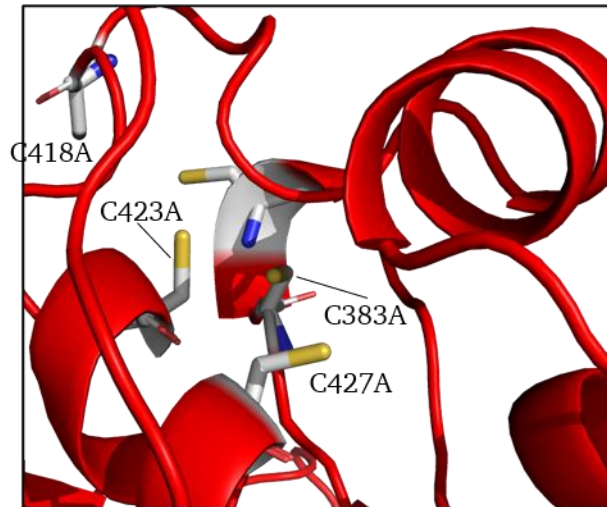
Verschiedene Aminosäuren, für die eine Cofaktor Bindung vorhergesagt wurde, wurden durch gezielte Mutagenese der jeweiligen Gene im *E. coli* *hcnABC*-Expressionsplasmid verändert (Plasmid 2). Dies waren Cysteine in HcnA und -B, die möglicherweise je ein FeS-Cluster binden.

Zudem wurden Aminosäuren, die für die FMN- oder FAD-Bindung zuständig sein könnten, verändert. In HcnA wurden drei Cysteine durch Alanin oder Serin ersetzt (Abb. 48), vier Cysteine in HcnB wurden durch Alanin ersetzt. Zudem wurden in HcnB Aminosäuren verändert, die möglicherweise für die FMN-Bindung zuständig sind (K408, Q419, R446). In HcnC wird wahrscheinlich FAD gebunden, zwei Arginine wurden verändert.

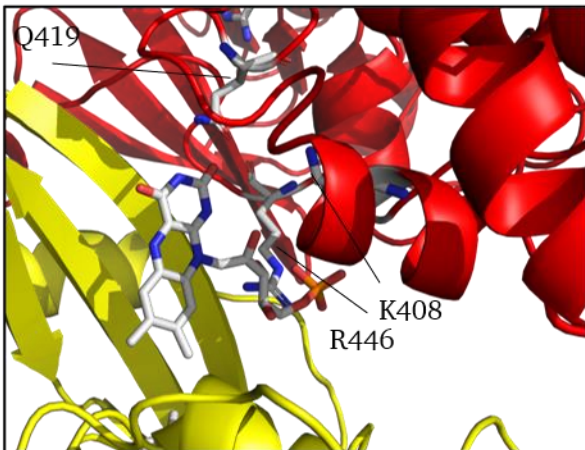
HcnA-“FeS-Cluster“



HcnB-“FeS-Cluster“



HcnB-“FMN-Bindestelle“



HcnC-“FAD-Bindestelle“

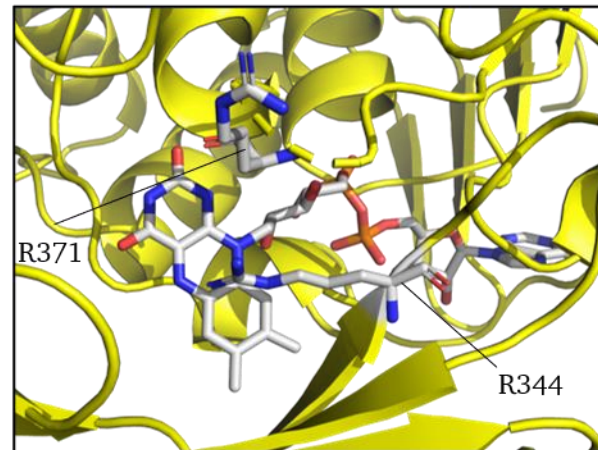


Abbildung 48 Übersicht über vorhergesagte Cofaktor Bindestellen in den *Ps. donghuensis* G2#25 HcnABC-Untereinheiten. Die markierten Aminosäuren wurden jeweils ersetzt.

Mit dem Expressionsplasmid pASK-HCN.dong transformierte *E. coli* Bl21 Kulturen zeigten die höchsten Cyanid-Konzentrationen von 0,9 mg/l bzw. 1,7 mg/l in zwei separaten Versuchsreihen (Abb. 49). Der Austausch der meisten Cysteine in HcnA und -B führte zu keiner oder einer sehr geringen Cyanidproduktion im Vergleich zum Wildtyp (max. 0,13 mg/l, HcnB_C423A). Die Cysteine scheinen eine essentielle Funktion in der Cyanidsynthese zu haben, womöglich durch die Bindung eines FeS-Clusters, wie in Opn-Dehydrogenasen (Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016). Nur die Veränderung HcnB_C427A führte zu einer Wildtyp-ähnlichen Cyanidproduktion von 1,2 mg/l. Dieses Cystein ist somit nicht

essentiell. Der Austausch der Aminosäuren in HcnB, die möglicherweise für die Bindung von FMN verantwortlich sind (K408, Q419, R446), führte zu einer Cyanidproduktion von 1,0 bis 1,3 mg/l. Die Cyanidproduktion war im Vergleich zum Wildtyp zwar geringer, jedoch sind diese Aminosäuren nicht essentiell. Der Austausch der Arginine 371 und 344 (FAD-Bindestelle) in HcnC führte zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust der Cyanidsynthese (maximale Cyanidproduktion 0,2 mg/l). Dies war sogar bei R344K der Fall, bei dem eine basische Aminosäure gegen eine andere basische ausgetauscht ist.

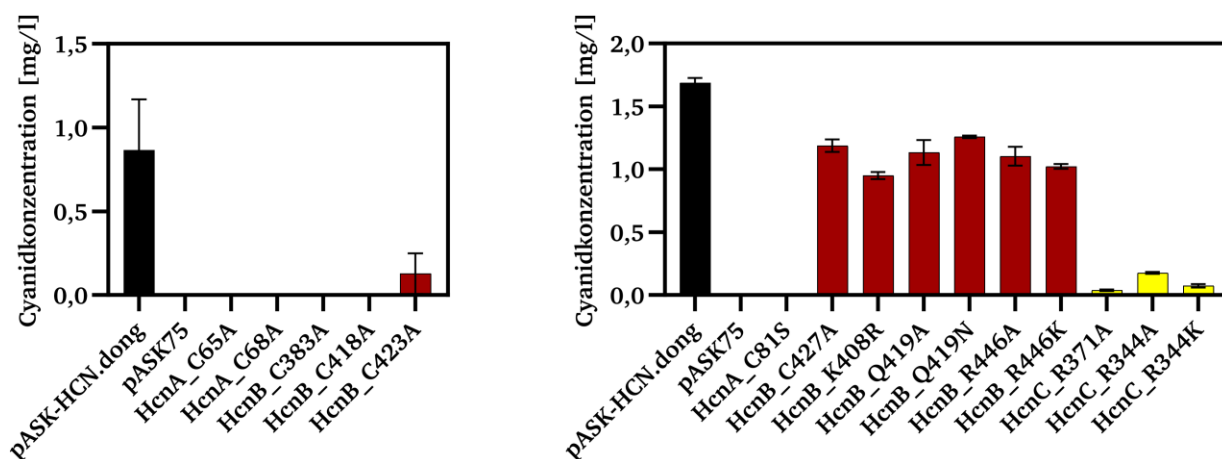


Abbildung 49 Einfluss von Aminosäureaustauschen auf die Cyanidproduktion von *E. coli* B121 Zellen mit cytoplasmatisch produzierter Cyanidsynthase. pASK-HCN.dong in *E. coli* diente als Positivkontrolle und der Leervektor pASK75 als Negativkontrolle. **Links:** Cyanidproduktion von Overnightkulturen ohne Induktion. Experimente durchgeführt von Södler, 2019. **Rechts:** Cyanidproduktion 24 h nach Induktion der Hauptkultur mit Anhydrotetrazyklin (200 µg/l) und Glycin-Methionin (5 g/l). Experimente durchgeführt von Peric, 2021. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

6.2.9. 3D-Strukturmodellierung von HcnCAB

Zum Vergleich der beiden Enzyme HcnABC und HcnCAB von *Ps. donghuensis* G2#25 wurden die drei Untereinheiten von HcnCAB ebenfalls modelliert (Abb. 50). Anschließend wurden die 3D-Modelle mit denen von HcnABC und von der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase von *Ps. aeruginosa* verglichen. Auch HcnCAB wurde auf die Sarcosin-Oxidase und Prolin-Dehydrogenase

modelliert. Die beiden Untereinheiten HcnAb und -Bb besaßen, wie die Paralogen von HcnABC, ein FeS-Cluster ähnliche Anordnung der Cysteine. Auch für die D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase wird das Vorhandensein von zwei FeS-Clustern vorhergesagt (Watanabe *et al.*, 2012). Diese befinden sich, wie bei den Opil-Dehydrogenasen, im HcnAb oder HcnBb Äquivalent (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016).

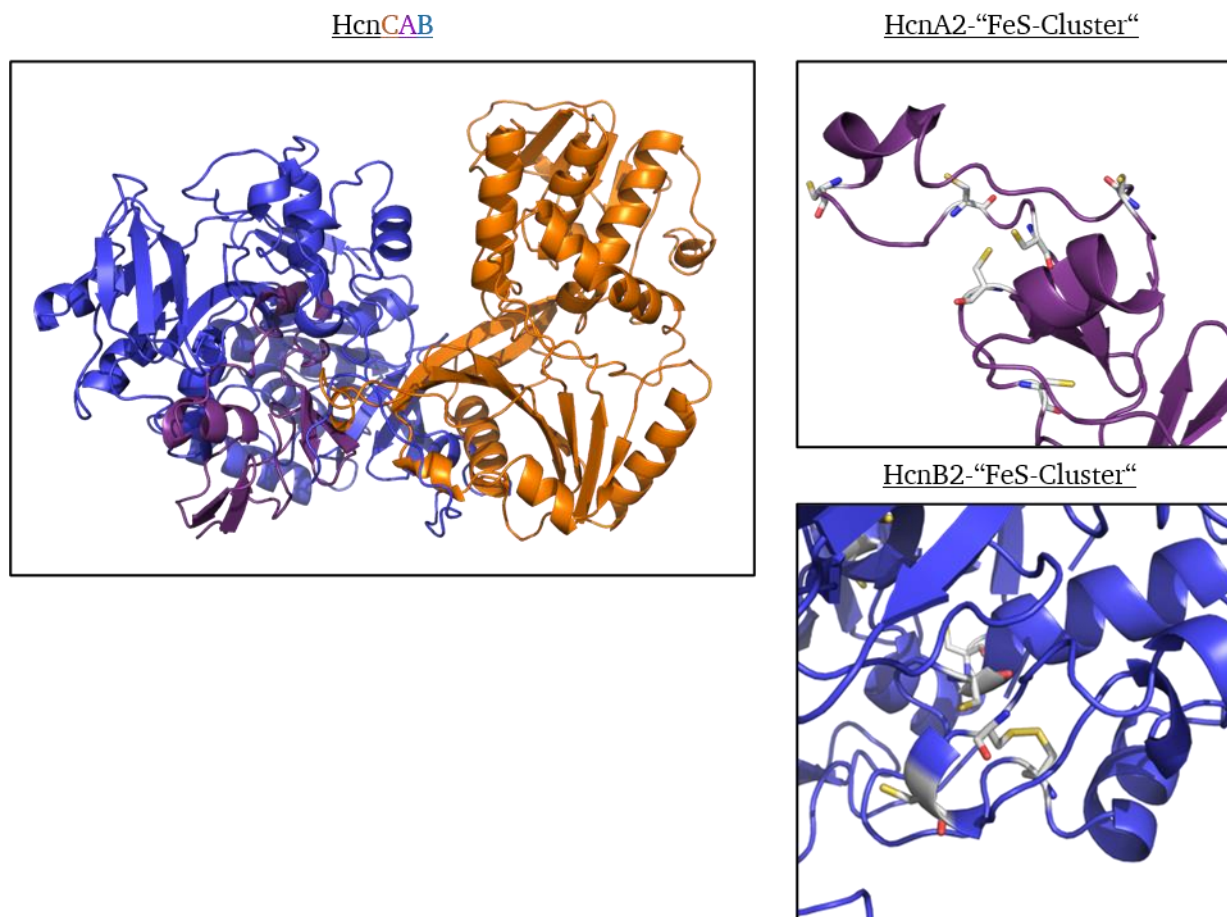


Abbildung 50 3D-Strukturmodell von *Ps. donghuensis* G2#25 HcnCAB. Die Modellierung der Untereinheiten wurde mit Phyre² durchgeführt. Die drei Untereinheiten HcnCb (Orange), HcnAb (Lila) und HcnBb (Blau) wurden auf die Sarcosin-Oxidase (PDB-ID: 2gag) aligniert. Die Anordnung der Cysteine in HcnAb und HcnBb ist dargestellt. Das 3D-Strukturmodell ist im elektronischen Anhang hinterlegt (Übersicht in Kapitel 11).

Der Vergleich der Strukturmodelle der einzelnen Untereinheiten von HcnABC und HcnCAB ergab einen maximalen RMSD-Wert von 4,2 Å (Tabelle 43). Die Strukturabweichung von HcnA war 4,2 Å, die von HcnC 0,064 Å. Die Modelle beider HcnB-Untereinheiten besaßen einen RMSD-Wert von 0,000 Å, sie waren ähnlicher als die beiden anderen Modelle. Trotz Aminosäuresequenzidentitäten von unter 44 % (Tabelle 38) waren die 3D-Strukturmodelle der beiden Proteine ähnlich. Die HcnB-Paralogen wurden ebenfalls anhand einer heterotetrameren Sarcosin-Oxidase, jedoch von einem anderen Actinobacterium, *Corynebacterium* sp. U-96, modelliert (PDB-ID: 3ad9, Moriguchi *et al.*, 2010). Das Modell von HcnBb besaß einen RMSD-Wert von 0 Å zu dem homologen Modell der

D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase (3D-Strukturmodell: elektronischer Anhang, Übersicht in Kapitel 11). Die Strukturen waren identisch. HcnAb und HcnBb besaßen einen RMSD-Wert von über 0 Å zu den Modellen der D-HypDH. Kristallstrukturen dieser Enzyme liegen bislang nicht vor.

Tabelle 43 Übersicht über die *root-mean-square deviation* Werte der HcnCAB-Untereinheiten zu HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25 und der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase von *Ps. aeruginosa* PA01.

Untereinheit	RMSD [Å] zu HcnABC	RMSD [Å] zu D-HypDH ¹
HcnAb	4,200	0,345
HcnBb	0,000	0,000
HcnCb	0,064	1,509

¹Es handelt sich um mit Phyre² erstellte 3D-Modelle.

Tabelle 44 Konservierte Aminosäuresequenzmotive in HcnABC.

Untereinheit	Konservierte Aminosäuresequenzmotive ¹
HcnA	C-X(2)-G-X-C-X(2)-C G-X(2)-V-X(3)-L-X(3)-G C-X(3)-[AGLS]-X(2)-[LMIV]
HcnB	E-X(4)-G-G-X(3)-R G-X(3)-R-X(2)-P-X(2)-G-W-X(3)-G-X(3)-L-G-X(2)-Q-X(3)-K G-X-G-P-L-L-X-L-V-A-X-Q G-D-X(5)-G-X(3)-A-X(3)-G-X(2)-A-A CRCE K-X(3)-R-X(2)-M-G-X-C-Q-G-X(2)-C C-Q-G-X(2)-C G-W-X(3)-G-[VTA] M-G-X-C-Q-G-[RK]-X-C
HcnC	P-[VI]-X-P-X-[KR]-G-[QFY] [GE]-[LF]-R-P

¹Die Aminosäuresequenzmotive sind in der Schreibweise für die PHI-BLASTP Suche angegeben. Die Motive wurden von den Studenten in Masterpraktika identifiziert. Die konservierten Cysteinmotive in HcnA und das CRCE-Motiv in HcnB wurden von Arnulf Kletzin identifiziert (siehe Beiträge anderer).

6.2.10. Identifizierung von *hcn*-Genclustern in weiteren neu isolierten Cyanidproduzenten

Die in dieser Arbeit sequenzierten Genome, die Genome von nächstverwandten Bakterien früherer Isolierungen (Fester, 2016, Popova, 2017, Sluka, 2018) aus der NCBI-Datenbank und die Genome von bereits bekannten Cyanidproduzenten wurden hinsichtlich des Vorkommens von *hcn*-Genclustern analysiert.

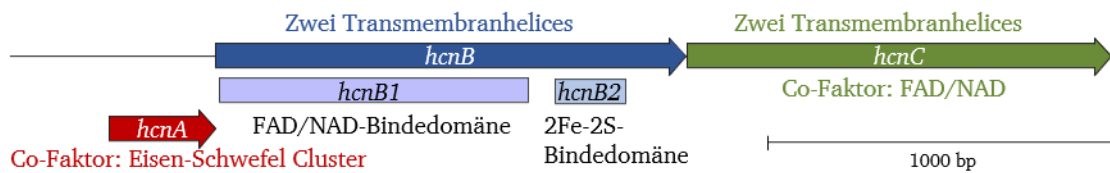
Zur Identifizierung der Gencluster wurden PHI-BLASTP Suchen durchgeführt. Konservierte Aminosäuremotive für die drei Untereinheiten wurden aus Aminosäure-Alignments von bisher bekannten HcnABC Sequenzen erstellt (Arnulf Kletzin, Kapitel 2.2.5.3.). Das erste Aminosäuresequenzmotiv von HcnA und das CRCE-Motiv von HcnB (stellt nur einen Teil der vorhandenen Cysteine dar) decken die Bereiche ab, die vermutlich für die Bindung je eines Eisenschwefelclusters verantwortlich sind (Tabelle 44). Es wurden nur zwei konservierte Aminosäuremotive in HcnC identifiziert. Die PHI-BLASTP Suche mit dem CRCE-Motiv von HcnB führte zu der besten Identifizierung von möglichen Genclustern, da in den umliegenden Genen des jeweiligen Treffers in der Regel je ein weiteres FAD-bindendes und ein FeS-Protein waren.

6.2.10.1. Identifizierung von Cyanidsynthasegenclustern in Firmicutes

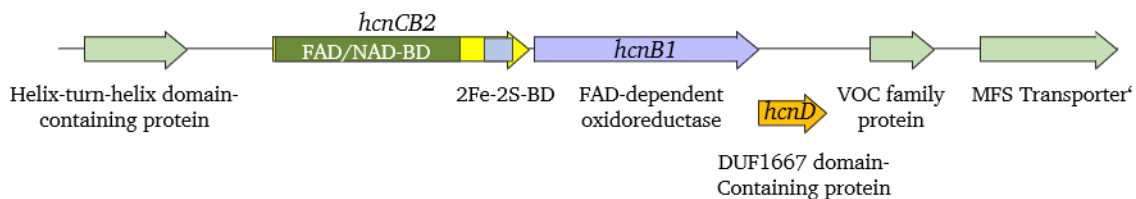
Unter den Eigenisolaten wurden Proteine mit Ähnlichkeiten zur Cyanidsynthase, neben den beiden *Pseudomonas* Stämmen, in zwei *Salipaludibacillus* Stämmen und nachfolgend in dem nächstverwandten Bakterium *Salipaludibacillus aurantiacus* S9 identifiziert. Die Reihenfolge war *CB2B1D* (Abb. 51). Der Teil von HcnB, welcher vermutlich das FeS-Cluster enthält (HcnB2), ist an HcnC fusioniert. HcnB1 wird als getrenntes Gen exprimiert. Ein HcnA-Homolog wurde nicht gefunden, stattdessen ein hypothetisches Protein, welches aus zwei Domänen besteht, einer DUF1667 genannten konservierten Domäne unbekannter Funktion und einem Eisen-Schwefel Cluster bindenden Bereich. Möglicherweise übernimmt dieses DUF/FeS-Protein die Rolle von HcnA. Die Genumgebung unterschied sich von der Umgebung der D-HypDH. Auch besaß das *Sa. aurantiacus* S9 HcnC-Protein nur eine AS-Sequenzidentität von 23 % zu dem entsprechenden Homolog der D-HypDH. Bei den identifizierten putativen Operons handelt es sich somit wahrscheinlich nicht um D-HypDHs.

Identifikation von *hcn*-Operons/Genclustern

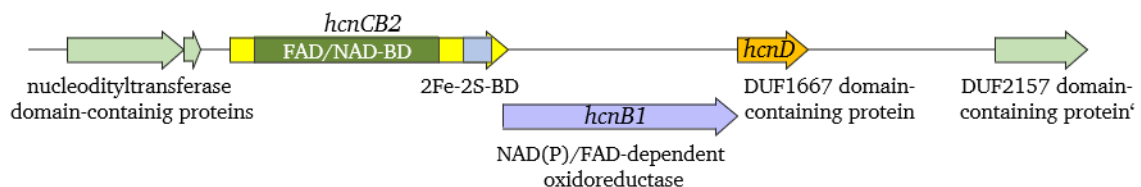
Pseudomonas donghuensis G2#25 *hcnABC*



Sa. aurantiacus AFL_Na11 F6



Salipaludibacillus sp. AFL_Na10 F22



Sa. aurantiacus S9

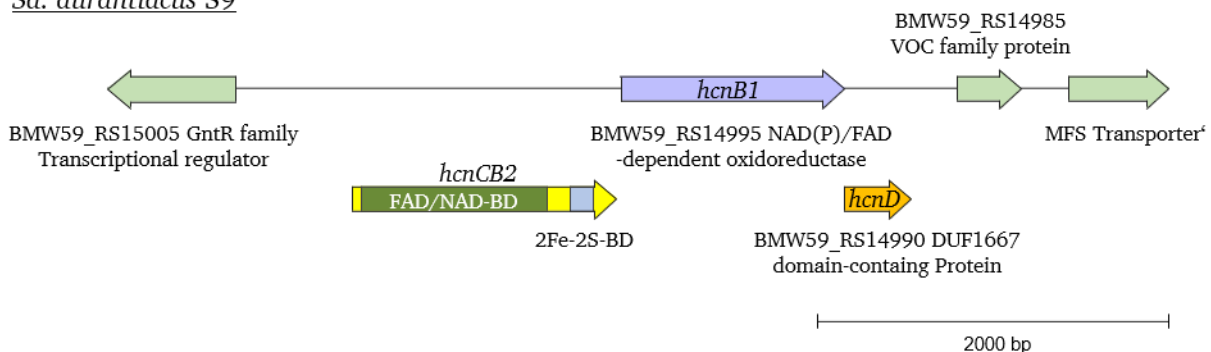


Abbildung 51 Putative Cyanidsynthaseoperons der Gattung *Salipaludibacillus*. *Ps. donghuensis* G2#25 *hcnABC* diente zum Vergleich der Operons. Umgebende Gene sind in hellgrün dargestellt. Das Gencluster in *Sa. aurantiacus* S9 wurde von Masterstudenten während des Masterpraktikums identifiziert. **Gelb**: Fusionsgen aus *hcnC* und *hcnB2*; **Hellblau**: *hcnB1*; **Orange**: 2-Domänen Protein mit Eisen-Schwefel Cluster-Bindemotiv, wird im folgenden *hcnD* genannt. *Sa. aurantiacus* AFL_Na11 F6 und *Salipaludibacillus* sp. AFL_Na10 F22 sind Eigenisolate, deren Genom sequenziert wurden. Die Genomsequenz von AFL_Na11 F6 wurde zusätzlich mittels Sangersequenzierung überprüft. Die Annotation der beiden Eigenisolate entspricht dem Ergebnis der BLASTX Analyse. Als Vergleich diente *Sa. aurantiacus* S9 (contig. NZ_FOGT01000013.1) aus der *NCBI* Datenbank inkl. dessen automatischer Annotation. Die beiden Bereiche der Fusionsgene *hcnCB2* wurden durch InterPro bestimmt (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). VOC = Vicinal-oxygen-chelate; MFS = Major-Facilitator-Superfamily; BMW = locus tags, ' = Gen nicht vollständig dargestellt.

Die Aminosäuresequenzidentitäten von *Sa. aurantiacus* S9 HcnCB2B1D zu *Ps. donghuensis* HcnABC und HcnCAB waren gering (<39 %, Tabelle 45). Auch die RMSD-Werte der 3D-Modelle lagen bei HcnD und HcnB1 über 3 Å (3D-Strukturmodelle: siehe elektronischer Anhang,

Übersicht in Kapitel 11). Zum Vergleich der 3D-Strukturen wurde das Gen *hcnCB2* entsprechend der Domänen getrennt modelliert. Nur diese beiden Strukturmodelle (HcnB2 und HcnC) waren zu HcnABC und -CAB ähnlich mit RMSD-Werten von unter 2,4 Å.

Tabelle 45 Vergleich der Cyanidsyntheseuntereinheiten von *Sa. aurantiacus* S9 HcnCB2B1D und *Ps. donghuen-sis* G2#25 HcnABC und HcnCAB.

Untereinheit		AS-Sequenzidentität [%]-HcnABC	AS-Sequenzidentität [%]-HcnCAB	RMSD [Å] HcnABC	RMSD [Å] HcnCAB
S9	G2#25				
HcnD	HcnA	Keine Ähnlichkeit	Keine Ähnlichkeit	10,822	5,503
HcnB1	HcnB	25	27	3,877	3,236
HcnB2 ¹	HcnB	38	30	2,167	0,854
HcnC ¹	HcnC	23	23	2,384	1,802

¹Das Gen *hcnCB2* wurde analog zu seinen beiden Domänen getrennt modelliert.

Die N-terminale Domäne von DUF1667 enthält Cysteinreste, wie für die Bindung eines FeS-Clusters, was analog zu HcnA von *Ps. donghuen-sis* G2#25 ist. Die Faltung von *Sa. aurantiacus* S9 HcnB2 führte dazu, dass sich die Cysteine in räumlicher Nähe befanden und womöglich ein FeS-Cluster koordinieren können (3D-Strukturmodell im elektronischen Anhang).

Bei den anderen 14 sequenzierten Genomen der Eigenisolate wurden mit den verwendeten BLAST-Analysen keine Cyanidsynthesegene oder -gencluster identifiziert.

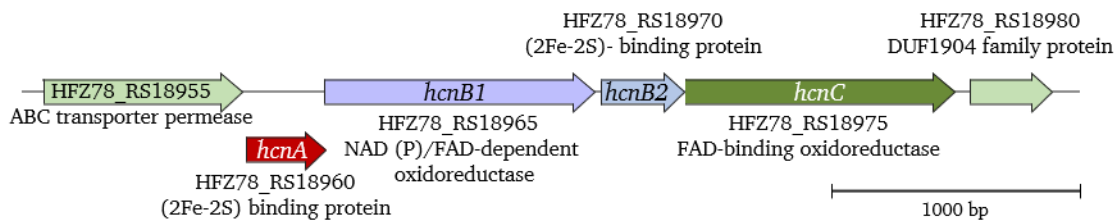
Priestia megaterium (ehemals *Bacillus megaterium*) ist ein bekannter Cyanidproduzent, für den Biolaugungsaktivität beschrieben worden war (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020). Dessen *hcn*-Gene sind nicht bekannt. Durch BLAST-Analysen wurde hier verschieden aufgebaute und untereinander wenig ähnliche (≤ 31 % Identität) putative *hcn*-Gencluster in den Stämmen S2 und ATCC 14581 sowie in *Alteribacter populi* identifiziert (Abb. 52, Stamm ATCC 14581 wie *Al. populi*, nicht separat dargestellt). Die Besonderheit der Gencluster bestand darin,

dass die Cyanidsynthese von vier ORFs kodiert wird. HcnB ist in zwei Untereinheiten geteilt, der Abschnitt, für den die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters vorhergesagt ist, ist als getrennter ORF codiert. Interessanterweise waren die putativen *hcn*-Gene von *Pr. megaterium* S2 Teil eines größeren Operons mit vier weiteren Genen für einen ABC-Transporter, zumindest suggeriert die enge Genabfolge dies (nicht dargestellt).

Die Genanordnung von *Al. populi* und *Pr. megaterium* ATCC 14581 unterschied sich von der Anordnung von *Pr. megaterium* S2. Das *hcn*-Gencluster war durch einen Transkriptionsregulator unterbrochen, bei dem unklar ist, ob er eine Rolle bei der Cyanidproduktion spielt. Auch waren die beiden getrennt codierten *hcnB*-Gene durch das *hcnA*-Homolog unterbrochen. Das *hcnC*-Homolog war entgegen der Leserichtung der anderen Gene codiert, gefolgt von einem Prolinracemasegen. Diese Genzusammenstellung (wenn auch nicht deren Reihenfolge) entspricht den *Ps. aeruginosa* *lhpABFE*-Genen.

Identifikation von *hcn*-Operons/Genclustern

Pr. megaterium S2 (NZ_CP051128.1)



Alteribacter populi FJAT-45347 (NZ_KZ293963.1)

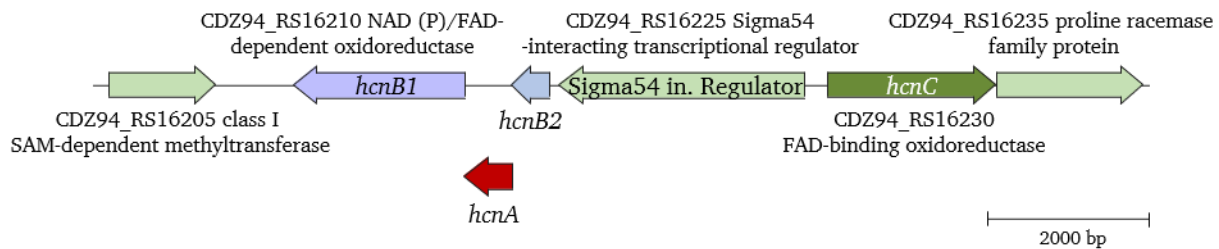


Abbildung 52 Übersicht über putative *hcn*-Genclustern in Firmicutes. Umgebende Gene sind in Hellgrün dargestellt. Die Annotation entspricht der automatischen Annotation von *NCBI*. Gene wurden im Rahmen der Masterpraktika MTB 03 (2020 + 2021) identifiziert.

Aufgrund der ähnlichen Genanordnung von *Pr. megaterium* S2 und *Ps. donghuensis* *hcnABC* wurden beide Proteine verglichen. Die Aminosäuresequenzidentitäten der homologen Untereinheiten von *Pr. megaterium* S2 und *Ps. donghuensis* G2#25 (*HcnABC*) lagen zwischen 28 und 33 % (Tabelle 46). Im gleichen Größenbereich lagen auch die AS-Sequenzidentitäten der *Hcn*-Proteine von *Al. populi* und *Ps. donghuensis*. Die RMSD-Werte der Untereinheiten von *Pr. megaterium* S2 (3D-Strukturmodelle: siehe elektronischer Anhang, Übersicht in Kapitel 11) zu *Ps. donghuensis* G2#25 *HcnABC* lagen zwischen 0,376 Å und 7,847 Å. Die 3D-Modelle der Untereinheiten sind ähnlich zu dem

Modell von der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25. Eine Ausnahme bildete die *HcnB1* Untereinheit, sie war mit 7,847 Å unterhalb eines signifikanten Wertes von maximal 3 Å. Der RMSD-Wert von *HcnB2* war mit 0,376 Å niedrig, die Modelle waren also sehr ähnlich. Die Untereinheiten der Cyanidsynthese von *Al. populi* FJAT-45347 waren mit RMSD-Werten von unter 2,1 Å ähnlich zu den Untereinheiten der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25.

Die Cysteine in *HcnB2* von *Pr. megaterium* S2, die vermutlich ein Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren, waren vorhanden (Abb. 53). Das Modell von *HcnB1* unterscheidet sich von dem *HcnB*-Modell von *Ps. donghuensis* G2#25. Die Modelle überlappten an kaum einer Stelle.

Tabelle 46 Vergleich von *Ps. donghuensis* G2#25 *HcnABC* mit *Pr. megaterium* S2 *HcnAB1B2C* und den *Hcn*-Untereinheiten von *Al. populi* FJAT-45347.

Unter-einheit	<i>Pr. megaterium</i> S2		<i>Al. populi</i> FJAT-45347	
	AS-Sequenzidentität [%]	RMSD [Å]	AS-Sequenzidentität [%]	RMSD [Å]
<i>HcnA</i>	28	1,835	30	2,071
<i>HcnB1</i>	24	7,847	27	1,833
<i>HcnB2</i>	33	0,376	35	1,477
<i>HcnC</i>	29	3,147	27	1,435

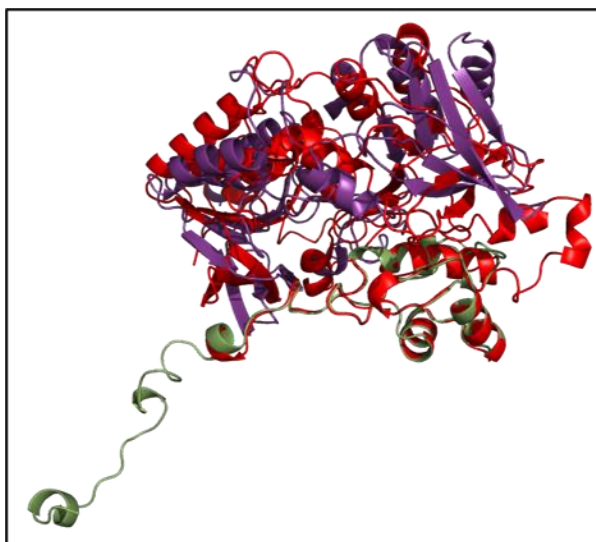


Abbildung 53 3D-Strukturmodelle von HcnB1 (Lila) und -B2 (Olive) von *Pr. megaterium* S2. Die beiden Modelle von HcnB1 und HcnB2 (Phyre²) wurden mit der HcnB-Untereinheit von *Ps. donghuensis* G2#25 (Rot) aligniert. Die 3D-Strukturmodelle wurden während des Masterpraktikums MTB 03 2021 erstellt.

Auch in dem Genom des Modellorganismuses *Ba. subtilis* JRS10 (Überblick in Yang *et al.*, 2021) wurde ein *hcn*-ähnliches, allerdings unvollständiges Gencluster identifiziert (Abb. 54), beim dem das *hcnC*-Homolog fehlt. Auch hier ist das *hcnB*-Homolog in zwei Untereinheiten geteilt. Diese sind durch *hcnA* unterbrochen. *Upstream* der Gene liegt ein Gen für eine Limonene Hydroxylase, von der unklar ist, ob sie etwas mit den *hcn*-ähnlichen Genen zu tun hat. Eine BLASTP Suche mit der AS-Sequenz dieses Proteins ergab eine hohe Ähnlichkeit von bis zu 100 % Identität zu dem Sigma54 interagierenden Transkriptionsregulator von *Bacillus cereus* (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei der vorliegenden Sequenz nur um einen Ausschnitt aus dem Genom handelt, ist es möglich, dass ein *hcnC*-Homolog

upstream der Limonene Hydroxylase liegt. Ein Vergleich der 3D-Modelle der Untereinheiten von *Ba. subtilis* mit HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25 ergab für HcnA, -B1 und -B2 RMSD-Werte von unter 3 Å, die Strukturen sind ähnlich (3D-Strukturmodelle: siehe elektronischer Anhang, Übersicht in Kapitel 11). Das 3D-Modell der Limonene Hydroxylase war nicht ähnlich zu HcnC, der RMSD-Wert lag bei 3,354 Å und es gab keine erkennbaren Sequenzähnlichkeiten. Die Limonene Hydroxylase gehört nicht wie HcnC zu den FAD-haltigen Redoxenzymen, sondern zu der RocR Superfamilie (Transkriptionsregulator mit Per-Arnt-Sim-, ATPase- und DNA-bindenden Fis-Domäne, Vorhersage mit BLAST Suche). Auch dies spricht für einen ähnlichen Aufbau des Genclusters wie bei *Al. populi* und *Pr. megaterium* ATCC 14581. Die Annotation als Limonene Hydroxylase ist vermutlich fehlerhaft.

6.2.10.2. Identifikation der *hcn*-Gene in Actinomyceten

In früheren Arbeiten waren weitere Cyanidproduzenten isoliert worden, deren Genome nicht sequenziert wurden (Fester, 2016, Popova, 2017, Sluka, 2018). In vier Bakterienpezies, welche nahe verwandt zu den Eigenisolaten waren, wurden mögliche Cyanidsynthaseoperons identifiziert (Abb. 55). In *Arthrobacter globiformis* 2PR, *Microbacterium sp.* SCN18, *Brevibacterium casei* DE0341 und *Rhodococcus erythropolis* ACN1 war die Genanordnung *CAB*. Die Genreihenfolge war ähnlich der Reihenfolge der D-HypDH von *Ps. aeruginosa*. Die umgebenden Gene unterschieden sich jedoch, und die AS-Sequenzidentitäten der jeweiligen HcnC-Homologen mit PalhpB waren unter 34 %.

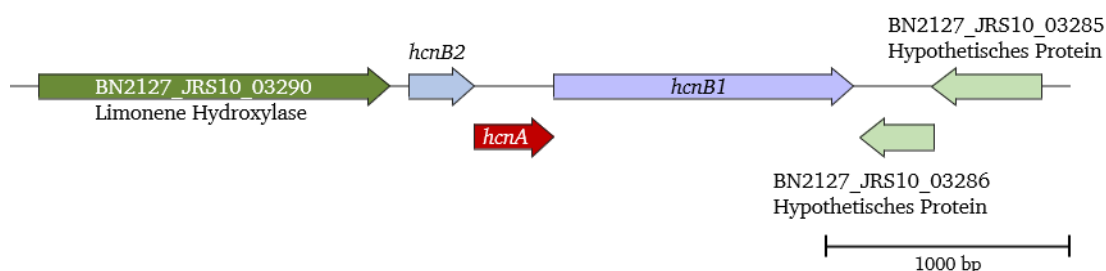
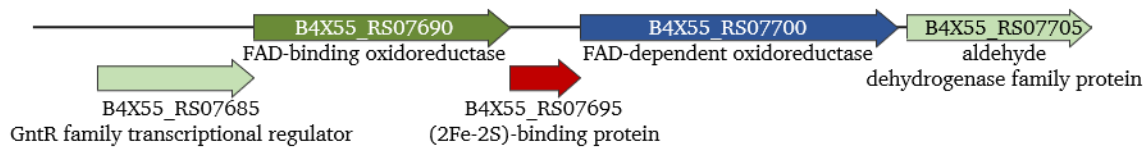


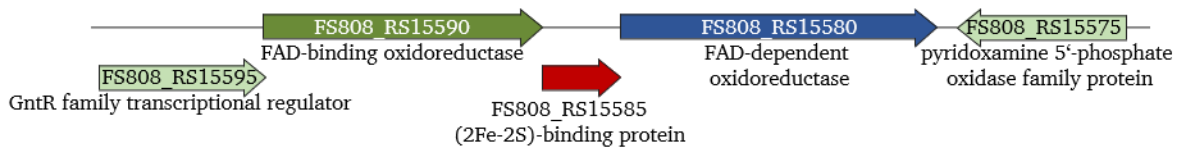
Abbildung 54 Hypothetisches *hcn*-Gencluster von *Bacillus subtilis* JRS10 (NCBI-Referenznummer: CYHR01000754) aus einer BLASTP Analyse von *Ps. donghuensis* G2#25 HcnABC gegen *Bacillus subtilis*.

Identifikation von *hcn*-Operons/Genclustern

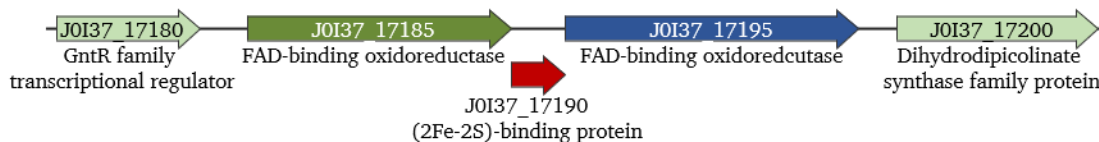
Arthrobacter globiformis 2PR (NZ_MYFE01000258.1)



Brevibacterium casei DE0341 (NZ_VEKE01000016.1)



Microbacterium sp. SCN18 (JAFKIWO10000014.1)



Rhodococcus erythropolis ACN1 (NZ_MRCL01000020.1)

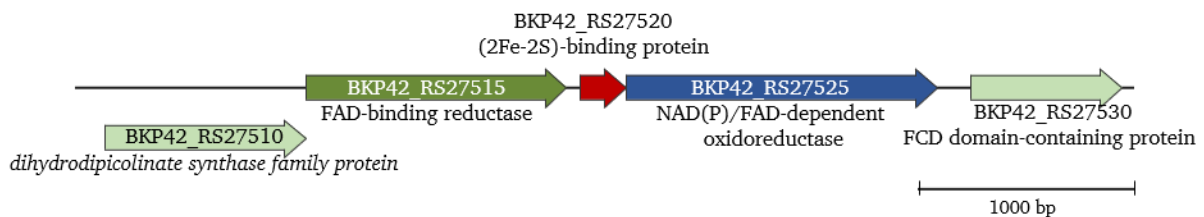


Abbildung 55 Cyanidsyntheseoperons der nächstverwandten Bakterien der isolierten Cyanidproduzenten. Die umgebenden Gene sind in Hellgrün dargestellt. Die Annotation entspricht der automatischen Annotation von *NCBI*. Die Gene wurden durch eine PHI-BLAST Analyse während der Masterpraktika MTB 03 2020 und 2021 identifiziert.

Die Aminosäuresequenzidentitäten der jeweiligen Homologen der Actinobacteria zu *Ps. donghuensis* HcnABC lagen zwischen 22 und 49 % (Tabelle 47). Die RMSD-Werte aller 3D-Modelle der Untereinheiten zu HcnABC lagen zwischen 0,042 und 3,619 Å (die 3D-Strukturmodelle: siehe elektronischer Anhang, Übersicht in Kapitel 11). Die 3D-Modelle der Untereinheiten waren ähnlich zu dem HcnABC-Modell von *Ps. donghuensis* G2#25, ausgenommen die Modelle von *Microbacterium* sp. SCN18. Die

Modellvergleiche der HcnCAB-Untereinheiten der Actinobacteria und der *Ps. donghuensis* HcnCAB-Untereinheiten ergaben höhere Strukturähnlichkeiten zu HcnCAB als zu HcnABC. In Bezug auf HcnCb besitzen die drei Actinomyceten eine AS-Sequenzidentität von mindestens 48 %, nur die AS-Sequenzidentitäten von *Rh. erythropolis* HcnCb zu den anderen Actinomyceten liegt unter 28 %. Die Identitäten von HcnAb und HcnBb waren bei allen Actinomyceten ähnlich.

Tabelle 47 Vergleich der Cyanidsynthaseuntereinheiten der nächstverwandten Bakterien¹ von nicht genomsequenzierten Eigenisolaten mit HcnABC und HcnCAB von *Ps. donghuensis* G2#25.

Bakterium	Untereinheit	Aminosäuresequenzidentität [%]-HcnABC	Aminosäuresequenzidentität [%]-HcnCAB	RMSD [Å] ² -HcnABC	RMSD [Å] ² -HcnCAB
<i>Ar. globiformis</i> 2PR	HcnAb	29	37	1,591	2,837
	HcnBb	32	33	0,042	0,000
	HcnCb	27	31	1,776	1,483
<i>Br. casei</i> DE0341	HcnAb	49	41	2,079	2,993
	HcnBb	28	31	0,548	0,402
	HcnCb	26	29	2,137	2,050
<i>Microbacterium sp.</i> SCN18	HcnAb	37	41	3,619	3,546
	HcnBb	30	34	3,057	1,992
	HcnCb	29	31	3,321	3,366
<i>Rh. erythropolis</i> ACN1	HcnAb	36	44	1,395	3,158
	HcnBb	30	29	0,369	0,311
	HcnCb	22	24	3,063	1,924

¹Die jeweils nächstverwandten Bakterien nach der 16S rDNA-Sequenzanalyse mit hinterlegten Genomsequenzen zu den isolierten Cyanidproduzenten wurden ausgewählt.

²3D-Strukturmodelle wurden während des Masterpraktikums MTB 03 2020 und 2021 erstellt.

Wie bereits erwähnt, wurden nur in den Genomsequenzen von vier Eigenisolaten *hcn*-ähnliche Operons identifiziert (Pseudomonaden und in *Salipaludibacillen*, Kapitel 6.2.1., 6.2.2., 6.2.6., 6.2.10.1.). Auch in den nächstverwandten Bakterien nach der 16S rDNA-Analyse der genomsequenzierten Eigenisolate und in den nicht sequenzierten Eigenisolaten (diese Arbeit, Fester, 2016, Popova, 2017, Sluka, 2018) *Alishewanella tabrizica*, *Alkalihalobacillus lindianensis*, *Alkalihalobacillus pseudofirmus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Evansella cellulosityticus*, *Exiguobacterium mexicanum*, *Jeotgalibacillus campisalis*, *Nitrincola alkalilacustris*, *Rheinheimera sp.*, *Salipaludibacillus agaradhaerens*, *Salipaludibacillus neizhouensis* und *Sutcliffiella horikoshii* wurden keine Cyanidsynthasegencluster identifiziert.

6.2.11. Phylogenetische Analyse der HcnC-Homologen verschiedener Phyla

HcnC ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Untereinheit der Cyanidsynthase, in der das aktive Zentrum lokalisiert ist, und zwar nahe des Isoalloxazinringsystems des FAD. Die Aminosäuresequenzen der HcnC-Untereinheiten von allen Cyanidsynthasen und verwandten Enzymen, wie z.B. Opn-Dehydrogenasen, wurden verglichen. Dazu wurde zuerst ein Alignment der Sequenzen erstellt (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transforms*) und anschließend basierend auf dem Sequenzalignment ein phylogenetisches Dendo-

gramm erstellt. Das Sequenzalignment zeigte Unterschiede zwischen HcnC und HcnCb von Gammaproteobacteria (Elektronischer Anhang: HcnC_Homologe_Alignment, Übersicht in Kapitel 11). Nahe des N-Terminus sind bei HcnC 33 Aminosäuren vorhanden, welche in keiner der anderen Paralogen von HcnC vorkommen. Die HcnCb Homologen haben am C-Terminus eine Insertion von sieben Aminosäuren, die nur bei dieser Gruppe vorkommt. Zudem zeigt das Sequenzalignment bei den HcnCB2 Fusionsproteinen die längere Sequenz, die durch HcnB2 begründet ist. Die Sequenzen der Opn-Synthasen, insbesondere der Octopine- und der Nopaline-Synthase, unterscheiden sich von den HcnC-Paralogen. Dies wird auch im Dendrogramm deutlich (Abb. 56).

Die Ähnlichkeit von HcnC (klassisches Operon) war bei Bakterien der Gattung *Pseudomonas* am höchsten. Die Verwandtschaft ist in den Klassen, beziehungsweise in den jeweiligen Gattungen, am engsten. Es ist eine klare Abtrennung des klassischen Operons der Pseudomonaden und des zweiten putativen *hcnCAB*-Operons der Pseudomonaden sichtbar. Bei dem zweiten putativen Operon handelt es sich wahrscheinlich um D-Hydroxyprolin-Dehydrogenasen, diese ist auch phylogenetisch bei den entsprechenden Sequenzen eingeordnet (*Ps. aeruginosa* LhpB, Abb. 56). Auch zwischen dem zweiten putativen Operon und den Opn-Dehydrogenasen ist eine klare Abtrennung sichtbar. Bei den degradierenden Opn-Dehydrogenasen ist eine Aufteilung in

zwei Gruppen erkennbar, diese wurde schon in Watanabe *et al.*, 2015 gezeigt. Die Opn-Dehydrogenase von *Pseudomonas putida* ist ähnlich zu der Opn-Dehydrogenase von *Ag. tumefaciens*. Die HcnC-Untereinheit von *Pseudomonas veronii* gehört vermutlich nicht zu den *hcnABC*-Operons, sondern zu den degradierenden Opn-Dehydrogenasen. Die drei Opn-Synthasen sind nicht ähnlich zu den anderen HcnC-Paralogen trotz ähnlicher Quartärstruktur.

Auch in dem Phylum Firmicutes lassen sich drei verschiedene Cyanidsynthase Untergruppen erkennen. Dies sind zum einen Firmicutes mit der Genreihenfolge *hcnCB2B1A*. Die zweite Gruppe

bilden *hcnAB1B2C*-Operons und die letzte Gruppe stellen die Gencluster dar, welche durch einen mit Sigma54-interagierenden Transkriptionsregulator getrennt sind.

Die HcnC Homologe von *Rhodococcus erythropolis* und *Leifsonia psychrotolerans* sind ähnlich zu Opn-Dehydrogenasen, womöglich sind die beiden identifizierten Sequenzen keine putativen *hcn*-Operons.

Durch das Sequenzalignment und das Dendrogramm ist es möglich vorherzusagen, zu welcher Dehydrogenase-Familie identifizierte HcnC-Homologe gehören. Hieraus lässt sich auch schließen, welche Gene womöglich an der Cyanidproduktion beteiligt sind.

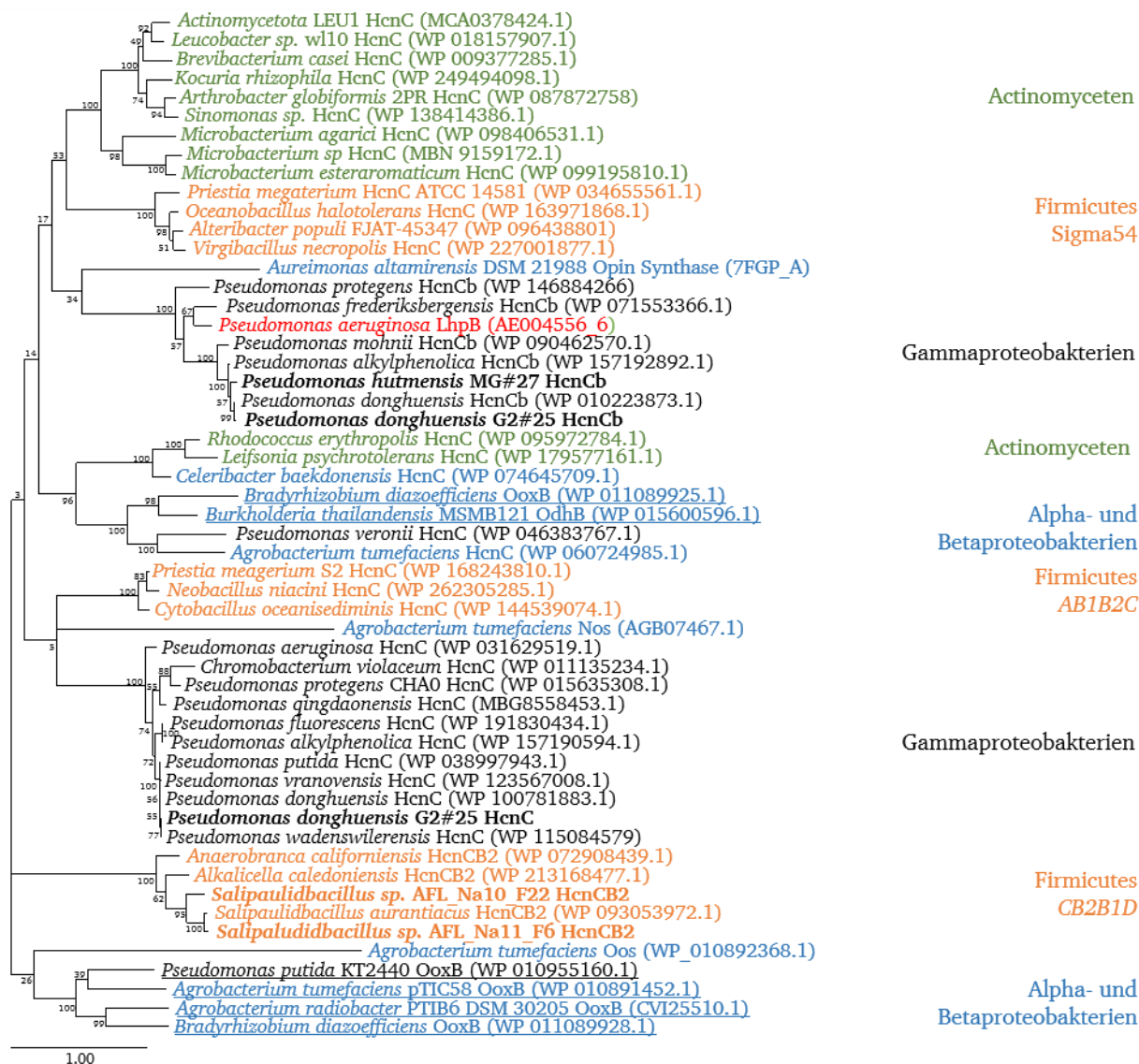


Abbildung 56 Phylogenetische Analyse identifizierter HcnC-Paraloge und -Homologe in verschiedenen Phyla basierend auf einem Maximum Likelihood Algorithmus. Es wurden jeweils die nahe verwandten Bakterien der Eigenisolate ausgewählt und weitere verwandte Arten, die eine AS-Sequenzidentität zwischen 70 und 90 % zu den in dieser Arbeit identifizierten Bakterien hatten. Die Bootstrap Werte basieren auf 100 Replikaten und sind in Prozent an den Verzweigungen angegeben. Die angegebenen Nummern in Klammern stehen für die *NCBI* Referenz Sequenzen. **Fett:** AS-Sequenzen der Eigenisolate. **Rot:** D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase von *Ps. aeruginosa* (LhpB); Unterstrichen: Degradierende Opin-Dehydrogenasen. Das Dendrogramm wurde mit MEGA11 erstellt (Tamura *et al.*, 2021).

6.3. Diskussion

In diesem Kapitel wurden putative *hcn*-Operons/Gencluster in Pseudomonaden und in weiteren Cyanidproduzenten identifiziert. Die 3D-Strukturen der identifizierten Cyanidsynthasen und weiteren putativen *hcn*-Operons wurden modelliert und bioinformatisch analysiert. Die beiden in *Ps. donghuensis* G2#25 identifizierten Operons wurden deletiert und die Auswirkung der Deletionen auf die Cyanidproduktion und die Biolaugungseffizienz untersucht.

6.3.1. Die Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25

Die Aminosäuresequenzidentitäten der Cyanidsyntheseuntereinheiten von dem Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 im Vergleich mit den bekannten Modellorganismen *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. protegens* und *Chromobacterium violaceum* lagen zwischen 66 und 82 % (Tabelle 37). Obwohl hierbei ausschließlich Pseudomonaden betrachtet wurden, lagen diese Sequenzidentitätswerte relativ niedrig. Die höchste Übereinstimmung hatte immer HcnC, die Untereinheit ist am stärksten konserviert. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass sie, aufgrund der Analogie zur Sarcosin-Oxidase und zur Prolin-Dehydrogenase, wahrscheinlich das aktive Zentrum birgt.

Die 3D-Strukturmodelle wurden erstellt, die Cyanidsynthese wurde auf der Basis der Sarcosin-Oxidase und Prolin-Dehydrogenase modelliert. Erstere besteht aus vier Untereinheiten, welche als Heterotetramer angeordnet sind, und enthält die drei Coenzyme FAD, FMN und NAD⁺ (Chen *et al.*, 2006). Paraloge der γ -, δ - und die C-terminale Hälfte der α -Untereinheit der Sarcosin-Oxidase sind in der Cyanidsynthese nicht vorhanden. Die Prolin-Dehydrogenase von *Py. horikoshii* besteht aus zwei Untereinheiten, welche als Heterooktamer angeordnet sind, mit den Cofaktoren FMN, FAD und ATP (Tsuge *et al.*, 2005). Die Cyanidsynthese wies zudem eine Sequenzähnlichkeit zu Opine-Dehydrogenasen auf, diese bestehen aus je 4 Kopien von drei Untereinheiten, was ein Heterododekamer ergibt (Watanabe *et al.*, 2015). Die Opine-Dehydrogenasen besitzen ebenfalls die Cofaktoren FAD und FMN, sowie

mindestens ein Eisen-Schwefel Cluster (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015, Watanabe *et al.*, 2016). Für HcnB und HcnC wurden N-terminal FAD- und NAD-Bindemotive vorhergesagt (Laville *et al.*, 1998), welche mit den drei Modellen übereinstimmen. Da alle ähnlichen Enzyme FMN als Cofaktor besitzen, ist dies auch für die Cyanidsynthese denkbar. In der Sarcosin-Oxidase und Prolin-Dehydrogenase kommen keine Eisen-Schwefel Cluster vor (Chen *et al.*, 2006, Tsuge *et al.*, 2005), in der Cyanidsynthese hingegen wurden diese Sequenz-basiert für HcnA und HcnB vorhergesagt (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). Auch die Anordnung der Cysteine im 3D-Modell deutet das Vorhandensein der Fe-S Cluster an (Abb. 48). Dies ist mit der Opine-Dehydrogenase gemein. Von dem Enzymaufbau, drei Untereinheiten und den Co-Enzymen, ähnelt die Cyanidsynthese am meisten der Opine-Dehydrogenase. Es gibt jedoch bislang keine Strukturaufklärung der Opine-Dehydrogenase, daher wurden die Strukturen nicht verglichen (Stand Oktober 2022).

Die Cyanidsynthese gehört zur gleichen Sequenzfamilie wie die Sarcosin-Oxidasen, Prolin-Dehydrogenasen und Opine-Dehydrogenasen. Alle besitzen eine ähnliche Struktur und ähnliche Cofaktoren bzw. Coenzyme.

6.3.2. Cofaktor/Coenzym bindende Aminosäuren

Um einzelne Cofaktor/Coenzym bindende Aminosäuren zu identifizieren, wurden einzelne Aminosäuren der Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 ausgetauscht. Bei HcnA und HcnB führten einzelne Austausche von jeweils drei verschiedenen Cysteinen gegen Alanin oder Serin zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust. Nur der C427A Austausch hatte geringe Auswirkungen auf die Aktivität. Zur Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern sind je vier Liganden nötig, mit wenigen Ausnahmen sind dies Cysteine (https://www.mpg.de/7808129/mpi_fuer_terrestrische_mikrobiologie_jb_20131, Aufruf Dezember 2023). Bei der 3D-Modellierung von HcnB ist noch das Cystein385 in räumlicher Nähe, möglicherweise ist dieses Cystein ebenfalls

daran beteiligt oder an dem Kontakt zum Cluster in HcnA. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein von FeS-Clustern in HcnA und -B hin, wie in früheren Arbeiten vorhergesagt (Laville *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2012). Rieske-artige Eisen-Schwefel-Cluster werden nicht über vier Cysteine, sondern über zwei Cysteine und zwei Histidine koordiniert (Link, 1999). Bei dem 3D-Modell ist jedoch nur Histidin387 (HcnB) in räumlicher Nähe zu den Cysteinen (9 bzw. 11 Å zu C383 bzw. C385), so dass eine Bildung von Eisen-Schwefel-Cluster vom Rieske Typ über Histidine nicht wahrscheinlich ist.

Der Austausch von Aminosäuren weist zum jetzigen Zeitpunkt nur deren Relevanz für die Cyanidproduktion nach, nicht aber deren Funktion. Ein direkter Nachweis von Eisen-Schwefel Clustern wäre durch Elektronenspinresonanz Spektroskopie möglich (EPR, Watanabe *et al.*, 2016). Hierfür sind Temperaturen zwischen 10 und 60 K nötig (Janssen *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2016). Auch andere spektroskopische Nachweise, wie z.B. Resonanz Raman, paramagnetische Kernspinresonanz oder Mössbauer Spektroskopie, sind möglich (Übersicht in Valer *et al.*, 2022). Erste EPR-Versuche mit Ganzzellextrakten (eigene Experimente) bzw. getrennt exprimierten Untereinheiten in *E. coli* Bl21 (Wendler, 2022) zeigten kein Signal im Vergleich zur Kontrolle, jedoch wurden aufgrund der technischen Voraussetzungen die Messungen bei der Temperatur flüssigen Stickstoffs durchgeführt. Daher beweist die Abwesenheit von Signalen nicht die Abwesenheit von FeS-Clustern (Daten nicht gezeigt).

Die Aminosäuren in HcnB, die aufgrund der Vorhersagen der 3D-Modelle für die Bindung von FMN mitverantwortlich sein sollten, waren nicht essentiell. Dagegen waren zwei Aminosäuren in HcnC essentiell, welche für die Bindung von FAD verantwortlich sein sollten, da es beim Austausch zu einem nahezu vollständigen Funktionsverlust kam. Die Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein von FAD in HcnC, während über die mögliche Bindung von FMN an der Schnittstelle von HcnB und C keine Aussage getroffen werden kann, da hierfür die Modellierungsergebnisse nicht genau genug sind. Der direkte Nachweis von FAD und FMN ist über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie möglich und war

bislang bei den entfernt ähnlichen Opin-Dehydrogenasen gelungen (Watanabe *et al.*, 2015). Es ist jedoch ein gereinigtes Enzym nötig.

6.3.3. Das putative *hcnCAB*-Operon von *Ps. donghuensis* G2#25 und die Komplementierung der Deletionsmutanten

Zu dem bisher bekannten *hcnABC*-Operon wurde in Pseudomonaden ein zweites putatives Operon mit der Genreihenfolge *hcnCAB* identifiziert (Kapitel 6.2.2., 6.2.6.). Wie auch für das klassische *hcnABC*-Operon sind Eisen-Schwefel Cluster für die Untereinheiten HcnAb und HcnBb vorhergesagt. Der Aufbau des putativen Operons ist ähnlich dem der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase aus *Ps. aeruginosa* und der Opin-Dehydrogenasen (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015). Die Aminosäuresequenzidentitäten der Untereinheiten von HcnCAB zu den jeweiligen Untereinheiten der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase sind mit über 65 % hoch. Die 3D-Modelle von HcnABC und HcnCAB sind ähnlich, vor allem die HcnB Untereinheiten weisen mit einem RMSD-Wert von 0,345 Å eine ähnliche Struktur auf. Die Ähnlichkeit von den Modellen von HcnCAB zu den Modellen von der D-HypDH ist höher als zu HcnABC, was bedeutet, dass die Enzyme möglicherweise die entsprechende Aktivität haben und keine Cyanidsynthaseaktivitäten.

Zur Untersuchung des jeweiligen Beitrags von HcnABC und HcnCAB zur Cyanidproduktion wurden *Ps. donghuensis* G2#25 Deletionsmutanten erstellt, deren Cyanidproduktion gemessen und Biolaugungseigenschaften untersucht. Ein positiver Methämoglobintest wurde bei allen drei Deletionsmutanten ($\Delta hcnABC$, $\Delta hcnCAB$, $\Delta hcnABC\Delta hcnCAB$) nur bei Zugabe von Methionin beobachtet. Die Werte lagen immer unter denen des Wildtyps. Da die Deletionsmutanten in dem Pikrin-Test kein positives Ergebnis zeigten, wird angenommen, dass Methionin im Methämoglobintest zu einem falsch-positiven Ergebnis führt. Durch eine vergleichende Transkriptomanalyse der Deletionsmutanten mit und ohne Induktion durch Methionin könnten neue Gene identifiziert werden, welche für die Produktion des Abbaustoffs verantwortlich sind, welcher den Test beeinflusst.

Für die Cyanidproduktion ohne Methionin und für die Biolaugung sind *hcnABC* und *hcnCAB*

essentiell, da keine Cyanidproduktion und keine Goldlaugungsaktivität bei beiden Einzeldeletionsmutanten nachgewiesen wurde (Abb. 44, 46).

Bei der Deletion von *hcnCAB* wurde das putative Operon so deletiert, dass ein nicht funktionaler Rest-Leserahmen übrigblieb, aufgrund von Leserasterfehlern der Assemblierung der Genomsequenz nach der Nanoporesequenzierung. Dieser Rest-Leserahmen war um fünf Basen verlängert im Vergleich zu dem tatsächlichen Leserahmen (Abb. 40).

Zur Vermeidung von größeren Veränderungen an der genomischen DNA können Gene inaktiviert statt deletiert werden. Dies ist beispielsweise durch eine Cytidin Deaminase möglich, da durch die Basenmutationen Stoppcodons erzeugt werden (Chen *et al.*, 2018b, Gu *et al.*, 2018). Durch die Auswahl von geeigneten Spacern werden gezielt Stoppcodons mit einer hohen Effizienz konstruiert (Chen *et al.*, 2018b).

Zum Ausschluss der polaren Effekte und Bestätigung der Funktion der Gene können Komplementierungsmutanten erstellt werden, also das Operon wieder in das Bakterium eingebracht werden. Die Komplementierung von *hcnABC* war erfolgreich, die Cyanidproduktion stieg wieder an und Biolaugungsaktivität war nachweisbar. Die Funktion von *hcnABC* bei der Cyanidproduktion und Biolaugung in *Ps. donghuensis* G2#25 wurde bestätigt (Kapitel 6.2.5.). Die Funktion von HcnABC bei der Cyanidproduktion wurde auch in *E. coli* durch heterologe Expression gezeigt (diese Arbeit, Amberger, 2016a). Wenn die Expression von *hcnABC* von dem nativen Promotor gesteuert wurde, war die Cyanidproduktion höher als beim Wildtyp und der Regulation über den konstitutiv aktiven Promotor P_{lacZ} . Dies spricht für eine höhere Transkriptionsrate vom nativen Promotor als von P_{lacZ} . Zur Überprüfung dieser Aussage müsste eine qRT-PCR durchgeführt werden, um die Transkriptmengen zu vergleichen. Eine mögliche Erklärung für die höhere Cyanidproduktion der Komplementierungsmutante mit dem nativen Promotor ist die Kopienzahl des verwendeten Plasmids. Diese wird in der Literatur mit niedrig bis moderat angegeben (Kovach *et al.*, 1995, Kovach *et al.*, 1994). Durch das Vorhandensein von mehreren Plasmiden und somit mehreren Genkopien kann die gesteigerte

Cyanidproduktion im Vergleich zum Wildtyp erklärt werden.

Die Deletionsmutanten zeigten, dass das *hcnABC*- und das putative *hcnCAB*-Operon für die Cyanidproduktion in *Ps. donghuensis* G2#25 verantwortlich sind. Für *hcnCAB* war die Assemblierung der Plasmidfragmente in *E. coli* nicht erfolgreich, es wurde kein Expressionsplasmid erstellt. Folglich wurde das putative *hcnCAB*-Operon nicht komplementiert. Aufgrund der Ähnlichkeit zur D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase spielt HcnCAB vermutlich eine Rolle im Aminosäurestoffwechsel, dessen Produkte dann als Ausgangssubstrate für die Cyanidsynthese dienen.

6.3.4. *hcn*-ähnliche Operons in Pseudomonaden

In fluoreszierenden Pseudomonaden ist das *hcnABC*-Operon weit verbreitet, einige Spezies besitzen aber zusätzlich oder ausschließlich ein putatives *hcnCAB*-Operon. Das Cyanid-produzierende Eigenisolat *Ps. hutmensis* MG#27 besitzt bspw. nur das putative *hcnCAB*-Operon. Bei nahezu allen identifizierten putativen *hcnCAB*-Operons in Pseudomonaden handelt es sich vermutlich um D-Hydroxyprolin-Dehydrogenasen.

6.3.5. *hcn*-ähnliche Gencluster in Cyanidproduzenten

Durch Alignments von bekannten Cyanidsynthese-Aminosäuresequenzen wurden konservierte Aminosäuremotive für jede Untereinheit identifiziert. Trotz der höchsten Aminosäuresequenzidentitäten für HcnC wurden hierfür die wenigsten konservierten Bereiche identifiziert (Tabelle 44). Ein konserviertes Cystein Motiv wurde in HcnA identifiziert, FeS-Cluster scheinen essentiell für die Cyanidsynthese zu sein.

In HcnB war das CRCE-Motiv am stärksten konserviert, auch hier sind Cysteine enthalten, die möglicherweise ein Eisen-Schwefel Cluster koordinieren. Dies spricht auch für das Vorhandensein des Cofaktors in HcnA und HcnB (Laville *et al.*, 1998, Pessi *et al.*, 2000, Watanabe *et al.*, 2012). Bei der PHI-BLAST Suche mit dem CRCE-Motiv war es möglich, direkt das gesamte Operon zu identifizieren. Die umliegenden Gene

Tabelle 48 Übersicht über die Cyanidproduktion und identifizierte *hcn*-Gencluster verschiedener Bakterien der DSMZ.

Spezies	Gencluster	Cyanid- produktion	Durchgeführt von
<i>Agrobacterium radiobacter</i> DSM 30305	ABC + <i>ooxBCA</i> ¹	nein	Kim, 2022
<i>Alteribacter (Bacillus) populi</i> FJAT	siehe Abb. 52	ja	Peric, 2021
<i>Microbacterium agarici</i> DSM 21798	CAB	ja	Masterpraktikum 2019
<i>Priestia (Bacillus) megaterium</i> ATCC 14581	wie <i>Alteribacter populi</i> FJAT	ja	Peric, 2021
<i>Pseudomonas mohnii</i> DSM 1837	CAB	nein	Kim, 2022
<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0	ABC + CAB	ja	Schneider, 2021a
<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331	ABC	nein	Kim, 2022

¹Gene der Opn-Dehydrogenase.

des Treffers waren meist ein FAD-bindendes Protein und ein FeS-Protein, eine getrennte BLAST-Suche von allen drei Untereinheiten war nicht nötig (Kapitel 6.2.10.).

Mit den erhaltenen Aminosäuremotiven wurden BLAST-Suchen zur Identifizierung von Cyanidsynthesegenclustern in Eigenisolaten und bekannten Cyanidproduzenten durchgeführt. Die Mehrzahl der hier identifizierten Gencluster beruht auf bioinformatischen Analysen, die experimentelle Bestätigung im Labor steht noch aus. Bei einigen Bakterien aus der DSMZ-Stammammlung wurden *hcn*-ähnliche Operons identifiziert (Tabelle 48). Cyanidproduktion wurde aber nur bei *Alteribacter populi* und *Microbacterium agarici* und den bereits bekannten Cyanidproduzenten *Priestia megaterium* und *Pseudomonas protegens* nachgewiesen.

Bei den in dieser Arbeit isolierten Cyanidproduzenten wurden nur bei *Salipaludibacillus* Isolaten mögliche *hcn*-Operons identifiziert. Die Genreihenfolge war dort *hcnCB2B1A* und die Aminosäuresequenzidentität zu *Ps. donghuensis* G2#25 HcnABC war gering (maximal 38 %). Auch die 3D-Strukturen unterschieden sich, HcnD und -B1 hatten keine ähnliche Struktur mit HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25. Die Besonderheit dieses Operons war die Fusion von HcnB2 mit HcnC.

In vielen Cyanidproduzenten wurden keine Cyanidsynthase ähnlichen Gene identifiziert. Durch den Einfluss von Methionin auf den Methämoglobintest ist es möglich, dass einige der Isolate falsch-positiv sind. Möglich ist auch, dass es weitere bisher unbekannte Cyanidsynthesewege in Bakterien gibt. Auch eine große Diversität an Cyanidsynthasen ist hier denkbar. Da mit Hilfe der bioinformatischen Methoden keine Identifizierung möglich war, muss eine

experimentelle Bestimmung stattfinden. Hierfür könnten beispielsweise *Bacterial Artificial Chromosomes* erstellt werden (O'Connor *et al.*, 1989) und die *E. coli* Klone auf Cyanidproduktion getestet werden.

Die Genanordnung der Cyanidsynthase des bekannten Cyanidproduzenten *Pr. megaterium* S2 war vergleichbar mit dem klassischen *hcnABC*-Operon, mit der Ausnahme, dass die HcnB Untereinheit nochmals in zwei Untereinheiten geteilt war. Das Cysteincluster, welches vermutlich das Eisen-Schwefel-Cluster koordiniert, war getrennt kodiert. Trotz geringer AS-Sequenzidentität war die Struktur der Untereinheiten ähnlich, nur die Struktur von HcnB1 wich ab. Die *hcn*-Gencluster von *Alteribacter populi* FJAT und *Pr. megaterium* ATCC 14581 unterschieden sich von den anderen Aufbauten, auch hier war *hcnB* in zwei Untereinheiten aufgeteilt. Das *hcnC*-Gen war in die andere Leserichtung kodiert und durch einen Transkriptionsregulator von den anderen Genen getrennt. Eine Cyanidproduktion bei der Expression dieses Genclusters in *E. coli* B121 wurde nicht nachgewiesen (Schneider, 2021b). Dies liegt vermutlich an dem komplexen Aufbau des Genclusters. Möglicherweise wäre hier die Wahl eines anderen Modellorganismus nötig, beispielsweise *Bacillus subtilis*, da dieser näher verwandt ist und dadurch das Gencluster besser korrekt exprimieren kann.

Der Modellorganismus *Bacillus subtilis* besaß ein *hcn*-ähnliches Gencluster, jedoch fehlte hier das *hcnC*-Homolog. Dies ist vermutlich durch eine unvollständige Sequenzierung begründet.

Bei anderen Cyanidproduzenten war die häufigste Reihenfolge *hcnCAB*. Eine Ähnlichkeit, wie bei den Pseudomonaden, zu der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase war nicht gegeben. Meist war die AS-Sequenzidentität dieser Unter-

einheiten höher zu HcnCAB als zu HcnABC von *Ps. donghuensis* G2#25. Auch die Strukturmodelle, ausgenommen HcnAb, waren ähnlicher zu den Modellen von HcnCAB.

Durch das erstellte phylogenetische Dendrogramm ist eine Aufspaltung der AS-Sequenzen in Untergruppen der einzelnen Phyla erkennbar. Jede Genclustieranordnung bildet eine eigene

Untergruppe, die nicht ähnlich zu den anderen Anordnungen des jeweiligen Phylums ist.

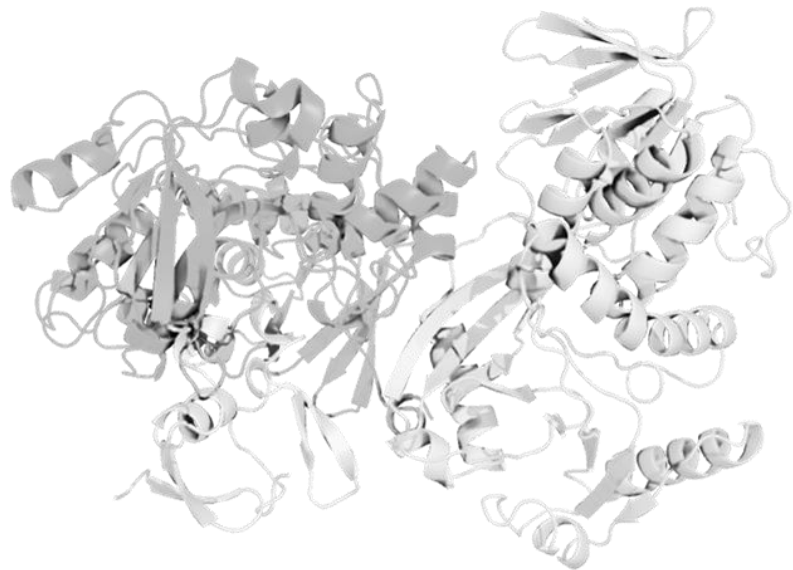
In diesem Kapitel wurden erstmals mögliche *hcn*-Gencluster in anderen Cyanidproduzenten identifiziert, welche nicht dem klassischen *hcnABC*-Aufbau entsprechen. Eine experimentelle Bestätigung der identifizierten Gencluster steht noch aus.

Kapitel 7

*Reinigung und Charakterisierung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25*

Beiträge anderer

Eine Proteinanreicherung aus der Komplementierungsmutante	Elina Kim	TU Darmstadt
Kalibrierreihe LB-HD + Kupfer	Kento Amann	
Erhöhung der Solubilität durch MBP in Zusammenarbeit mit	Jakob Eller	
Zugabe Proteaseinhibitor zu Reinigung + Solubilisierung der Cyanidsynthase mit SMALPs in Zusammenarbeit mit	Eugenio Pérez Patallo	TU Kaiserslautern



7. Reinigung und Charakterisierung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25

7.1. Einleitung

Das *hcnABC*-Operon kodiert für die Cyanidsynthase (Laville *et al.*, 1998). Glycin dient als Substrat und es entstehen HCN und CO₂ (Castric, 1977, Michaels *et al.*, 1965, Wissing, 1974). Die Cyanidsynthase ist sauerstoffsensitiv und wahrscheinlich membrangebunden oder membranassoziiert (Bunch *et al.*, 1982). Bisher wurde die Cyanidsynthase nicht erfolgreich gereinigt. Alle Enzymdaten beruhen auf Messungen von Zellextrakten oder ganzen Zellen. In ganzen Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* war die Cyanidsynthase temperaturabhängig (Lorck, 1948). Eine Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 26 °C führte bei Lorck, 1948 zu einer dreimal höheren Cyanidausbeute. Wenn die Proteinanreicherung unter anaeroben Bedingungen abläuft, ist die Aktivität der Cyanidsynthase höher (Bunch *et al.*, 1982). Die Cyanidsynthase war in der partikulären Fraktion nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation zu finden, daher ist sie wahrscheinlich an die Membran gebunden (Bunch *et al.*, 1982). Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall und anschließender Ultrazentrifugation war die Cyanidsynthase noch aktiv (Wissing *et al.*, 1981). Es kam jedoch zu einem Aktivitätsverlust um 40 % durch den Zellaufschluss. Durch die Zugabe von TritonX-100 und Ölsäure wurde die Aktivität im Überstand auf 78 % gesteigert (Wissing *et al.*, 1981). *In vivo* dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor für die Reaktion (Castric, 1994, Wissing, 1974). Aufgrund der Sauerstoffsensitivität der Cyanidsynthase wurde *in vitro* ein anderer Elektronenakzeptor gewählt (Castric, 1994). PMS und 2,6-Dichlorphenol-Indophenol eigneten sich als Elektronenakzeptoren, hierbei zeigte PMS eine höhere Cyanidausbeute. Die Verwendung von Pyridin- und Flavin-Elektronenakzeptoren führte zu keiner messbaren Cyanidproduktion (Castric, 1994).

Wie in Kapitel 6 gezeigt wurde, besitzt die Cyanidsynthase Ähnlichkeiten zu Opn-Dehydrogenasen und D-Hydroxyprolin-Dehydrogenasen.

Für beide Enzyme ist jeweils eine Enzymreinigung beschrieben (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015). Die His-Tag markierten Gene für die Opn-Dehydrogenase aus *Ps. putida* KT2440 und der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase aus *Ps. aeruginosa* PA01 wurden über ein Plasmid in *Ps. putida* exprimiert (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015). Die Expression der Gene wurde durch IPTG induziert und nach 18 h erfolgte die Zellernte (Watanabe *et al.*, 2015). Zur Expression von *LhpBFE* wurden die Zellen über Nacht inkubiert (Watanabe *et al.*, 2012). Die Zellaufschlüsse erfolgten durch Ultraschall-Behandlung. Die Membranbestandteile wurden sedimentiert und die Enzyme im Überstand mittels Ni-NTA Säulenchromatographie gereinigt. Die Reinigung der Enzyme erfolgte bei aeroben Bedingungen. Nach der Reinigung waren die Enzyme aktiv. Die verschiedenen Substrate, Coenzyme und artifiziellen Elektronenakzeptoren wurden anschließend bestimmt. Auch die mögliche Struktur der Enzyme wurde aufgedeckt (Watanabe *et al.*, 2012, Watanabe *et al.*, 2015).

Aufgrund der Ähnlichkeiten der Opn-Dehydrogenase und der D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase zur Cyanidsynthase können ähnliche Reinigungsbedingungen wie eben beschrieben getestet werden.

7.1.1. Zielsetzung

In diesem Teil der Arbeit sollte erstmals die Cyanidsynthase gereinigt werden. Hierfür wurden sowohl eine heterologe als auch eine homologe Genexpression mit anschließender Proteinanreicherung durchgeführt. Das Wissen aus den Aktivitätstests mit den Zellextrakten und aus der Reinigung der ähnlichen Enzyme diente als Grundlage für die hier beschriebene Proteinreinigung. Die gereinigte Cyanidsynthase sollte anschließend biochemisch charakterisiert werden.

7.2. Ergebnisse

7.2.1. Heterologe Genexpression von *hcnABC* (pASK-HCN.dong) in *E. coli* BL21

7.2.1.1. Medienoptimierung zur Verringerung toxischer Effekte durch Cyanid für die Proteinreinigung aus *E. coli* BL21

Die heterologe Genexpression von *hcnABC* aus *Ps. donghuensis* G2#25 in *E. coli* BL21 war im Gegensatz zur Reinigung des Proteins erfolgreich gewesen (Amberger, 2016a). Die Gesamtzellmasse der *E. coli* BL21 Zellen mit pASK-HCN.dong war um den Faktor 0,25 geringer als mit einem Kontrollplasmid (Amberger, 2016a).

Auch bei eigenen Experimenten zeigte sich, dass wegen der Cyanidproduktion und der fehlenden Cyanidresistenz von *E. coli*, die finale OD in LB-Medium geringer als bei der Kontrolle ohne Cyanidsynthasegene war. Aufgrund der geringen Ausbeute an Zellmasse war keine Reinigung möglich (Daten nicht gezeigt). Daher sollte durch eine Medienanpassung die Cyanidproduktion gesenkt und gleichzeitig die Menge an freiem Cyanid verringert werden. Für die Kultivierung der *E. coli* BL21 *hcnABC*-Zellen, welche für die Proteinreinigung verwendet wurden, verwendete

Amberger (2016a) LB-Komplexmedium. In eigenen Experimenten wurde die Menge an Hefeextrakt gegenüber Amberger verringert (von 0,5 % auf 0,4 %), Glucose (0,0125 %) und 0,75 mM CuCl₂ dem Medium zugefügt (Kapitel 2.1.6.2. LB-HD-Medium + Kupfer). Anschließend wurde das Wachstum und die Cyanidproduktion in LB-Medium und dem angepassten Medium untersucht. Die Kontrollkultur *E. coli* BL21 pASK75 (Leervektor) wuchs auf die höchste End-OD_{600 nm} von 4,7 (Abb. 57). *E. coli* BL21 pASK-HCN.dong in LB-Medium zeigte ab Stunde drei ein geringeres Wachstum und erreichte eine End-OD_{600 nm} von 2,3 nach 24 h. Das angepasste Medium führte zu einem verbesserten Wachstum, jedoch geringer als bei der Kontrolle, die End-OD_{600 nm} betrug 3,2. Die gleichzeitig bestimmte Cyanidkonzentration war bei *E. coli* BL21 pASK-HCN.dong in LB pH 8 zu allen Zeitpunkten, mit einem Maximum nach 7 h mit 3,1 mg/l Cyanid, am höchsten. Nach 24 h sank bei allen Proben die Cyanidkonzentration im Vergleich zu dem 9 h Wert. Das optimierte Medium führte zu einer geringeren Menge an freiem Cyanid im Vergleich zu LB pH 8. Hieraus resultierte ein Wachstum auf eine höhere End-OD.

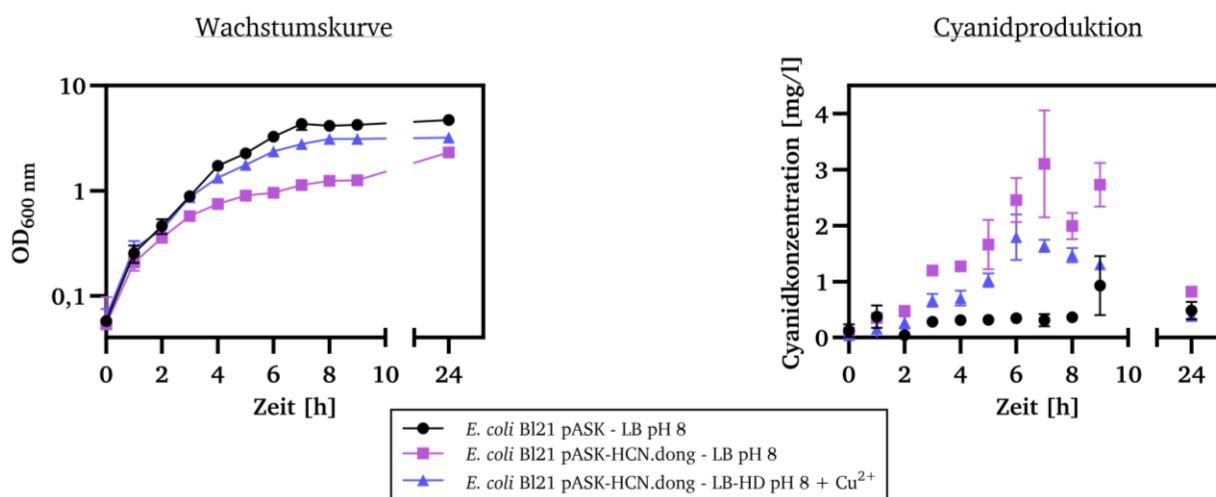


Abbildung 57 Wachstumskurven mit Cyanidgehaltsbestimmungen der Medienoptimierung für *E. coli* BL21 pASK-HCN.dong und pASK75. Die Cyanidkonzentration wurde vom Kulturüberstand während jeder Wachstumskurve mittels Methämoglobintest bestimmt. Die Werte der Cyanidkonzentration in LB-HD-Medium + Kupfer wurden zum Ausgleich des Medieneinflusses nachträglich berechnet (Kapitel 2.2.3.1.: Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest). Aufgrund der komplexierenden Wirkung von Cyanid auf Kupfer wurde die Kalibrierreihe ohne Kupfer durchgeführt (Kento Amann). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Das optimierte Medium wurde für die Vor- und Hauptkultur von *E. coli* Bl21 pASK-HCN.dong im Zuge der Proteinreinigung verwendet. In den Elutionsfraktionen nach der Strep-tag-Säulenaффinitätschromatographie wurde kein Protein nachgewiesen, womit die Proteinreinigung nicht erfolgreich war. Zur Vermeidung von Cyanidproduktion bei der Hauptkultur wurde anstatt dem angepassten Medium M9-Medium verwendet.

7.2.1.2. Einfluss der Position des Strep-tags an den verschiedenen Untereinheiten der Cyanidsynthase auf die Cyanidproduktion

Eine Hypothese zur Erklärung des Misserfolgs der Proteinreinigung war, dass der Strep-tag (Position: HcnC C-terminal) im Protein maskiert war. Daher wurde getestet an welchen Positionen des Strep-tags an den Untereinheiten das Protein aktiv und im Western Blot nachweisbar war. Eine Cyanidkonzentration von ca. 1 mg/l war in *E. coli* Bl21 Übernachtskulturen messbar, sofern der Strep-tag an HcnB oder HcnC C-terminal lokalisiert war (Abb. 58). Sobald der Strep-tag an den anderen Positionen der Untereinheiten fusioniert war, wurde kein Cyanid gemessen. Das Enzym war inaktiv oder wurde nicht gebildet.

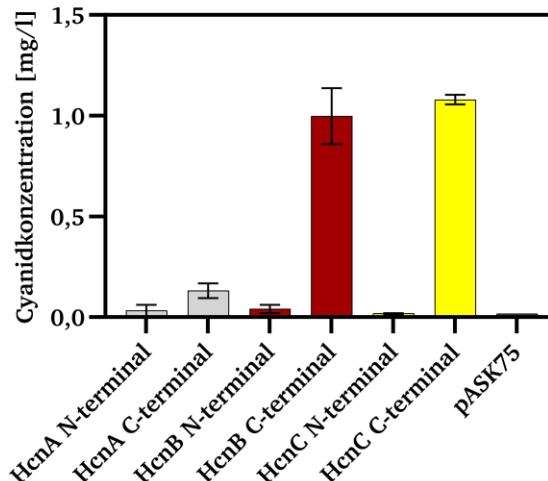


Abbildung 58 Cyanidproduktion von *E. coli* Bl21 pASK-HCN.dong in Abhängigkeit der Position des Strep-tags. Cyanidkonzentration des Überstands von ÜNK (LB pH 8). *E. coli* Bl21 pASK75 (Leervektor) diente als Negativkontrolle. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Um zu unterscheiden, ob das Enzym inaktiv war oder nicht gebildet wurde, wurde ein Western Blot durchgeführt. Bei allen Positionen der Untereinheiten waren die Strep-tags zusätzlich zur getaggten Position an HcnC C-terminal vorhanden. Bei allen ÜNKs war ein Signal bei 22 kDa sichtbar. Dieses Signal entspricht dem biotinhaltigen Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) von *E. coli* (Abb. 59). Nur wenn der Strep-tag an den Positionen HcnB C-terminal oder HcnC C-terminal vorhanden war, wurden noch weitere Signale detektiert. Diese entsprechen HcnB bzw. HcnC. Bei den ÜNKs, die keine Cyanidproduktion zeigten, wurde auch kein Protein detektiert. Die Cyanidsynthase wurde also nicht gebildet. Keine der Untereinheiten wurde produziert, auch HcnC war nicht nachweisbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass schon die Transkription durch das Einfügen des Strep-tags an den verschiedenen Positionen nicht stattfindet, beziehungsweise ein unvollständiges Transkript entsteht.

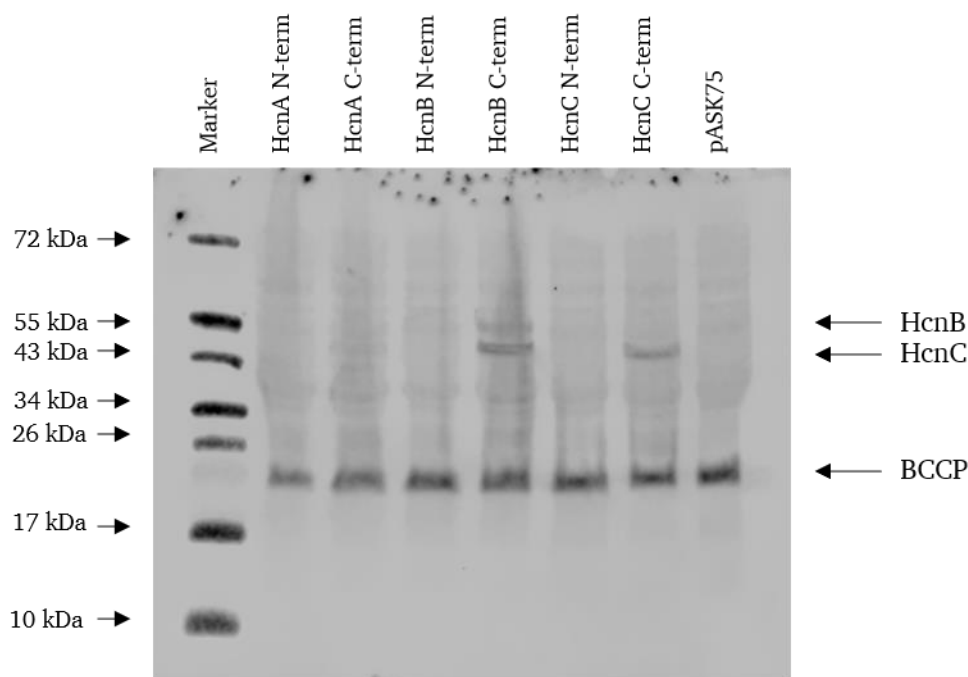


Abbildung 59 Western Blot von *E. coli* BL21 pASK-HCN.dong Gesamtzelllysaten mit unterschiedlichen Positionen des Strep-tags. Ein Ganzzelllysate wurde auf das SDS-Gel aufgetragen. *E. coli* BL21 pASK75 diente als Negativkontrolle. Die Detektion erfolgte über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin. BCCP: Biotin Carboxyl Carrier Protein.

7.2.1.3. Proteinanreicherung aus *E. coli* BL21 pASK-HCN.dong

Die heterologe Genexpression und die anschließende Proteinreinigung von der Cyanidsynthese aus *E. coli* BL21 war nicht erfolgreich. Es wurde kein Protein von der Säule eluiert. Daher wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Proteinanreicherung Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert (Durchführung siehe 2.2.3.2. Proteinanreicherung aus *E. coli*: Überprüfung *inclusion bodies*). Der Strep-tag zur

Proteinreinigung befand sich an HcnC C-terminal (46 kDa), daher wurde nur HcnC im Western Blot nachgewiesen (siehe vorheriges Kapitel). HcnC war in den ganzen Zellen, vor und nach dem Zellaufschluss, im Pellet der ersten Zentrifugation (900 g) und im Pellet der zweiten Zentrifugation (10 000 g) vorhanden (Abb. 60). In den Überständen der Zentrifugationen wurde HcnC nicht nachgewiesen. HcnC war somit in den Zelltrümmern (900 g Pellet) und in *inclusion bodies* (10 000 g Pellet), jedoch nicht in den Überständen, lokalisiert.

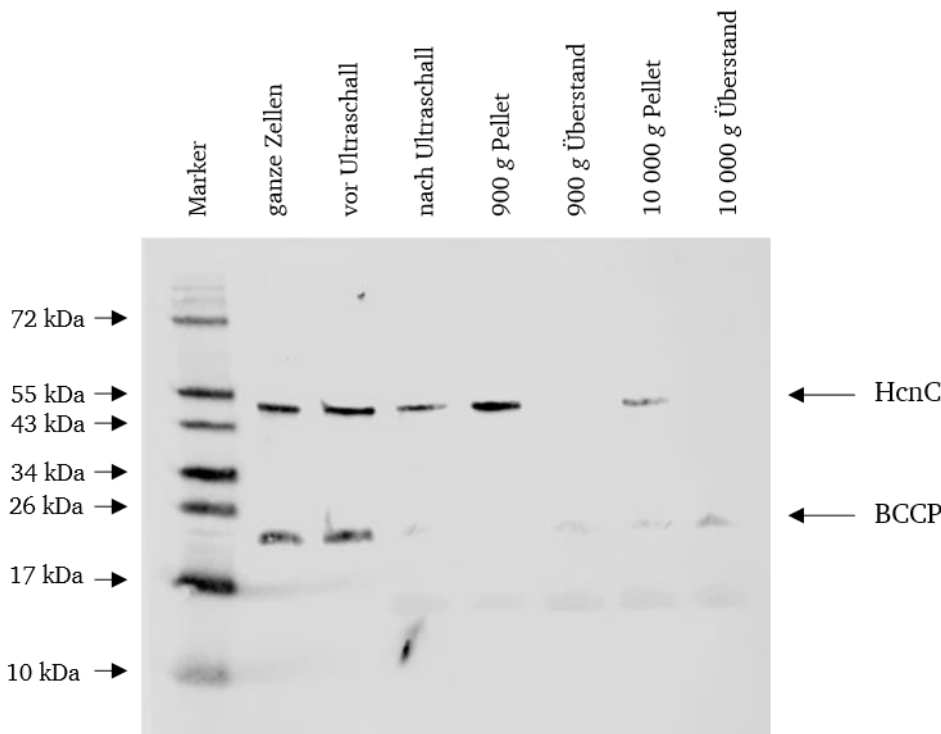


Abbildung 60 Nachweis der Cyanidsynthase nach der Proteinanreicherung aus *E. coli* B121 pASK-HCN.dong durch Westernblot. 7,3 µg Protein/Spur wurden auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte über fluoreszenzmarkiertes Streptavidin. 900 g: 1. Zentrifugation nach Ultraschall. 10 000 g: Zentrifugation des Überstands der 1. Zentrifugation. BCCP: Biotin Carboxyl Carrier Protein.

Es wurde versucht die Cyanidsynthase durch verschiedene Detergenzien und Behandlungen zu solubilisieren, um sie anschließend reinigen zu können (Kapitel 2.2.3.2.). Hierzu wurde entweder zu dem Zelltrümmerpellet oder vor dem Zellaufschluss das entsprechende Detergenz dazu gegeben. Nach der Inkubation wurde eine Ultrazentrifugation bei 100 000 g durchgeführt. Durch eine Western Blot Analyse wurde ermittelt, ob die Cyanidsynthase im Überstand nach der Ultrazentrifugation detektiert wurde. Die Solubilisierung der Cyanidsynthase wurde nur mit $\geq 2\%$ SDS erreicht (Tabelle 49). Keines der anderen Detergenzien führte zur Solubilisierung. Weder

die Solubilisierung mit synthetischen Polymeren, die Nanodiscs ausbilden (DIBMA und SMA 2:1), noch die Erhöhung der Salzkonzentration des Puffers führten zur Solubilisierung der Cyanidsynthase, ebenso wenig wie ein Hochdruck Zellaufschluss.

Da nach der Solubilisierung mit 5 % SDS HcnC im Überstand detektiert wurde, wurde der Überstand zur Proteinreinigung auf eine Streptactin Säule gegeben. Es wurde kein Protein eluiert. Durch die hohe SDS-Konzentration wurde das Protein wahrscheinlich inaktiviert und es kam zu einem Verlust der Quartärstruktur und der Cofaktor-Bindung.

Tabelle 49 Übersicht über verwendeten Detergenzien und Behandlungen zur Solubilisierung der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 aus *E. coli* Bl21.

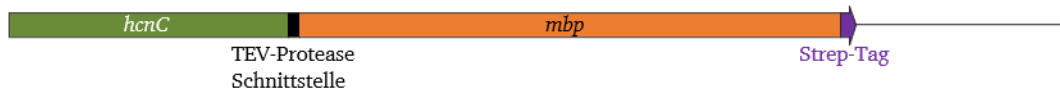
Detergenz/Behandlung	Dauer der Einwirkung	Solubilisierung (Protein nach Ultrazentrifugation im Überstand)
Detergenz		
6,5 mM CHAPS	20 h	Nein
1% CTAB	20 h	Nein
0,8 % DDM	1,5 bzw. 24 h	Nein
1,5 % DDM	20 h	Nein
2 % DDM	20 h	Nein
39 mM DDM	30 min vor US, 20 h nach US ¹	Nein
2,5 % DIBMA	30 min vor US, 20 h nach US ¹	Nein
5 % DIBMA	20 h	Nein
4 mM Natriumdesoxycholat	20 h	Nein
207 mM Natriumdesoxycholat	3 h (vor US ¹)	Nein
1 % SDS	20 h	Nein
2 % SDS	20 h	Ja
5 % SDS	20 h	Ja
10 % SDS	20 h	Ja
SMA 2:1	20 h	Nein
5 % Triton	20 h	Nein
1 % Triton + 0,1 % SDS	20 h	Nein
2 % Triton + 0,1 % SDS	20 h	nein
2 % Triton + 0,5 % SDS	20 h	nein
5 % Triton + 10 % SDS	20 h	Ja
10 % Triton + 10 % SDS	20 h	Ja
Änderung des Reinigungsprotokolls		
cOmplete Protease Inhibitor	20 min (vor US ¹)	Nein
EmusiFlex statt Ultraschall	-	Nein
0,5 mg/ml Lysozym	3 bzw. 20 h	Nein
1 M NaCl in Puffer W	-	Nein
Zellsuspension vor Ultraschall einfrieren + auftauen	-	Nein
Zellernte nach 1 h Induktion	-	Nein

¹US = Ultraschall.

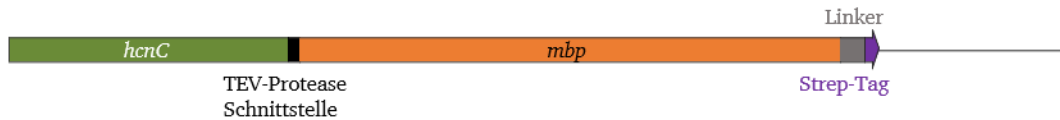
Zur Erhöhung der Solubilität der Cyanidsynthase wurde das *mbp*-Gen für das Maltosebindeprotein (Waugh, 2016) sowohl 5' an *hcnA* als auch 3' an *hcnC* fusioniert (Abb. 61). Ziel hierbei war es, das Protein zu reinigen. *E. coli* Bl21 wurde mit den jeweils erstellten Plasmiden (Plasmid 21, 22) transformiert und die Cyanidproduktion von ÜNKs in LB pH 8 bestimmt. Wenn MBP N-terminal an HcnA fusioniert war, wurde keine Cyanidproduktion gemessen. Das Fusionsprodukt von MBP C-terminal an HcnC zeigte eine Cyanidproduktion von über 1,4 mg/l (pASK-HCN.dong 1,3 mg/l). Es war jedoch nicht erfolgreich, HcnC mittels Western Blot nachzuweisen. Auch eine Proteinreinigung war nicht erfolgreich, es wurde kein Protein von der Streptactin Säule

eluiert. Da der Strep-tag möglicherweise durch MBP maskiert war, wurde ein Linker zwischen MBP und dem Strep-tag eingefügt (Plasmid 23). Die Cyanidproduktion von *E. coli* Bl21 pASK-HCN.dong MBP-L-Strep C-term wurde nachgewiesen (0,8 mg/l), jedoch war kein Protein mittels Western Blot nachweisbar. Zudem wurde der Strep-tag vor MBP gesetzt (Plasmid 24), um eine Maskierung zu verhindern. Auch hier war Cyanidproduktion messbar (1,1 mg/l), jedoch kein Protein im Western Blot sichtbar. Ebenso war die Verwendung eines Antikörpers gegen MBP nicht erfolgreich, während die Positivkontrolle detektiert wurde (gereinigtes Protein MBP-TEV-MccC-Strep, bereitgestellt von Jakob Eller).

HcnC-MBP-Strep



HcnC-MBP-Linker-Strep



HcnC-Strep-MBP-Linker-Strep

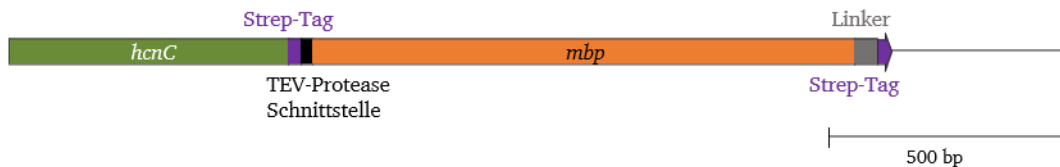


Abbildung 61 Übersicht über die unterschiedlichen Maltosebindeprotein-Fusionsprodukte. Zwischen HcnC und dem Maltosebindeprotein liegt eine Schnittstelle für die TEV-Protease. Die Strep-tag-Codons waren zu Beginn C-terminal an *mbp* fusioniert. Zwischen MBP und dem Strep-tag wurde ein Linker eingefügt. Ein weiterer Strep-tag wurde vor die TEV-Protease Schnittstelle gesetzt.

In Kapitel 7.2.1.2 wurde gezeigt, dass der Strep-tag auch an HcnB C-terminal fusioniert sein kann. Daher wurde auch hier der Strep-tag an HcnB C-terminal fusioniert. Es wurde keine Cyanidproduktion gemessen und das Protein wurde auch nicht per Western Blot nachgewiesen.

Auch eine *in vitro* Proteinsynthese von HcnABC war nicht erfolgreich. Hierbei wurde keine Proteinproduktion nachgewiesen (Kapitel 2.2.3.2. *in vitro* Protein Synthese).

7.2.2. Proteinanreicherung von HcnABC aus *Ps. donghuensis* G2#25

7.2.2.1. *In vitro* Aktivitätsnachweis von HcnABC nach dem Zellaufschluss

Bei den hier angegebenen Werten der Cyanidproduktion ist zu beachten, dass Methionin für den Test verwendet wurde. Es ist unklar, ob Methionin mit Puffer W auch den Methämoglobintest, wie LB + Methionin, beeinflusst (Kapitel 6.2.4.). Zunächst wurde ein *in vitro* Aktivitätsnachweis der Cyanidsynthese entwickelt, um später zu testen, in welcher Fraktion der Proteinanreicherung sich die Cyanidsynthese befindet. In *Ps. donghuensis* G2#25 ist sie nicht mit einem Strep-tag markiert, daher kann sie nicht mittels Western Blot nachgewiesen werden.

In der Literatur wurde die Sauerstoffsensitivität der Cyanidsynthese beschrieben (Bunch *et al.*, 1982). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Sauerstoff auf die Aktivität der ganzen Zellen und der Proteinlösung nach Ultraschallbehandlung getestet. Hierfür wurde eine Hauptkultur auf zwei Gefäße aufgeteilt und ein Experiment fand aerob statt, während das andere bei allen Schritten anaerob, sofern dies möglich war, stattfand. Der Zellaufschluss und die Zentrifugationen wurden immer aerob durchgeführt.

Für den Cyanidtest mussten die verschiedenen Fraktionen der Proteinanreicherung verdünnt werden, da es sonst zu einer Trübung während des Methämoglobintests kam und die Messung nicht auswertbar war. Nach dem Zellaufschluss wurde nur Aktivität nachgewiesen, wenn vor der Ultraschallbehandlung DTT zu der Zellsuspension gegeben worden war (Daten nicht gezeigt). Die ganzen Zellen zeigten bei aerober Inkubation nach 24 h eine Cyanidproduktion von 2,1 mg/l, unter anaeroben Bedingungen 4,4 mg/l (Abb. 62). Nach dem Zellaufschluss war bei aeroben Bedingungen eine Verringerung der Cyanidmenge verglichen mit vor dem Zellaufschluss erkennbar (0,5 mg/l), während die Cyanidmenge unter anaeroben Bedingungen nach dem Zellaufschluss um 1 mg/l zunahm. *E. coli* Bl21 zeigte lediglich eine Hintergrund Cyanidproduktion von $\leq 0,1$ mg/l.

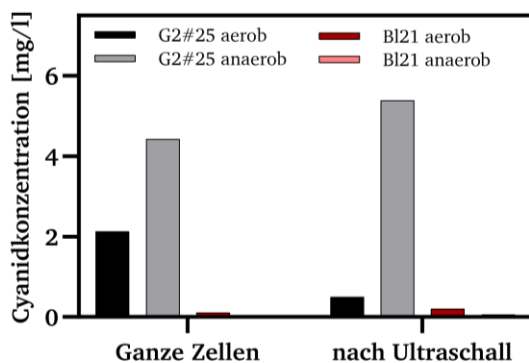


Abbildung 62 Einfluss von Sauerstoff auf die Cyanidproduktion nach 24 h von ganzen und aufgeschlossenen *Ps. donghuensis* G2#25 Zellen. Eine Hauptkultur wurde aufgeteilt. Die ganzen Zellen entsprechen der Zellmenge einer 250 ml ÜNK, welche pelletiert und in 10 ml Puffer W aufgenommen wurde. Hiervon wurde sowohl vor als auch nach dem Zellaufschluss eine Probe entnommen und diese 1:5 in Puffer W verdünnt. Eine Proteinanreicherung wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt und eine unter anaeroben Bedingungen. Die Inkubationen der Proben erfolgten entweder aerob oder anaerob. Da die ursprüngliche Kalibrierreihe in LB pH 8 durchgeführt wurde, wurde eine erneute Kalibrierreihe mit Puffer W (mit/ohne Glycin) durchgeführt. Um dies auszugleichen wurden die Cyanidkonzentrationen nachträglich berechnet (Kapitel 2.2.3.1.: Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest). *E. coli* BI21 ohne Expressionsplasmid. Als Negativkontrolle diente *E. coli* BI21 ohne Expressionsplasmid.

Die Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 war nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall aktiv und sauerstoffsensitiv. Daher wurden weitere Proteinanreicherungen und Aktivitätstests unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Temperaturabhängigkeit der Cyanidproduktion wurde durch einen Enzymaktivitätstest untersucht. Hierfür wurden die Reaktionsgefäße bei Temperaturen zwischen 25 °C und 33 °C inkubiert. Die ganzen Zellen von *Ps. donghuensis* G2#25 wiesen eine Cyanidproduktion von 2,5 mg/l bei 30 °C nach 24 h auf (Positivkontrolle). Die Zelllysate nach der Ultraschallbehandlung wiesen eine ähnliche Cyanidkonzentration von 2,5 mg/l, unabhängig von der Temperatur, auf (Abb. 63). Die höchste Cyanidproduktion wurde bei 27 °C mit 3 mg/l gemessen. Die Aktivität der Cyanidsynthese wurde von Temperaturen zwischen 25 °C und 33 °C nur gering beeinflusst.

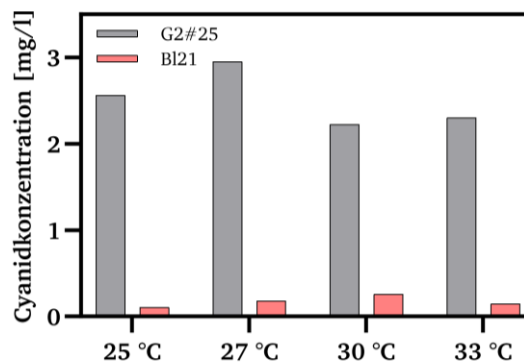


Abbildung 63 Einfluss der Temperatur auf die Cyanidproduktion von aufgeschlossenen *Ps. donghuensis* G2#25 Zellen. Zellen einer 500 ml Expressionskultur wurden sedimentiert und in 20 ml anaerobisiertem Puffer W resuspendiert. Nach dem Ultraschall wurde das Lysat 1:5 verdünnt. Es wurde anaerobisiertes Glycin-Methionin, Eisen-(III)-citrat und PMS gelöst in anaerobisiertem Puffer W verwendet. Die Aufteilung der Enzymtests auf die 1,5 ml Reaktionsgefäße (Schraubdeckelgefäße mit Dichtung) erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Die Inkubation der Reaktionsgefäße erfolgte aerob. Die Cyanidkonzentration wurde nach 24 h bestimmt. Diese wurden nachträglich berechnet, um den Effekt von Puffer W auf die Kalibrierreihe auszugleichen (Kapitel 2.2.3.1.: Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest). *E. coli* BI21 ohne Expressionsplasmid diente als Negativkontrolle.

7.2.2.2. Anfügen einer für den Strep-tag kodierenden DNA-Sequenz an *hcnC* im Genom von *Ps. donghuensis* G2#25

Die Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 besitzt keinen Affinitätstag, daher ist ein Nachweis durch Western Blot und eine Reinigung des Enzyms schwierig. Aus diesem Grund wurde der Strep-tag durch das CRISPR/Cas9-System C-terminal an HcnC fusioniert.

Nach der Erstellung der Mutante wurden die Auswirkungen des Strep-tags auf das Wachstum und die Cyanidproduktion untersucht. In den ersten Stunden (bis Stunde acht) zeigte *Ps. donghuensis* HcnC-Strep ein dichteres Wachstum als der Wildtyp (Abb. 64). Nach 3 h war die OD_{600 nm} 0,5, die von *Ps. donghuensis* G2#25 nur 0,3. Zu späteren Messpunkten war kein Unterschied bei den OD_{600 nm}-Werten zwischen dem Wildtyp und der Strep-tag-Mutante messbar. Die End-OD_{600 nm} von dem Wildtyp war mit 6 höher als die der Strep-tag-Mutante mit 4,5. Die Fusionierung des Strep-tags an HcnC hatte nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum.

In einem weiteren Experiment wurde die Cyanidproduktion der Strep-tag-Mutante mit der des Wildtyps verglichen. Hier wurden andere Zellen als bei der Wachstumskurve verwendet und die Start-OD betrug 1. Die Cyanidproduktion 2 h nach Zugabe von Glycin-Methionin war geringer als die des Wildtyps (1,6 mg/l bzw. 2,7 mg/l). Nach 6 h produzierte der Wildtyp 6,6 mg/l Cyanid und *Ps. donghuensis* HcnC-Strep 3,1 mg/l. Auch nach 8 und 24 h war die Cyanidproduktion der Mutante geringer als die des Wildtyps. Der Strep-tag an HcnC führte zu einer Verringerung der Cyanidproduktion.

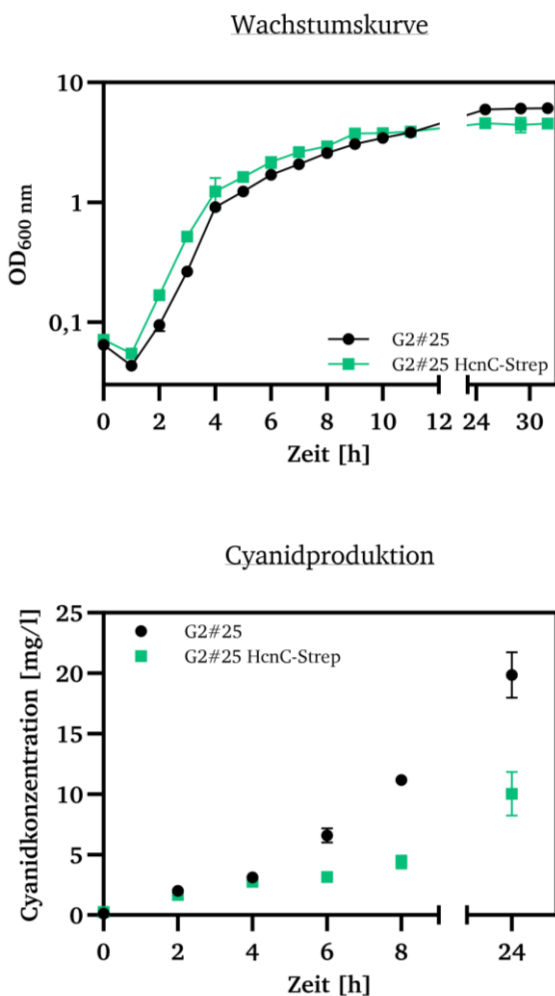


Abbildung 64 Wachstumskurve und Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* G2#25 HcnC-Strep. Für die Wachstumskurven wurde LB pH 7,2 verwendet und für die Cyanidproduktion LB pH 8 + 5 g/l Glycin-Methionin. Hauptkulturen der Wachstumskurve wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 0,05 beimpft und die der Cyanidmessung mit 1. Die Aufnahme der Wachstumskurve und die Bestimmung der Cyanidproduktion erfolgten zeitlich unabhängig voneinander und unterschiedliche Zellen wurden verwendet. Vom Kulturüberstand wurde die Cyanidkonzentration bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Trotz der geringeren Cyanidproduktion wurde mit *Ps. donghuensis* HcnC-Strep eine Proteinanreicherung durchgeführt. Der Nachweis des HcnC-Strep Proteins durch eine Western Blot Analyse war nicht erfolgreich. Es wurde bei keiner Fraktion (ganze Zellen, nach Ultraschall, Zentrifugationspellets/-überstände) ein Signal auf der erwarteten Höhe detektiert (Daten nicht gezeigt). Wie auch in dem vorherigen Cyanidtest zeigte der Wildtyp im Enzymtest eine höhere Cyanidproduktion als *Ps. donghuensis* HcnC-Strep (Abb. 65). Eine Cyanidproduktion war bei ganzen Zellen, aufgeschlossenen Zellen und jeweils in den Überständen der Zentrifugationen nachweisbar. Die ganzen Zellen produzierten am meisten Cyanid (3,3 bzw. 2,5 mg/l). Die Cyanidproduktion nach dem Zellaufschluss war von allen Fraktionen ähnlich. *Ps. donghuensis* G2#25 produzierte 2,5 mg/l, während *Ps. donghuensis* HcnC-Strep 2,1 mg/l produzierte. Da die Cyanidproduktion im Überstand nach der Ultrazentrifugation nachgewiesen wurde, befand sich die Cyanidsynthase folglich im Überstand. Auch nach einer Aufkonzentrierung (Faktor 19) des Überstands von *Ps. donghuensis* HcnC-Strep wurde kein Proteinsignal im Western Blot detektiert (Daten nicht gezeigt).

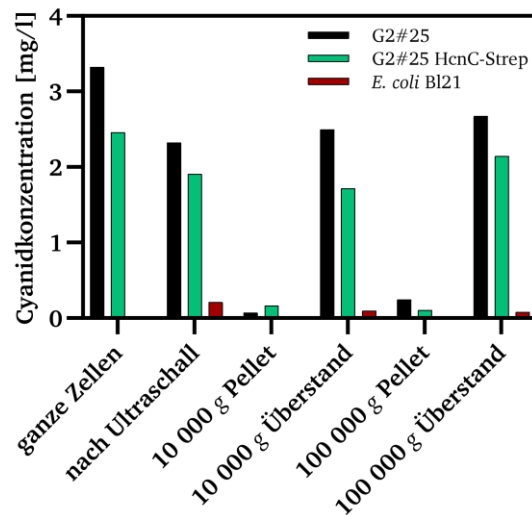


Abbildung 65 Cyanidaktivitätstest einzelner Fraktionen der Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* HcnC-Strep nach 24 h. Von allen Fraktionen wurde 1 ml abgenommen und 1:5 verdünnt. Je 1 ml dieser Verdünnung wurde für den Enzymaktivitätstest eingesetzt. Nach 24 h wurden die Enzymtests abzentrifugiert und die Cyanidkonzentration der Überstände gemessen. *E. coli* BI21 ohne Expressionsplasmid diente als Negativ-Kontrolle.

7.2.2.3. Einbringen eines zweiten *hcnABC* Operons in *Ps. donghuensis* G2#25

Da die Strep-tag-Reinigung der Cyanidsynthese aus *Ps. donghuensis* G2#25 HcnC-Strep nicht erfolgreich gewesen war, wurde ein zweites Strep-tag markiertes *hcnABC*-Operon in *Ps. donghuensis* G2#25 eingebracht. Die Gene wurden hierfür über das Plasmid pBBR1MCS-2_ *lacZabc* exprimiert. Durch eine PCR wurde bestätigt, dass das Plasmid von *Ps. donghuensis* G2#25 aufgenommen wurde (Daten nicht gezeigt). *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2_ *lacZabc* produzierte nach 2 und 4 h mehr Cyanid als der Wildtyp (2 h: 3,4 bzw. 2 mg/l; 4 h: 6,1 bzw. 3,4 mg/l; Abb. 66). Nach acht Stunden war die Cyanidproduktion vergleichbar mit dem Wildtyp bei 11 mg/l Cyanid. Auch nach 24 h war die Cyanidproduktion vergleichbar, die vom Wildtyp war jedoch mit 14,8 mg/l höher als die von *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2_ *lacZabc* mit 12,1 mg/l. Das Einbringen des zusätzlichen *hcnABC*-Operons erhöhte die Cyanidproduktion somit in den ersten sechs Stunden.

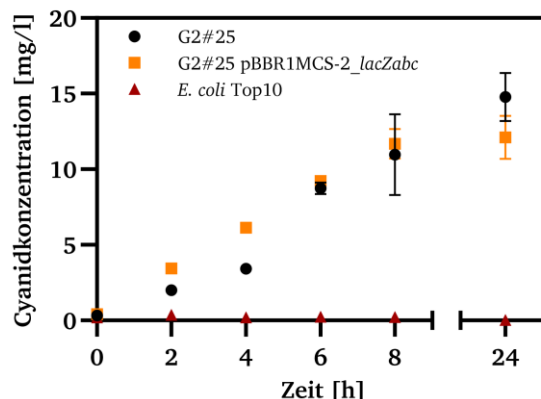


Abbildung 66 Cyanidproduktion von *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2_ *lacZabc* mit zwei funktionalen *hcnABC* Operons im Vergleich zum Wildtyp. Übernachtskulturen wurden sedimentiert und in LB pH 8 mit 5 g/l Glycin-Methionin resuspendiert. Die Hauptkulturen wurden mit einer Start-OD_{600 nm} von 1 angeimpft und die Cyanidkonzentrationen der Überstände bestimmt. *E. coli*/Top10 diente als Negativkontrolle. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Eine Proteinanreicherung wurde durchgeführt, um die Fraktion zu ermitteln, in der sich die Cyanidsynthese befindet. Bei ganzen Zellen wurde kein Signal auf der Höhe von HcnC detektiert (Abb. 67). Nach dem Zellaufschluss wurde in den Fraktionen 10 000 g Überstand und Pellet und in der Membranfraktion nach der Ultrazentrifugation (100 000 g Pellet) ein Signal von 46 kDa detektiert. Dies entspricht HcnC. In dem Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde nur ein schwaches Signal der erwarteten Größe detektiert. In einem weiteren Experiment wurde dies bestätigt. Eine Proteinreinigung des Überstands über eine Strep-tag Säule war ebenso nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

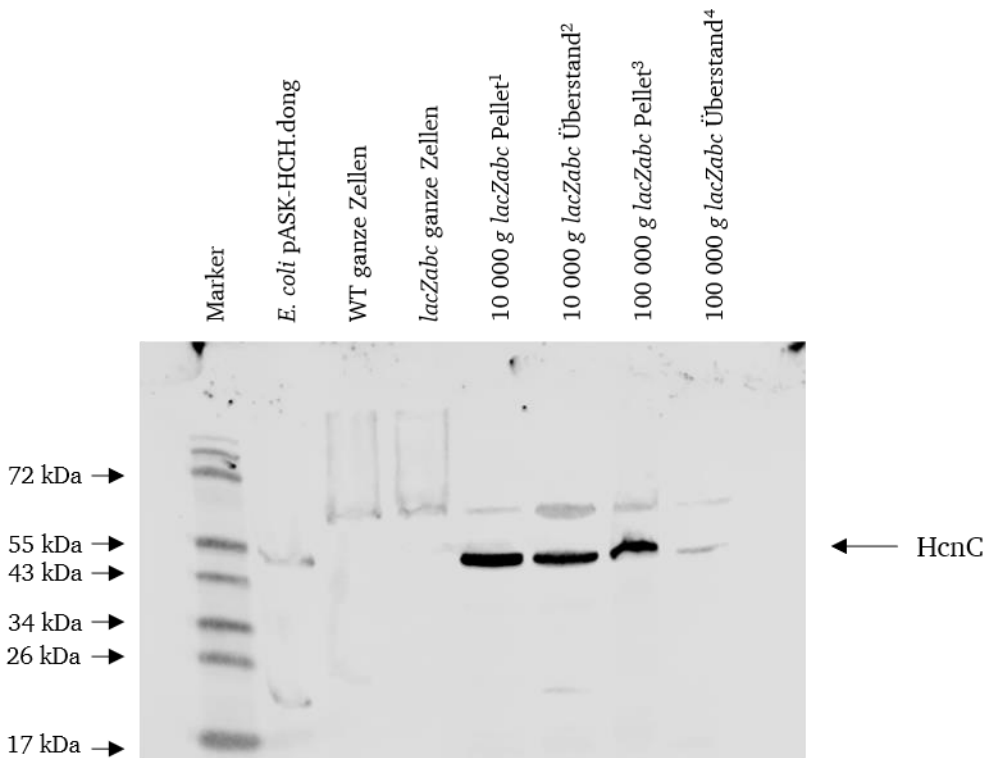
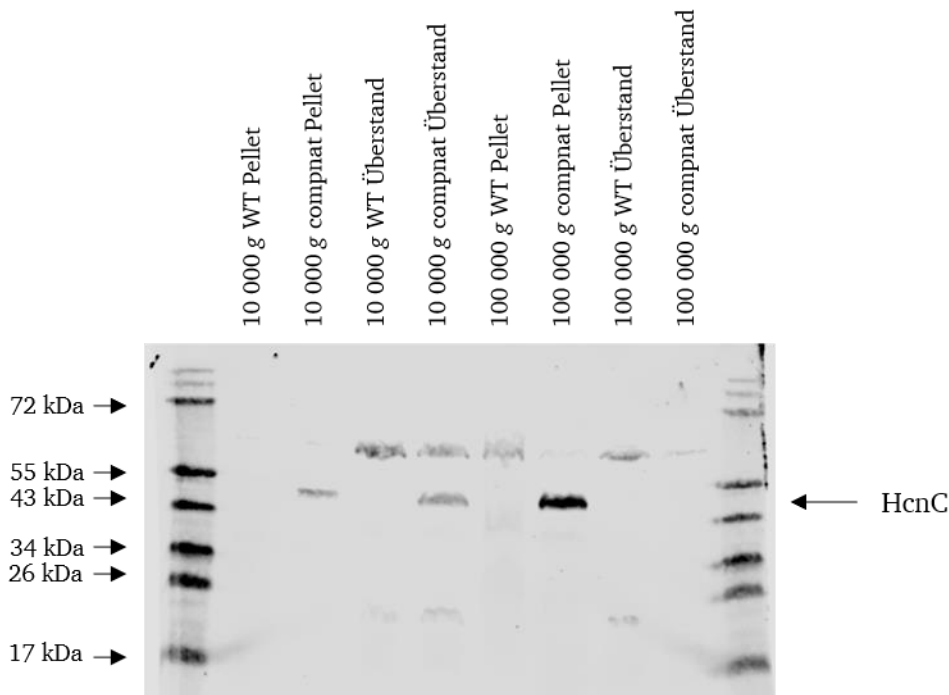


Abbildung 67 Western Blot Analyse der Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2_ *lacZabc* Zellen. Protein/Spur: ¹19 µg, ²81 µg, ³52 µg, ⁴61 µg. Positivkontrolle: *E. coli* BI21 pASK-HCN.dong. Die Detektion erfolgte über Streptavidin.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf Cyanidproduktion getestet. Da die ganzen Zellen, welche für die Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2_ *lacZabc* verwendet wurden, keine Cyanidproduktion in Puffer W mit Glycin-Methionin zeigten, wurde mit den weiteren Fraktionen keine Tests durchgeführt. Der Test auf Cyanidproduktion wurde hier nicht wie vorher in LB pH 8, sondern in Puffer W durchgeführt. (Abb. 66). Nach einer weiteren Reinigung wurde ebenfalls keine Cyanidproduktion detektiert. Daher wurden keine weiteren Proteinanreicherungen mit dieser Mutante durchgeführt.

7.2.2.4. Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* $\Delta hcnABC$ compnatProABC

Da bei *Ps. donghuensis* pBBR1MCS-2-*lacZabc* auch das native *hcnABC*-Operon im Genom vorhanden war, wurde vermutet, dass das Vorhandensein beider Operons zu der Inaktivität führte. Daher wurde eine Proteinanreicherung mit der Komplementierungsmutante *Ps. donghuensis* ΔABC compnatProABC durchgeführt. Die *hcnABC*-Gene im Genom waren deletiert und über das Plasmid wieder unter Kontrolle des nativen Promotors in *Ps. donghuensis* eingebracht worden (Kapitel 6.2.5.). Nach dem Zellaufschluss und der darauffolgenden Zentrifugation wurde HcnC sowohl im Überstand als auch im Pellet detektiert (Abb. 68). Bei dem Wildtyp wurde bei keiner Probe HcnC detektiert, da HcnC nicht mit dem Strep-tag markiert war. Nach der Ultrazentrifugation wurde HcnC bei der Komplementierungsmutante im Pellet nachgewiesen, also in der Membranfraktion. Im Überstand wurde HcnC nicht nachgewiesen.



Probe	Proteinkonzentration [mg/ml]	Aufgetragene Proteinmenge [μ g]
10 000 g WT Pellet	0,3	9
10 000 g compnat Pellet	0,3	9
10 000 g WT Überstand	3,5	105
10 000 g compnat Überstand	2,8	84
100 000 g WT Pellet	2,7	82
100 000 g compnat Pellet	2,5	75
100 000 g WT Überstand	3,0	90
100 000 g compnat Überstand	1,5	45

Abbildung 68 Fluoreszenzbasierte Western Blot Analyse der Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* Δ *hcnABC* *compnatProABC*. Die Proben der einzelnen Fraktionen wurden unverdünnt aufgetragen, dadurch ergaben sich die unterschiedlichen Proteinmengen. Die Detektion erfolgte über Streptavidin. Negativkontrolle: *Ps. donghuensis* G2#25.

Wie schon in dem vorherigen Cyanidtest (Kapitel 6.2.5.) war die Cyanidproduktion der ganzen Zellen der Komplementierungsmutante mit 4 mg/l höher als die des Wildtyps mit 3 mg/l (Abb. 69). Nach dem Zellaufschluss zeigte der Wildtyp eine Cyanidproduktion zwischen 1,3 mg/l und 2,8 mg/l. Im Vergleich dazu zeigte die Komplementierungsmutante trotz gleicher Durchführung keine Cyanidproduktion nach der Ultraschallbehandlung. Die Proteinanreicherung wurde zweimal an unabhängigen Tagen durchgeführt. Auch bei einer vorherigen Durchführung wurde kein Cyanid bei dem Cyanidaktivitätstest nach dem Zellaufschluss nachgewiesen (vorherige Durchführung von Kim, 2022).

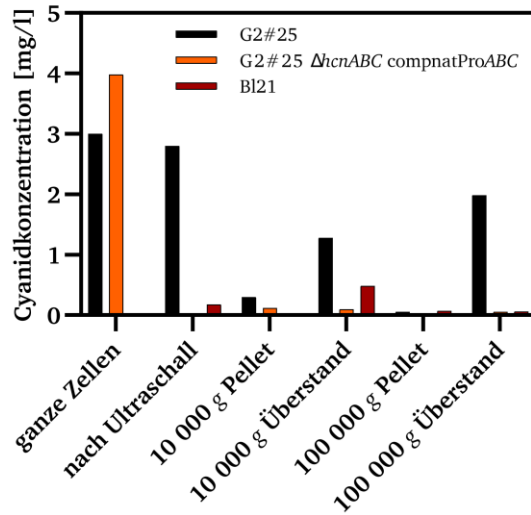


Abbildung 69 Nachweis der Cyanidaktivität einzelner Fraktionen der Proteinanreicherung aus *Ps. donghuensis* ΔABC compnatProABC nach 24 h. Die einzelnen Fraktionen wurden 1:5 verdünnt. Die Cyanidproduktion wurde durch Zugabe von je 5 mg Glycin-Methionin induziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben des Aktivitätstests pelletiert. Die Cyanidkonzentration der Überstände wurde gemessen. Positivkontrolle: *Ps. donghuensis* G2#25.

7.3. Diskussion

Ziel dieses Kapitels war es gewesen, die Cyanidsynthese aus dem Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 heterolog in *E. coli* B121 zu produzieren und zu reinigen. Anschließend sollte die biochemische Charakterisierung des Enzyms stattfinden.

Durch die Expression der Cyanidsynthasegene zeigte *E. coli* B121 ein Wachstum auf eine niedrigere End-OD_{600 nm} als der Wildtyp. Die Verschlechterung des Wachstums war das Ergebnis der Cyanidproduktion. Cyanid inhibiert die Cytochrom-*d*- und *o*-Oxidasen der Atmungskette (Keilin, 1929, Pudek *et al.*, 1974) und auch die DNA-Replikation (Weigel *et al.*, 1975). Da das verwendete LB-Medium Hefeextrakt und Pepton enthielt, wurde zunächst versucht, die Menge an Hefeextrakt zu reduzieren. Hefeextrakt enthält eine Vielzahl von Aminosäuren (Lo *et al.*, 1997, Zarei *et al.*, 2016), welche als Substrat für die Cyanidsynthese dienen können. Cyanid bildet mit Metallen Komplexe, die weniger toxisch als Cyanwasserstoff sind (Redman *et al.*, 2012). Durch eine Reduktion der Cyanidproduktion durch weniger Hefeextrakt und die Komplexbildung von freiem Cyanid mit Kupfer wurde eine höhere End-OD von *E. coli* pASK.HCN_dong erreicht (Abb. 57). Zur Reinigung des Enzyms wurde es an allen Untereinheiten jeweils N- oder C-terminal mit einem Strep-tag versehen. Enzymaktivität wurde nur nachgewiesen, wenn der Strep-tag C-terminal an HcnB oder HcnC fusioniert war (Abb. 58). Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit dem 3D-Strukturmodell fiel auf,

dass der C-Terminus von HcnA nicht freiliegt, während die anderen drei im Heterotrimer zugänglich sind (Abb. 70). Die Prolin-Dehydrogenase und die Opin-Dehydrogenase besitzen Ähnlichkeiten zu der Cyanidsynthese (Kapitel 6.1.). Die Quartärstruktur beider Enzyme unterscheidet sich von dem 3D-Strukturmodell der Cyanidsynthese. Die L-Prolin-Dehydrogenase besteht aus zwei Untereinheiten, welche als Heterooktamer angeordnet sind (Tsuge *et al.*, 2005), die Untereinheiten der Opin-Dehydrogenase sind wahrscheinlich als Heterododekamer angeordnet (Watanabe *et al.*, 2015). Die Quartärstrukturen der beiden Enzyme legen die Vermutung nahe, dass die Quartärstruktur der Cyanidsynthese sich von dem 3D-Modell unterscheidet, wodurch manche Termini maskiert sein könnten.

Bei der anschließenden Proteinreinigung zeigte sich, dass ein Teil des Proteins in *inclusion bodies* vorlag (Abb. 60). Dies geschieht, wenn die Faltung nicht korrekt abläuft (Baneyx, 1999) oder die Proteine eine abnormale Struktur aufweisen (Prouty *et al.*, 1972, Prouty *et al.*, 1975). Ein Teil des Proteins lag hier auch in der Zelltrümmerfraktion vor. Frühere Experimente zeigten, dass die Cyanidsynthese in der Membranfraktion vorliegt (Bunch *et al.*, 1982). Hier wurde versucht, die Cyanidsynthese aus der *inclusion body*/Zelltrümmerfraktion zu isolieren. Jedoch gelang dies nur mit SDS. *Inclusion bodies* können durch starke Proteindenaturierungsmittel, wie Guanidin-HCl oder Detergenzien, gereinigt werden (Überblick in Singh *et al.*, 2005).

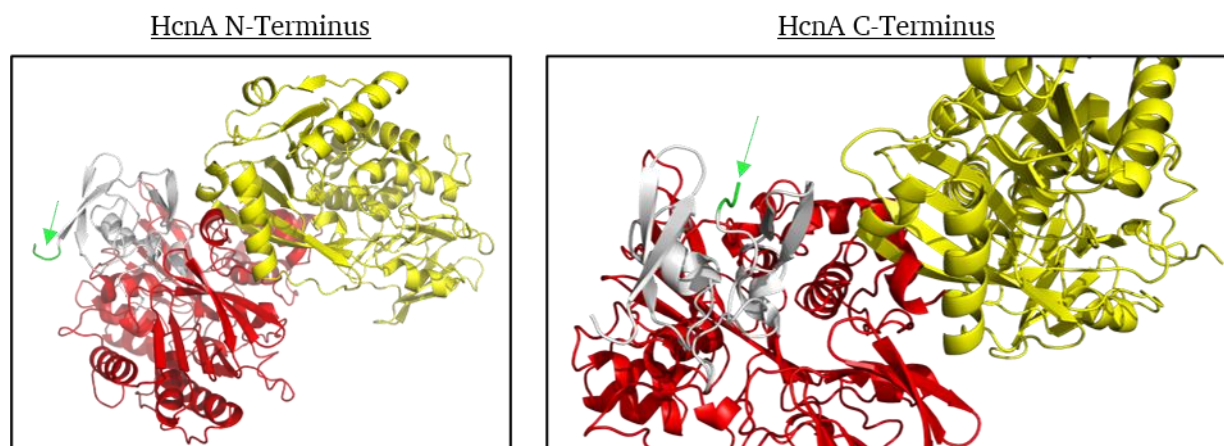


Abbildung 70 Übersicht über die Lage der Termini (Grün) von HcnA im 3D-Strukturmodell der Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25.

Jedoch müsste anschließend eine Rückfaltung durchgeführt werden (Palmer *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2005). In früheren Arbeiten wurde die erfolgreiche Auflösung von *inclusion bodies* und eine anschließende Proteinreinigung mit SDS bereits beschrieben. Die SDS-Konzentration betrug dort zwischen 0,5 und 2 % (He *et al.*, 2017, Schröder-Tittmann *et al.*, 2010). Bei der hier durchgeführten Solubilisierung waren mindestens 2 % SDS nötig. Da SDS jedoch stark denaturierend wirkt (Bhuyan, 2010) und bereits ab 0,2 % die Cofaktor-Bindung löst (Martínez-Limón *et al.*, 2016), ist es für die Proteinreinigung nur bedingt geeignet.

Die Solubilisierung der Cyanidsynthase durch eine Erhöhung der Löslichkeit durch MBP (Waugh, 2016) war nicht erfolgreich. Da auch die Proteinsynthese *in vitro* mit *E. coli* Extrakten nicht erfolgreich war, wurden die Proteinreinigungsversuche mit *E. coli* beendet.

Der Modellorganismus *Bacillus subtilis* (Überblick in Yang *et al.*, 2021) würde sich vermutlich besser als *E. coli* zur Proteinproduktion eignen, da er mit dem bekannten Cyanidproduzenten *Pr. megaterium* (Aminian-Dehkordi *et al.*, 2020, Faraji *et al.*, 2020, Gorji *et al.*, 2020) näher verwandt ist. Es gibt Veröffentlichungen zur Cyaniddegradation von *Ba. subtilis* (Al-Badri *et al.*, 2020, Nwokoro *et al.*, 2014) und auch zur Cyanidproduktion von *Ba. subtilis* Stämmen (Grover *et al.*, 2009, Walia *et al.*, 2013). Eine Resistenz gegen Cyanid sollte folglich vorliegen. Hier wurde auch ein *hcn*-ähnliches Gencluster identifiziert (Kapitel 6.2.10.1., Abb. 54). Somit sollte sich *Ba. subtilis* als Bakterium zur heterologen Expression der Cyanidsynthasegene eignen. Die weiteren Experimente zur Proteinreinigung wurden direkt mit dem Eigenisolat *Ps. donghuensis* G2#25 durchgeführt, wodurch Probleme bei post-translationalen Modifikationen wie Glykosylierung (Cain *et al.*, 2014) oder Fehlfaltungen ausgeschlossen werden können. Da es sich hierbei um ein Eigenisolat handelt, gibt es keine Daten zur Proteinreinigung und Handhabung des Bakteriums während der Experimente. Zur Proteinreinigung wurde *Ps. donghuensis* G2#25 mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurde die Enzymaktivität gemessen. Ein erfolgreicher Zellaufschluss per Ultraschall bei Anreicherungen der Cyanidsynthase wurde schon in früheren Publikationen

gezeigt (Bunch *et al.*, 1982, Wissing *et al.*, 1981). Die Sauerstoffsensitivität der Cyanidsynthase wurde bestätigt. Hier ist jedoch wieder zu beachten, dass in allen Experimenten Methionin vorhanden war. Es ist unklar, ob hier auch eine Beeinflussung des Methämoglobintests vorlag, da hier Puffer W mit Methionin und nicht LB mit Methionin verwendet wurden. Wenn der Enzymtest unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, war die Cyanidproduktion höher (Abb. 62). Daher wurden alle folgenden Reinigungen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Temperaturoptimum der Cyanidsynthase lag bei 27 °C, jedoch war nur eine leicht erniedrigte Cyanidproduktion bei 25 °C, 30 °C und 33 °C feststellbar. Frühere Messungen waren bei 30 °C durchgeführt worden (Bunch *et al.*, 1982).

Zur Reinigung der Cyanidsynthase wurde HcnC C-terminal mit einem Strep-tag markiert. Jedoch wurde die Cyanidproduktion von ganzen Zellen von *Ps. donghuensis* G2#25 um ca. die Hälfte durch diese Genomveränderung verringert. Auch ein Nachweis der Cyanidsynthase über einen Western Blot war nicht erfolgreich. Diese geringere Cyanidproduktion zeigte sich auch beim Aktivitätstest mit verschiedenen Fraktionen der Proteinanreicherung (Abb. 65). Für den His-Tag wurde ein Einfluss auf die Proteinausbeute (Mohanty *et al.*, 2004) und die Stabilität, unter anderem von Membranproteinen, gezeigt (Booth *et al.*, 2018, Mohanty *et al.*, 2004). Möglicherweise wird durch den Strep-tag die Stabilität bzw. die Ausbeute der Cyanidsynthase beeinflusst, welche die niedrigere Cyanidproduktion und das Fehlen eines Signals beim Western Blot aufgrund zu geringer Proteinkonzentrationen erklären würden.

Für den Wildtyp und für die genomische Strep-tag-Mutante wurden Enzymaktivitäten im Überstand nach der Ultrazentrifugation nachgewiesen, jedoch nicht in der Membranfraktion (Kapitel 7.2.2.2.). Bei Proteinanreicherungen aus *Ch. violaceum* lag die Cyanidsynthase hauptsächlich in der Membranfraktion vor (Bunch *et al.*, 1982). Es war auch beschrieben worden, dass sich das Enzym leicht von der Membran lösen lässt. Daher stehen die Ergebnisse nicht im Widerspruch. Zum Ausschluss von möglichen polaren Effekten, welche durch das Einbringen des Strep-tags in das Genom entstanden sein

könnten, wurde das mit einem Strep-tag markierte Operon über ein Plasmid in *Ps. donghuensis* G2#25 eingebracht. Das native Operon war zudem im Genom vorhanden. Das Vorhandensein von zwei *hcn*-Operons führte in den ersten Stunden zu einer höheren Cyanidproduktion (Abb. 66). HcnC wurde bei der Proteinanreicherung in der Membranfraktion nachgewiesen. Es wurde jedoch für die ganzen Zellen keine Enzymaktivität bei der Proteinanreicherung nachgewiesen. Der Wildtyp hingegen zeigte Cyanidproduktion. Es wurde vermutet, dass das Vorhandensein beider Operons zu Problemen bei der Expression

führte. Um diesen Verdacht zu überprüfen, wurde ein *hcnABC*-Expressionsplasmid in die *Ps. donghuensis* $\Delta hcnABC$ -Mutante eingebracht. Auch hier wurde das Protein in der Membranfraktion nachgewiesen. Die ganzen Zellen der Komplementierungsmutante zeigten Cyanidproduktion. Jedoch wurde nach dem Ultraschall keine Aktivität nachgewiesen. Der Verlust der Aktivität nach dem Zellaufschluss bleibt unklar. Weitere Experimente müssen hier durchgeführt werden, um ein aktives mit Affinitätstag markiertes Enzym zu erhalten.

8. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden erstmals gezielt alkalitolerante/alkaliphile Cyanidproduzenten isoliert, mit dem Ziel, diese für Biolaugungsexperimente einzusetzen. Durch weitere gezielte Isolierungen von Cyanidproduzenten aus anderen Habitaten kann das Spektrum an Mikroorganismen, die in Zukunft für Biolaugungen eingesetzt werden können, erweitert werden. Insbesondere die Neuisolate der Gattung *Mongoliicoccus* sollten näher untersucht und charakterisiert werden, da es bisher nur die Erstbeschreibungsliteratur gibt und sie eine hohe Toleranz gegenüber Kupfer aufwiesen. Durch ein besseres Verständnis dieser Resistenz können möglicherweise Bakterien so optimiert werden, dass sie eine hohe Resistenz gegen Kupfer aufweisen.

Von den isolierten Bakterien aus dieser Arbeit und früheren weiteren Isolaten wurden nur Goldlaugungsaktivitäten bei *Ps. donghuensis* G2#25 für mehrere Laugungssubstrate nachgewiesen. Die Goldausbeuten wurden gezielt durch eine Vorbehandlung des Substrats und zwei Medienoptimierungen gesteigert. Die erhaltenen Ergebnisse aus der statistischen Versuchsplanung können als Grundlage für weitere Medienoptimierungen genutzt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Goldausbeuten stellt die Kombination von verschiedenen Mikroorganismen dar. Hier ist ein mehrstufiger Prozess zu testen oder der gleichzeitige Einsatz von Bakterien, beispielsweise von *Ps. donghuensis* G2#25 und *Ps. metallosolvens*.

Außerdem wurde für *Ps. donghuensis* G2#25 ein CRISPR/Cas9-System etabliert, wodurch gezielte Veränderungen im Genom ermöglicht wurden. Durch diese gezielten Veränderungen sollte die Cyanidproduktion und somit die Biolaugungsaktivität gesteigert werden. Durch Analysen des Promotorbereichs wurde eine Bindestelle für den anaeroben Regulator ANR identifiziert. Es wurde jedoch nur eine entfernt ähnliche *lux*-Box, an welche die *quorum sensing* Regulatoren RhlR und LasR binden, identifiziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Transkription ähnlich wie bei *Ps. fluorescens* reguliert wird und nicht wie bei *Ps. aeruginosa*. Durch Transkriptomanalysen könnten mögliche weitere Regulatoren identifiziert werden.

Durch das CRISPR/Cas9-System wurden erstmals Promotorveränderungen direkt im Genom des Cyanidproduzenten vorgenommen, wodurch eine genauere Untersuchung des Einflusses von Regulatoren auf die Cyanidproduktion möglich war.

Durch den Austausch des nativen Promotorbereichs gegen P_{BAD} wurde die Cyanidproduktion und die Biolaugungsaktivität gesteigert. Hier gibt es noch Raum für weitere Steigerungen, da der Induktor Arabinose von *Ps. donghuensis* G2#25 auch verstoffwechselt wird. Induzierbare Promotoren, wie P_{Xut} und P_{Rha} , wären hier denkbar, zumal die Kosten der Induktoren geringer sind als beispielsweise von IPTG. Die Insertion von DNA-Stücken >1 200 bp durch das verwendete CRISPR/Cas9-System stellte sich als problematisch heraus. Durch die Verwendung eines 2-Plasmid-Systems mit Lambda-Red könnte die Fähigkeit zur homologen Rekombination gesteigert werden (Chen *et al.*, 2018b) und somit längere DNA-Insertionen vorgenommen werden.

Die Cyanidsynthese von *Ps. donghuensis* G2#25 wurde näher bezüglich möglicher Coenzym-Bindestellen charakterisiert. Durch verschiedene Aminosäureaustausche wurden potentielle FeS-Cluster Bindestellen in HcnA und B, sowie eine FAD-Bindestelle in HcnB identifiziert. Eine Verifizierung der Ergebnisse ist ausstehend. Hierfür ist ein gereinigtes Enzym notwendig. Zudem besitzt die Cyanidsynthese strukturelle Ähnlichkeiten zu Sarcosin-Oxidase, Opn-Dehydrogenasen und Prolin-Dehydrogenasen.

Die Genome von einigen Neuisolaten wurden sequenziert mit dem Ziel der näheren Charakterisierung und der Identifizierung von Cyanidsynthesegenclustern. Durch bioinformatische Analysen wurden putative Cyanidsynthesegencluster, die nicht dem klassischen *hcnABC*-Aufbau entsprachen, identifiziert. Eine Verifizierung der bioinformatischen Ergebnisse durch Experimente sollte durchgeführt werden. Erstaunlich war hierbei, dass in den meisten Cyanidproduzierenden Neuisolaten keine Cyanidsynthesegencluster identifiziert wurden. In Pseudomonaden wurde ein zweites putatives *hcnCAB*-Operon identifiziert, welches essentiell für die Cyanidproduktion in *Ps. donghuensis*

G2#25 war. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase, eine Verifizierung des bioinformatischen Ergebnisses steht noch aus.

Zum besseren Verständnis sollte die Cyanidsynthase hier gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Die heterologe Genexpression in *E. coli* mit anschließender Proteinreinigung war nicht erfolgreich. Aus diesem Grund eignete sich *E. coli* nicht als Modellorganismus. Bei der Proteinreinigung aus *Ps. donghuensis* G2#25 zeigte sich eine Verringerung der Cyanidproduktion bei der Markierung von HcnC mit einem Strep-tag. Ein Ansatzpunkt hier wäre es, andere Affinitätstags zu testen bzw. diese an HcnB C-terminal zu setzen, da sich bei

dieser Position Enzymaktivität zeigte. Möglicherweise beeinflusst der Affinitätstag an dieser Position nicht die Enzymaktivität. Auch die Proteinreinigung aus der Komplementierungsmutante sollte weiter fortgeführt werden. Eine Aktivität des Enzyms könnte hierbei möglicherweise durch die Verwendung anderer Zellaufschlussarten oder anderer Reduktionsmittel wieder hergestellt werden. Zusätzlich zu der Proteinreinigung aus dem Eigenisolat sollte zudem eine Expression der Gene in dem Modellorganismus *Ba. subtilis* durchgeführt werden. Dieses Bakterium ist gut erforscht und für Proteinproduktionen etabliert. Zudem können einige *Ba. subtilis* Stämme Cyanid sowohl produzieren als auch degradieren. Somit sollte eine Cyanid Resistenz gegeben sein.

9. Literaturverzeichnis

- Al-Badri, B. A. S.; Al-Maawali, S. S.; Al-Balushi, Z. M.; Al-Mahmooli, I. H.; Al-Sadi, A. M. & Velazhahan, R. (2020) "Cyanide degradation and antagonistic potential of endophytic *Bacillus subtilis* strain BEB1 from *Bougainvillea spectabilis* Willd." *All Life* **13**: 92-98; DOI: [10.1080/26895293.2020.1728393](https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1728393)
- Alcocer, J.; Escobar, E. G.; Lugo, A. & Oseguera, L. A. (1999) "Benthos of a perennially-astatic, saline, soda lake in Mexico." *Int J Salt Lake Res* **8**: 113-126; DOI: [10.1023/a:1009059028881](https://doi.org/10.1023/a:1009059028881)
- Amann, K. (2023) "Transposon-Mutagenese und Cyanidnachweis von *Pseudomonas donghuensis* G2#25". TU Darmstadt. Bericht Forschungspraktikum.
- Amberger, M. (2016a) "Amplifikation von Cyanidsynthasegenen aus Umweltproben und Expression in *Escherichia coli*". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik
- Amberger, M. (2016b) "Identifikation von cyanidproduzierenden Mikroorganismen aus Erdproben". TU Darmstadt. Bericht Forschungspraktikum.
- Aminian-Dehkordi, J.; Mousavi, S. M.; Marashi, S. A.; Jafari, A. & Mijakovic, I. (2020) "A systems-based approach for cyanide overproduction by *Bacillus megaterium* for gold bioleaching enhancement." *Front Bioeng Biotechnol* **8**: 528; DOI: [10.3389/fbioe.2020.00528](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00528)
- Anand, A.; Chinchilla, D.; Tan, C.; Mène-Saffrané, L.; L'Haridon, F. & Weisskopf, L. (2020) "Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans*." *Microorganisms* **8**; DOI: [10.3390/microorganisms8081144](https://doi.org/10.3390/microorganisms8081144)
- Andrussow, L. (1927) "Über die schnell verlaufenden katalytischen Prozesse in strömenden Gasen und die Ammoniak-Oxydation (V)." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **60**: 2005-2018; DOI: [10.1002/cber.19270600857](https://doi.org/10.1002/cber.19270600857)
- Andrussow, L. (1935) "Über die katalytische Oxydation von Ammoniak-Methan-Gemischen zu Blausäure." *Angewandte Chemie* **48**: 593-595; DOI: [10.1002/ange.19350483702](https://doi.org/10.1002/ange.19350483702)
- Askeland, R. A. & Morrison, S. M. (1983) "Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Environ Microbiol* **45**: 1802-1807; DOI: [10.1128/aem.45.6.1802-1807.1983](https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1802-1807.1983)
- Baneyx, F. (1999) "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411-421; DOI: [10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)
- Barrangou, R. (2013) "CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**: 267-278; DOI: [10.1002/wrna.1159](https://doi.org/10.1002/wrna.1159)
- Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D. A. & Horvath, P. (2007) "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." *Science* **315**: 1709-1712; DOI: [10.1126/science.1138140](https://doi.org/10.1126/science.1138140)
- Barreto, E. S.; Torres, A. R.; Barreto, M. R.; Vasconcelos, A. T.; Astolfi-Filho, S. & Hungria, M. (2008) "Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the brazilian amazon." *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 783-790; DOI: [10.1007/s10295-008-0331-z](https://doi.org/10.1007/s10295-008-0331-z)
- Baumeister, R. & Schievelbein, H. (1971) "Einfache Methode zur Bestimmung von kleinen Mengen Cyanid in Zigarettenrauch und biologischem Material." *Fresenius J Anal Chem* **255**: 362-363; DOI: [10.1007/bf00424393](https://doi.org/10.1007/bf00424393)
- Bhatt, F. H. & Jeffery, C. J. (2010) "Expression, detergent solubilization, and purification of a membrane transporter, the MexB multidrug resistance protein." *J Vis Exp*; DOI: [10.3791/2134](https://doi.org/10.3791/2134)
- Bhutani, N.; Maheshwari, R.; Sharma, N.; Kumar, P.; Dang, A. S. & Suneja, P. (2022) "Characterization of halo-tolerant plant growth promoting endophytic *Bacillus licheniformis* MHN 12." *J Genet Eng Biotechnol* **20**: 113; DOI: [10.1186/s43141-022-00407-3](https://doi.org/10.1186/s43141-022-00407-3)
- Bhuyan, A. K. (2010) "On the mechanism of SDS-induced protein denaturation." *Biopolymers* **93**: 186-199; DOI: [10.1002/bip.21318](https://doi.org/10.1002/bip.21318)
- Binnewies, M.; Finze, M.; Jäckel, M.; Schmidt, P.; Wilner, H. & Ryner-Canham, G. (2016) *Allgemeine und Anorganische Chemie*. (ed), Springer Spektrum: 508, 766.
- Blumer, C. & Haas, D. (2000a) "Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0." *Microbiology* **146**: 2417-2424; DOI: [10.1099/00221287-146-10-2417](https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2417)

- Blumer, C. & Haas, D. (2000b) "Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis." *Arch Microbiol* **173**: 170-177; DOI: [10.1007/s002039900127](https://doi.org/10.1007/s002039900127)
- Bolotin, A.; Quinquis, B.; Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. (2005) "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." *Microbiology* **151**: 2551-2561; DOI: [10.1099/mic.0.28048-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0)
- Bondarczuk, K. & Piotrowska-Seget, Z. (2013) "Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria." *Cell Biol Toxicol* **29**: 397-405; DOI: [10.1007/s10565-013-9262-1](https://doi.org/10.1007/s10565-013-9262-1)
- Booth, W. T.; Schlachter, C. R.; Pote, S.; Ussin, N.; Mank, N. J.; Klapper, V.; Offermann, L. R.; Tang, C.; Hurlburt, B. K. & Chruszcz, M. (2018) "Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability." *ACS Omega* **3**: 760-768; DOI: [10.1021/acsomega.7b01598](https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01598)
- Boros, E.; Horváth, Z.; Wolfram, G. & Vörös, L. (2014) "Salinity and ionic composition of the shallow astatic soda pans in the Carpathian Basin." *Ann Limnol - Int J Lim* **50**: 59-69; DOI: [10.1051/limn/2013068](https://doi.org/10.1051/limn/2013068)
- Boros, E.; Katalin, V.-B.; Vörös, L. & Horváth, Z. (2017) "Multiple extreme environmental conditions of intermittent soda pans in the Carpathian Basin (Central Europe)." *Limnologica* **62**: 38-46; DOI: [10.1016/j.limno.2016.10.003](https://doi.org/10.1016/j.limno.2016.10.003)
- Borsodi, A. K.; Márialigeti, K.; Szabó, G.; Palatinszky, M.; Pollák, B.; Kéki, Z.; Kovács, A. L.; Schumann, P. & Tóth, E. M. (2008) "*Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes." *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 845-851; DOI: [10.1099/ijs.0.65325-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.65325-0)
- Bradford, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254; DOI: [10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brencic, A.; McFarland, K. A.; McManus, H. R.; Castang, S.; Mogno, I.; Dove, S. L. & Lory, S. (2009) "The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs." *Mol Microbiol* **73**: 434-445; DOI: [10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06782.x)
- Brinker, A. M. & Seigler, D. S. (1989) "Methods for the detection and quantitative determination of cyanide in plant materials." *Phytochem. Bull* **21**: 24-31;
- Brown, N. L.; Rouch, D. A. & Lee, B. T. (1992) "Copper resistance determinants in bacteria." *Plasmid* **27**: 41-51; DOI: [10.1016/0147-619x\(92\)90005-u](https://doi.org/10.1016/0147-619x(92)90005-u)
- Bunch, A. W. & Knowles, C. J. (1982) "Production of the secondary metabolite cyanide by extracts of *Chromobacterium violaceum*." *J Gen Microbiol* **128**: 2675-2680; DOI: [10.1099/00221287-128-11-2675](https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2675)
- Burgio, M. (2020) "Neuisolierung alkaliphiler Cyanid-produzierender Bakterien". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Caicedo, J. C.; Villamizar, S. & Orlandoni, G. (2022) "The use of synthetic agonists of quorum sensing N-acyl homoserine lactone pathway improves the bioleaching ability in *Acidithiobacillus* and *Pseudomonas* bacteria." *PeerJ* **10**: e13801; DOI: [10.7717/peerj.13801](https://doi.org/10.7717/peerj.13801)
- Cain, J. A.; Solis, N. & Cordwell, S. J. (2014) "Beyond gene expression: the impact of protein post-translational modifications in bacteria." *J Proteomics* **97**: 265-286; DOI: [10.1016/j.jprot.2013.08.012](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.012)
- Calero, P.; Jensen, S. I. & Nielsen, A. T. (2016) "Broad-host-range proUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of p-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440." *ACS Synth Biol* **5**: 741-753; DOI: [10.1021/acssynbio.6b00081](https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00081)
- Callaghan, J. D.; Stella, N. A.; Lehner, K. M.; Treat, B. R.; Brothers, K. M.; St Leger, A. J. & Shanks, R. M. Q. (2020) "Xylose-inducible promoter tools for *Pseudomonas* species and their use in implicating a role for the type II secretion system protein XcpQ in the inhibition of corneal epithelial wound closure." *Appl Environ Microbiol* **86**; DOI: [10.1128/AEM.00250-20](https://doi.org/10.1128/AEM.00250-20)
- Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K. & Madden, T. L. (2009) "BLAST+: architecture and applications." *BMC Bioinformatics* **10**: 421; DOI: [10.1186/1471-2105-10-421](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421)
- Carepo, M. S.; Azevedo, J. S.; Porto, J. I.; Bentes-Sousa, A. R.; Batista Jda, S.; Silva, A. L. & Schneider, M. P. (2004) "Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification." *Genet Mol Res* **3**: 181-194;

- Castric, K. F. & Castric, P. A. (1983) "Method for rapid detection of cyanogenic bacteria." *Appl Environ Microbiol* **45**: 701-702; DOI: [10.1128/aem.45.2.701-702.1983](https://doi.org/10.1128/aem.45.2.701-702.1983)
- Castric, P. (1994) "Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase." *Curr Microbiol* **29**: 19-21; DOI: [10.1007/Bf01570186](https://doi.org/10.1007/Bf01570186)
- Castric, P. A. (1975) "Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*." *Can J Microbiol* **21**: 613-618; DOI: [10.1139/m75-088](https://doi.org/10.1139/m75-088)
- Castric, P. A. (1977) "Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis." *J Bacteriol* **130**: 826-831; DOI: [10.1128/jb.130.2.826-831.1977](https://doi.org/10.1128/jb.130.2.826-831.1977)
- Castric, P. A. (1981) The metabolism of hydrogen cyanide by bacteria. In *Cyanide in Biology*. B. Vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles & J. Westley (ed). London, Academic Press Inc. (London) LTD.: 233-261.
- Castric, P. A.; Castric, K. F. & Meganathan, R. (1981) Factors influencing the termination of cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Cyanide in Biology*. B. Vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles, J. Westley & F. Wissing (ed). London, Academic Press: 263-275.
- Castric, P. A.; Ebert, R. F. & Castric, K. F. (1979) "The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*." *Curr Microbiol* **2**: 287-292; Springer Nature, DOI: [10.1007/BF02602861](https://doi.org/10.1007/BF02602861)
- Chan, V.; Dreolini, L. F.; Flintoff, K. A.; Lloyd, S. J. & Mattenley, A. A. (2002) "The effect of increasing plasmid size on transformation efficiency in *Escherichia coli*." *JEMI* **2**: 207-223;
- Chen, M.; Wang, P. & Xie, Z. (2018a) "A complex mechanism involving LysR and TetR/AcrR that regulates iron scavenger biosynthesis in *Pseudomonas donghuensis* HYS." *J Bacteriol* **200**; DOI: [10.1128/JB.00087-18](https://doi.org/10.1128/JB.00087-18)
- Chen, W.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Pi, Y.; Gu, T.; Song, L.; Wang, Y. & Ji, Q. (2018b) "CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species." *iScience* **6**: 222-231; DOI: [10.1016/j.isci.2018.07.024](https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.024)
- Chen, Z. W.; Hassan-Abdulah, A.; Zhao, G.; Jorns, M. S. & Mathews, F. S. (2006) "Heterotetrameric sarcosine oxidase: structure of a diflavin metalloenzyme at 1.85 Å resolution." *J Mol Biol* **360**: 1000-1018; DOI: [10.1016/j.jmb.2006.05.067](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.067)
- Chiaruttini, C. & Guillier, M. (2020) "On the role of mRNA secondary structure in bacterial translation." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **11**: e1579; DOI: [10.1002/wrna.1579](https://doi.org/10.1002/wrna.1579)
- Comolli, J. C. & Donohue, T. J. (2002) "*Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase." *Mol Microbiol* **45**: 755-768; DOI: [10.1046/j.1365-2958.2002.03046.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03046.x)
- Cong, L.; Ran, F. A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P. D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L. A. & Zhang, F. (2013) "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." *Science* **339**: 819-823; DOI: [10.1126/science.1231143](https://doi.org/10.1126/science.1231143)
- Cook, T. B.; Rand, J. M.; Nurani, W.; Courtney, D. K.; Liu, S. A. & Pflieger, B. F. (2018) "Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*." *J Ind Microbiol Biotechnol* **45**: 517-527; DOI: [10.1007/s10295-017-2001-5](https://doi.org/10.1007/s10295-017-2001-5)
- Cunningham, L.; Pitt, M. & Williams, H. D. (1997) "The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases." *Mol Microbiol* **24**: 579-591; DOI: [10.1046/j.1365-2958.1997.3561728.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3561728.x)
- Danielczak, B.; Meister, A. & Keller, S. (2019) "Influence of Mg²⁺ and Ca²⁺ on nanodisc formation by diisobutylene/maleic acid (DIBMA) copolymer." *Chem Phys Lipids* **221**: 30-38; DOI: [10.1016/j.chemphyslip.2019.03.004](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.004)
- de Smit, M. H. & van Duin, J. (1990) "Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **38**: 1-35; DOI: [10.1016/s0079-6603\(08\)60707-2](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60707-2)
- Devi, K. K. & Kothamasi, D. (2009) "*Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome *c* oxidase of the termite respiratory chain." *FEMS Microbiol Lett* **300**: 195-200; DOI: [10.1111/j.1574-6968.2009.01782.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01782.x)
- Dong, L.; Wang, S.; Cao, H.; Zhao, B.; Zhang, X.; Wu, K. & Wang, H. (2020) "*Bacillus lacisalsi* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a saline-alkaline lake." *Antonie Van Leeuwenhoek* **113**: 127-136; DOI: [10.1007/s10482-019-01322-3](https://doi.org/10.1007/s10482-019-01322-3)

- Espinosa-Urgel, M. & Ramos, J. L. (2004) "Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440." *Appl Environ Microbiol* **70**: 5190-5198; DOI: [10.1128/AEM.70.9.5190-5198.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5190-5198.2004)
- Fadel, F.; Bassim, V.; Francis, V. I.; Porter, S. L.; Botzanowski, T.; Legrand, P.; Perez, M. M.; Bourne, Y.; Cianfèrani, S. & Vincent, F. (2022) "Insights into the atypical autokinase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* GacS histidine kinase and its interaction with RetS." *Structure* **30**: 1285-1297 e1285; DOI: [10.1016/j.str.2022.06.002](https://doi.org/10.1016/j.str.2022.06.002)
- Faraji, F.; Wang, J.; Mahandra, H. & Ghahreman, A. (2020) "A green and sustainable process for the recovery of gold from low-grade sources using biogenic cyanide generated by *Bacillus megaterium*: A comprehensive study." *ACS Sustain Chem Eng* **9**: 236-245; DOI: [10.1021/acssuschemeng.0c06904](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06904)
- Faramarzi, M. A.; Stagars, M.; Pensini, E.; Krebs, W. & Brandl, H. (2004) "Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*." *J Biotechnol* **113**: 321-326; DOI: [10.1016/j.jbiotec.2004.03.031](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.031)
- Fernández-Piñar, R.; Ramos, J. L.; Rodríguez-Herva, J. J. & Espinosa-Urgel, M. (2008) "A two-component regulatory system integrates redox state and population density sensing in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* **190**: 7666-7674; DOI: [10.1128/JB.00868-08](https://doi.org/10.1128/JB.00868-08)
- Fesko, K. (2016) "Threonine aldolases: perspectives in engineering and screening the enzymes with enhanced substrate and stereo specificities." *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 2579-2590; DOI: [10.1007/s00253-015-7218-5](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7218-5)
- Fester, N. (2016) "Zyanid-produzierende und degradierende Bakterien". Master Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Flury, P.; Aellen, N.; Ruffner, B.; Péchy-Tarr, M.; Fataar, S.; Metla, Z.; Dominguez-Ferreras, A.; Bloemberg, G.; Frey, J.; Goesmann, A.; Raaijmakers, J. M.; Duffy, B.; Höfte, M.; Blom, J.; Smits, T. H.; Keel, C. & Maurhofer, M. (2016) "Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics." *ISME J* **10**: 2527-2542; DOI: [10.1038/ismej.2016.5](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.5)
- Frasson, D.; Opoku, M.; Picozzi, T.; Torossi, T.; Balada, S.; Smits, T. H. M. & Hilber, U. (2017) "*Pseudomonas wadenswilerensis* sp. nov. and *Pseudomonas reidholzensis* sp. nov., two novel species within the *Pseudomonas putida* group isolated from forest soil." *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 2853-2861; DOI: [10.1099/ijsem.0.002035](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002035)
- Gabor, E.; Schulze, R. & Kletzin, A. (2018) "A new species of genus *Pseudomonas*" EP Patent WO 2019/057664 A1
- Gallagher, L. A. & Manoil, C. (2001) "*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning." *J Bacteriol* **183**: 6207-6214; DOI: [10.1128/JB.183.21.6207-6214.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6207-6214.2001)
- Gao, J.; Xie, G.; Peng, F. & Xie, Z. (2015) "*Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore." *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**: 83-94; DOI: [10.1007/s10482-014-0306-1](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0306-1)
- Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R. Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A., 3rd & Smith, H. O. (2009) "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." *Nat Methods* **6**: 343-345; DOI: [10.1038/nmeth.1318](https://doi.org/10.1038/nmeth.1318)
- Gilchrist, F. J.; Belcher, J.; Jones, A. M.; Smith, D.; Smyth, A. R.; Southern, K. W.; Španěl, P.; Webb, A. K. & Lenney, W. (2015) "Exhaled breath hydrogen cyanide as a marker of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis." *ERJ Open Res* **1**; DOI: [10.1183/23120541.00044-2015](https://doi.org/10.1183/23120541.00044-2015)
- Goris, J.; Konstantinidis, K. T.; Klappenbach, J. A.; Coenye, T.; Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007) "DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities." *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 81-91; DOI: [10.1099/ijms.0.64483-0](https://doi.org/10.1099/ijms.0.64483-0)
- Gorji, M.; Hosseini, M. R. & Ahmadi, A. (2020) "Comparison and optimization of the bio-cyanidation potentials of *B. megaterium* and *P. aeruginosa* for extracting gold from an oxidized copper-gold ore in the presence of residual glycine." *Hydrometallurgy* **191**; DOI: [10.1016/j.hydromet.2019.105218](https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105218)
- Grethen, A.; Oluwole, A. O.; Danielczak, B.; Vargas, C. & Keller, S. (2017) "Thermodynamics of nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid (2:1) copolymer." *Sci Rep* **7**: 11517; DOI: [10.1038/s41598-017-11616-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11616-z)

- Grissa, I.; Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007) "CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats." *Nucleic Acids Res* **35**: W52-57; DOI: [10.1093/nar/gkm360](https://doi.org/10.1093/nar/gkm360)
- Grover, M.; Nain, L. & Saxena, A. K. (2009) "Comparison between *Bacillus subtilis* RP24 and its antibiotic-defective mutants." *World J Microbiol Biotechnol* **25**: 1329-1335; DOI: [10.1007/s11274-009-0019-1](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0019-1)
- Gu, T.; Zhao, S.; Pi, Y.; Chen, W.; Chen, C.; Liu, Q.; Li, M.; Han, D. & Ji, Q. (2018) "Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase." *Chem Sci* **9**: 3248-3253; DOI: [10.1039/c8sc00637g](https://doi.org/10.1039/c8sc00637g)
- Hack, E. & Kemp, J. D. (1980) "Purification and characterization of the crown gall-specific enzyme, octopine synthase." *Plant Physiol* **65**: 949-955; DOI: [10.1104/pp.65.5.949](https://doi.org/10.1104/pp.65.5.949)
- He, C. & Ohnishi, K. (2017) "Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS." *Biochem Biophys Res Commun* **490**: 1250-1253; DOI: [10.1016/j.bbrc.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.003)
- Hemsley, A.; Arnheim, N.; Toney, M. D.; Cortopassi, G. & Galas, D. J. (1989) "A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction." *Nucleic Acids Res* **17**: 6545-6551; DOI: [10.1093/nar/17.16.6545](https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6545)
- Ho, J.; Zhao, M.; Wojcik, S.; Taiaroa, G.; Butler, M. & Poulter, R. (2020) "The application of the CRISPR-Cas9 system in *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae." *J Med Microbiol* **69**: 478-486; DOI: [10.1099/jmm.0.001124](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001124)
- Højberg, O.; Schnider, U.; Winteler, H. V.; Sørensen, J. & Haas, D. (1999) "Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil." *Appl Environ Microbiol* **65**: 4085-4093; DOI: [10.1128/AEM.65.9.4085-4093.1999](https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4085-4093.1999)
- Hosny, A. E. M.; Rasmy, S. A.; Aboul-Magd, D. S.; Kashef, M. T. & El-Bazza, Z. E. (2019) "The increasing threat of silver-resistance in clinical isolates from wounds and burns." *Infect Drug Resist* **12**: 1985-2001; DOI: [10.2147/IDR.S209881](https://doi.org/10.2147/IDR.S209881)
- Ingvorsen, K.; Højer-Pedersen, B. & Godtfredsen, S. E. (1991) "Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*." *Appl Environ Microbiol* **57**: 1783-1789; DOI: [10.1128/aem.57.6.1783-1789.1991](https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1783-1789.1991)
- Jackson, R. J.; Elvers, K. T.; Lee, L. J.; Gidley, M. D.; Wainwright, L. M.; Lightfoot, J.; Park, S. F. & Poole, R. K. (2007) "Oxygen reactivity of both respiratory oxidases in *Campylobacter jejuni*: the *cydAB* genes encode a cyanide-resistant, low-affinity oxidase that is not of the cytochrome *bd* type." *J Bacteriol* **189**: 1604-1615; DOI: [10.1128/JB.00897-06](https://doi.org/10.1128/JB.00897-06)
- Jain, C.; Rodriguez, R. L.; Phillippy, A. M.; Konstantinidis, K. T. & Aluru, S. (2018) "High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries." *Nat Commun* **9**: 5114; DOI: [10.1038/s41467-018-07641-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9)
- Jansen, R.; van Embden, J. D.; Gastra, W. & Schouls, L. M. (2002) "Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes." *OMICS* **6**: 23-33; DOI: [10.1089/15362310252780816](https://doi.org/10.1089/15362310252780816)
- Janssen, K. H.; Diaz, M. R.; Golden, M.; Graham, J. W.; Sanders, W.; Wolfgang, M. C. & Yahr, T. L. (2018) "Functional analyses of the RsmY and RsmZ small noncoding regulatory RNAs in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **200**: e00736-00717; DOI: [10.1128/JB.00736-17](https://doi.org/10.1128/JB.00736-17)
- Janssen, S.; Trincão, J.; Teixeira, M.; Schäfer, G. & Anemuller, S. (2001) "Ferredoxins from the archaeon *Acidianus ambivalens*: overexpression and characterization of the non-zinc-containing ferredoxin FdB." *Biol Chem* **382**: 1501-1507; DOI: [10.1515/BC.2001.184](https://doi.org/10.1515/BC.2001.184)
- Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012) "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." *Science* **337**: 816-821; DOI: [10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829)
- Johnson, J. S.; Spakowicz, D. J.; Hong, B. Y.; Petersen, L. M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S. R.; Hanson, B. M.; Agresta, H. O.; Gerstein, M.; Sodergren, E. & Weinstock, G. M. (2019) "Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis." *Nat Commun* **10**: 5029; DOI: [10.1038/s41467-019-13036-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1)
- Jones, D. A. (1998) "Why are so many food plants cyanogenic?" *Phytochemistry* **47**: 155-162; DOI: [10.1016/s0031-9422\(97\)00425-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00425-1)
- Kalam, S.; Basu, A. & Podile, A. R. (2020) "Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere." *Heliyon* **6**: e04734; DOI: [10.1016/j.heliyon.2020.e04734](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04734)

- Keilin, D. (1929) "Cytochrome and respiratory enzymes." *Proc R Soc Lond B* **104**: 206-252; DOI: [10.1098/rspb.1929.0009](https://doi.org/10.1098/rspb.1929.0009)
- Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N. & Sternberg, M. J. (2015) "The Phyre² web portal for protein modeling, prediction and analysis." *Nat Protoc* **10**: 845-858; DOI: [10.1038/nprot.2015.053](https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053)
- Kemp, J. D.; Sutton, D. W. & Hack, E. (1979) "Purification and characterization of the crown gall specific enzyme nopaline synthase." *Biochemistry* **18**: 3755-3760; DOI: [10.1021/bi00584a017](https://doi.org/10.1021/bi00584a017)
- Keshavarz-Tohid, V.; Vacheron, J.; Dubost, A.; Prigent-Combaret, C.; Taheri, P.; Tarighi, S.; Taghavi, S. M.; Moëne-Loccoz, Y. & Muller, D. (2019) "Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas allopuntida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov." *Syst Appl Microbiol* **42**: 468-480; DOI: [10.1016/j.syapm.2019.04.004](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.004)
- Kim, E. (2022) "Homologe und heterologe Expression der *Pseudomonas donghuensis* Gene für Cyanidsynthasen". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Kim, M.; Oh, H. S.; Park, S. C. & Chun, J. (2014) "Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes." *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 346-351; DOI: [10.1099/ijs.0.059774-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0)
- Klein, S.; Lorenzo, C.; Hoffmann, S.; Walther, J. M.; Storbeck, S.; Piekarski, T.; Tindall, B. J.; Wray, V.; Nimtz, M. & Moser, J. (2009) "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol." *Mol Microbiol* **71**: 551-565; DOI: [10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x)
- Kleppmann, W. (2016) Versuchsplanung Produkte und Prozesse optimieren. 9., *Praxisreihe Qualitätswissen*, K. Matyas, Carl Hanser Verlag München Wien, München.
- Kotov, V.; Bartels, K.; Veith, K.; Josts, I.; Subhramanyam, U. K. T.; Günther, C.; Labahn, J.; Marlovits, T. C.; Moraes, I.; Tidow, H.; Löw, C. & Garcia-Alai, M. M. (2019) "High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins." *Sci Rep* **9**: 10379; DOI: [10.1038/s41598-019-46686-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-46686-8)
- Kovach, M. E.; Elzer, P. H.; Hill, D. S.; Robertson, G. T.; Farris, M. A.; Roop 2nd, R. M. & Peterson, K. M. (1995) "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." *Gene* **166**: 175-176; DOI: [10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Kovach, M. E.; Phillips, R. W.; Elzer, P. H.; Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994) "pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector." *Biotechniques* **16**: 800-802;
- Krachler, R.; Korner, I.; Dvorak, M.; N., M.; Rabitsch, W.; Werba, F.; Zulka, P. & Kirschner, A. (2012) Die Salzlacken des Seewinkels: Erhebung des aktuellen ökologischen Zustandes sowie Entwicklung individueller Lackenerhaltungskonzepte für die Salzlacken des Seewinkels (2008-2011). Österreichischer Naturschutzbund, Eisenstadt, Österreich.
- La Brooy, S. R.; Linge, H. G. & Walker, G. S. (1994) "Review of gold extraction from ores." *Minerals Engineering* **7**: 1213-1241; DOI: [10.1016/0892-6875\(94\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0892-6875(94)90114-7)
- Lambden, P. R. & Guest, J. R. (1976) "Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor." *J Gen Microbiol* **97**: 145-160; DOI: [10.1099/00221287-97-2-145](https://doi.org/10.1099/00221287-97-2-145)
- Latifi, A.; Winson, M. K.; Foglino, M.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S.; Lazdunski, A. & Williams, P. (1995) "Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *Mol Microbiol* **17**: 333-343; DOI: [10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17020333.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17020333.x)
- Laville, J.; Blumer, C.; Von Schroetter, C.; Gaia, V.; Défago, G.; Keel, C. & Haas, D. (1998) "Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0." *J Bacteriol* **180**: 3187-3196; DOI: [10.1128/JB.180.12.3187-3196.1998](https://doi.org/10.1128/JB.180.12.3187-3196.1998)
- Laville, J.; Voisard, C.; Keel, C.; Maurhofer, M.; Défago, G. & Haas, D. (1992) "Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1562-1566; DOI: [10.1073/pnas.89.5.1562](https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1562)

- Lazazzera, B. A.; Beinert, H.; Khoroshilova, N.; Kennedy, M. C. & Kiley, P. J. (1996) "DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen." *J Biol Chem* **271**: 2762-2768; DOI: [10.1074/jbc.271.5.2762](https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2762)
- Lin, Y.; Lin, H.; Liu, Z.; Wang, K. & Yan, Y. (2014) "Improvement of a sample preparation method assisted by sodium deoxycholate for mass-spectrometry-based shotgun membrane proteomics." *J Sep Sci* **37**: 3321-3329; DOI: [10.1002/jssc.201400569](https://doi.org/10.1002/jssc.201400569)
- Link, T. A. (1999) "The structures of rieske and rieske-type proteins." *Adv Inorg Chem* **47**: 83-157; DOI: [10.1016/S0898-8838\(08\)60077-X](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60077-X)
- Liu, Y. P.; Wang, Y. X.; Li, Y. X.; Feng, F. Y.; Liu, H. R. & Wang, J. (2012) "*Mongoliticoccus roseus* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake." *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 2206-2212; DOI: [10.1099/ijs.0.035766-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.035766-0)
- Liu, Z. W.; Guo, X. Y.; Tian, Q. H. & Zhang, L. (2022) "A systematic review of gold extraction: Fundamentals, advancements, and challenges toward alternative lixivants." *J Hazard Mater* **440**: 129778; DOI: [10.1016/j.jhazmat.2022.129778](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129778)
- Lo, Y.-M.; Yang, S.-T. & Min, D. B. (1997) "Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*." *Appl Microbiol Biotechnol* **47**: 689-694; DOI: [10.1007/s002530050996](https://doi.org/10.1007/s002530050996)
- Lorck, H. (1948) "Production of hydrocyanic acid by bacteria." *Physiol Plant* **1**: 142-146; DOI: [10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1948.tb07118.x)
- Lu, H.; Giordano, F. & Ning, Z. (2016) "Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly." *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**: 265-279; DOI: [10.1016/j.gpb.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004)
- Mahdi, I.; Fahsi, N.; Hafidi, M.; Allaoui, A. & Biskri, L. (2020) "Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* Willd." *Microorganisms* **8**; DOI: [10.3390/microorganisms8060948](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060948)
- Mahendran, R.; Bs, S.; Thandeeswaran, M.; kG, K.; Vijayarathy, M.; Angayarkanni, J. & Muthusamy, G. (2020) "Microbial (enzymatic) degradation of cyanide to produce pterins as cofactors." *Curr Microbiol* **77**: 578-587; DOI: [10.1007/s00284-019-01694-9](https://doi.org/10.1007/s00284-019-01694-9)
- Marques, H. M.; Brown, K. L. & Jacobsen, D. W. (1988) "Kinetics and activation parameters of the reaction of cyanide with free aquocobalamin and aquocobalamin bound to a haptocorrin from chicken serum." *J Biol Chem* **263**: 12378-12383; DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)37766-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37766-4)
- Martínez-Limón, A.; Alriquet, M.; Lang, W. H.; Calloni, G.; Wittig, I. & Vabulas, R. M. (2016) "Recognition of enzymes lacking bound cofactor by protein quality control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 12156-12161; DOI: [10.1073/pnas.1611994113](https://doi.org/10.1073/pnas.1611994113)
- Matsushita, K.; Yamada, M.; Shinagawa, E.; Adachi, O. & Ameyama, M. (1983) "Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. A KCN-insensitive alternate oxidase chain and its energetics." *J Biochem* **93**: 1137-1144; DOI: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134239](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134239)
- McFarlane, J. S.; Davis, C. L. & Lamb, A. L. (2018) "Staphylopine, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase." *J Biol Chem* **293**: 8009-8019; DOI: [10.1074/jbc.RA118.002007](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002007)
- McFarlane, J. S.; Zhang, J.; Wang, S.; Lei, X.; Moran, G. R. & Lamb, A. L. (2019) "Staphylopine and pseudopaline dehydrogenase from bacterial pathogens catalyze reversible reactions and produce stereospecific metallophores." *J Biol Chem* **294**: 17988-18001; DOI: [10.1074/jbc.RA119.011059](https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011059)
- Meyers, A.; Furtmann, C.; Gesing, K.; Tozakidis, I. E. P. & Jose, J. (2019) "Cell density-dependent auto-inducible promoters for expression of recombinant proteins in *Pseudomonas putida*." *Microb Biotechnol* **12**: 1003-1013; DOI: [10.1111/1751-7915.13455](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13455)
- Meyers, P. R.; Rawlings, D. E.; Woods, D. R. & Lindsey, G. G. (1993) "Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1." *J Bacteriol* **175**: 6105-6112; DOI: [10.1128/jb.175.19.6105-6112.1993](https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6105-6112.1993)
- Michaels, R.; Hankes, L. V. & Corpe, W. A. (1965) "Cyanide formation from glycine by nonproliferating cells of *Chromobacterium violaceum*." *Arch Biochem Biophys* **111**: 121-125; DOI: [10.1016/0003-9861\(65\)90329-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90329-2)

- Mion, S.; Carriot, N.; Lopez, J.; Plener, L.; Ortalo-Magné, A.; Chabrière, E.; Culioli, G. & Daudé, D. (2021) "Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*." *NPJ Biofilms Microbiomes* 7: 40; DOI: [10.1038/s41522-021-00211-w](https://doi.org/10.1038/s41522-021-00211-w)
- Mistry, J.; Chuguransky, S.; Williams, L.; Qureshi, M.; Salazar, G. A.; Sonnhammer, E. L. L.; Tosatto, S. C. E.; Paladin, L.; Raj, S.; Richardson, L. J.; Finn, R. D. & Bateman, A. (2021) "Pfam: The protein families database in 2021." *Nucleic Acids Res* 49: D412-D419; DOI: [10.1093/nar/gkaa913](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913)
- Mogi, T.; Ano, Y.; Nakatsuka, T.; Toyama, H.; Muroi, A.; Miyoshi, H.; Migita, C. T.; Ui, H.; Shiomi, K.; Omura, S.; Kita, K. & Matsushita, K. (2009) "Biochemical and spectroscopic properties of cyanide-insensitive quinol oxidase from *Gluconobacter oxydans*." *J Biochem* 146: 263-271; DOI: [10.1093/jb/mvp067](https://doi.org/10.1093/jb/mvp067)
- Mohanty, A. K. & Wiener, M. C. (2004) "Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position." *Protein Expr Purif* 33: 311-325; DOI: [10.1016/j.pep.2003.10.010](https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.010)
- Mojica, F. J.; Diéz-Villaseñor, C.; García-Martínez, J. & Soria, E. (2005) "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements." *J Mol Evol* 60: 174-182; DOI: [10.1007/s00239-004-0046-3](https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3)
- Moore, E. R. B.; Tindall, B. J.; Martins Dos Santos, V. A. P.; Pieper, D. H.; Ramos, J. & Palleroni, N. J. (2006) Nonmedical: *Pseudomonas*. In *The Prokaryotes*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (ed). New York, Springer. 6.
- Moriguchi, T.; Ida, K.; Hikima, T.; Ueno, G.; Yamamoto, M. & Suzuki, H. (2010) "Channeling and conformational changes in the heterotetrameric sarcosine oxidase from *Corynebacterium sp.* U-96." *J Biochem* 148: 491-505; DOI: [10.1093/jb/mvq083](https://doi.org/10.1093/jb/mvq083)
- Nair, C.; Shoemark, A.; Chan, M.; Ollosson, S.; Dixon, M.; Hogg, C.; Alton, E. W.; Davies, J. C. & Williams, H. D. (2014) "Cyanide levels found in infected cystic fibrosis sputum inhibit airway ciliary function." *Eur Respir J* 44: 1253-1261; DOI: [10.1183/09031936.00097014](https://doi.org/10.1183/09031936.00097014)
- Nandi, M.; Selin, C.; Brassinga, A. K.; Belmonte, M. F.; Fernando, W. G.; Loewen, P. C. & de Kievit, T. R. (2015) "Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematicidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*." *PLoS One* 10: e0123184; DOI: [10.1371/journal.pone.0123184](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123184)
- Natarajan, G. & Ting, Y. P. (2014) "Pretreatment of e-waste and mutation of alkali-tolerant cyanogenic bacteria promote gold biorecovery." *Bioresour Technol* 152: 80-85; DOI: [10.1016/j.biortech.2013.10.108](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.108)
- Natarajan, G. & Ting, Y. P. (2015) "Gold biorecovery from e-waste: An improved strategy through spent medium leaching with pH modification." *Chemosphere* 136: 232-238; DOI: [10.1016/j.chemosphere.2015.05.046](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.046)
- Nazly, N.; Collins, P. A. & Knowles, C. J. (1981) Cyanide production by harvested *Chromobacterium violaceum*. In *Cyanide in Biology*. B. Vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles, J. Westley & F. Wissing (ed). London, Academic Press: 289-299.
- Nelson, L. (2006) "Acute cyanide toxicity: mechanisms and manifestations." *J Emerg Nurs* 32: S8-11; DOI: [10.1016/j.jen.2006.05.012](https://doi.org/10.1016/j.jen.2006.05.012)
- Neradt, A. (2022) "Isolierung von RNA aus cyanidbildenden Bakterien". TU Darmstadt. Bericht Forschungspraktikum.
- Nielsen, P.; Fritze, D. & Priest, F. G. (1995) "Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species." *Microbiology* 141: 1745-1761; DOI: [10.1099/13500872-141-7-1745](https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1745)
- Nwokoro, O. & Dibua, M. E. U. (2014) "Degradation of soil cyanide by single and mixed cultures of *Pseudomonas stutzeri* and *Bacillus subtilis*." *Arh Hig Rada Toksikol* 65: 113-119; DOI: [10.2478/10004-1254-65-2014-2449](https://doi.org/10.2478/10004-1254-65-2014-2449)
- O'Connor, M.; Peifer, M. & Bender, W. (1989) "Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*." *Science* 244: 1307-1312; DOI: [10.1126/science.2660262](https://doi.org/10.1126/science.2660262)
- Oluwole, A. O.; Danielczak, B.; Meister, A.; Babalola, J. O.; Vargas, C. & Keller, S. (2017) "Solubilization of membrane proteins into functional lipid-bilayer nanodiscs using a diisobutylene/maleic acid copolymer." *Angew Chem Int Ed Engl* 56: 1919-1924; DOI: [10.1002/anie.201610778](https://doi.org/10.1002/anie.201610778)

- Omotajo, D.; Tate, T.; Cho, H. & Choudhary, M. (2015) "Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes." *BMC Genomics* **16**: 604; DOI: [10.1186/s12864-015-1808-6](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1808-6)
- Oraby, E. A.; Eksteen, J. J. & Tanda, B. C. (2017) "Gold and copper leaching from gold-copper ores and concentrates using a synergistic lixiviant mixture of glycine and cyanide." *Hydrometallurgy* **169**: 339-345; DOI: [10.1016/j.hydromet.2017.02.019](https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2017.02.019)
- Pacheco-Moreno, A.; Stefanato, F. L.; Ford, J. J.; Trippel, C.; Uszkoreit, S.; Ferrafiat, L.; Grenga, L.; Dickens, R.; Kelly, N.; Kingdon, A. D.; Ambrosetti, L.; Nepogodiev, S. A.; Findlay, K. C.; Cheema, J.; Trick, M.; Chandra, G.; Tomalin, G.; Malone, J. G. & Truman, A. W. (2021) "Pan-genome analysis identifies intersecting roles for *Pseudomonas* specialized metabolites in potato pathogen inhibition." *Elife* **10**; DOI: [10.7554/eLife.71900](https://doi.org/10.7554/eLife.71900)
- Palmer, I. & Wingfield, P. T. (2004) "Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 6**: 6.3.1-6.3.18; DOI: [10.1002/0471140864.ps0603s38](https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s38)
- Parkins, M. D.; Ceri, H. & Storey, D. G. (2001) "*Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation." *Mol Microbiol* **40**: 1215-1226; DOI: [10.1046/j.1365-2958.2001.02469.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02469.x)
- Patty, F. A. (1921) "The production of hydrocyanic acid by *Bacillus pyocyaneus*." *The Journal of Infectious Diseases* **29**: 73-77; DOI: [10.1093/infdis/29.2.73](https://doi.org/10.1093/infdis/29.2.73)
- Peric, N. (2020) "Mutagenese Studien an dem *hcnABC* Gencluster der HCN-Synthase". TU Darmstadt. Bericht Forschungspraktikum.
- Peric, N. (2021) "Heterologe Expression von *hcn*-Operons und deren Mutagenese". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik
- Pessi, G. & Haas, D. (2000) "Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **182**: 6940-6949; DOI: [10.1128/JB.182.24.6940-6949.2000](https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6940-6949.2000)
- Pessi, G. & Haas, D. (2001) "Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *FEMS Microbiol Lett* **200**: 73-78; DOI: [10.1111/j.1574-6968.2001.tb10695.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10695.x)
- Pitzschke, A. & Hirt, H. (2010) "New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation." *EMBO J* **29**: 1021-1032; DOI: [10.1038/emboj.2010.8](https://doi.org/10.1038/emboj.2010.8)
- Polati, R.; Zapparoli, G.; Giudici, P. & Bossi, A. (2009) "A CTAB based method for the preparation of total protein extract of wine spoilage microorganisms for proteomic analysis." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**: 887-891; DOI: [10.1016/j.jchromb.2009.02.022](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.022)
- Popova, E. (2017) "Isolierung und Charakterisierung von Cyanid-produzierenden Bakterien". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik
- Prouty, W. F. & Goldberg, A. L. (1972) "Fate of abnormal proteins in *E. coli* accumulation in intracellular granules before catabolism." *Nat New Biol* **240**: 147-150; DOI: [10.1038/newbio240147a0](https://doi.org/10.1038/newbio240147a0)
- Prouty, W. F.; Karnovsky, M. J. & Goldberg, A. L. (1975) "Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs." *J Biol Chem* **250**: 1112-1122; DOI: [10.1016/s0021-9258\(19\)41897-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41897-8)
- Pudek, M. R. & Bragg, P. D. (1974) "Inhibition by cyanide of the respiratory chain oxidases of *Escherichia coli*." *Arch Biochem Biophys* **164**: 682-693; DOI: [10.1016/0003-9861\(74\)90081-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90081-2)
- Quan, J. & Tian, J. (2009) "Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways." *PLoS One* **4**: e6441; DOI: [10.1371/journal.pone.0006441](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441)
- Rajwar, A. & Sahgal, M. (2016) "Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, *Pseudomonas*-specific and *rpoD* genes." *3 Biotech* **6**: 80; DOI: [10.1007/s13205-016-0386-x](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0386-x)
- Ramette, A.; Frapolli, M.; Défago, G. & Moëgne-Loccoz, Y. (2003) "Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability." *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 525-535; DOI: [10.1094/MPMI.2003.16.6.525](https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.6.525)

- Rath, D.; Amlinger, L.; Rath, A. & Lundgren, M. (2015) "The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications." *Biochimie* **117**: 119-128; DOI: [10.1016/j.biochi.2015.03.025](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025)
- Redman, A. & Santore, R. (2012) "Bioavailability of cyanide and metal-cyanide mixtures to aquatic life." *Environ Toxicol Chem* **31**: 1774-1780; DOI: [10.1002/etc.1906](https://doi.org/10.1002/etc.1906)
- Reimann, C.; Beyeler, M.; Latifi, A.; Winteler, H.; Foglino, M.; Lazdunski, A. & Haas, D. (1997) "The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase." *Mol Microbiol* **24**: 309-319; DOI: [10.1046/j.1365-2958.1997.3291701.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3291701.x)
- Rivic, D. (2020) "Cyanidsynthesen aus alkalitoleranten Bakterien". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik
- Rostain, W.; Grebert, T.; Vyhovskyi, D.; Pizarro, P. T.; Tshinsele-Van Bellingen, G.; Cui, L. & Bikard, D. (2023) "Cas9 off-target binding to the promoter of bacterial genes leads to silencing and toxicity." *Nucleic Acids Research* **51**: 3485-3496; DOI: [10.1093/nar/gkad170](https://doi.org/10.1093/nar/gkad170)
- Rudolf von Rohr, M.; Furrer, G. & Brandl, H. (2009) "Effect of iron and phosphate on bacterial cyanide formation determined by methemoglobin in two-dimensional gradient microcultivations." *J Microbiol Methods* **79**: 71-75; DOI: [10.1016/j.mimet.2009.08.008](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.008)
- Ryall, B.; Davies, J. C.; Wilson, R.; Shoemark, A. & Williams, H. D. (2008) "*Pseudomonas aeruginosa*, cyanide accumulation and lung function in CF and non-CF bronchiectasis patients." *Eur Respir J* **32**: 740-747; DOI: [10.1183/09031936.00159607](https://doi.org/10.1183/09031936.00159607)
- Santo, C. E.; Morais, P. V. & Grass, G. (2010) "Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces." *Appl Environ Microbiol* **76**: 1341-1348; DOI: [10.1128/AEM.01952-09](https://doi.org/10.1128/AEM.01952-09)
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* **166**: 368-379; DOI: [10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schatz, M. C.; Delcher, A. L. & Salzberg, S. L. (2010) "Assembly of large genomes using second-generation sequencing." *Genome Res* **20**: 1165-1173; DOI: [10.1101/gr.101360.109](https://doi.org/10.1101/gr.101360.109)
- Schirch, L. V. & Gross, T. (1968) "Serine transhydroxymethylase." *J Biol Chem* **243**: 5651-5655; DOI: [10.1016/s0021-9258\(18\)91916-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)91916-2)
- Schneider, F. (2021a) "Amplifikation der Cyanidsynthasegene verschiedener Pseudomonaden und Expression in *E. coli*". TU Darmstadt. Bericht Forschungspraktikum.
- Schneider, F. (2021b) "Expression von Glycinderhydrogenaseoperons verschiedener Bakterienspezies in *Escherichia coli* für Aktivitätsmessungen". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Schröder-Tittmann, K.; Bosse-Doenecke, E.; Reedtz-Runge, S.; Ihling, C.; Sinz, A.; Tittmann, K. & Rudolph, R. (2010) "Recombinant expression, *in vitro* refolding, and biophysical characterization of the human glucagon-like peptide-1 receptor." *Biochemistry* **49**: 7956-7965; DOI: [10.1021/bi101159s](https://doi.org/10.1021/bi101159s)
- Schrödinger, LLC (2015) "The PyMOL molecular graphics system, version 2.0".
- Shadel, G. S.; Young, R. & Baldwin, T. O. (1990) "Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: Identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744." *J Bacteriol* **172**: 3980-3987; DOI: [10.1128/jb.172.7.3980-3987.1990](https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3980-3987.1990)
- Shin, D.; Jeong, J.; Lee, S.; Pandey, B. D. & Lee, J.-c. (2013) "Evaluation of bioleaching factors on gold recovery from ore by cyanide-producing bacteria." *Miner Eng* **48**: 20-24; DOI: [10.1016/j.mineng.2013.03.019](https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.03.019)
- Singh, S. M. & Panda, A. K. (2005) "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." *J Biosci Bioeng* **99**: 303-310; DOI: [10.1263/jbb.99.303](https://doi.org/10.1263/jbb.99.303)
- Skerra, A. (1994) "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*." *Gene* **151**: 131-135; DOI: [10.1016/0378-1119\(94\)90643-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90643-2)
- Slock, J.; VanRiet, D.; Kolibachuk, D. & Greenberg, E. P. (1990) "Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis." *J Bacteriol* **172**: 3974-3979; DOI: [10.1128/jb.172.7.3974-3979.1990](https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3974-3979.1990)
- Sluka, J. (2018) "Isolierung von alkaliphilen cyanogenen Bakterien aus Umweltproben". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik

- Södler, L. (2019) "Mutagenesestudien an heterolog exprimierten Glycinderhydrogenasegenen". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Son, M. S.; Matthews, W. J., Jr.; Kang, Y.; Nguyen, D. T. & Hoang, T. T. (2007) "In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients." *Infect Immun* **75**: 5313-5324; DOI: [10.1128/IAI.01807-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01807-06)
- Song, H.; Li, Y. & Wang, Y. (2023) "Two-component system GacS/GacA, a global response regulator of bacterial physiological behaviors." *Eng Microbiol* **3**; DOI: [10.1016/j.engmic.2022.100051](https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100051)
- Sorokin, D. Y.; Detkova, E. N. & Muyzer, G. (2011a) "Sulfur-dependent respiration under extremely haloalkaline conditions in soda lake 'acetogens' and the description of *Natroniella sulfidigena* sp. nov." *FEMS Microbiol Lett* **319**: 88-95; DOI: [10.1111/j.1574-6968.2011.02272.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02272.x)
- Sorokin, D. Y.; Muntyan, M. S.; Panteleeva, A. N. & Muyzer, G. (2012) "*Thioalkalivibrio sulfidiphilus* sp. nov., a haloalkaliphilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from alkaline habitats." *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1884-1889; DOI: [10.1099/ijs.0.034504-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.034504-0)
- Sorokin, D. Y.; Tourova, T. P.; Kolganova, T. V.; Detkova, E. N.; Galinski, E. A. & Muyzer, G. (2011b) "Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov." *Extremophiles* **15**: 391-401; DOI: [10.1007/s00792-011-0370-7](https://doi.org/10.1007/s00792-011-0370-7)
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994) "Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology." *Int J Syst Evol Microbiol* **44**: 846-849; DOI: [10.1099/00207713-44-4-846](https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846)
- Stemmer, M.; Thumberger, T.; Del Sol Keyer, M.; Wittbrodt, J. & Mateo, J. L. (2015) "CCTop: An intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool." *PLoS One* **10**: e0124633; DOI: [10.1371/journal.pone.0124633](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124633)
- Strano, C. P.; Bella, P.; Licciardello, G.; Caruso, A. & Catara, V. (2017) "Role of secondary metabolites in the biocontrol activity of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*." *Eur J Plant Pathol* **149**: 103-115; DOI: [10.1007/s10658-017-1169-x](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1169-x)
- Stresser, D. M.; Turner, S. D.; McNamara, J.; Stocker, P.; Miller, V. P.; Crespi, C. L. & Patten, C. J. (2000) "A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19)." *Anal Biochem* **284**: 427-430; DOI: [10.1006/abio.2000.4729](https://doi.org/10.1006/abio.2000.4729)
- Subhash, Y.; Tushar, L.; Sasikala, C. & Ramana, C. V. (2013) "*Mongoliicoccus alkaliphilus* sp. nov. and *Litoribacter alkaliphilus* sp. nov., isolated from salt pans." *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 3457-3462; DOI: [10.1099/ijs.0.049924-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.049924-0)
- Sultanpuram, V. R. & Mothe, T. (2016) "*Salipaludibacillus aurantiacus* gen. nov., sp. nov. a novel alkali tolerant bacterium, reclassification of *Bacillus agaradhaerens* as *Salipaludibacillus agaradhaerens* comb. nov. and *Bacillus neizhouensis* as *Salipaludibacillus neizhouensis* comb. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 2747-2753; DOI: [10.1099/ijsem.0.001117](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001117)
- Svercel, M.; Duffy, B. & Défago, G. (2007) "PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp." *J Microbiol Methods* **70**: 209-213; DOI: [10.1016/j.mimet.2007.03.018](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.018)
- Tamura, K.; Stecher, G. & Kumar, S. (2021) "MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11." *Mol Biol Evol* **38**: 3022-3027; DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)
- Tay, S. B.; Natarajan, G.; Rahim, M. N.; Tan, H. T.; Chung, M. C.; Ting, Y. P. & Yew, W. S. (2013) "Enhancing gold recovery from electronic waste via lixiviant metabolic engineering in *Chromobacterium violaceum*." *Sci Rep* **3**: 2236; DOI: [10.1038/srep02236](https://doi.org/10.1038/srep02236)
- Telek, A.; Molnár, Z.; Vértessy, B. G. & Tasnádi, G. (2023) "Opine dehydrogenases, an underexplored enzyme family for the enzymatic synthesis of chiral amines." *Biotechnol Bioeng* **10**: 2793-2808; DOI: [10.1002/bit.28469](https://doi.org/10.1002/bit.28469)
- Thakur, P. & Kumar, S. (2021) "Pretreatment of low-grade shredded dust e-waste to enhance silver recovery through biocyanidation by *Pseudomonas balearica* SAE1." *3 Biotech* **11**: 454; DOI: [10.1007/s13205-021-02977-4](https://doi.org/10.1007/s13205-021-02977-4)
- Thakur, P. & Kumar, S. (2023) "Augmentation in bioleaching potential of indigenous *Bacillus* sp. ISO1 for metals recovery from waste computer-printed circuit boards." *Int Microbiol*; DOI: [10.1007/s10123-023-00434-1](https://doi.org/10.1007/s10123-023-00434-1)

- TRBA (2020). TRBA 466 "Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen" 5. 9 A. f. B. *Arbeitsstoffe* Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
- Tsai, C. S. & Winans, S. C. (2010) "LuxR-type quorum-sensing regulators that are detached from common scents." *Mol Microbiol* **77**: 1072-1082; DOI: [10.1111/j.1365-2958.2010.07279.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07279.x)
- Tsuge, H.; Kawakami, R.; Sakuraba, H.; Ago, H.; Miyano, M.; Aki, K.; Katunuma, N. & Ohshima, T. (2005) "Crystal structure of a novel FAD-, FMN-, and ATP-containing L-proline dehydrogenase complex from *Pyrococcus horikoshii*." *J Biol Chem* **280**: 31045-31049; DOI: [10.1074/jbc.C500234200](https://doi.org/10.1074/jbc.C500234200)
- Ugidos, A.; Morales, G.; Rial, E.; Williams, H. D. & Rojo, F. (2008) "The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator." *Environ Microbiol* **10**: 1690-1702; DOI: [10.1111/j.1462-2920.2008.01586.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01586.x)
- Uden, G. & Trageser, M. (1991) "Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein." *Antonie Van Leeuwenhoek* **59**: 65-76; DOI: [10.1007/BF00445650](https://doi.org/10.1007/BF00445650)
- Valer, L.; Rossetto, D.; Scintilla, S.; Hu, Y. J.; Tomar, A.; Nader, S.; Betinol, I. O. & Mansy, S. S. (2022) "Methods to identify and characterize iron-sulfur oligopeptides in water." *Can J Chem* **100**: 475-483; DOI: [10.1139/cjc-2021-0237](https://doi.org/10.1139/cjc-2021-0237)
- Valverde, C.; Heeb, S.; Keel, C. & Haas, D. (2003) "RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0." *Mol Microbiol* **50**: 1361-1379; DOI: [10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x)
- Veith, A.; Klingl, A.; Zolghadr, B.; Lauber, K.; Mentele, R.; Lottspeich, F.; Rachel, R.; Albers, S. V. & Kletzin, A. (2009) "*Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* surface layers: structure, composition and gene expression." *Mol Microbiol* **73**: 58-72; DOI: [10.1111/j.1365-2958.2009.06746.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06746.x)
- Vladimirov, I. A.; Matveeva, T. V. & Lutova, L. A. (2015) "Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*." *Russ J Genet* **51**: 121-129; DOI: [10.1134/s1022795415020167](https://doi.org/10.1134/s1022795415020167)
- Vogt, D. & Kleinschmidt, P. (1985) "Verfahren zur Herstellung von Cyanwasserstoff" EP Patent 0072416
- Walia, A.; Mehta, P.; Chauhan, A. & Shirkot, C. K. (2013) "Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions." *Proc Natl Acad Sci, India, Sect. B Biol Sci* **84**: 145-155; DOI: [10.1007/s40011-013-0189-3](https://doi.org/10.1007/s40011-013-0189-3)
- Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K. & Karube, I. (1998) "Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase." *Microbiology* **144** 1677-1682; DOI: [10.1099/00221287-144-6-1677](https://doi.org/10.1099/00221287-144-6-1677)
- Watanabe, S.; Morimoto, D.; Fukumori, F.; Shinomiya, H.; Nishiwaki, H.; Kawano-Kawada, M.; Sasai, Y.; Tozawa, Y. & Watanabe, Y. (2012) "Identification and characterization of D-hydroxyproline dehydrogenase and Delta1-pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate deaminase involved in novel L-hydroxyproline metabolism of bacteria: metabolic convergent evolution." *J Biol Chem* **287**: 32674-32688; DOI: [10.1074/jbc.M112.374272](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374272)
- Watanabe, S.; Sueda, R.; Fukumori, F. & Watanabe, Y. (2015) "Characterization of flavin-containing opine dehydrogenase from bacteria." *PLoS One* **10**: e0138434; DOI: [10.1371/journal.pone.0138434](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138434)
- Watanabe, S.; Tajima, K.; Matsui, K. & Watanabe, Y. (2016) "Characterization of iron-sulfur clusters in flavin-containing opine dehydrogenase." *Biosci Biotechnol Biochem* **80**: 2371-2375; DOI: [10.1080/09168451.2016.1206812](https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1206812)
- Waugh, D. S. (2016) "The remarkable solubility-enhancing power of *Escherichia coli* maltose-binding protein." *Postepy Biochem* **62**: 377-382; DOI: [10.18388/pb.2016_41](https://doi.org/10.18388/pb.2016_41)
- Weigel, P. H. & Englund, P. T. (1975) "Inhibition of DNA replication in *Escherichia coli* by cyanide and carbon monoxide." *J Biol Chem* **250**: 8536-8542; DOI: [10.1016/s0021-9258\(19\)40793-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40793-x)
- Wendler, A. (2022) "Heterologe Expression von *hcn*-Genen und Charakterisierung der Proteine und deren Eisen-Schwefel Cluster". Bachelor Thesis, TU Darmstadt: Schwefelbiochemie und mikrobielle Bioenergetik.
- Winteler, H. V. & Haas, D. (1996) "The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters." *Microbiology (Reading)* **142**: 685-693; DOI: [10.1099/13500872-142-3-685](https://doi.org/10.1099/13500872-142-3-685)

- Wissing, F. (1974) "Cyanide formation from oxidation of glycine of *Pseudomonas* species." *J Bacteriol* **117**: 1289-1294; DOI: [10.1128/jb.117.3.1289-1294.1974](https://doi.org/10.1128/jb.117.3.1289-1294.1974)
- Wissing, F. & Andersen, K. S. (1981) The enzymology of cyanide production from glycine by a *Pseudomonas* species. Solubilization of the enzyme. In *Cyanid in Biology*. B. Vennesland, E. E. Conn, C. J. Knowles, J. Westley & F. Wissing (ed). London, Academic Press: 275-287.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005) "Real-time PCR for mRNA quantitation." *Biotechniques* **39**: 75-85; DOI: [10.2144/05391RV01](https://doi.org/10.2144/05391RV01)
- Yang, H.; Qu, J.; Zou, W.; Shen, W. & Chen, X. (2021) "An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*." *Appl Microbiol Biotechnol* **105**: 6607-6626; DOI: [10.1007/s00253-021-11533-2](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11533-2)
- Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J. & Zhang, Y. (2015a) "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." *Nat Methods* **12**: 7-8; DOI: [10.1038/nmeth.3213](https://doi.org/10.1038/nmeth.3213)
- Yang, J. & Zhang, Y. (2015b) "I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions." *Nucleic Acids Res* **43**: W174-181; DOI: [10.1093/nar/gkv342](https://doi.org/10.1093/nar/gkv342)
- Ye, R. W.; Haas, D.; Ka, J. O.; Krishnapillai, V.; Zimmermann, A.; Baird, C. & Tiedje, J. M. (1995) "Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr." *J Bacteriol* **177**: 3606-3609; DOI: [10.1128/jb.177.12.3606-3609.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.12.3606-3609.1995)
- Yoshida, N. & Sato, M. (2009) "Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies." *Appl Microbiol Biotechnol* **83**: 791-798; DOI: [10.1007/s00253-009-2042-4](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2042-4)
- Zarei, O.; Dastmalchi, S. & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016) "A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media." *Iran J Pharm Res* **15**: 907-913; DOI: [10.22037/IJPR.2016.1915](https://doi.org/10.22037/IJPR.2016.1915)
- Zdor, R. E. (2015) "Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions." *J Appl Microbiol* **118**: 267-274; DOI: [10.1111/jam.12697](https://doi.org/10.1111/jam.12697)
- Zhang, W.; Du, P.; Zheng, H.; Yu, W.; Wan, L. & Chen, C. (2014) "Whole-genome sequence comparison as a method for improving bacterial species definition." *J Gen Appl Microbiol* **60**: 75-78; DOI: [10.2323/jgam.60.75](https://doi.org/10.2323/jgam.60.75)
- Zhou, G.; Zhang, H.; Yang, W.; Wu, Z.; Liu, W. & Yang, C. (2020) "Bioleaching assisted foam fractionation for recovery of gold from the printed circuit boards of discarded cellphone." *Waste Manag* **101**: 200-209; DOI: [10.1016/j.wasman.2019.10.016](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.016)
- Zimmermann, A.; Reimann, C.; Galimand, M. & Haas, D. (1991) "Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **5**: 1483-1490; DOI: [10.1111/j.1365-2958.1991.tb00794.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00794.x)
- Zuhra, K. & Szabo, C. (2022) "The two faces of cyanide: an environmental toxin and a potential novel mammalian gasotransmitter." *FEBS J* **289**: 2481-2515; DOI: [10.1111/febs.16135](https://doi.org/10.1111/febs.16135)

10. Anhang

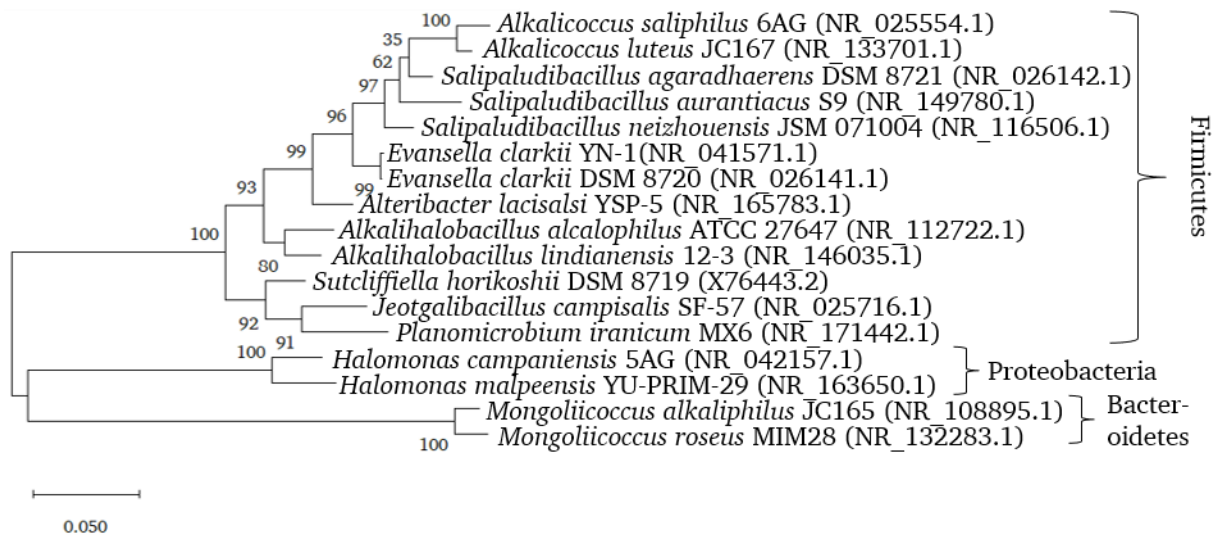


Abbildung S 1 Phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Sequenzen der nächstverwandten Bakterienspezies. Phylogenetisches Dendogramm basierend auf einem Maximum Likelihood Algorithmus. Die Bootstrap Werte basieren auf 1 000 Replikaten und sind in Prozentwerten an den Verzweigungspunkten angegeben. Der Balken steht für die Anzahl an Nukleotid Substitutionen pro Nukleotid Position. Der Stammbaum wurde mit MEGA11 erstellt (Tamura *et al.*, 2021).

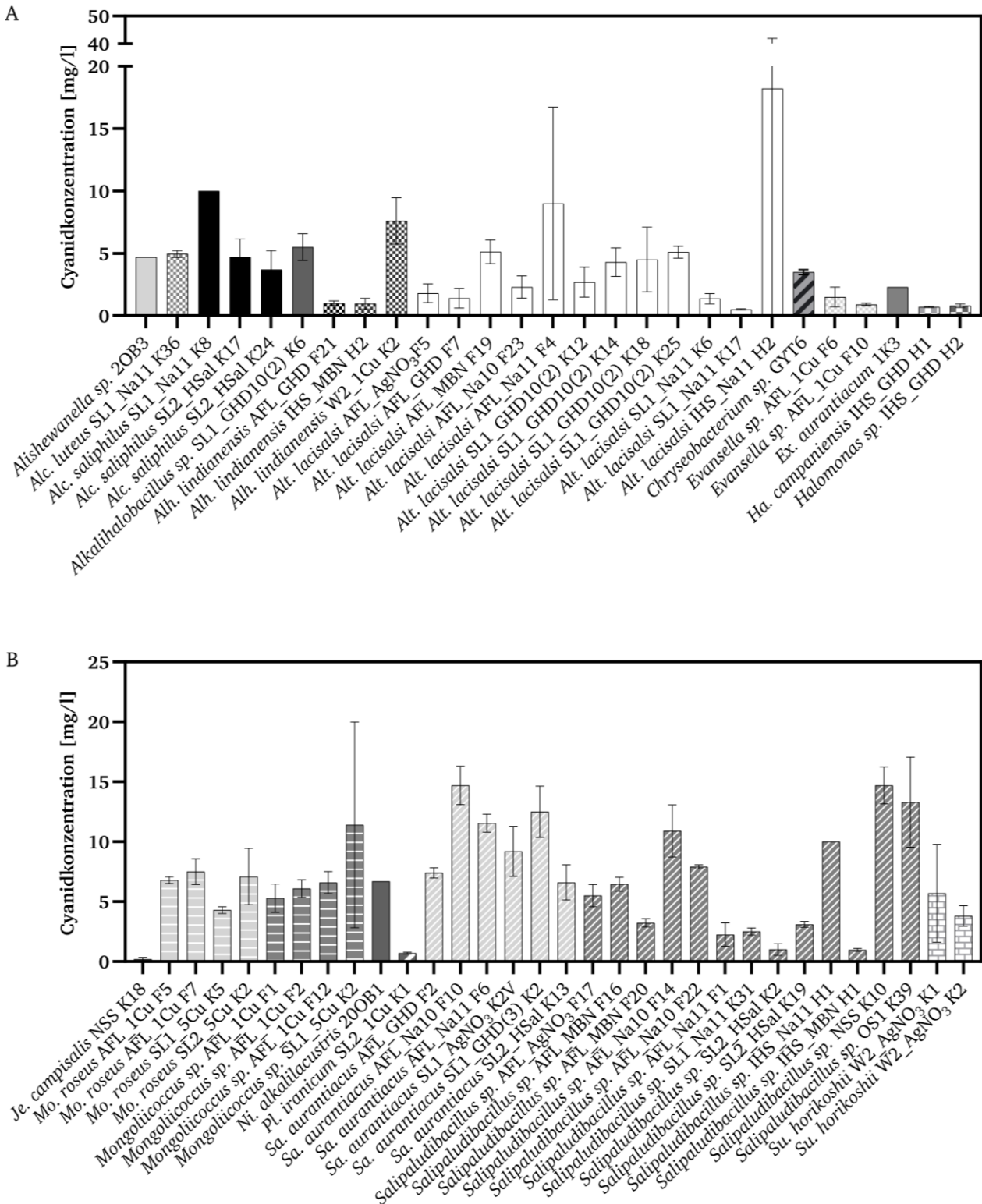


Abbildung S 2 Cyanidproduktion der Neuisolate. Die Messung der Cyanidproduktion erfolgte 6 h nach Induktion durch Glycin-Methionin. Bei Isolaten von den metallhaltigen Medien wurde GHD10-Medium mit Glycin-Methionin zur Kultivierung verwendet. Im Nachhinein wurden die Cyanidproduktionswerte korrigiert, um den Effekt von dem Induktionsmedium auf die Kalibrierreihe auszugleichen (Kapitel 2.2.3.1.: Cyanidnachweis mittels Methämoglobintest). Die Cyanidmessungen für *Salipaludibacillus* sp. IHS_Na11 H1 und *Alc. saliphilus* SL1_Na11 K8 lagen außerhalb des Messbereichs der Kalibriergerade (Medium Na11 Induktion), daher sind die Werte mit 10 mg/l Cyanid angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar (n = 3).

Tabelle S 1 Übersicht über die Genomsequenzierungen mittels Nanopore Technologie.

gDNA	Flowcell Number	Anzahl der benutzten Poren
<i>Sa. aurantiacus</i> AFL_Na11 F6		
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na11 F1		
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_Na10 F22		
<i>Ps. hutmensis</i> MG#27	FAN29024	444
<i>Alh. lindianesis</i> W2_1Cu W2		
<i>Alh. lindianesis</i> AFL_GHD10 F21		
<i>Evansella</i> sp. AFL_1Cu F6		
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12		
<i>Mo. roseus</i> AFL_1Cu F5		
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2		
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25		
<i>Chryseobacterium</i> sp. GYT6		
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3	FAN41810	483
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3		
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1		
<i>Salipaludibacillus</i> sp. AFL_AgNO ₃ F17		
<i>Je. campisalis</i> NSS K18		
<i>Su. horikoshii</i> W2_AgNO ₃ K1		
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F12		
<i>Mongoliicoccus</i> sp. AFL_1Cu F2		
<i>Ps. donghuensis</i> G2#25		
<i>Chryseobacterium</i> sp. GYT6	FAN41810 ¹	445
<i>Ex. mexicanum</i> 1K3		
<i>Alishewanella</i> sp. 2OB3		
<i>Ni. alkalilacustris</i> 20OB1		

¹Einzelne gDNAs von dem zweiten Lauf wurden nochmals mit der gleichen *Flowcell* sequenziert (dritter Lauf).

Tabelle S 2 Pipettierschema des 2-Level faktoriellen Versuchsplanung zur Medienoptimierung der alkalisch vorbehandelten Elektroschrott Verbrennungasche.

Well	Hefe- extrakt [μ L]	Glycin [μ L]	Serin [μ L]	L-Phenyl- alanin [μ L]	Methio- nin [μ L]	L-Threo- nin [μ L]	L-Gluta- mat [μ L]	LB pH 7,2 100 mM Tris [μ L]	LB pH 8 100 mM Tris [μ L]	LB pH 9 100 mM Tris [μ L]	alkalisch vor- behandelte Asche [μ L]	dH ₂ O [μ L]
1	0	15	0	0	0	0	0	1 500	0	0	350	1 085
2	0	15	0	0	0	0	0	0	1 500	0	350	1 085
3	42,86	15	0	0	150	0	180	1 500	0	0	350	712,14
4	42,86	150	0	300	0	0	0	0	0	1 500	350	607,14
5	0	150	115	300	0	69	0	1 500	0	0	350	466
6	42,86	150	0	0	0	69	180	1 500	0	0	350	658,14
7	42,86	15	115	0	0	69	0	0	0	1 500	350	858,14
8	42,86	150	115	300	150	69	180	0	1 500	0	350	93,14
9	0	15	0	300	0	69	180	0	0	1 500	350	536
10	0	15	115	300	150	0	0	1 500	0	0	350	520
11	0	150	0	300	150	0	180	0	1 500	0	350	320
12	0	150	115	0	0	0	180	0	1 500	0	350	655
13	42,86	150	0	0	0	69	180	0	1 500	0	350	658,14
14	42,86	150	115	300	150	69	180	0	0	1 500	350	93,14
15	42,86	150	115	0	150	0	0	0	0	1 500	350	642,14
16	42,86	150	115	300	150	69	180	1 500	0	0	350	93,14
17	42,86	15	115	300	0	0	180	1 500	0	0	350	447,14
18	0	150	0	300	150	0	180	1 500	0	0	350	320
19	42,86	15	0	0	150	0	180	0	0	1 500	350	712,14
20	0	15	115	300	150	0	0	0	1 500	0	350	520
21	0	150	115	300	0	69	0	0	1 500	0	350	466
22	42,86	150	0	0	0	69	180	0	0	1 500	350	658,14
23	0	150	115	300	0	69	0	0	0	1 500	350	466
24	42,86	150	115	0	150	0	0	1 500	0	0	350	642,14
25	42,86	150	0	300	0	0	0	0	1 500	0	350	607,14
26	0	150	115	0	0	0	180	0	0	1 500	350	655
27	42,86	15	0	300	150	69	0	1 500	0	0	350	523,14
28	42,86	150	0	300	0	0	0	1 500	0	0	350	607,14
29	42,86	150	115	0	150	0	0	0	1 500	0	350	642,14
30	0	15	115	0	150	69	180	0	1 500	0	350	571
31	0	150	0	0	150	69	0	0	0	1 500	350	731
32	0	15	0	300	0	69	180	0	1 500	0	350	536
33	42,86	15	0	0	150	0	180	0	1 500	0	350	712,14
34	0	15	0	300	0	69	180	1 500	0	0	350	536
35	0	150	0	0	150	69	0	1 500	0	0	350	731
36	0	15	0	0	0	0	0	0	0	1 500	350	1 085
37	0	15	115	0	150	69	180	0	0	1 500	350	571

Well	Hefe- extrakt [μ L]	Glycin [μ L]	Serin [μ L]	L-Phenyl- alanin [μ L]	Methio- nin [μ L]	L-Threo- nin [μ L]	L-Gluta- mat [μ L]	LB pH 7,2 100 mM Tris [μ L]	LB pH 8 100 mM Tris [μ L]	LB pH 9 100 mM Tris [μ L]	alkalisch vor- behandelte Asche [μ L]	dH ₂ O [μ L]
38	42,86	15	115	0	0	69	0	0	1 500	0	350	858,14
39	42,86	15	115	300	0	0	180	0	0	1 500	350	447,14
40	0	15	115	300	150	0	0	0	0	1 500	350	520
41	0	15	115	0	150	69	180	1 500	0	0	350	571
42	0	150	115	0	0	0	180	1 500	0	0	350	655
43	42,86	15	0	300	150	69	0	0	0	1 500	350	523,14
44	42,86	15	115	300	0	0	180	0	1 500	0	350	447,14
45	0	150	0	0	150	69	0	0	1 500	0	350	731
46	42,86	15	0	300	150	69	0	0	1 500	0	350	523,14
47	42,86	15	115	0	0	69	0	1 500	0	0	350	858,14
48	0	150	0	300	150	0	180	0	0	1 500	350	320

Tabelle S 3 Pipettierschema des *optimal design* Versuchsplans zur Medienoptimierung der Biolaugung mit der gemahlene Elektroschrott Verbrennungasche.

Well	Hefeextrakt [μL]	Glycin [μL]	Serin [μL]	L-Glutamat [μL]	L-Phenyl- alanin [μL]	Fe-(III)- citrat [μL]	MgSO ₄ [μL]	LB pH 7,2 100 mM Tris [μL]	LB pH 7,6 100 mM Tris [μL]	LB pH 8 100 mM Tris [μL]	L- Threonin [μL]	gemahlene Asche [μL]	dH ₂ O [μL]
1	49,05	75	32,73	233,7	170,99	44,33	30	1 500	0	0	69,2	400	395
2	51,56	127,5	38,5	60	350	0	0	0	1 500	0	69,2	400	403,24
3	64,3	225	11,55	195	350	0	30	0	1 500	0	69,2	400	154,95
4	64,3	225	0	80,7	0	0	5,25	0	1 500	0	69,2	400	655,55
5	25,7	188,25	20,79	179,35	0	45	20,4	1 500	0	0	69,2	400	551,31
6	63,33	139,5	38,5	153,6	350	26,1	20,7	0	0	1 500	69,2	400	239,07
7	64,3	225	38,5	172,24	220,68	45	30	0	1 500	0	69,2	400	235,08
8	25,7	75	38,5	240	0	0	27	0	0	1 500	69,2	400	624,6
9	49,61	156,75	38,5	69	12,25	45	6,15	1 500	0	0	69,2	400	653,54
10	64,3	225	38,5	240	0	45	30	0	0	1 500	69,2	400	388
11	25,7	225	27,91	60	0	20,25	0	0	1 500	0	69,2	400	671,94
12	25,7	225	38,5	60	350	45	30	0	1 500	0	69,2	400	256,6
13	45,97	75	6,54	170,7	350	29,25	17,25	0	1 500	0	69,2	400	336,09
14	25,7	75	38,5	240	0	45	0	0	1 500	0	69,2	400	606,6
15	25,7	146,72	0	75,02	49,81	27,35	15,03	1 500	0	0	69,2	400	691,17
16	25,7	198	38,5	240	350	12,15	27,77	1 500	0	0	69,2	400	138,68
17	25,7	225	0	240	0	0	0	0	1 500	0	69,2	400	540,1
18	64,3	225	0	192,3	350	12,6	0	0	0	1 500	69,2	400	186,6
19	44,23	225	16,94	240	350	45	17,4	0	0	1 500	69,2	400	92,23
20	26,67	197,25	0	60	350	17,32	13,5	1 500	0	0	69,2	400	366,06
21	41,14	210	38,5	60	0	0	30	1 500	0	0	69,2	400	651,16
22	50,05	225	38,5	193,2	117,25	6,75	10,35	0	1 500	0	69,2	400	389,7
23	64,3	225	25,27	60	217	22,05	12	1 500	0	0	69,2	400	405,18
24	64,3	75	0	240	29,75	45	10,5	0	0	1 500	69,2	400	566,25
25	61,41	75	13,86	60	350	45	0	0	0	1 500	69,2	400	425,53
26	64,3	75	0	240	182	0	0	0	1 500	0	69,2	400	469,5
27	34,77	104,12	0	66,3	110,25	0	4,5	0	0	1 500	69,2	400	710,86
28	45,56	224,92	5,58	60	131,25	14,5	30	0	1 500	0	69,2	400	518,99
29	39,21	75	28,49	240	350	0	0	0	0	1 500	69,2	400	298,1
30	46,35	130,5	19,25	60	0	35,1	30	0	0	1 500	69,2	400	709,6
31	30,33	174,62	38,5	240	130,63	33,75	0	0	0	1 500	69,2	400	382,97
32	25,7	225	37,34	94,2	350	0	0	0	0	1 500	69,2	400	298,56
33	48,28	112,5	16,75	177	0	18	0	1 500	0	0	69,2	400	658,27
34	64,3	75	38,5	60	0	0	0	0	0	1 500	69,2	400	793
35	25,7	75	34,65	94,2	217	26,77	9,3	1 500	0	0	69,2	400	548,18
36	25,7	75	0	60	0	45	30	0	1 500	0	69,2	400	795,1
37	64,3	159,15	0	100,5	267,75	45	30	1 500	0	0	69,2	400	364,1

Well	Hefeextrakt [μL]	Glycin [μL]	Serin [μL]	L-Glutamat [μL]	L-Phenyl- alanin [μL]	Fe-(III)- citrat [μL]	MgSO ₄ [μL]	LB pH 7,2 100 mM Tris [μL]	LB pH 7,6 100 mM Tris [μL]	LB pH 8 100 mM Tris [μL]	L- Threonin [μL]	gemahlene Asche [μL]	dH ₂ O [μL]
38	64,3	180	34,65	240	350	45	0	0	1 500	0	69,2	400	116,85
39	25,7	75	0	240	350	45	30	0	0	1 500	69,2	400	265,1
40	25,7	225	0	60	0	45	0	0	0	1 500	69,2	400	675,1
41	43,07	75	23,29	60	350	0	30	0	0	1 500	69,2	400	449,44
42	25,7	123,75	20,43	157,92	164,5	0	27,45	0	1 500	0	69,2	400	511,05
43	49,05	176,25	0	240	12,25	29,25	30	0	1 500	0	69,2	400	494
44	64,3	170,25	19,25	240	70	0	15,3	0	0	1 500	69,2	400	451,7
45	33,42	176,25	3,47	153,6	203,04	45	0	0	1 500	0	69,2	400	416,02
46	61,21	75	0	144,6	0	0	30	1 500	0	0	69,2	400	719,99
47	30,52	225	2,12	159	155,63	11,03	30	0	0	1 500	69,2	400	417,5
48	64,3	93,5	33,43	72,6	0	29,25	28,05	0	1 500	0	69,2	400	709,67

11. Elektronischer Anhang

Sequenzen, Alignments, BLAST-Ergebnisse und 3D-Strukturmodelle sind auf einer beiliegenden CD dargestellt.

Kapitel 2

Plasmidsequenzen

- 2_pASK-HCN.dong
- 24_pASK-HCN.dong Strep_MPB_L-Strep-C-term
- 25_pASK_Rox
- 46_pBBR1MCS-2_lacZabc
- 47_pBBR1MCS-2_natProabc
- 49_DHFR_HcnABC

pCas9-basierte Plasmidsequenzen werden nicht dargestellt, da die Plasmidsequenz des Ursprungsplasmids Eigentum der BRAIN Biotech AG ist. Auch die Sequenzen von PMQ688 und pPR1 malE-TEV-mccC(delta)1-3_2 werden nicht dargestellt, da diese Eigentum von Robert M. Q. Shanks bzw. Jakob Eller sind.

Die Plasmidsequenzen sind im GenBank-Format gespeichert und können mit allen bekannten Sequenzverarbeitungsprogrammen geöffnet werden.

Kapitel 3

16S rDNA-Sequenzen: 16S rDNA-Sequenzen + BLAST-Ergebnisse der Sequenzen gegen die 16S rRNA-Datenbank von *NCBI*

- Fuchslotzacke und Herrensee
- Sodaseen
 - SL1 und SL2
 - Neuisolate Proben Jan Sluka
- Waldboden

Alignments: 16S rDNA-Sequenzen der Neuisolate mit nächstverwandten Bakterienspezies

- *Alkalicoccus*
- *Alteribacter lacisalsi*
- *Halomonas*
- *Mongoliicoccus*
- *Salipaludibacillus*
- Weitere Neuisolate

Terminale Oxidasen Sequenzen

- G2_25_CioAB
- G2_25_CioAB2
- MG#27_assembl_cioAB
- CioAB_tblastn_out: TBLASTN von CioA/B *Ps. aeruginosa* gegen die Genomsequenzen der Neuisolate

Die 16S rDNA-Sequenzen bestehen jeweils aus einer Sequenzdatei im Fasta Format, welche mit allen bekannten Sequenzanalyse Programmen und dem Editor geöffnet werden können. Zudem ist eine Datei zur Standalone BLAST Analyse vorhanden. Für jede Sequenz ist jeweils ein Excel-Dokument mit den Ergebnissen der BLAST-Analyse gegen die 16S rRNA-Datenbank von *NCBI* vorhanden (Stand 2021).

Kapitel 5

Regulatoren

- Globaler_Aktivator_tblastn_out – BLAST Ergebnis GacS/A von *Ps. fluorescens* gegen Genomsequenzen
- *Ps_donghuensis*_ANR – *Ps. donghuensis* G2#25 ANR
- *Ps_donghuensis* RoxSR – Sequenzen RoxS/R von *Ps. donghuensis* G2#25
- Regulatoren_tblastn_all out-BLAST Ergebnis Regulatoren gegen Genomsequenzen

Die Sequenzdateien sind im GenBank Format gespeichert und lassen sich mit allen bekannten Sequenzverarbeitungsprogrammen öffnen. BLAST Ergebnisse lassen sich mit allen bekannten Browsern öffnen.

Kapitel 6

3D-Strukturmodelle

- *Al. populi* Hcn
- *Ar. globiformis* HcnCAB
- *Ba. subtilis* Hcn
- *Br. casei* HcnCAB
- *Microbacterium* sp. HcnCAB
- *Pr. megaterium* HcnAB1B2C
- *Ps. aeruginosa* LhpBFE
- *Ps. donghuensis* HcnABC
 - *Ps. donghuensis* HcnABC + Kofaktoren
- *Ps. donghuensis* HcnCAB
- *Ps. hutmensis* MG#27 HcnCAB
- *Rh. erythropolis* HcnCAB
- *Sa. aurantiacus* S9

Zur Visualisierung der 3D-Strukturmodelle eignen sich die Programme PyMOL oder Chimera. Die einzelnen Untereinheiten sind als .pdb Datei abgespeichert. Zudem ist jeweils eine Datei vorhanden, in der die Untereinheiten auf die Cyanidsynthase von *Ps. donghuensis* G2#25 aligniert sind (.pse Dateien → nur in PyMOL visualisierbar).

Sequenzalignment HcnC Homologe/Paraloge: HcnC_Alignment

Das Sequenzalignment ist im Fasta Format abgespeichert, welches mit allen bekannten Sequenzanalyse Programmen und dem Editor geöffnet werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

Nicht dargestellt sind allgemeingültige Abkürzungen und SI-Einheiten (nach der *American Society for Microbiology* [<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.01712-07>, Stand Januar 2023]).

ad	auffüllen auf
AFL → F	Fuchslochlacke
AHL	Acyl-Homoserinlactone
AHT	Anhydrotetracyclin
<i>Alh.</i>	<i>Alkalihalobacillus</i>
<i>Al.</i>	<i>Alteribacter</i>
<i>Alc.</i>	<i>Alkalicoccus</i>
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzkassette
ANI	<i>average nucleotide identity</i>
ANR	<i>anaerobic regulator of arginine deiminase and nitrate reductase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Ar.</i>	<i>Arthrobacter</i>
AS	Aminosäure
AST	Sóstó
<i>Alt.</i>	<i>Alteribacter</i>
<i>Ba.</i>	<i>Bacillus</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>Br. casei</i>	<i>Brevibacterium casei</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CF	Cystische Fibrose
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
<i>Ch.</i>	<i>Chromobacterium</i>
CIO	Cyanidinsensitive Oxidase
CPEC	<i>circular polymerase extension cloning</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CV	Säulenvolumen
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol-Natrium
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
dH ₂ O/ddH ₂ O	einfach deionisiertes Wasser/doppelt deionisiertes Wasser
D-HypDH	D-Hydroxyprolin-Dehydrogenase
DIBMA	<i>Diisobutylene/myleic acid</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
<i>DoE</i>	<i>Design of Experiment</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Elektronenspinresonanz
<i>Ev.</i>	<i>Evansella</i>
<i>Ex.</i>	<i>Exiguobacterium</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FNR	Fumarat und Nitrat Reduktase Regulation
<i> fwd</i>	<i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
gRNA	<i>guide RNA</i>
IHS → H	Herrnsee
HABA	Hydroxy-Azophenyl Benzoesäure
<i>Ha.</i>	<i>Halomonas</i>
HD	Hefe-Dextrose
hfB	hinterer flankierender Bereich
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IOH	Obere Hölllacke
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>Je.</i>	<i>Jeotgalibacillus</i>

K_M	Michaelis-Menten Konstante
Km^R	Kanamycin-Resistenzkassette
LB	<i>lysogeny broth</i>
MBP	Maltosebindeprotein
<i>Mo.</i>	<i>Mongoliicoccus</i>
mRNA	messenger RNA
n	Stichprobenumfang
n.a.	nicht angegeben
n.b.	nicht bestimmt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>Ni.</i>	<i>Nitrincola</i>
NSS	Neusiedlersee
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
OF	Oxidation-Fermentation
ORF	<i>open reading frame</i>
OS1	Oberer Stinkersee
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDB	Proteindatenbank
PHI-BLAST	<i>pattern hit initiated BLAST</i>
<i>Pl.</i>	<i>Planomicrobium</i>
PMS	Phenazin-Methosulfat
<i>Pr. (ehemals Ba.)</i>	<i>Priestia (ehemals Bacillus)</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
<i>Rh.</i>	<i>Rhodococcus</i>
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR
RMSD	mittleres Abweichungsquadrat (<i>root mean square deviation</i>)
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
<i>Sa.</i>	<i>Salipaludibacillus</i>
SÄB	Badelacke
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sRNA	<i>small regulatory RNA</i>
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
SMA 2:1	<i>Styrene/maleic acid</i>
SMALP	<i>styrene-maleic acid copolymers lipid particles</i>
SSS	Salzlacke Sárvíz völgye Tájvédelmi körzet
SST	Sárkány-tó
<i>St.</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Su.</i>	<i>Sutcliffiella</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRBA	Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
vfB	vorderer flankierender Bereich
W	Waldboden TU Darmstadt
WT	Wildtyp
Δ	Gendeletion

Beiträge anderer

Alle hier genannten Studenten (Forschungspraktika, Masterpraktika und Bachelor-Thesen) habe ich während ihrer Laboraufenthalte betreut und angeleitet.

Kapitel 3:

Probenentnahme im Burgenland, Österreich

Die Probenentnahmen im Nationalpark Neusiedlersee Seewinkel fanden in Zusammenarbeit mit Roland Albert (Universität Wien) und Mitarbeitern des Informationszentrums des Nationalparks Neusiedlersee statt.

Auswahl der primären Schwermetallkonzentrationen für die Plattierungen

Die Auswahl der Konzentrationen (Cu^{2+} und Ag^+) fand in Zusammenarbeit mit Sabrina Völkel (TU Darmstadt) statt.

Isolation von Cyanid-produzierenden Mikroorganismen

Renate Fröhlich (TU Darmstadt) führte die Aufschlammungen der Proben SL1 und SL2 und die primären Plattierungen durch.

Marina Burgio isolierte während ihrer Bachelor-Thesis Cyanid-produzierende Mikroorganismen aus den Proben IHS1 (H) und AFL2 (F). Sie führte zudem die 16S rDNA-Sequenzierung und Cyanidmessungen dieser Isolate durch.

Genomsequenzierungen mit der Nanopore Technologie und bioinformatische Analysen

Almut Kohl (BRAIN Biotech AG) hat die Probenvorbereitung und Sequenzierung der gDNA durchgeführt.

Jan Ziegler (BRAIN Biotech AG) hat folgende bioinformatischen Analysen der Genomsequenzen durchgeführt: Auswertung und Assemblierung der Sequenzen, Bestimmung der ANI-Werte, Genom-BLAST, Analyse der Spacersequenzen mit CCTop_Standalone.

Charakterisierung der Cyanid-produzierenden Mikroorganismen

Sven Schladerbeck führte ein Teil der Charakterisierungen der Cyanid-produzierenden Neuisolate während seines Forschungspraktikums (2021) durch. Dies waren die makroskopische und mikroskopische Beschreibung der Neuisolate, der Test auf Hitzetoleranz, Gram-Färbungen, Katalase- und Oxidase-Tests, OF-Tests und die Wachstumskurven mit dem *microplate reader*. Zudem überprüfte er während seiner Bachelor-Thesis das Wachstum in Abhängigkeit der Anwesenheit von Sauerstoff.

Renate Fröhlich (TU Darmstadt) führte den Test auf NaCO_3 Toleranz auf Agarmedien durch, welcher die Grundlage für die Wachstumskurven mit dem *microplate reader* von Sven Schladerbeck bildete.

Kapitel 3-5: Biolaugungen (genannte Namen sind Mitarbeiter der BRAIN Biotech AG)

Die ICP-MS Messungen wurden von Annabelle Klämke durchgeführt. Die meisten Königswasseraufschlüsse wurden von Annabelle Klämke und André Clauß durchgeführt.

Die statistische Versuchsplanung mit DesignExpert wurde in Zusammenarbeit mit Gina Kuippers durchgeführt. Die Bedienung von DesignExpert und die statistische Auswertung der Versuche mit dieser Software wurden von ihr durchgeführt. Die Programmierung des Pipettierrobotors wurde von ihr und Jan Ziegler durchgeführt.

Die Biolaugungsexperimente mit den CRISPR/Cas9 Promotor-/Operatormutanten (ausgenommen P_{BAD}) wurden von Gina Kuippers und Annabelle Klämke durchgeführt.

Kapitel 5: CRISPR/Cas9 in *Ps. donghuensis* G2#25

Die Einarbeitung in die CRISPR/Cas9-Thematik erfolgte durch Christian Zurek (BRAIN Biotech AG).

Kapitel 5-7: NaOH-Menge Cyanidtests

David Rivic legte die Menge an zugegebenen NaOH zu den Cyanidtests (8 μ l 10 M NaOH) während seiner Bachelor Thesis fest.

Kapitel 6:

Der Einfluss von Methionin auf den Methämoglobintest

Kento Amann entdeckte während seines Forschungspraktikums den Einfluss von Methionin auf die Cyanidproduktion (Amann, 2023). Die Einarbeitung wurde von mir durchgeführt, die eigentlichen Experimente fanden unter Anleitung von Arnulf Kletzin statt. Hierbei fand immer ein Austausch mit mir statt.

Überprüfung der Deletionsmutanten

Die PCRs mit anschließenden Gelelektrophoresen der drei Deletionsmutanten bezüglich des *hcnABC*- und des putativen *hcnCAB*-Operons wurden von Kento Amann während seines Forschungspraktikums durchgeführt (Amann, 2023). Eine Überprüfung der Cyanidproduktion der drei Deletionsmutanten und die Cyanidmessung der *gacA*-Deletionsmutante wurden ebenfalls von ihm durchgeführt.

Funktionalität der Cyanidsynthese nach Aminosäureaustauschen

Lara Södler erstellte die Plasmide pASK-HCN.dong C65A, C68A, C383A, C418A, C423A und C427A während ihrer Bachelor-These. Nadja Peric erstellte die Plasmide pASK-HCN.dong C81S, K408R, R344A, R344K, R371A, R446A, R446K während ihres Forschungspraktikums (Peric, 2020) unter der Anleitung von Arnulf Kletzin.

Die Cyanidmessungen wurden von Lara Södler während ihrer Bachelor-These durchgeführt. Nadja Peric führte die Messungen und den Nachweis der Proteine während ihres Forschungspraktikums und ihrer Bachelor-These unter der Anleitung von Arnulf Kletzin durch (Peric, 2020, 2021).

Erstellung der *Ps. donghuensis* G2#25 Komplementierungsmutanten

Elina Kim erstellte während ihrer Bachelor-These das Plasmid pBBR1MCS-2 natProabc. Zudem erstellte und überprüfte sie beide *Ps. donghuensis* Δ ABC-Komplementierungsmutanten. Außerdem führte sie die Cyanidtests und Biolaugungsexperimente mit den Komplementierungsmutanten und eine Proteinanreicherung aus der Komplementierungsmutante durch.

Identifizierung der Cyanidsynthesecluster in Cyanid-produzierenden Bakterien

Die konservierten Cystein-Aminosäuremotive in HcnA und das CRCE-Motiv in HcnB wurden erstmals von Arnulf Kletzin identifiziert.

Lina Dammal, Felix Herrmann, Elena Klein, Juliane Kliehm, Alisa Mazur, Juliane Müller, Kevin Müller, Josefine Panthel und Alexander Pattberg identifizierten einige *hcn*-Gencluster und modellierten die dazugehörigen 3D-Strukturen während des Mikrobiologie Mastermoduls MB 03 (*Arthrobacter globiformis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Alteribacter populi*, *Priestia megaterium*, *Salipaludibacillus aurantiacus* S9, *Microbacterium sp.* und *Brevibacterium casei*).

Die Tests auf Cyanidproduktion von Bakterien der DSMZ wurden von Elina Kim, Nadja Peric und Fabienne Schneider während ihrer Forschungspraktika/Bachelorarbeiten durchgeführt. Der Cyanidtest von *Microbacterium agarici* wurde von Ciaran Rühmkorff, Patrick Bröschky, Lukas Neuenfeld und Samira Ortega Iannazzo während des Mikrobiologie Mastermoduls (MB 03) durchgeführt.

Kapitel 7:

Kalibrierreihe LB-HD + Kupfer

Kento Amann erstellte während seines Forschungspraktikums die Kalibrierreihe für dieses Medium.

Zusammenarbeit bei der Verwendung von SMALPs

Die Erstellung des Protokolls zur Solubilisierung der Cyanidsynthase mittels SMALPs erfolgte in Zusammenarbeit mit Eugenio Pérez Patallo (TU Kaiserslautern). Zudem riet er zur Verwendung des Proteaseinhibitorcocktails cOmplete bei Proteinreinigungen. Daraufhin wurde dieser bei Reinigungen verwendet.

Erhöhung der Solubilität der HCN-Synthase durch MBP

Die Planung der Durchführung der Experimente mit MBP fand in Zusammenarbeit mit Jakob Eller (TU Darmstadt) statt.

Auswahl Spacer Strep-tag

Die Auswahl der Sequenz erfolgte in Zusammenarbeit mit Alexandra Neradt im Rahmen ihres Forschungspraktikums.

Konferenzbeiträge

Ein Teil der hier dargestellten Ergebnisse wurden bereits auf zwei nationalen Jahrestagungen der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) präsentiert.

Poster

VAAM-Jahrestagung 2022, online

„Bioleaching of waste materials with a newly isolated cyanide-producing *Pseudomonas* strain”

C. Schuster, G. Kuippers, A. Klämke, M. Amberger, E. Gabor, A. Kletzin

VAAM-Jahrestagung 2020, Leipzig, Deutschland

„Screening for alcaliphilic cyanide-producing bacteria”

C. Schuster, J. Sluka, N. Fester, E. Popova, M. Amberger, Y. Tiffert, E. Gabor, A. Kletzin

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Carolin Schuster

Akademischer Werdegang

seit 11/2018 Promotion im Fachbereich Biologie (TU Darmstadt, Betreuer: PD Dr. Arnulf Kletzin) im Rahmen des UfIB-Programms in Zusammenarbeit mit der BRAIN Biotech AG (Zwingenberg)

10/2020-03/2021 Forschungsaufenthalt bei der BRAIN Biotech AG

10/2016 – 09/2018 M. Sc. Technische Biologie, TU Darmstadt
Master-Thesis: Die Rolle regulatorischer Genprodukte sowie der Cytochrom *c*-Domäne der N₂O – Reduktase bei der Lachgas-Atmung von *Wolinella succinogenes*10/2013-09/2016 B. Sc. Biologie, TU Darmstadt
Bachelor-Thesis: Chromatin Dynamics in DNA Double Strand Break Repair**Schulischer Werdegang**

08/2005 – 06/2013 Abitur, Starkenburg-Gymnasium Heppenheim

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei allen Personen, die mich während meines Studiums und der anschließenden Promotion unterstützt und somit diese Dissertation erst ermöglicht haben.

Zuerst bedanke ich mich bei Dr. Arnulf Kletzin, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Er hatte sich stets die Zeit genommen, mich bei Problemen oder Fragen zu unterstützen. Außerdem hat er mir den Freiraum gelassen, neue Ideen in das Projekt mitzubringen und meinen Forschungsschwerpunkt frei zu wählen. Zudem möchte ich mich für seine stetige Unterstützung bei der Erstellung von Präsentationen, Postern und anderen Berichten bedanken. Wir hatten gemeinsam die Möglichkeit eine Exkursion zum Neusiedlersee durchzuführen. Hierbei erlebte ich die klassische Mikrobiologie und wir verbrachten eine tolle wissenschaftliche und kulinarische Woche zusammen. Danke, dass du mir geholfen hast, mich sowohl persönlich als auch wissenschaftlich weiterzuentwickeln!

Ich bedanke mich bei Dr. Jörg Simon für die Übernahme des Korreferats und für seine hilfreichen Ratschläge. Er ermöglichte mir, die Masterarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu absolvieren und begeisterte mich dadurch für die Mikrobiologie. Damit legte er den Grundstein für meine Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Esther Gabor von der BRAIN Biotech AG. Wir standen immer in einem engen Austausch und durch die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen zu meinem Thema hat sie mich sehr unterstützt.

Mein Dank gilt auch Dr. Gina Kuippers, die mich nicht nur toll während meiner Zeit bei der BRAIN Biotech AG betreut hat, sondern auch darüber hinaus für einen interessanten Austausch zur Verfügung stand. Sie unterstützte mich mit hilfreichen Ratschlägen zu weiteren Experimenten und Präsentationen. Auch bei Dr. Christian Zurek, Mark Gauert und Jan Ziegler bedanke ich mich für die anregenden Diskussionen und Ratschläge, die mich in dem CRISPR-Projekt, in dem Biolaugungsprojekt, den bioinformatischen Analysen, Proteinreinigungen und allen weiteren Problemen weiter nach vorne gebracht haben.

Ich bedanke mich bei Annabelle Klämke für die Messung meiner unzähligen ICP-MS Proben. Annabelle und Ute Grünebaum haben die Zeit bei der BRAIN Biotech AG unvergesslich gemacht. Ich hatte mit ihnen eine tolle Zeit, auch außerhalb des wissenschaftlichen Kontextes. Vielen Dank für die gemeinsamen Mittagspausen und Feierabende. Aus Laborbekanntschaften sind tolle Freundschaften entstanden. Außerdem möchte ich mich auch bei allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der BRAIN Biotech AG bedanken. Ich habe mich während meines Aufenthalts dort sehr wohl gefühlt.

Ich bedanke mich bei Dr. Sandro Keller für die Bereitstellung der SMALPs. Eugenio Pérez Patallo danke ich für die Hilfestellung bei der Verwendung der SMALPs. Mein Dank gilt auch Robert M. Q. Shanks für die Bereitstellung von Plasmiden und genomischer DNA und den Austausch über effektive Promotoren in Pseudomonaden.

Ich danke der Umsetzungsfördernde Initiative Bioökonomie (UfIB) für die Finanzierung der ersten drei Jahre meiner Doktorarbeit.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kletzin, Pfeifer und Simon bedanke ich mich für die tolle Zeit im Labor. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und haben mich mit hilfreichen Tipps und Ratschlägen versorgt. Insbesondere bei Patrick Rühl, Patrick Haas und Dennis Wilkens möchte ich mich für die gemeinsame Zeit und die Einarbeitung in den Laboralltag bedanken.

Ich bedanke mich bei meinem Freund Darío Macarrón für seine bedingungslose Unterstützung und sein Verständnis. Bei meinen Freunden und meiner Familie bedanke ich mich für ihr Verständnis, ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und vor allem für die gemeinsame Zeit, um wieder Kraft zu tanken. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, den

Carolin Schuster