

**Anaerobe Kultivierung des denitrifizierenden Bakteriums  
„*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten:  
Acetat-limitiertes Wachstum und Induktion der Benzoat-  
Verwertung**



**Diplomarbeit**

im Fachbereich Biologie der Naturwissenschaften 2

Universität Bremen



vorgelegt von

**Sven Alexander Lahme**

angefertigt am

**Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie**

**Bremen**

Dezember 2009

„The study of growth of bacterial cultures does not constitute a specialised subject or a branch of research: it is the basic method of microbiology”

(J. Monod, 1949)

Verfasser: Sven Alexander Lahme  
Grenzstrasse 2  
28217 Bremen  
Tel.: 0421-6955099  
E-Mail: [slahme@mpi-bremen.de](mailto:slahme@mpi-bremen.de)

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel  
Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie Bremen  
Abteilung Mikrobiologie  
Universität Bremen  
Tel.: 0421-2028-702  
E-Mail: [fwiddel@mpi-bremen.de](mailto:fwiddel@mpi-bremen.de)

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Rabus  
Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM)  
Allgemeine und Molekulare Mikrobiologie  
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
Tel.: 0441-798-3884  
E-Mail: [rabus@icbm.de](mailto:rabus@icbm.de)

## Erklärung gemäß DPO Biologie §21 Abs. 6

Hiermit versichere ich, Sven Lahme, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig und ohne andere als die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Stellen, die von anderen Werken dem Wortlaut oder Sinn nach übernommen sind, wurden als Zitate gekennzeichnet.

Bremen, 10.12.2009

---

Sven Lahme

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>III</b>
<b>A Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Vorkommen und Abbau aromatischer Verbindungen.....	1
2. „ <i>Aromatoleum aromaticum</i> “ Stamm EbN1.....	2
3. Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA als zentrale Intermediate im anaeroben Aromatenabbau .....	2
4. Kontinuierliche Kultivierung: Der Chemostat .....	5
5. Linearisierungsverfahren: Bestimmung der Parameter $\mu_{\max}$ und $K_S$ .....	9
5.1 Lineweaver/Burk Verfahren .....	10
5.2 Hanes Verfahren.....	11
5.3 Eadie/Hofstee Verfahren .....	11
5.4 Eisenthal/Cornish-Bowden Verfahren.....	12
6. Zielsetzung der Arbeit.....	12
<b>B Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
1. Chemikalien und Gase .....	14
2. Mikrobiologische Methoden.....	14
2.1 Organismus .....	14
2.2 Nährmedium .....	14
2.3 Kultivierung .....	23
2.4 Probennahme am Chemostaten .....	27
2.5 Wachstumsparameter im Chemostaten .....	29
2.6 Stamm-spezifische Substrattests.....	31
2.7 Nitritstress-Experiment .....	33
3. Chemische und molekularbiologische Methoden.....	34
3.1 Fixierung von Zellen für Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS).....	34
3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	34
<b>C Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>37</b>
1. Charakterisierung des Acetat-limitierten anaeroben Wachstums von „ <i>Aromatoleum aromaticum</i> “ Stamm EbN1 im Chemostaten.....	37
1.1 Beschreibung des Wachstumsverhalten von Stamm EbN1 im Chemostaten .....	38
1.2 Wachstumskinetik .....	46
1.3 Nitrit-Stress Experiment .....	54
2. Dynamik und Induktion des anaeroben Benzoatstoffwechsels in „ <i>Aromatoleum aromaticum</i> “ Stamm EbN1 im Chemostaten .....	56
2.1 Substratshift mit 2 mM Benzoat.....	56

2.2 Substratshift mit 0,5 mM Benzoat .....	61
2.3 Diskussion der Substratshift-Experimente .....	64
<b>D Ausblick.....</b>	<b>70</b>
<b>E Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>F Appendix.....</b>	<b>79</b>
<b>G Danksagung.....</b>	<b>99</b>

## Zusammenfassung

Für die Charakterisierung des Wachstums von Mikroorganismen ist die kontinuierliche, Substrat-limitierte Kultivierung in Chemostaten das Verfahren der Wahl, wenn Umwelt-ähnliche Bedingungen simuliert werden sollen. In Chemostaten findet ein kontinuierlicher Zu- bzw. Abfluß von Medium bzw. Kulturbrühe statt, so dass sich ein Fließgleichgewicht (Steady State) einstellt. Durch Variation von Substratkonzentration bzw. Flußraten lassen sich verschiedene Steady States einstellen, und damit Natur-nahe Bedingungen nachstellen. Das denitrifizierende Bakterium „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 wurde anaerob unter Acetat-limitierten Bedingungen im Chemostaten kultiviert und sein Wachstumsverhalten bei einer stufenweisen Erhöhung der Verdünnungsrate mittels verschiedener Parameter (Zellzahl, Konzentrationen von Acetat, Nitrat und Nitrit, Trockenmasse, DNA- und Proteingehalt und der Zellmorphologie) beobachtet. Eine Erhöhung der Verdünnungsrate erfolgte nach einem achtfachen Volumenaustausch der Kulturbrühe, um jeweils den Steady State erreicht zu haben. Verschiedene graphische Methoden (Linearisierungen der Monodgleichung) wurden zur Bestimmung der Parameter der maximalen spezifischen Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) und der Substrataffinitätskonstanten ( $K_S$ ) verwendet. Mit dem Verfahren nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) konnte ein  $\mu_{\max}$  von  $0,26 \text{ h}^{-1}$  und ein  $K_S$ -Wert von  $0,34 \text{ mM}$  Acetat bestimmt werden. Der Vergleich des  $K_S$ -Wertes mit anderen Acetat-verwertenden fakultativ anaeroben Bakterien zeigte, dass Stamm EbN1 eine relativ niedrige Affinität für Acetat besitzt. Während der Kultivierung von Stamm EbN1 kam es bei hohen Verdünnungsraten zu einem Anstieg der extrazellulären Nitritkonzentration auf  $> 10 \text{ mM}$ . Daher wurde der Einfluss hoher Nitritkonzentrationen auf das Wachstum und  $\mu_{\max}$  in Batch-Kulturen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass hohe Nitritkonzentrationen keinen Einfluss auf  $\mu_{\max}$  haben, das Wachstum aber im Vergleich zu Nitrat um das 1,5-Fache verringern. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die hohen Nitritkonzentrationen ( $10\text{-}14 \text{ mM}$ ) weniger wegen der toxischen Wirkung des Nitrits Wachstums-inhibierend wirken, sondern eher aufgrund einer Hemmung der Nitratreduktase. Vermutlich handelt es sich bei dieser Art der Regulation um eine Detoxifizierung, die einsetzt bevor kritische Nitritkonzentrationen erreicht werden.

In einem Substratshift-Experiment wurde die Induktion des Benzoatstoffwechsels in Acetat-limitierten Zellen im Chemostaten untersucht. Der Vorteil von Chemostaten gegenüber Batch-Kulturen besteht darin, dass metabolisch aktive Zellen vorliegen, und diese sofort auf verändertes Substratangebot reagieren können (ohne „Lag“-Phase). Die Versuche wurden mit konstanter Acetatkonzentration ( $8 \text{ mM}$ ) und verschiedenen Benzoatkonzentrationen ( $2,0 \text{ mM}$

und 0,5 mM) im einfließenden Medium durchgeführt. Ein Induktionszeitraum von weniger als 40 Minuten wurde bestimmt. Die durchgeführten Experimente erlaubten erste Einblicke in das Verhalten von Stamm EbN1 bei Wachstum im Chemostaten in Gegenwart von zwei verschiedenen Kohlenstoffquellen. In zukünftigen Experimenten soll der Induktionszeitraum noch genauer eingegrenzt und die induktiv wirksame Benzoatkonzentration bestimmt werden.



## Abkürzungen

F	Flussrate
D	Verdünnungsrate
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$K_S$	Substrataffinitätskonstante (Monodkonstante)
OD	Optische Dichte
$q_S$	Spezifische Substrataufnahmerate
$S_R$	Substratkonzentration im Mediumreservoir
S	Verbleibende Substratkonzentration im Chemostaten
$\tilde{S}$	Steady State Substratkonzentration im Chemostaten
TM	Trockenmasse
V	Kulturvolumen
$v_{max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms
x	Biomassekonzentration im Chemostaten
$\tilde{x}$	Steady State Biomassekonzentration im Chemostaten
$Y_{X/S}$	Wachstumsertrag
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate
$\mu_{max}$	Spezifische maximale Wachstumsrate
$\tau$	Mittlere Verweilzeit

## A Einleitung

Mikroorganismen tragen aufgrund ihrer metabolischen Vielseitigkeit und Flexibilität wesentlich zu biogeochemischen Prozessen bei. Natürliche Systeme stehen meist in einem Fließgleichgewicht, d. h. es findet ein gleichmäßiger Zu- und Abfluss von Substraten und Biomasse statt. Daher ist es auch schwierig solche Prozesse in der Natur zu verstehen und zu verfolgen. Wie wichtig solche Kreisläufe im globalen Zusammenhang sind, zeigt sich besonders in der heutigen Zeit des Klimawandels (Vitousek et al., 1997; Schlesinger and Andrews, 2000). Es ist daher für die Zukunft unerlässlich, globale Prozesse, aber auch die Interaktionen von Makro- und Mikroorganismen, besser zu verstehen.

Mikroorganismen sind an vielerlei Stoffkreisläufen als Konsumenten, aber auch als Primärproduzenten beteiligt. Destruenten bauen organische Kohlenstoffverbindungen ab und ermöglichen über Mineralisierung eine Rezyklierung des Kohlenstoffs. Mit dem Kohlenstoffkreislauf sind die Kreisläufe des Stickstoffs, Schwefels und anorganischer Verbindungen, welche als Elektronendonatoren oder –akzeptoren dienen können, verbunden. Zum besseren Verständnis des mikrobiellen Wachstums, der Physiologie und der Ökologie wurden in den letzten 100 Jahren enorme Fortschritte in der Kultivierung und molekularbiologischen Analyse von Bakterien gemacht. Angefangen mit der Ära von Robert Koch begann die Isolierung einzelner Bakterien und deren Charakterisierung. Die Kultivierung einzelner Reinkulturen, aber auch die enormen Fortschritte der Genomforschung in den letzten Jahrzehnten, haben dazu beigetragen, das Verständnis der metabolischen Vielfalt von Bakterien zu erweitern (Schlegel et al., 1999).

### 1. Vorkommen und Abbau aromatischer Verbindungen

Aromatische Verbindungen kommen in einer Vielzahl verschiedener natürlich vorkommender Stoffe (Aminosäuren, Chinone etc.) und Polymere (Lignin, Melanin) vor. Die Mineralisierung wird fast ausschließlich von Mikroorganismen übernommen. Der Abbau in Gegenwart von Sauerstoff ist seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt. Aufgrund der hohen Stabilität des aromatischen Ringsystems, hervorgerufen durch die Resonanzenergie und die inerten C-H und C-C Bindungen, galt Sauerstoff als starker Reaktant für die Aktivierung der Verbindungen für lange Zeit als unerlässlich (Widdel and Rabus, 2001; Boll et al., 2002). Daher wurde ein anaerober Abbau dieser Verbindungen lange ausgeschlossen. Mit Ende der

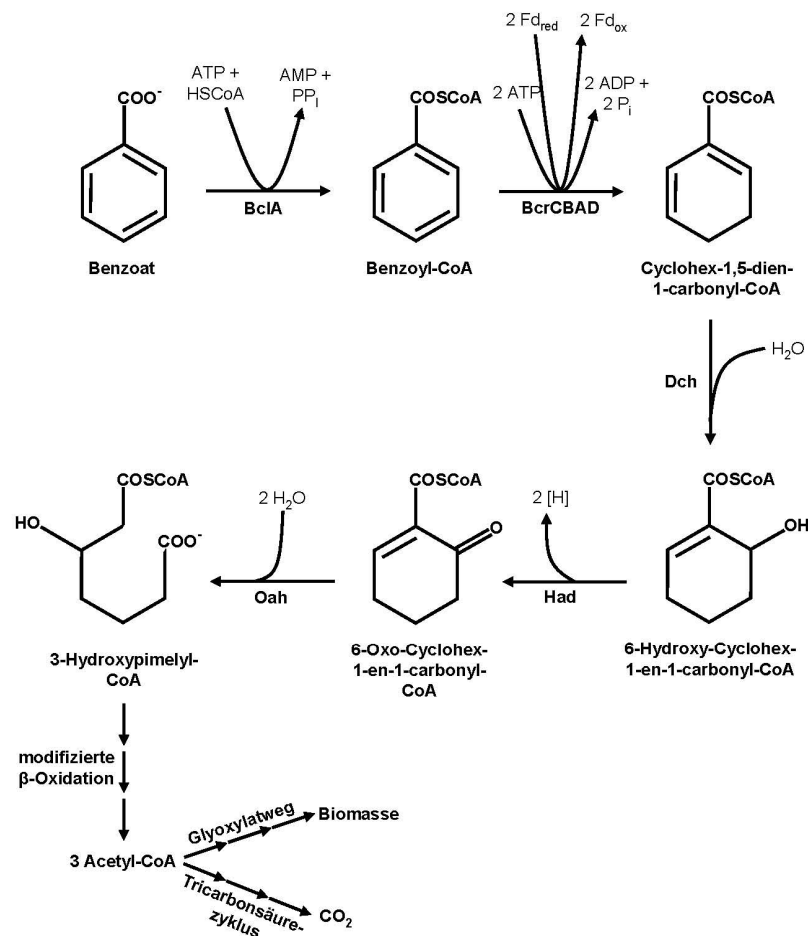
1980er Jahre konnte bei immer mehr Mikroorganismen ein anaerober Abbau gesättigter und aromatischer Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. Zurzeit sind vier verschiedene Typen von aromatischen Stoffwechselwegen bekannt (Fuchs, 2008): (i) Im aeroben Abbau erfolgt eine oxidative Ringöffnung mit Hilfe von Sauerstoff als Kosubstrat. (ii) Eine Hybrid-Form des aeroben Metabolismus wird von einigen fakultativ anaeroben Bakterien in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt. Bei diesem Stoffwechselweg wird der Coenzym A Thioester des Substrats verwendet und der aromatische Ring ohne Sauerstoff geöffnet. Vermutlich wird hierbei eine Reduktase für die Dearomatisierung des Rings verwendet. (iii) In Abwesenheit von Sauerstoff wird von einigen fakultativ anaeroben Mikroorganismen eine reduktive Dearomatisierung durchgeführt. Hierbei wird Benzoyl-Coenzym A durch eine Reduktase unter ATP-Verbrauch reduktiv dearomatisiert. Das verbleibende Ringsystem wird anschließend hydrolytisch geöffnet. Dieser Abbauweg wird auch von dem Stamm EbN1 verwendet. (iv) In strikt anaeroben Bakterien operiert eine noch wenig charakterisierte Benzoyl-Coenzym A Reduktase, welche einen noch unbekanntem Mechanismus der Dearomatisierung einsetzt (Fuchs, 2008).

## **2. „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1**

Das denitrifizierende Bakterium „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 gehört zur *Aromatoleum/Azoarcus/Thauera* Gruppe der  $\beta$ -Proteobakterien und wurde aus Schlammproben Bremer Gräben und der Weser isoliert (Rabus and Widdel, 1995). Die Genomanalyse vom Stamm EbN1 zeigte das große metabolische Potential dieses Organismus, vor allem in Hinblick auf den anaeroben Abbau aromatischer Verbindungen (Rabus et al., 2005a). Im Folgenden konnten genomisch vorhergesagte Abbauwege für aromatische und aliphatische Verbindungen proteomisch bestätigt werden (Wöhlbrand et al., 2007). Für den Stamm EbN1 konnte gezeigt werden, dass Benzoat unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen abgebaut werden kann (Rabus and Widdel, 1995), wobei in beiden Wegen unterschiedliche Enzyme verwendet werden.

## **3. Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA als zentrale Intermediate im anaeroben Aromatenabbau**

Benzoat stellt in seiner aktivierten Form, dem Benzoyl-Coenzym A, ein zentrales Intermediat im anaeroben Aromatenabbau dar (Carmona et al., 2009). Daher eignet sich Benzoat sehr gut



**Abbildung 1: Anaerober Abbau von Benzoat in Stamm EbN1.** Dargestellt ist der Benzoyl-CoA-Weg bis zur modifizierten  $\beta$ -Oxidation und der weitere Weg des intermediär gebildeten Acetyl-CoA. Enzyme: **BclA**, Benzoyl-CoA Ligase; **BcrCBAD**, Benzoyl-CoA Reduktase; **Dch**, Cyclohexa-1,5-dien-1-carbonyl-CoA Hydratase; **Had**, 6-Hydroxycyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA Dehydrogenase; **Oah**, 6-Oxocyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA Hydrolase; **Fd**, Ferredoxin

als Modellsubstrat für die Untersuchung der Regulation des anaeroben Aromatenabbaus. In Stamm EbN1 sind die Gene für die Aufnahme und den Abbau von Benzoat in einem großen Gencluster organisiert (Rabus et al., 2005a). Für den Transport von Benzoat über die Cytoplasmamembran sind zwei Wege denkbar. Bei einem System handelt es sich um den Protonen-Symporter BenK. In *Acinetobacter* sp. Dient dieses System der Aufnahme von Benzoat unter oxischen Bedingungen (Collier et al., 1997). Eine zweite Möglichkeit könnte über einen ABC-Transporter (ABC = ATP-binding cassette) bestehen. Gene für beide möglichen Transportsysteme konnten im Gencluster des anaeroben Benzoatabbaus gefunden werden (Rabus et al., 2005a).

Die enzymatischen Reaktionen des Benzoatstoffwechsels sind in der Abbildung 1 dargestellt. Innerhalb der Zelle wird Benzoat von einer Benzoat-CoA Ligase aktiviert zu Benzoyl-Coenzym A (Rabus et al., 2005a; Fuchs, 2008). Im Anschluss wird zunächst der Ring reduktiv dearomatisiert, wodurch Cyclohexa-1,5-dien-1-carbonyl-CoA entsteht. Diese Reaktion wird von der Benzoyl-CoA Reduktase katalysiert. Es werden insgesamt zwei Elektronen auf den aromatischen Ring übertragen, wobei pro Elektron ein ATP hydrolysiert wird (Boll et al., 2002). Die Elektronen stammen im Falle von EbN1 vermutlich wie bei *Thauera aromatica* von einer 2-Oxoglutarat:Ferredoxin Oxidoreduktase (Dorner and Boll, 2002; Rabus et al., 2005a). In *T. aromatica* folgen eine Hydratisierung zu 6-Hydroxycyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA, katalysiert durch die Cyclohexa-1,5-dien-1-carbonyl-CoA Hydratase (Laempe et al., 1998), eine Oxidation zu 6-Oxocyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA durch eine Dehydrogenase (Laempe et al., 1999) und die hydrolytische Ringspaltung zu 3-Hydroxypimelyl-CoA. Letztere Reaktion wird durch die 6-Oxocyclohex-1-en-1-carbonyl-CoA Hydrolase katalysiert (Laempe et al., 1999). Die Gene für alle genannten Enzyme finden sich auch in Stamm EbN1 (Rabus et al., 2005a). 3-Hydroxypimelyl-CoA wird über eine modifizierte  $\beta$ -Oxidation zu drei Acetyl-CoA abgebaut (Carmona et al., 2009), die direkt in den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) einfließen und zu CO<sub>2</sub> abgebaut werden können. Ein Teil des Acetyl-CoA wird vermutlich über den Glyoxylatweg zur Biosynthese verwendet, wie es auch für *Azoarcus evansii* vorgeschlagen wurde (Ebenau-Jehle et al., 2003). Gene des Glyoxylatwegs finden sich ebenfalls im Genom von Stamm EbN1 (Rabus et al., 2005a).

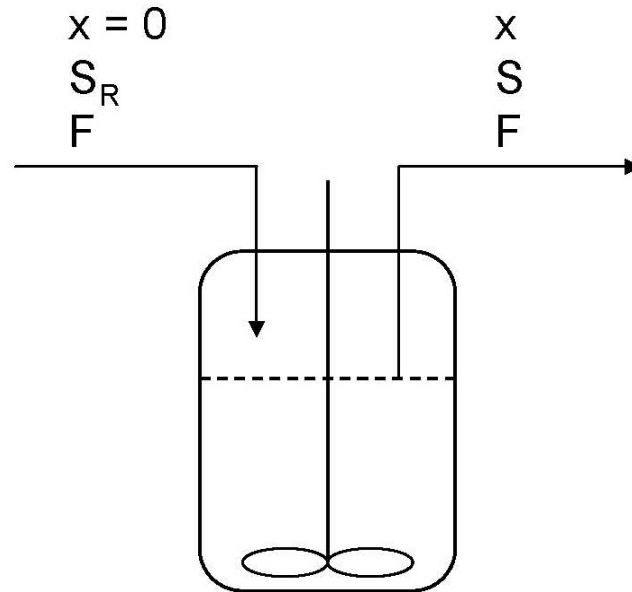
Über die Regulation der Genexpression des anaeroben Benzoatabbaus ist noch nicht viel bekannt. Jedoch konnte kürzlich die Funktion des Regulatorproteins BzdR im nahverwandten *Azoarcus* sp. Stamm CIB aufgeklärt werden (Barragán et al., 2005). Eine BzdR-homologe Sequenz konnte auch im Benzoatoperon vom Stamm EbN1 identifiziert werden (Rabus et al., 2005a). Das Operon für den anaeroben Benzoatabbau steht bei *Azoarcus* sp. CIB unter der Kontrolle des P<sub>N</sub> Promotors (Barragán et al., 2004). Der Repressor BzdR kontrolliert dabei das Benzoatoperon negativ durch Repression des P<sub>N</sub> Promotors, wenn kein Benzoat vorliegt. Die Genexpression wird jedoch nicht durch Benzoat selbst induziert, sondern durch das erste Zwischenprodukt Benzoyl-CoA, welches durch Bindung an BzdR die Repression aufhebt (Barragán et al., 2005).

Acetat ist ein häufig in anoxischen Habitaten anzutreffendes Fermentationsprodukt (Lovley and Chapelle, 1995). In aktiver Form (Acetyl-CoA) steht es an einer Schlüsselposition im

Zentralstoffwechsel. In Stamm EbN1 wird Acetat vermutlich durch einen im Genom gefundenen Natrium-Symporter in die Zelle transportiert (Tamang et al., 2009). Im Cytoplasma angelangt, wird Acetat unter Hydrolyse eines ATP zu Acetyl-CoA aktiviert. Die Reaktion wird durch das Enzym Acetyl-CoA Synthetase katalysiert (Starai and Escalante-Semerena, 2004). Über Kondensation mit Oxalacetat fließt das Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus ein und wird zu zwei Molekülen CO<sub>2</sub> oxidiert (Rabus et al., 2005a). Die vollständige Oxidation des Acetats zu CO<sub>2</sub> stellt dem Bakterium pro Molekül Acetat acht Elektronen zur Verfügung. Während des anaeroben Wachstums von Stamm EbN1 werden die Elektronen unter Generierung eines Protonengradienten auf Nitrat bzw. Intermediate der Denitrifikation übertragen. Der Protonengradient wird zur Bildung von ATP über Elektronentransportphosphorylierung genutzt. Es finden sich beim Stamm EbN1 auch Gene für Phosphotransacetylase (*pts*) und Acetat Kinase (*ackA*), Enzyme die für eine Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat genutzt werden können (Rabus et al., 2005a). Hierdurch kann ATP über Substratstufenphosphorylierung gewonnen werden.

#### **4. Kontinuierliche Kultivierung: Der Chemostat**

Die kontinuierliche Kultivierung im Chemostaten bietet die Möglichkeit, Stoffwechselwege und deren Regulation über verschiedene künstlich eingestellte Wachstumsraten zu verfolgen. Sie basiert auf Monods früher Arbeit zur Kinetik mikrobiellen Wachstums (Monod, 1949). Neben Monod leisteten auch Novick, Szilard und Herbert fundamentale Arbeit auf dem Gebiet der Chemostatentheorie (Monod, 1950; Novick and Szilard, 1950; Herbert et al., 1956). Bei dieser Form der Kultivierung handelt es sich um ein offenes kontinuierliches Kultivierungssystem im Gegensatz zur geschlossenen statischen Batchkultivierung. Der Unterschied besteht in der kontinuierlichen Zufuhr von Nährstoffen gekoppelt mit gleichzeitigem Ableiten von Kulturbrühe, so dass das Kulturvolumen (V) über den gesamten Inkubationszeitraum konstant bleibt (Abbildung 2). Das Wachstum der Mikroorganismen wird von einem essentiellen Nährstoff begrenzt, welcher in einer limitierenden Konzentration vorliegt. D. h. das bakterielle Wachstum befindet sich, bezogen auf eine „normale“ Wachstumskurve, am Übergang zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Der Verlauf der kontinuierlichen Kultivierung wird dabei von der Verweilzeit der Partikel oder Moleküle und von der Kinetik der Reaktion bestimmt (Herbert et al., 1956). In einem



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Chemostaten.** Dargestellt ist das Kulturgefäß mit einigen Parametern in Bezug auf das zugeführte Medium und die abgeführte Kulturbrühe.  $x$ , Biomassekonzentration;  $S_R$ , Konzentration des limitierenden Substrats im zugeführten Medium;  $S$ , verbleibende Substratkonzentration;  $F$ , Flussrate.

Chemostat können Mikroorganismen unter definierten und konstanten Nährstoff- und Umweltverhältnissen in einem stabilen Fließgleichgewicht, dem sogenannten „Steady State“, untersucht werden (Herbert et al., 1956).

In diesem Versuch wird ein permanent durchmischter Chemostat verwendet, in den kontinuierlich steriles Medium zu- und im gleichen Maße Kulturbrühe abgeführt wird. Das Kulturvolumen ( $V$ ) bleibt dabei konstant. Es wird hier angenommen, dass einströmendes Medium aufgrund der Durchmischung sofort gleichmäßig im Chemostatengefäß verteilt wird (Demain et al., 1999). Die Verweilzeit in einer solchen Kultur wird als Verhältnis zwischen Flussrate ( $F$ ) und dem Kulturvolumen ( $V$ ) angegeben und als Verdünnungsrate ( $D$ ) bezeichnet:

$$D = F/V \quad (1)$$

d. h. die Anzahl der kompletten Volumenaustausche pro Stunde. Die mittlere Verweilzeit ( $\tau$ ) eines Partikels im Kulturgefäß ist daher definiert durch Gleichung 2 (Herbert et al., 1956).

$$\tau = 1/D \quad (2)$$

Die mittlere Verweilzeit ( $\tau$ ) beschreibt die Zeit, die für einen kompletten Volumenaustausch im Kulturgefäß, in Bezug auf die jeweilige Flussrate, benötigt wird. Die Auswaschrage, d. h. die Verringerung der Biomassekonzentration im Kulturgefäß über die Zeit, ist definiert durch

$$-\frac{dx}{dt} = D \cdot x \quad (3)$$

wobei  $x$  der Konzentration der Organismen im Kulturgefäß entspricht (Herbert et al., 1956). Um das Wachstum von Bakterien in einem solchen System beschreiben zu können, bedarf es einer Erklärung des Wachstumsprozesses. Das exponentielle Wachstum ist definiert durch die folgende Gleichung

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} = \mu = \frac{\log_e 2}{t_d} \quad (4)$$

Dabei ist  $\mu$  die spezifische Wachstumsrate und  $t_d$  die Verdopplungszeit (Verhulst, 1845, 1847; Herbert et al., 1956; Richards, 1959). Monod (1949) entwickelte ein vom klassischen abweichendes Konzept, in dem er ein Wachstums-kontrollierendes („limitierendes“) Substrat implizierte. Diese Verbindung zwischen Wachstumsrate und Substratverwertung beschreibt die Wachstumsrate als Funktion des Wachstums-kontrollierenden Substrates. Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  ist proportional zur Substratkonzentration, wenn diese gering ist, erreicht jedoch einen limitierenden Sättigungswert bei hohen Substratkonzentrationen gemäß der Gleichung:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (5)$$

dabei ist  $S$  die Substratkonzentration,  $\mu_{\max}$  die maximale spezifische Wachstumsrate und  $K_S$  die Substrataffinitätskonstante.  $K_S$  entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximalem Wachstum (Monod, 1949). Die von Monod beschriebenen Gleichungen und Konstanten können gleichermaßen auf kontinuierliche Kultivierungen angewandt werden, wenn keine Produkthemmung vorliegt (Herbert et al., 1956; Demain et al., 1999).

Betrachtet man das Wachstum von Bakterien in einer ideal gemischten kontinuierlichen Kultur, bei der im einströmenden Medium eine einzige Kohlenstoffquelle (z.B. Acetat) in einer definierten Konzentration ( $S_R$ ) vorliegt und alle anderen Substrate im Überschuß vorhanden sind, dann ist die Versorgung mit dieser Kohlenstoffquelle der einzige Wachstums-limitierende Faktor. Die Wachstumskontrolle erfolgt daher über die Substrat-



konzentration im einströmenden Medium und über die Flussrate (Herbert et al., 1956). Das Wachstum der Bakterien ist definiert durch die Gleichung 4 und die gleichzeitige Auswaschrage durch die Gleichung 3. Daraus folgt für die Nettozunahme an Zellmasse (wenn Zellsterben vernachlässigbar gering und das einströmende Medium steril ist):

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - D \cdot x \quad (6)$$

Wenn die Änderung der Zellmasse über die Zeit null ist, befindet sich das System im Steady State. In diesem Zustand ist  $\mu$  gleich  $D$ , d. h. die spezifische Wachstumsrate entspricht der Verdünnungsrate. Der Steady State ist definiert als der Zustand, bei dem keine Änderungen des Systems (Substratkonzentration, Biomasse etc.) zu beobachten sind (Demain et al., 1999). Durch Variation von  $S_R$  und  $D$  läßt sich theoretisch eine unbegrenzte Anzahl verschiedener Steady States einstellen (Herbert et al., 1956). Die Verdünnungsrate beeinflusst auch die Substratkonzentration im Kulturgefäß, da  $\mu$  von  $S$  abhängig ist. Wie für die Änderung der Zellmasse, läßt sich die Nettoänderung der Substratkonzentration ähnlich beschreiben (Demain et al., 1999):

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_R - D \cdot S - q_S \cdot x \quad (7)$$

Dabei ist  $q_S$  die spezifische Substrataufnahmerate. Der letzte Term der Gleichung 7 kann auch in Bezug auf den Ertrag an Biomasse mit dem jeweiligen Substrat umgeformt werden (Demain et al., 1999). Dann folgt aus Gleichung 7:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_R - D \cdot S - \frac{\mu \cdot x}{Y_{X/S}} \quad (8)$$

Der Wachstumsertrag  $Y_{X/S}$  ist wie folgt definiert (Demain et al., 1999):

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} \quad (9)$$

Befindet sich die Kultur im Steady State, so gilt für Gleichung 6 und 7 bzw. 8, dass  $dx/dt = dS/dt = 0$  ist (Herbert et al., 1956). Die Steady State-Werte für  $x$  (Biomasse) und  $S$  (Substrat) können durch folgende Gleichungen ausgedrückt werden.

$$\tilde{S} = K_S \left( \frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (10)$$

und

$$\tilde{x} = Y_{X/S}(S_R - \tilde{S}) = Y_{X/S} \left\{ S_R - K_S \left( \frac{D}{\mu_{\max} - D} \right) \right\} \quad (11)$$

Die Parameter gekennzeichnet mit dem Symbol  $\sim$  entsprechen den Steady State-Werten. Die Gleichungen 11 und 12 entstehen durch Einsetzen der Gleichung 6 in die Gleichungen 7 und 9 und Auflösen nach  $dx/dt = dS/dt = 0$ . Dabei wird angenommen, dass  $S_R$  und  $D$  konstant gehalten werden und demnach spezifische Werte für  $x$  und  $S$  existieren (Herbert et al., 1956). Die Konzentration von  $S$ , also die im Kulturüberstand verbleibende Substratkonzentration, steigt langsam mit geringen Werten von  $D$  und schnell je näher sich  $D$  an  $\mu_{\max}$  annähert (Demain et al., 1999).

Wie zuvor erwähnt wurde, lassen sich mit einem Chemostaten theoretisch unendlich viele verschiedene Steady States einstellen. Die Kultur benötigt jedoch für das Erreichen eines Steady States eine gewisse Zeit. Festgemacht wird ein Steady State an den bereits oben erwähnten Parametern, wie etwa der Biomasse oder der verbleibenden Substratkonzentration im Kulturüberstand, es sollten jedoch so viele Parameter wie möglich mit einbezogen werden (Demain et al., 1999). In der Literatur wurden verschiedene mittlere Verweilzeiten ( $\tau$ ) beschrieben, nach denen sich ein Steady State eingestellt hat (Herbert et al., 1956; Postma et al., 1989; Menzel et al., 1996; Xiu et al., 1998). Hier wird ein Steady State nach erst  $8 \cdot \tau$  angenommen.

Chemostatstudien mit Reinkulturen wie auch Kulturgemischen sind ideale Systeme, um bakterielles Verhalten unter umweltnahen Bedingungen zu untersuchen (Kovarova-Kovar and Egli, 1998).

## 5. Linearisierungsverfahren: Bestimmung der Parameter $\mu_{\max}$ und $K_S$

Klassische Modelle zur Beschreibung mikrobiellen Wachstums berücksichtigen allein die Zunahme an Zellmasse über einen bestimmten Zeitraum mit einer spezifischen Rate  $\mu$ , der Wachstumsrate (Verhulst, 1845, 1847; Richards, 1959). Wie oben erwähnt wurde, entwickelte Monod (1949) ein neues Modell, welches ein Wachstums-kontrollierendes („limitierendes“) Substrat einbezog (Gleichung 5). Bei einer Auftragung von  $\mu$  gegen  $S$  resultiert aus Gleichung 5 eine rektangulären Hyperbel mit Asymptoten bei  $\mu = \mu_{\max}$  und  $S = -K_S$ . Da die Asymptoten nicht dicht genug angelegt werden können, ist es folglich nicht möglich,  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  akkurat

von so einer Kurve zu bestimmen (Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974). Hierzu wurden in der Enzymkinetik häufig Linearisierungsverfahren verwendet (Hanes, 1932; Lineweaver and Burk, 1934; Eadie, 1942; Hofstee, 1952). Da diese auf geraden Linien basieren, sind sie leicht zu konstruieren und benötigen keine komplizierten Berechnungen (Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974). Meistens ist es eine der folgenden drei linearen Transformationen der Gleichung 6, welche von Woolf (1932) erstmals in „Allgemeine Chemie der Enzyme“ vorgestellt wurden (Haldane and Stern, 1932). Diese Verfahren zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) und maximalen Geschwindigkeit der Enzymreaktion ( $v_{max}$ ) (Michaelis and Menten, 1913) finden ebenso Verwendung bei der Bestimmung vergleichbarer Parameter beim Wachstum bakterieller Kulturen (Zevenboom and Mur, 1981; El Hassan et al., 1985; Postma et al., 1988; Esteve-Núñez et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Parameter  $\mu_{max}$  und  $K_S$  geringfügig voneinander beeinflusst werden (Lobry et al., 1992). Daher wurde bereits vorgeschlagen, ein Verhältnis von  $\mu_{max}/K_S$  als vergleichbaren Parameter zu verwenden (Healey, 1980). Das Verhältnis wird auch als spezifische Affinität bezeichnet und vereinigt die enzymatische Substrataufnahmerate mit dem mikrobiellen Wachstum.

### 5.1 Lineweaver/Burk Verfahren

Lineweaver und Burk (1934) brachten die Gleichung 5 in eine lineare Form, indem sie von beiden Seiten der Gleichung den Reziprokwert bildeten (Lineweaver and Burk, 1934). Daraus ergibt sich für die Gleichung 5:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (12)$$

Wird nun  $1/\mu$  gegen  $1/S$  aufgetragen, schneidet die Gerade die Ordinate im Punkt  $1/\mu_{max}$  und die Steigung ist  $K_S/\mu_{max}$ . Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich diese Methode bei ungewichteten Daten nicht eignet, da kleine Fehler bei niedrigen Wachstumsraten zu großen Fehlern in  $1/\mu$  führen. Gegenzugliches gilt für große Fehler bei hohen Werten, wodurch die Gefahr der Verzerrung hin zu niedrigen Messdaten besteht. Außerdem besteht die Gefahr, dass diese Methode künstlich die natürliche Streuungen der Messdaten verfälscht (Dowd and Riggs, 1965).

## 5.2 Hanes Verfahren

Multipliziert man Gleichung 12 mit der Substratkonzentration S ergibt sich:

$$\frac{S}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} S + \frac{K_S}{\mu_{\max}} \quad (13)$$

Eine Auftragung von  $S/\mu$  gegen S führt zu einem Schnittpunkt mit der y-Achse der  $K_S/\mu_{\max}$  entspricht. Zusätzlich schneidet die Gerade die x-Achse bei  $-K_S$  und zeigt einen Anstieg von  $1/\mu_{\max}$ . Diese Methode wurde unter anderem von Hanes (1932) zur Bestimmung der Parameter in enzymatischen Reaktionen verwendet. Sie zeigt im Gegensatz zur doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk den Vorteil, dass Fehler gleichermaßen übernommen werden und nur eine leichte Tendenz der Fehlerverzerrung bei hohen Messwerten besteht (Dowd and Riggs, 1965; Cornish-Bowden, 1979). Problematisch bei diesem Verfahren ist, dass die eigentlich unabhängige Variable S auf beiden Seiten der Gleichung auftaucht, was unweigerlich zu einer Korrelation führt (Dowd and Riggs, 1965).

## 5.3 Eadie/Hofstee Verfahren

Ein weiteres Verfahren wurde von Eadie bzw. Hofstee verwendet (Eadie, 1942; Hofstee, 1952). Hierfür werden beide Seiten der Gleichung 12 mit  $\mu$  und  $\mu_{\max}$  multipliziert, was zu folgender Gleichung führt.

$$\mu = -K_S \frac{\mu}{S} + \mu_{\max} \quad (14)$$

Wird nun  $\mu$  gegen  $\mu/S$  aufgetragen, schneidet die resultierende Gerade die Y-Achse bei  $\mu_{\max}$  und die X-Achse bei  $\mu_{\max}/K_S$ . Die Steigung der Geraden entspricht  $-K_S$ . Wie bei dem Verfahren, welches von Hanes (1932) angewendet wurde, taucht auch hier die abhängige Variable  $\mu$  auf beiden Seiten der Gleichung auf, was unweigerlich zu einer gewissen Korrelation der Messdaten führt und beide Variablen durch Fehler von  $\mu$  beeinflusst werden (Wilkinson, 1961; Dowd and Riggs, 1965).

Bei der Verwendung von linearen Transformationen sollte man sich der statistischen Probleme bewusst sein, die bei dieser Transformation auftreten können.  $K_S$  und  $\mu_{\max}$  können durch diese Transformationen signifikant beeinflusst werden (Cornish-Bowden, 1979). Verschiedene Arbeiten überprüften die Verfahren auf ihre statistische Anwendbarkeit und zeigten, dass alle drei Verfahren statistisch unzureichend sind und nur mit einer speziellen

Gewichtung der Messdaten verlässliche Ergebnisse lieferten (Johansen and Lumry, 1961; Wilkinson, 1961; Dowd and Riggs, 1965).

#### 5.4 Eisenthal/Cornish-Bowden Verfahren

Eisenthal und Cornish-Bowden stellten ein einfaches grafisches Verfahren zur Bestimmung von  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  vor, welches die statistische Problematik der Transformation umgeht und keiner komplizierten Berechnungen bedarf (Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974). Für jeden Messpunkt wird die Position der Einzeldaten  $S$  und entsprechendem  $\mu$ -Wert auf der  $K_S$ - bzw.  $\mu_{\max}$ -Achse markiert. Es gilt dabei:  $K_S = -S$  und  $\mu_{\max} = \mu$ . Beide Punkte werden durch eine Linie verbunden. Im Idealfall treffen sich alle Linien in einem Punkt. Dieser Punkt hat die Koordinaten  $(K_S, \mu_{\max})$  und liefert so die Daten der beiden Konstanten  $K_S$  und  $\mu_{\max}$  (Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974). Basierend hierauf kann die Gleichung 5 wie folgt umgestellt werden:

$$\frac{\mu_{\max}}{\mu} - \frac{K_S}{S} = 1 \quad (15)$$

Dadurch stehen  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  in linearem Bezug zueinander,  $\mu$  und  $S$  bleiben jedoch unabhängig voneinander. Aufgrund von Messungenauigkeiten gibt es in der Regel keinen gemeinsamen Schnittpunkt der gemessenen Daten. Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) stellten daher ein Verfahren vor, mit dem die bestmöglichen Werte für  $K_S$  und  $\mu_{\max}$  bestimmt werden können. Jeder Schnittpunkt zweier (oder mehrerer) Linien liefert einen bestimmten Wert für  $K_S$  und  $\mu_{\max}$ . Diese werden auf der  $K_S$ - und  $\mu_{\max}$ -Achse markiert und der Median aller Punkte wird als bestmögliche Annäherung an die zu bestimmenden Parameter berechnet (Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974). Es konnte gezeigt werden, dass sich der Median hier besser eignet, da dieser im Gegensatz zum Mittelwert ohne eine Gewichtung der Messdaten auskommt (Bowley, 1928). Auch diese Methode fand bereits Verwendung zur Bestimmung kinetischer Parameter in Chemostatenstudien (Wick et al., 2002).

#### 6. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das anaerobe Wachstum des denitrifizierenden Bakteriums „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten mit Acetat als limitierendes Substrat charakterisiert werden. Anhand verschiedener Parameter (s. Material und Methoden) soll das

Wachstum über mehrere eingestellte Verdünnungs- bzw. Wachstumsraten verfolgt werden. Dabei werden morphologische Besonderheiten wie auch physiologische Parameter beobachtet und ausgewertet. Über die Ergebnisse sollen wachstumsspezifische Parameter wie  $K_S$ ,  $\mu_{\max}$  und  $Y_{X/S}$  bestimmt werden und, wenn möglich, auch assimilatorische und dissimilatorische Verhältnisse bezogen auf den Kohlenstoff geklärt werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Wachstumscharakterisierung mit Acetat als limitierendem Substrat sollen Substratwechsel-Experimente (Substratshift-Experimente) im Chemostaten durchgeführt werden. Bei diesem Versuch werden die Bakterien mit einer Verdünnungsrate von  $0,12 \text{ h}^{-1}$  auf Acetat bis zum Erreichen des Steady States kultiviert. Nachdem dieser erreicht ist, wird das verwendete Medium durch ein Medium mit Benzoat als zusätzlichem Substrat ersetzt. Die Konzentrationen der anderen im Medium enthaltenen Komponenten sind dabei äquivalent zu denen im vorangegangenen Medium. Unter sterilen Bedingungen sollte sich die Benzoatkonzentration im Chemostaten langsam erhöhen, bis sich die Mediumkonzentration im Chemostaten eingestellt hat. Um dies zu untersuchen, wird zusätzlich ein steriles Kontrollexperiment im Chemostaten durchgeführt, bei dem der Konzentrationsaufbau des Benzoats verfolgt wird. Über die Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die Induktion des Benzoatstoffwechsels gewonnen werden.

## B Material und Methoden

### 1. Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen und hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ bzw. „reinst“.

Die folgenden Gase der Firma Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) wurden verwendet: N<sub>2</sub> (99,999 %), CO<sub>2</sub> (99,995 %), N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90/10, vol/vol) und He (99,999 %).

### 2. Mikrobiologische Methoden

#### 2.1 Organismus

Bei dem in dieser Studie verwendeten Organismus handelt es sich um das denitrifizierende Bakterium „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 (Rabus and Widdel, 1995).

#### 2.2 Nährmedium

##### 2.2.1 Stammlösungen für das Mineralmedium

##### a) Spurenelementlösung (komplexiert)

Zur Herstellung der Spurenelementlösung wurden zunächst etwa 800 ml bidest. H<sub>2</sub>O vorgelegt. Unter Erwärmen wurden folgende Salze gelöst:

Na <sub>2</sub> EDTA	5200,0 mg
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2100,0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30,0 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100,0 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	190,0 mg
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	24,0 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	29,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	144,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	36,0 mg

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 2 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt und mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde auf Schraubdeckelflaschen (50 ml) verteilt und geschlossen mit Luftraum autoklaviert.

b) Selenit-Wolframat-Lösung

NaOH	400,0 mg
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	6,0 mg
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	8,0 mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde auf Schraubdeckelflaschen (50 ml) verteilt und geschlossen mit Luftraum autoklaviert.

c) Salzkonzentrat

MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	81,0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,4 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 250,0 ml

Die Lösung wurde auf Schraubdeckelflaschen verteilt und geschlossen mit Luftraum autoklaviert.

d) Vitamingemisch

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM, pH 7,1	250,0 ml
4-Aminobenzoessäure	10,0 mg
D(+)-Biotin	2,5 mg
Nicotinsäure	25,0 mg
Calcium-D(+)-Pantothenat	12,5 mg
Pyridoxolhydrochlorid	37,5 mg
DL- $\alpha$ -Liponsäure	3,8 mg



---

Folsäure	10,0 mg
2-Mercaptoethansulfonsäure	62,5 mg

Die Vitaminlösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) in autoklavierte Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert und in Alufolie verpackt bei 4°C gelagert.

e) Vitamin B<sub>12</sub>-Lösung

Cyanocobalamin	12,5 mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 250,0 ml

Die Vitaminlösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) in autoklavierte Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert und in Alufolie verpackt bei 4°C gelagert.

f) Ascorbatlösung

Für die Ascorbatlösung wurde zunächst eine ausreichende Menge bidest. H<sub>2</sub>O in Serumflaschen autoklaviert. Die Gasphase wurde anschließend durch N<sub>2</sub> ausgetauscht und mit geeignetem Butyl-Stopfen verschlossen. Nach dem Abkühlen wurden etwa 100 ml des anoxischen bidest. H<sub>2</sub>O in ein geeignetes Becherglas vorgelegt und mit N<sub>2</sub> begast. Im Eisbad wurden 19,7 ml einer 10 M NaOH-Lösung zugegeben. L-Ascorbinsäure (35,2 g) wurden anschließend gelöst und mit 2 M NaOH neutralisiert. Danach wurde die Lösung auf 200 ml mit anoxischem bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt, über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) in ein begasbares Spezialgefäß sterilfiltriert und in diesem unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 4°C dunkel gelagert.

g) Natriumbicarbonatlösung

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde in Serumflaschen verschiedener Größe mit 1/3 Luftraum abgefüllt und mit Butylstopfen und Aluminium Klemmkappen verschlossen. Anschließend wurde die Lösung über ein Spezialgerät mit CO<sub>2</sub> gesättigt und in Klemmvorrichtungen autoklaviert.

Alle Mediumzusätze wurden zusätzlich auch in autoklavierte Serumflaschen abgefüllt und mit geeigneten Butyl-Stopfen steril verschlossen. Diese dienen der Supplementierung des Mediums im Chemostaten für die, der kontinuierlichen Anzucht vorausgehenden Anzucht von Stamm EbN1 als Batch-Kultur.

### 2.2.2 Elektronendonoren und -akzeptoren

#### a) Natriumacetatlösung (1 M)

Na(CH <sub>3</sub> COO) · 3 H <sub>2</sub> O	136,1 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde in 500 ml Schraubdeckelflaschen gefüllt, die geschlossen mit Luftraum autoklaviert wurden. Von dieser Stammlösung wurden weitere Verdünnungen in bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt.

#### b) Natriumbenzoatlösung (1 M)

Na(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COO)	72,1 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 500,0 ml

Die Lösung wurde in 100 ml Schraubdeckelflaschen gefüllt, die geschlossen mit Luftraum autoklaviert wurden. Von dieser Stammlösung wurden weitere Verdünnungen in bidest. H<sub>2</sub>O angesetzt.

#### c) Natriumnitratlösung (1 M)

NaNO <sub>3</sub>	85,0 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde in 500 ml Schraubdeckelflaschen gefüllt, die geschlossen mit Luftraum autoklaviert wurden.

d) Natriumnitritlösung (0,1 M)

NaNO <sub>2</sub>	69,0 mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) in autoklavierte Schraubdeckelflaschen (50 ml) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.2.3 Weitere Lösungen

a) Natriumhydroxidlösung (10 M)

NaOH	200,0 g
bidest. H <sub>2</sub> O (im Eisbad)	ad 500,0 ml

Die Lösung wurde in ein 500 ml Polypropylengefäß gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Von dieser Stammlösung (10 M) wurde eine 2 M Lösung und eine 1 M Lösung angesetzt. Letztere wurde in 100 ml Schraubdeckelflaschen gefüllt, die geschlossen mit Luftraum autoklaviert wurden.

b) Salzsäure (1 M)

HCl (25 %)	129,9 ml
bidest. H <sub>2</sub> O (im Eisbad)	ad 1000,0 ml

Die 1 M HCl-Lösung wurde in eine 1 l Duran<sup>®</sup> Flasche (Schott AG, Mainz) gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

c) Glycerinlösung (50 % Glycerin, 20 mM MgCl<sub>2</sub>)

MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	31,0 mg
Glycerin	4725,0 mg
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 75,0 ml

Je 750 µl der Lösung wurden auf 2 ml Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) verteilt und autoklaviert. Diese Lösung wurde zur Konservierung von Stamm EbN1 bei -80°C verwendet.

d) Glucoselösung (1 M)

C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	18,0 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde auf 50 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt und mit 1/3 Luftraum autoklaviert.

e) L-Tyrosin (0,2 M)

C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	3,6 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde auf 50 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt und mit 1/3 Luftraum autoklaviert.

f) 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN)

HMN wurde in 100 ml Serumflaschen mit 1/3 Luftraum abgefüllt und mit Butylstopfen und Aluminium Klemmkappen verschlossen. Anschließend wurde die Lösung über ein Spezialgerät mit N<sub>2</sub> gesättigt und in Klemmvorrichtungen autoklaviert.

## g) Wasserunlösliche Substrate

Die wasserunlöslichen Substrate, welche später der Reinheitskontrolle über Substrattests dienten, wurden in HMN gelöst. Folgende Konzentrationen (% v/v) wurden in 50 ml HMN hergestellt.

Toluol	2,00
Ethylbenzol	2,00
<i>p</i> -Ethylphenol	0,25
Propylbenzol	2,00
<i>p</i> -Cymol	5,00
<i>m</i> -Xylol	2,00
<i>p</i> -Ethyltoluol	2,00
Hexan	5,00
Propiophenon	1,00
$\alpha$ -Terpinen	1,00
$\alpha$ -Phellandren	1,00

Die Lösungen wurden wie für HMN oben beschrieben behandelt.

2.2.4 Herstellung des anoxischen Mineralmediums

## a) Medium für die Batchkulturen

Die Kultivierung von Stamm EbN1 wurde in einem Phosphat-gepuffertem Mineralmedium durchgeführt (Tschech and Fuchs, 1987), da das typische Bicarbonat-gepufferte Medium nicht optimal mit einem offenen Kultivierungsansatz kombinierbar ist.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,1 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5,6 g/l
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,8 g/l

NaSO <sub>4</sub>	0,2 g/l
NaCl	1,0 g/l

Die hitzebeständigen Salze wurden zunächst in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst und in einen Spezialkolben mit Begasungsaufsatz (Widdel, 1980) autoklaviert und bei 85°C aus dem Autoklaven entnommen. Anschließend wurde sofort die Gasphase durch N<sub>2</sub> ausgetauscht. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden folgende Mengen der zuvor beschriebenen Stammlösungen steril zugegeben.

Spurenelementlösung (komplexiert)	1,0 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1,0 ml/l
Salzkonzentrat	1,0 ml/l
Vitamingemisch	1,0 ml/l
Vitamin B <sub>12</sub> -Lösung	1,0 ml/l
1 M NaNO <sub>3</sub>	7,0 ml/l
pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 7,3 eingestellt	
1 M Ascorbat	4,0 ml/l
1 M Na(CH <sub>3</sub> COO)	10,0 ml/l

Das Medium wurde nun über einen autoklavierten Glas-Abfüllstutzen luftblasenfrei in autoklavierte Schraubdeckelflaschen (50 ml) oder in 100 ml bzw. 200 ml Kulturflaschen abgefüllt. Letztere enthielten 1/5 Luftraum, der durch N<sub>2</sub> ausgetauscht wurde. Die Flaschen wurden dann mit autoklavierten Butylstopfen verschlossen. Das abgefüllte Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C dunkel gelagert. Für das Nitritstress-Experiment wurde das gleiche Medium verwendet, jedoch wurde kein Nitrat zugegeben.

Für die anaerobe Kultivierung von Stamm EbN1 wurden anoxische Schraubdeckelröhrchen verwendet. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen je 15 ml Medium aus den 50 ml Schraubdeckelflaschen (s. Punkt a) in sterile Schraubdeckelröhrchen überführt. Der Luftraum wurde anschließend durch N<sub>2</sub> ausgetauscht und die Röhrchen mit autoklavierten Butylstopfen und Lochdeckeln anoxisch verschlossen. Bis zur Verwendung wurden die Röhrchen bei 4°C gelagert.

Die Herstellung der Röhren für die Reanimation von Glycerinkulturen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, es wurden hierbei jedoch nur 9 ml Medium je Röhren zugegeben.

b) Medium für Chemostatenkulturen

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6 g/l
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,8 g/l
$\text{NaSO}_4$	0,2 g/l
$\text{NaCl}$	1,0 g/l

Das Mineralmedium, welches im Chemostaten zur kontinuierlichen Kultivierung verwendet wurde, enthielt nur 1/10 des Phosphatgehaltes des Batch-Mediums. Die hitzebeständigen Salze wurden zunächst in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und in 5 l Duran<sup>®</sup> Flaschen (Schott AG, Mainz) mit Seitenstutzen, Begasungsschlauch mit Begasungskerze und Abfüllschlauch autoklaviert. Anschließend wurde die Gasphase des 85°C heißen Mediums durch  $\text{N}_2$  ausgetauscht. Nach dem Abkühlen des Mediums wurden folgende Mengen der zuvor beschriebenen Stammlösungen steril zugegeben.

Spurenelementlösung (komplexiert)	1,0 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1,0 ml/l
Salzkonzentrat	1,0 ml/l
Vitamingemisch	1,0 ml/l
Vitamin B <sub>12</sub> -Lösung	1,0 ml/l
1 M $\text{NaNO}_3$	16,0 ml/l
1 M Ascorbat	4,0 ml/l
1 M $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO})$	8,0 ml/l

Das Medium wurde über den Abfüllschlauch in das Mediumreservoir umgefüllt und unter  $\text{N}_2$  Atmosphäre gelagert.

## 2.3 Kultivierung

### 2.3.1 Glycerinkulturen

Für die Glycerinkulturen wurde Stamm EbN1 zunächst anaerob von Benzoat an Acetat angepasst. Hierzu wurden drei Passagierungen in anoxischen Röhrchen mit je 15 ml Medium durchgeführt. Im Anschluss wurden zwei Passagen in 80 ml und eine weitere in 200 ml Medium durchgeführt. Als initiale Vorkultur diente eine mit 4 mM Benzoat gewachsene Kultur. Es wurde jeweils mit 5 % Inokulum gearbeitet und die Kulturen wurden bei 28°C bis zu einer OD<sub>660</sub> von etwa 0,3 inkubiert (entspricht etwa 1/2 OD<sub>max</sub>). Die 5. Passage mit Acetat wurde in 750 µl Portionen steril auf Schraubdeckelröhrchen mit 750 µl Glycerinlösung (steril) verteilt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Wiederbelebung der konservierten Kulturen wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. In das erste Röhrchen (mit 9 ml Medium mit Acetat) wurden 1,5 ml Zellen-Glyceringemisch gegeben.

### 2.3.2 Vorkulturen

Die Vorkulturen der „Acetat“-Chemostaten wurden wie bei den Glycerinkulturen beschrieben passagiert. Die letzte Passage in 200 ml Volumen diente als eigentliche Vorkultur zur Inokulierung des Chemostaten.

Für die Substratshift-Experimente wurde jeweils eine Glycerinkultur aufgetaut und als Inokulum für ein anoxisches Röhrchen mit 9 ml Medium (s.o.) verwendet. Von hier aus wurden vier Passagen in Röhrchen, eine in 80 ml Medium und eine in 200 ml Medium durchgeführt. Wobei Letztere als Inokulum für den Chemostaten diente.

### 2.3.3 Chemostat

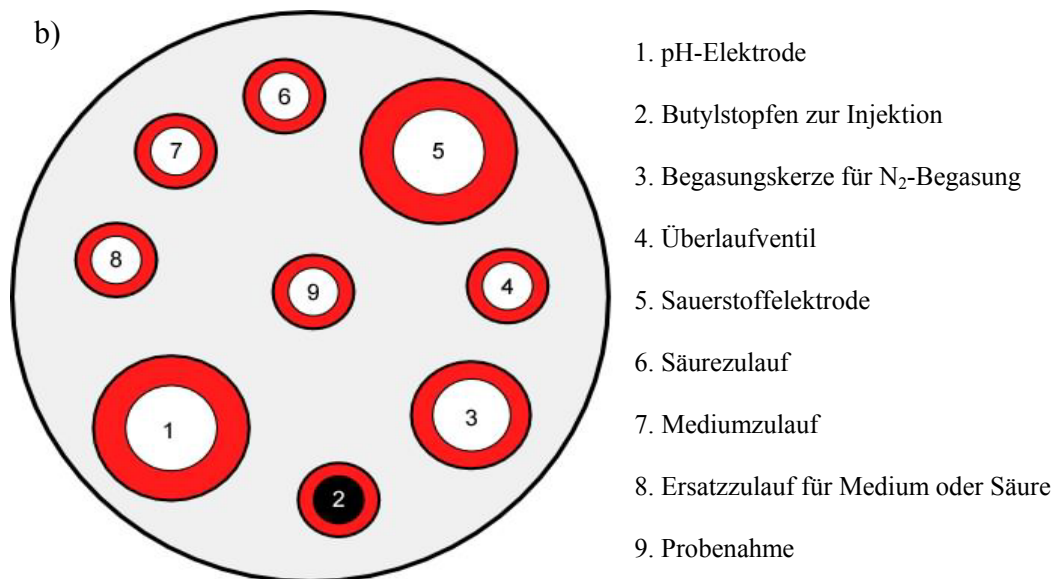
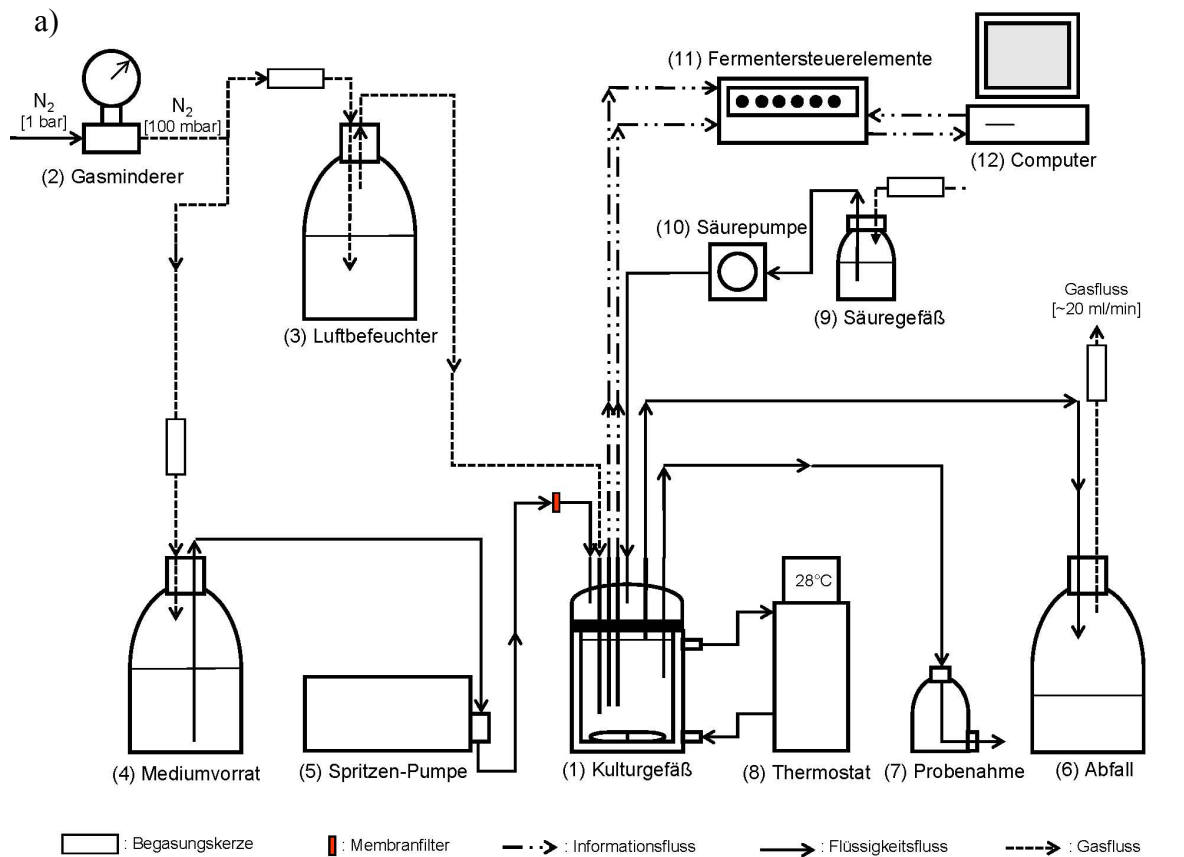
Bei sämtlichen im System verwendeten Glasflaschen handelte es sich um Duran<sup>®</sup> Flaschen (Schott AG, Mainz) verschiedenen Volumens, welche mit Butylstopfen und Lochdeckeln (Schott AG) verschlossen wurden. Für Zu- und Ablauf wurden Löcher in die Stopfen gebohrt, durch welche verschieden lange Glasstäbe (Ochs GmbH, Bovenden, Lenglern) mit einem Durchmesser von 6 mm (bzw. 5 mm für die Probenschleife) eingebracht wurden. Für die Verbindungen der einzelnen Komponenten miteinander wurden sauerstoffdichte Isoversinic Viton Schläuche (Ochs GmbH) mit einem Außendurchmesser von 8 mm und einem Innendurchmesser von 5 mm (bzw. 5 mm und 3 mm für die Probenahmeschleife) verwendet.



Die Schläuche wurden an ihren freien Enden mit verchromten Messing-Luer-Lock Schlaucholiven der Größen 4,5 mm bzw. 3 mm (Ochs GmbH) versehen. Um Kontaminationen durch die gasführenden Leitungen zu vermeiden, wurden diese mit Watte gefüllten Begasungskerzen (Tiefenfilter) (Ochs GmbH) (Abbildung 3) versehen. Alle verwendeten Gefäße wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert. Kulturgefäß und Luftbefeuchter wurden nach dem Autoklavieren direkt mit N<sub>2</sub> begast.

#### a) Aufbau des Chemostaten

Der prinzipielle Aufbau des Chemostaten ist in der Abbildung 3A schematisch dargestellt und im folgenden beschrieben. Die Kultivierung wurde in einem 1 l Kleinfärmer mit Temperiermantel (1) (Ochs GmbH) durchgeführt. Der Deckel wurde speziell wie in der Abbildung 3B dargestellt angefertigt (Ochs GmbH). Das System wurde über einen Gasreiner (2) (Tescom Europe, Selmsdorf) mit einem konstanten Druck von 100 mbar N<sub>2</sub> mit einem Durchfluss von ca. 20 ml/min begast. Das einströmende Gas wurde, um Evaporation aus dem System vorzubeugen, durch einen Luftbefeuchter (3) geleitet. Hierzu wurde eine druckfeste, beschichtete 5 l Duran<sup>®</sup> Flasche (Schott AG) mit ca. 3 l bidest. H<sub>2</sub>O befüllt und das einfließende Gas durch das Wasser geleitet, bevor es durch den Luftraum weiter zum Chemostaten befördert wurde. Das Chemostatenmedium wurde wie oben beschrieben separat vorbereitet und anschließend in ein Vorratsgefäß (4) transferiert. Bei diesem Gefäß handelte es sich um eine druckfeste 5 l Duran<sup>®</sup> Flasche (Schott AG, Mainz) mit speziellem Peek-Deckel (Sykam, Fürstfeldbruck) mit vier Anschlüssen: Der Deckel bestand aus einem Anschluss zum Auffüllen des Vorratsgefäß, einem Gaszulauf, sowie einer zur Pumpe führenden Verbindung. Bei der verwendeten Pumpe (5) handelte es sich um eine Spritzen Pumpe S1610 Syring Dosing System (Sykam). Vor der Verwendung wurden die Leitungen der Pumpe mit Methanol befüllt, um über Nacht zu sterilisieren. Um die Sterilität des Systems zu wahren, wurde zwischen der Verbindung des Pumpenschlauchs mit dem Kulturgefäß ein Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) angebracht. Dieser wurde täglich durch einen neuen Filter ersetzt. Das Medium wurde über eine abgeschnittene Pasteurpipette im Deckel des Kulturgefäßes kontrolliert abgegeben. Zur Gewährleistung eines konstanten Volumens von 1 l wurde ein 6 mm durchmessender Glasstab vor dem Autoklavieren auf Höhe des Flüssigkeitsstands im gerührten (250 rpm), komplett mit Elektroden bestückten Chemostaten justiert. Nach dem Autoklavieren wurde an diesen Überlauf eine leere, autoklavierte 5 l Abfallflasche (6) angeschlossen. Über diesen



**Abbildung 3:** a) Schema des Chemostatenaufbaus inklusive aller verwendeten Komponenten. b) Aufsicht des Kulturgefäßdeckels.

Ablauf erfolgte neben der Regulation des Kulturvolumens auch der Austritt des eingeleiteten N<sub>2</sub>-Gases. Dazu befand sich an der Flasche ein ~1 m langer Schlauch der am Ende mit einem Tiefenfilter (Ochs GmbH) versehen war. In den Butylstopfen der Begasungskerze wurde eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,4 mm angebracht, damit der Gasfluss durch das System gemindert wurde.

Für Probennahmen wurde ein 250 ml Gefäß mit am Boden angebrachtem Seitenstutzen (7) verwendet. Über einen Glasstab konnten Proben aus dem Kulturgefäß zunächst in das Probenahmegefäß geleitet werden und von hier aus wie später beschrieben entnommen werden.

Während der Kultivierung wurden Parameter wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt kontinuierlich über Elektroden erfaßt. Die pH Kontrolle erfolgte über eine pH-Elektrode (Mettler & Toledo, Urdorf, Schweiz). Temperatur und Sauerstoffgehalt wurden über eine Sauerstoffelektrode aus der InPro<sup>®</sup> 6800 Serie (Mettler & Toledo) bestimmt. Die Elektroden wurden mit einem Fermentersteuerungselement (11) (Eigenbau von V. Meyer MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen) verbunden, welches die Information an einen Computer (12) weiterleitete. Datenauswertung und Prozesssteuerung erfolgten mit Hilfe des Programms AD-98-Schreiber (V. Meyer MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen). Für die Regulation des pH-Werts wurde ein 500 ml Gefäß mit 1 M HCl (9) verwendet, welches über eine Schlauchpumpe der MA-CA Serie (10) (Ismatec, Wertheim-Mondfeld) mit dem Kulturgefäß verbunden wurde. Über eine abgeschnittene Pasteurpipette im Deckel des Kulturgefäßes, welche mit der Pumpe verbunden war, konnte kontrolliert Säure in das Kulturgefäß abgegeben werden. Der pH-Wert wurde zwischen pH 7,3-7,4 ± 0,2 gehalten. Die Temperaturregulierung erfolgte mit Hilfe eines Thermostaten J25 (8) (Julabo, Seelbach), der an den Temperiermantel des Kulturgefäßes angeschlossen war.

#### b) Animpfen des Chemostaten

Für das Animpfen des Chemostaten wurden 50 ml Vorkultur (siehe oben, OD<sub>660</sub> ≈ 0,3) anoxisch zugespritzt. Die Batchanzucht im Chemostaten wurde anschließend über Nacht bis zu einer OD<sub>660</sub> ≈ 0,5 durchgeführt. Anschließend wurde wie im Folgenden beschrieben eine Probenahme durchgeführt und die Mediumzufuhr (Pumpe), sowie die Durchmischung der Chemostatenkultur (Rührer, 250 rpm) gestartet.

## 2.4 Probennahme am Chemostaten

### 2.4.1 Lösungen für die Probenvorbereitung

a) Tris-HCl Puffer (0,1 M Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	12,1 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,0 g
pH-Wert mit 25 % HCl auf pH 7,5 eingestellt	
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde anschließend in 1 l Flaschen mit 1/3 Luftraum autoklaviert.

b) Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	8,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,2 g
bidest. H <sub>2</sub> O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde anschließend in 100 ml Flaschen mit 1/3 Luftraum autoklaviert.

### 2.4.2 Probenahme (Wachstumscharakterisierung)

Für die Probenahme am Chemostaten wurden die Schlauchklemmen der zum Probenahmegefäß führenden Schläuche kurz geöffnet, so dass das abzunehmende Volumen über Druck zum Probenahmegefäß gelangen konnte. Anschließend konnten über einen zweiten Schlauch die Proben mit Hilfe von sterilen Einwegspritzen (B. Braun, Melsungen) der Volumina 5, 10 und 20 ml entnommen werden.

Zur Bestimmung der im Nachfolgenden beschriebenen Wachstumsparameter wurden unter sterilen Bedingungen, folgende Volumina über das Probenahmegefäß (Abbildung 3A, 7) steril dem Chemostaten entnommen. Dabei wurde das Totvolumen als erstes getrennt entnommen.

Totvolumen der Probenahmeschleife	15,0 – 20,0 ml
-----------------------------------	----------------

Zellzahlbestimmung	0,5 ml
Optische Dichte bei 660 nm	1,0 ml
Proteinbestimmung	3,0 ml
FISH	4,0 ml
Mikroskopische Aufnahmen	0,1 ml
<hr/> Gesamtvolumen	<hr/> 23,6 – 28,6 ml

Für die Analyse der Substratkonzentration über Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und für den Nitrat Schnelltest Merckoquant<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) wurden folgende Volumina über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) aus dem Chemostaten abfiltriert.

Fettsäure HPLC	4,0 ml
Nitrit/Nitrat HPLC	1,0 ml
Merckoquant <sup>®</sup>	0,1 ml
<hr/> Gesamtvolumen	<hr/> 5,1 ml

Die Proben für die HPLC wurden in autoklavierte 1,5 ml bzw. 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

#### 2.4.3 Probenahme (Substratshift)

Für die Substratshift-Experimente wurden die Probenahme Bedingungen leicht verändert, um das Totvolumen der Probenahmeschleife zu verringern. Während der Anfangsphase (nur Acetat im Medium) bis zum Erreichen des Steady States wurden die Proben wie oben beschrieben weiterhin über das Probenahmegefäß entnommen. Unmittelbar vor dem Substratshift (Acetat plus Benzoat im Medium) wurde das Probenahmegefäß entfernt und die Proben wurden nun direkt vom Probenahmeschlauch entnommen.

Es wurden die folgenden Volumina entnommen.

Totvolumen der Probenschleife	6,0 ml
Zellzahl	0,5 ml

Optische Dichte bei 660 nm	1,0 ml
<hr/>	
Gesamtvolumen	7,5 ml

Zur Analyse der Substratkonzentrationen über HPLC wurden folgende Volumina ebenfalls direkt aus dem Probenschlauch abgenommen und filtriert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit gewissen Abständen durchgeführt. Hierzu wurde eine minimal größere Probenmenge entnommen.

Fettsäure HPLC	2,0 ml
Nitrit/Nitrat HPLC	1,0 ml
Aromaten Reversed Phase HPLC	2,0 ml
<hr/>	
Gesamtvolumen	5,0 ml

Die Proben für die HPLC wurden in autoklavierte 1,5 ml bzw. 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen tranferiert und bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

## 2.5 Wachstumsparameter im Chemostaten

### 2.5.1 Optische Dichte (OD)

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Chemostatenproben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 660 nm. Hierzu wurde ein UV-VIS Spektrophotometer UV mini 1240 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) verwendet. Für die Analyse wurden 500 µl Probe mit 500 µl Tris-HCl Puffer (0,1 M Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) gemischt und die OD<sub>660</sub> in Plastikküvetten gemessen. Dies wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert beider Messungen gebildet.

### 2.5.2 Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration wurde über die Trockenmasse bei jeder Flussrate im Steady State bestimmt. Zunächst wurden sechs Plastikwägeschalen bei 80°C für mindestens zwei Stunden getrocknet. Nach zehnminütigem Abkühlen wurde jede Schale fünfmal mit der Feinwaage

AG 245 (Mettler & Toledo) gewogen und die Ergebnisse notiert. Nach Erreichen des Steady States, unmittelbar vor dem Umschalten auf eine nächst höhere Flussrate, wurden 100 ml Chemostatenkultur entnommen und in ein autoklaviertes 500 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde für 30 Minuten mit 8000 rpm bei 4°C mit einem JA-10 Rotor in einer Avanti® J-26 XP Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Tris-HCl Puffer resuspendiert und auf drei der zuvor gewogenen Wägeschalen zu je 5 ml verteilt. Auf die restlichen drei Schalen wurden je 5 ml Tris-HCl Puffer gegeben. Anschließend wurden die Schalen für mindestens zwei Tage im Trockenschrank bei 80°C getrocknet und nach Erreichen der Gewichtskonstanz gewogen. Für die Bestimmung der Trockenmasse wurden die Mittelwerte der Gewichte der Schalen inklusive eingetrockneten Puffer abgezogen.

### 2.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen speziellen Objektträger aus drei Stegen, wobei der Mittlere um 0,1 mm abgesengt ist. Auf dem Mittelsteg ist das Zählnetz definierter Fläche eingraviert. Der Mittelbereich für die Zählung wird als Großquadrat bezeichnet. Dieses weist eine Kantenlänge von 1 mm auf und ist in 4 x 4 Gruppenquadrate mit einer Kantenlänge von 0,2 mm unterteilt. Jedes Gruppenquadrat ist seinerseits wiederum in 4 x 4 Kleinstquadrate mit einer Kantenlänge von 0,05 mm unterteilt. Vor der Benutzung wurde die Zählkammer, sowie das Deckglas mit bidest. H<sub>2</sub>O, 96%igem Ethanol und einem fusselfreiem Tuch gereinigt. Im Anschluss wurde das Deckglas mit etwas Druck aufgeschoben. Liegt das Deckglas korrekt auf bildet sich ein Kapillarspalt mit einer Höhe von 0,1 mm und an den Außenstegen sind Interferenz-Linien (Newton'sche Ringe) zu erkennen.

Für die Bestimmung wurden zwei geeignete Verdünnungen (meistens 1:20 und 1:30) der Kulturprobe in Tris-HCl Puffer angefertigt. Für die Zählung wurden 6 µl einer Verdünnung in die Zählkammer über Kapillarkräfte eingebracht und über ein Lichtmikroskop Axioskop (Zeiss, Jena) bei einer 400-fachen Vergrößerung analysiert. Es wurden Zellen in den 16 Gruppenquadrate gezählt und im Anschluss der Mittelwert gebildet. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde der Mittelwert der Zählung mit dem Kammerfaktor (1,25) und der Verdünnungsstufe multipliziert. Zur Absicherung wurden je zwei Verdünnungen ausgezählt.

#### 2.5.4 Mikroskopische Aufnahmen

##### a) Agar-Objektträger

Für die Fotografie der Chemostatenkultur wurden zunächst mit Agar beschichtete Objektträger angefertigt. Hierzu wurden 2,2 g Bacto™ Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in 200 ml bidest. H<sub>2</sub>O suspendiert und für 10 Minuten auf einem Magnetrührer gewaschen. Anschließend wurde, nachdem der Agar sich abgesetzt hat, der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Diese Prozedur wurde 4 bis 5 mal wiederholt, bis der Agar eine annähernd weiße Färbung zeigte. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Volumen mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert. Währenddessen wurden Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) mit Ethanol und fusselfreien Tüchern gereinigt. Nach dem Autoklavieren des Agars wurden dieser kurz gemischt und je 2-3 ml pro Objektträger gleichmäßig aufgetragen. Die Objektträger wurden anschließen zum Schutz vor Staub abgedeckt und 1-2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Am Ende sollte die Agarschicht nicht mehr zu erkennen sein.

##### b) Mikroskopische Aufnahmen

Die mikroskopischen Aufnahmen der Kultur wurde mit einem Axioplan Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) durchgeführt. Es wurden 12 µl Kultur auf einen Agarobjektträger gegeben und mit einem Deckglas versehen. Zunächst wurde bei 400-facher Vergrößerung ein geeigneter Bereich ausgewählt. Die Aufnahmen wurden bei 1000-facher Vergrößerung durchgeführt. Hierzu wurde eine Axio Cam MRc und das Programm „AxioVision“ (Zeiss, Jena) verwendet.

#### **2.6 Stamm-spezifische Substrattests**

Für Reinheitskontrollen der Chemostaten wurden Stamm-spezifische Substrattests durchgeführt (Rabus et al., 2008). Die Substrattests dienen dabei der Unterscheidung des Stammes EbN1 von dem Stamm pCyN1 und weiteren nahverwandten Stämmen, welche nicht durch die bei Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendete Oligonukleotidsonde (EbN825) differenziert werden konnten.

Bei dem Medium für die Substrattests handelt es sich im Allgemeinen um das gleiche Medium wie unter Punkt 2.2.4 a) beschrieben. Zusätzlich wurden jedoch vor dem Einstellen des pH-Wertes 10 ml Natriumbicarbonat zugegeben, welches für Carboxylierungsreaktionen



benötigt wird. Zusätzlich wurde die Begasung auf N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> umgestellt, um den pH-Wert aufrechtzuerhalten. Desweiteren wurde kein Natriumacetat zugegeben. Wasserlösliche Substrate wurden direkt bei der Herstellung der Röhren zugegeben. Bei den wasserunlöslichen Substraten wurde im Anschluss je 1 ml Trägerphase mit den unten genannten Substratkonzentration (% v/v) anoxisch zugespritzt.

**Positive Kontrolle (Stamm EbN1 spezifische Wachstumssubstrate)**

Toluol	2,00 %
Ethylbenzol	2,00 %
<i>p</i> -Ethylphenol	0,25 %
L-Tyrosin	2,00 mM

**Negative Kontrolle (Substrate, die nicht von Stamm EbN1 verwertet werden)**

Propylbenzol	2,00 %
<i>p</i> -Cymol	5,00 %
<i>m</i> -Xylol	2,00 %
<i>p</i> -Ethyltoluol	2,00 %
Hexan	5,00 %
Propiophenon	1,00 %
$\alpha$ -Terpinen	1,00 %
$\alpha$ -Phellandren	1,00 %
Glucose	5,00 mM

**Weitere Kontrollen**

Inokuliert, ohne Substrat

Nicht-inokuliert, HMN

Die Röhren für die Substrattests wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Vor der Auswaschphase des Chemostaten wurde Kulturbrühe zum Inokulieren der Röhren entnommen (800  $\mu$ l Kultur pro Röhren). Die inokulierten Röhren wurden bei 28°C inkubiert und über mindestens vier Wochen beobachtet. Dazu wurde die OD<sub>660</sub> der Röhren in einem speziellen Röhren-Spektralphotometer UV 1202 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) regelmäßig gemessen. Tyrosin wurde als Nicht-Wachstumssubstrat eingestuft, jedoch scheint der Stamm EbN1 dies abzubauen. Dies wurde bereits öfter beobachtet (K.

Trautwein, unveröffentlichte Daten) und konnte auch in diesen Experimenten bestätigt werden.

Für die Reinheitskontrolle der Substratshift-Experimente wurden nur noch zwei Röhren mit 2% Ethylbenzol und zwei mit *p*-Cymol, sowie ein Röhren ohne Substrat und ein Röhren mit nur HMN verwendet. Die Röhren wurden vor dem Inokulieren über Nacht bei 28°C auf einem Schüttler vorinkubiert. Die Wachstumskurven sind im Appendix zu finden.

## **2.7 Nitritstress-Experiment**

Das Nitritstress-Experiment wurde durchgeführt, um den Effekt hoher Nitritkonzentrationen auf die maximale spezifische Wachstumsrate von Stamm EbN1 zu untersuchen. Hierzu wurde wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben Medium und anoxische Röhren hergestellt. Das verwendete Medium war kein Nitrat-frei. Vor dem Verschließen der Röhren wurde Nitrit in 2 mM Intervallen von 6 mM bis 14 mM zugegeben. Als Referenzen für die maximale spezifische Wachstumsrate wurden Röhren mit 7 mM und 16 mM Nitrat hergestellt. Alle Ansätze bis auf die Kontrollen enthielten zusätzlich 10 mM Acetat. Es wurden pro Konzentrationsstufe drei Röhren angesetzt. Weiterhin wurden eine negativ Kontrolle ohne Acetat und Inokulum sowie jeweils zwei inokulierte Kontrollen mit 10 mM Acetat ohne Nitrit bzw. ohne Acetat mit 6 mM Nitrit durchgeführt. Als Inokulum für die Röhren diente eine der oben beschriebenen Glycerinkulturen. Diese wurde wie beschrieben passagiert, wobei das verwendete Medium anstelle von Nitrat 6 mM Nitrit enthielt. Je Röhren wurden 5 % (v/v) Inokulum einer halbmaximal gewachsenen Kultur verwendet.

Die Röhren wurden nach dem Inokulieren für acht Stunden bei 28°C inkubiert und dann etwa alle 60 Minuten für 35 Stunden in einem speziellen Röhren-Spektralphotometer UV 1202 (Shimadzu Deutschland GmbH) gemessen. Anhand der OD<sub>660</sub> Zunahme über die Zeit konnte mit Hilfe der Gleichung 5 die maximale spezifische Wachstumsrate berechnet werden (Tabelle 4). Die Wachstumskurven sind dem Appendix zu entnehmen.

### 3. Chemische und molekularbiologische Methoden

#### 3.1 Fixierung von Zellen für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Reinheitskontrolle im Chemostaten wurde, neben dem schon erwähnten Substrattest, zusätzlich mit Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Für die Fixierung der Zellen wurden zweimal 2 ml Probe aus dem Chemostaten abgenommen und für 10 Minuten mit 4000 g bei 4°C in einer Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 750 µl PBS (s.o.) gelöst, mit 250 µl Formaldehyd (4 %) versehen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Probe hin und wieder gemischt. Im Anschluss wurde die Probe erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erst in 500 µl PBS und dann in 500 µl PBS mit 500 µl Ethanol (96 % reinst) gewaschen. Anschließend wurde die Probe in 250 µl PBS und 250 µl Ethanol (96 % reinst) resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die eigentliche Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und die Zellsortierung wurde an anderer Stelle durchgeführt (Winterling, 2009).

#### 3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist ein chromatographisches Verfahren zur Auftrennung von Substanzgemischen (Analyten). Die Auftrennung erfolgt durch spezifische Interaktion des Analyten mit dem Packungsmaterial (stationäre Phase) der verwendeten Trennsäule. Die Wechselwirkung wird dabei durch das Laufmittel (mobile Phase) vermittelt. Aufgrund der Wechselwirkung wird der Transport der Einzelkomponenten durch die Säule verzögert, so dass diese erst nach einer spezifischen Zeit (Retentionszeit) die Säule verlassen. Wird während der Trennung nur ein Laufmittel verwendet, spricht man von einer isokratischen Trennung und bei einem Laufmittelgemisch von einer Gradiententrennung. Bei der HPLC wird die mobile Phase über eine Pumpe mit einer an den Durchmesser der Trennsäule angepassten Flussrate befördert (Lottspeich and Engels, 2006). Die Identifizierung und Quantifizierung wird durch Standards, entsprechende Detektionsverfahren (z. B. UV, Leitfähigkeit) und das Erstellen von Kalibrationskurven erreicht. Je nach Eigenschaften der zu analysierenden Substanz sind verschiedene Trennsäulen und Methoden verfügbar.

Die verwendeten HPLC-Systeme stammen von der Firma Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH (Fürstenfeldbruck). Die Datenauswertung wurde mit der Clarity HPLC Software (DataApex, Prag, Tschechien) durchgeführt.

### 3.2.1 Anionenaustauscher-HPLC für flüchtige Fettsäuren

Die Quantifizierung des Acetats im Medium wurde über eine HPLC mit Anionenaustauschersäule durchgeführt. Hier basiert die Trennung auf einer Interaktion der negativ geladenen Carboxylgruppe des Acetats mit positiven Ladungen des Säulenmaterials.

#### a) Analysebedingungen

Vorsäule:	Anion neutral 4 x 20 mm (Sykam GmbH)
Trennsäule:	Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany)
Laufmittel:	5 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Pumpendruck:	4,0-5,4 MPa
Säulentemperatur:	60 °C
Flussrate:	0,6 ml/min
Detektionswellenlänge:	210 nm
Signalverstärkung (Range):	0,1 oder 0,05

#### b) Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Proben wurden nach dem Auftauen für 10 Minuten mit 13.000 rpm bei 4°C in einer Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und filtriert (Acrodisc<sup>®</sup> Syringe Filters 4 mm/0.45 µm, Pall Life Sciences, Dreieich).

### 3.2.2 Anionenaustauscher-HPLC für Nitrat, Nitrit und Benzoat

Nitrat ( $\text{NO}_3$ ) und Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) im Medium wurden ebenfalls durch eine HPLC mit Anionenaustauschersäule analysiert und quantifiziert. Zusätzlich wurde mit dieser Methode die Benzoatkonzentration während der Substratshift-Experimente bestimmt, da es technische Probleme mit der Umkehrphasen HPLC gab. Diese Methode wäre um ein Vielfaches sensitiver gewesen.

#### a) Analysebedingungen

Vorsäule:	Anion neutral 4 x 20 mm (Sykam GmbH)
Trennsäule:	Anion exchange column IBJ A3, High Speed $\text{NO}_x$ , 4 x 60 mm (Sykam GmbH)
Laufmittel:	20 mM NaCl, 45 % Ethanol (v/v, 96 % reinst)
Pumpendruck:	3,0 MPa
Säulentemperatur:	50 °C
Flussrate:	1,0 ml/min
Detektionswellenlänge:	220 nm

#### b) Probenvorbereitung

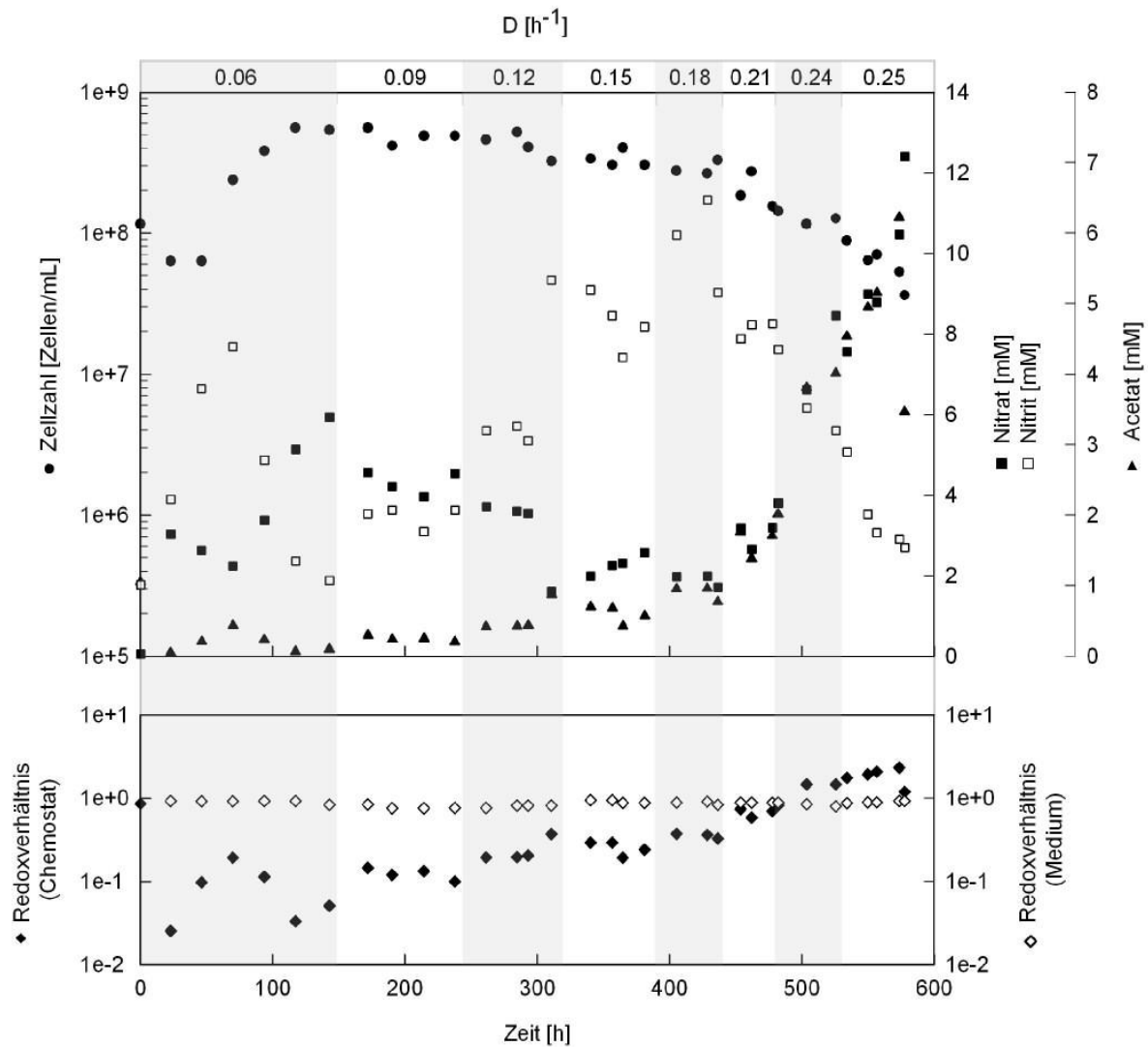
Die zu analysierenden Proben wurden nach dem Auftauen für 10 Minuten mit 13.000 rpm bei 4°C in einer Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, 1:10 mit Laufmittel verdünnt und filtriert (Acrodisc<sup>®</sup> Syringe Filters 4 mm/0.45 µm, Pall Life Sciences, Dreieich).

## C Ergebnisse und Diskussion

### 1. Charakterisierung des Acetat-limitierten anaeroben Wachstums von „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten

Für den im Folgenden beschriebenen Chemostaten wurde als primärer Parameter zur Ermittlung des Steady States die Zellzahl herangezogen. Diese eignet sich bei Weitem besser als die optische Dichte der Kultur, da bei dieser aufgrund von Änderungen der Zellgröße oder zellulären Speicherstoffen starke Schwankungen beobachtet wurden. In diesem Versuch wurde ein Steady State nach  $8 \cdot \tau$  angenommen, d.h. nach einem achtfachen Austausch des Kulturvolumens und über die Zellzahl direkt kontrolliert. Zusätzlich wurden in den Flussraten-spezifischen Steady States der DNA- und Proteingehalt über Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS) gemessen (Appendix Abbildung S6). Die Substratkonzentration im Kulturüberstand wurden über Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysiert. Zusammenfassend ist das Wachstum von Stamm EbN1 im Acetat-limitierten Chemostaten in Abbildung 4 dargestellt. Hier sind die Zellzahlen, die Acetat-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen über die Zeit und bei der entsprechenden Verdünnungsrate (D) dargestellt. Zusätzlich sind die Redoxverhältnisse (Elektronen zur Verfügung gestellt durch Elektronendonator Acetat geteilt durch Elektronen, die potentiell auf Elektronenakzeptor Nitrat bzw. Nitrit übertragen werden können) zwischen Elektronenakzeptor (Nitrat) und -donor (Acetat) im Chemostaten, sowie im zulaufenden Medium abgebildet. Diese dienen zur Veranschaulichung der Acetat-Limitation während des Versuchs. Ein Wert  $< 1$  kennzeichnet dabei eine Acetat-Limitation, d. h. es können weniger Elektronen durch Acetat-Oxidation gebildet, als durch Nitratreduktion verbraucht werden. Aufgrund der langen Inkubationszeiten (mehrere Wochen) wurde die Kontaminationsfreiheit des EbN1-Chemostaten regelmäßig überprüft. Dazu wurde Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit einer spezifischen Oligonukleotidsonde (EbN825) (Appendix Abbildung S8) sowie differenzierende Substrattests mit verschiedenen Wachstums- und Nichtwachstumssubstraten durchgeführt (Appendix Abbildung S7). Durch diese Tests lassen sich die Stämme EbN1, pCyN1 und weitere nahverwandte Stämme der Gattung „*Aromatoleum*“ differenzieren (Rabus et al., 2008).

Die anaerobe Wachstumscharakterisierung des denitrifizierenden Bakteriums „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Acetat-limitierten Chemostaten dient zur Bestimmung



**Abbildung 4: Acetat-limitiertes anaerobes Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten.** Im oberen Teil der Abbildung sind die Konzentrationen von Acetat, Nitrat und Nitrit im Chemostaten, sowie die Zellzahl über die Zeit dargestellt. Die verschiedenen eingestellten Verdünnungsraten ( $0.06$  bis  $0.25 h^{-1}$ ) sind jeweils grau bzw. weiß hinterlegt. Im unteren Teil sind die Redoxverhältnisse zwischen Acetat und Nitrat im Chemostaten (Erklärung s. Text), sowie im zulaufenden Medium dargestellt. Das Medium enthielt  $8$  mM Acetat und  $16$  mM Nitrat.

wachstumsphysiologischer Parameter wie der maximale Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ), der Substrataffinitäts-Konstanten ( $K_S$ ) und dem Wachstumsertrag ( $Y_{X/S}$ ).

### 1.1 Beschreibung des Wachstumsverhaltens im Chemostaten

Das anaerobe Wachstum des denitrifizierenden Bakteriums „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten wurde über  $600$  Stunden beobachtet (Abbildung 4). Nach achtmaligem

Volumenaustausch des Kulturmediums und einer erfolgreichen Einstellung eines Steady States wurde jeweils die nächst höhere Verdünnungsrate ( $D$ ) eingestellt. Nachdem die Batchkultur im Chemostaten angewachsen war, wurde die Pumpe gestartet. Die Verdünnungsrate betrug anfänglich  $0,06 \text{ h}^{-1}$  und wurde stufenweise bis auf einen Wert von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  erhöht, bei dem die Verdünnungsrate die maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) überstieg und es zum Auswaschen der Zellen aus dem Chemostaten kam.

### 1.1.1 Zellzahl

Nach Starten des Mediumzulaufs war zunächst eine leichte Verringerung der Zellzahl zu beobachten. Nach ungefähr 50 Stunden begann ein kontinuierlicher Anstieg der Zellzahl, welcher sich nach etwa 100 Stunden auf eine Höhe von  $5,4 \cdot 10^8$  Zellen/ml stabilisierte. Nach dem Erhöhen der Verdünnungsrate auf  $0,09 \text{ h}^{-1}$  kam es bis auf leichte Schwankungen zu keiner größeren Veränderung der Zellzahl. Bei der anschließenden sukzessiven Erhöhung der Verdünnungsrate wurde eine kontinuierlich abnehmende Zellzahl beobachtet, die sich bei jeder Verdünnungsrate entsprechend auf einen stabilen Wert einstellte. Während der Erhöhung der Verdünnungsrate von  $0,06 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,24 \text{ h}^{-1}$ , reduzierte sich die Zellzahl um das 4-Fache (Tabelle 1). Das gleiche Phänomen konnte auch in einem vorherigen Chemostatenexperiment unter gleichen Bedingungen beobachtet werden. Hier kam es aufgrund des höheren Volumenwechsels zwischen aufeinanderfolgenden Verdünnungsrate zu einer stufenweisen Abnahme der Zellzahl (Appendix Abbildung S1).

### 1.1.2 Acetatkonzentration

Die Acetatkonzentration im Kulturüberstand wurde mittels HPLC-Analysen über den gesamten Verlauf des Chemostaten beobachtet. Wie bei der Zellzahl kam es auch hier anfänglich zu Fluktuationen während der ersten 100 Stunden (Abbildung 4). Genau wie die Zellzahl stellte sich auch die Acetatkonzentration bei den verschiedenen Verdünnungsraten jeweils auf einen charakteristischen Wert im Steady State ein (Tabelle 1). Die Acetatkonzentration steigt mit zunehmender Verdünnungsrate an, was einem der Zellzahl gegenläufigen Trend entspricht. Im stabilen Zustand bei einer Verdünnungsrate von  $0,12 \text{ h}^{-1}$  konnte eine unerwartet hohe Acetatkonzentration von  $0,9 \text{ mM}$  gemessen werden (Tabelle 1). Jedoch scheint dies eher an den „normalen“ Schwankungen des Systems zu liegen, da auch bei anderen Verdünnungsraten Schwankungen in der Acetatkonzentration festgestellt wurden



**Tabelle 1: Meßparameter im Steady State.** Dargestellt für die Verdünnungsraten von 0,06 h<sup>-1</sup> bis 0,24 h<sup>-1</sup>. Zusätzlich sind der Wachstumsertrag (Y<sub>X/S</sub>) und die Produktivität dargestellt.

D	ACETAT	NITRAT	NITRIT	ZELLZAHL	BIOMASSE	WACHSTUMSERTRAG (Y <sub>X/S</sub> )	PRODUKTIVITÄT
[h <sup>-1</sup> ]	[mM]	[mM]	[mM]	[Zellen/ml]	[mg/l]	[mg TM/ mmol Acetat] <sup>1</sup>	[mg TM/ l·h] <sup>1</sup>
0,06	0,1	5,9	1,9	5,4·10 <sup>8</sup>	120	16	7
0,09	0,2	4,5	3,6	4,9·10 <sup>8</sup>	127	17	11
0,12	0,9	1,6	9,3	3,2·10 <sup>8</sup>	125	18	15
0,15	0,6	2,6	8,2	3,0·10 <sup>8</sup>	139	22	21
0,18	0,8	1,7	9,0	3,3·10 <sup>8</sup>	79	12	14
0,21	1,7	3,2	8,3	1,6·10 <sup>8</sup>	71	11	15
0,24	4,0	8,5	5,6	1,3·10 <sup>8</sup>	28	8	7

<sup>1</sup> TM: Trockenmasse

(Abbildung 4). Mit zunehmender Verdünnungsrate scheinen diese jedoch deutlich zugenommen zu haben. Ein Ursache hierfür war vermutlich das Wechseln des Mediumvorrats, da hier die Pumpe gestoppt wurde und so kurzzeitig Batchbedingungen vorlagen. Dies würde auch die mit steigender Verdünnungsrate ebenfalls erhöhten Fluktuationen erklären, da häufiger der Mediumvorrat aufgefüllt werden musste.

### 1.1.3 Nitrat- bzw. Nitritkonzentration

Verglichen mit den anderen Meßparametern, konnten über den Verlauf des Chemostaten bei den Nitrat- und Nitritkonzentrationen die größten Fluktuationen festgestellt werden (Abbildung 4), wobei Nitrat- und Nitritkonzentrationen gegenläufige Trends zeigten. Mit ansteigendem Nitratgehalt sank der des Nitrits. Über den Gesamtverlauf fällt der Nitratgehalt mit steigender Verdünnungsrate bis zu 0,18 h<sup>-1</sup>. Anschließend steigt der Nitratgehalt bis zum Auswaschen der Zellen bei D = 0,25 h<sup>-1</sup> an. Aufgrund der bekannten Toxizität von Nitrit und seiner Akkumulierung (bis über 10 mM) bei hohen Verdünnungsraten wurden zusätzliche

Wachstumsexperimente mit verschiedenen Nitritkonzentrationen durchgeführt (siehe Punkt 1.2).

#### 1.1.4 DNA-, rRNA und Proteingehalt

Im Laufe der Wachstumscharakterisierung wurden an verschiedenen Probenahmepunkten Zellfixierungen durchgeführt, die der Kontaminationskontrolle mittels FISH und der Analyse des DNA-, rRNA und Proteingehalts mittels FACS dienen (Winterling, 2009). Die Ergebnisse sind im Appendix Abbildung S6 dargestellt. Über den Verlauf der jeweils eingestellten Verdünnungsraten ist ein Anstieg im DNA- und Proteingehalt zu beobachten, der rRNA-Gehalt bleibt hingegen bis auf einzelne Fluktuationen relativ konstant. Eine Auffälligkeit ist der hohe DNA-Gehalt nach der Batchanzucht und der starke Anstieg während der zweiten Probenahme nach Start der kontinuierlichen Kultivierung. Dieser korreliert zudem mit der später beschriebenen Pleomorphie der Kultur (Abbildung 5a und b). Danach fiel der DNA-Gehalt ab und stieg kontinuierlich über die nachfolgenden Verdünnungsraten an. Auch der Proteingehalt steigt nach der Batchanzucht kurzzeitig an, und nimmt dann einen ähnlichen Verlauf wie der DNA-Gehalt.

#### 1.1.5 Biomassekonzentration

Zur Bestimmung der Biomassekonzentration wurde jeweils im Steady State der einzelnen Verdünnungsraten die Trockenmasse bestimmt (Tabelle 1). Während der ersten drei Verdünnungsraten 0,06, 0,09 und 0,12 h<sup>-1</sup> blieb die Trockenmasse relativ konstant. Bei einer Verdünnungsrate von 0,15 h<sup>-1</sup> kam es zu einer geringfügigen Erhöhung. Ab D = 0,18 h<sup>-1</sup> sank die Biomassekonzentration um fast die Hälfte des vorherigen Wertes, welche mit steigender Verdünnungsrate weiter abnahm. Bei der letzten Verdünnungsrate von 0,24 h<sup>-1</sup> betrug die Trockenmasse nur noch 28 mg/l. Die aus der Biomasse berechnete Produktivität zeigt eine stetige Zunahme bis zu einem Maximum von 21 mg TM/l·h bei einer Verdünnungsrate von 0,15 h<sup>-1</sup>. Während der folgenden beiden Verdünnungsraten (0,18 h<sup>-1</sup> und 0,21 h<sup>-1</sup>) sank die Produktivität etwas ab, blieb jedoch dann relativ konstant bei ~15 mg TM/l·h. Bei der letzten Verdünnungsrate von 0,24 h<sup>-1</sup> reduzierte sich diese um mehr als 50 %. Dies steht im Einklang mit der Reduktion der Zellzahl über die Verdünnungsraten (Abbildung 4). Auch der Wachstumsertrag ( $Y_{X/S}$ ), repräsentativ für den Elektronentransfer von Acetat zu Biomasse,

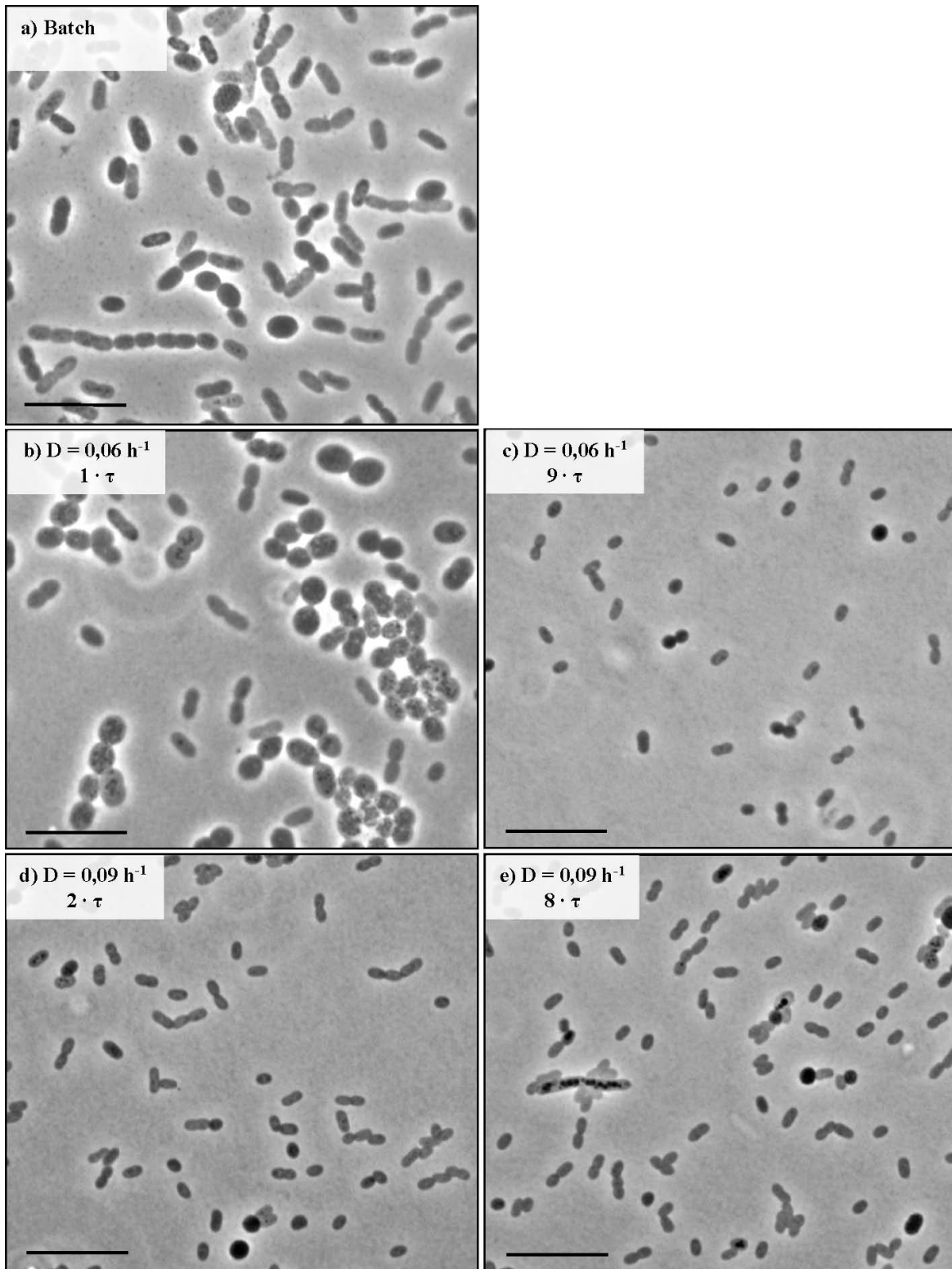


Abbildung 5: Beschreibung siehe Seite 44

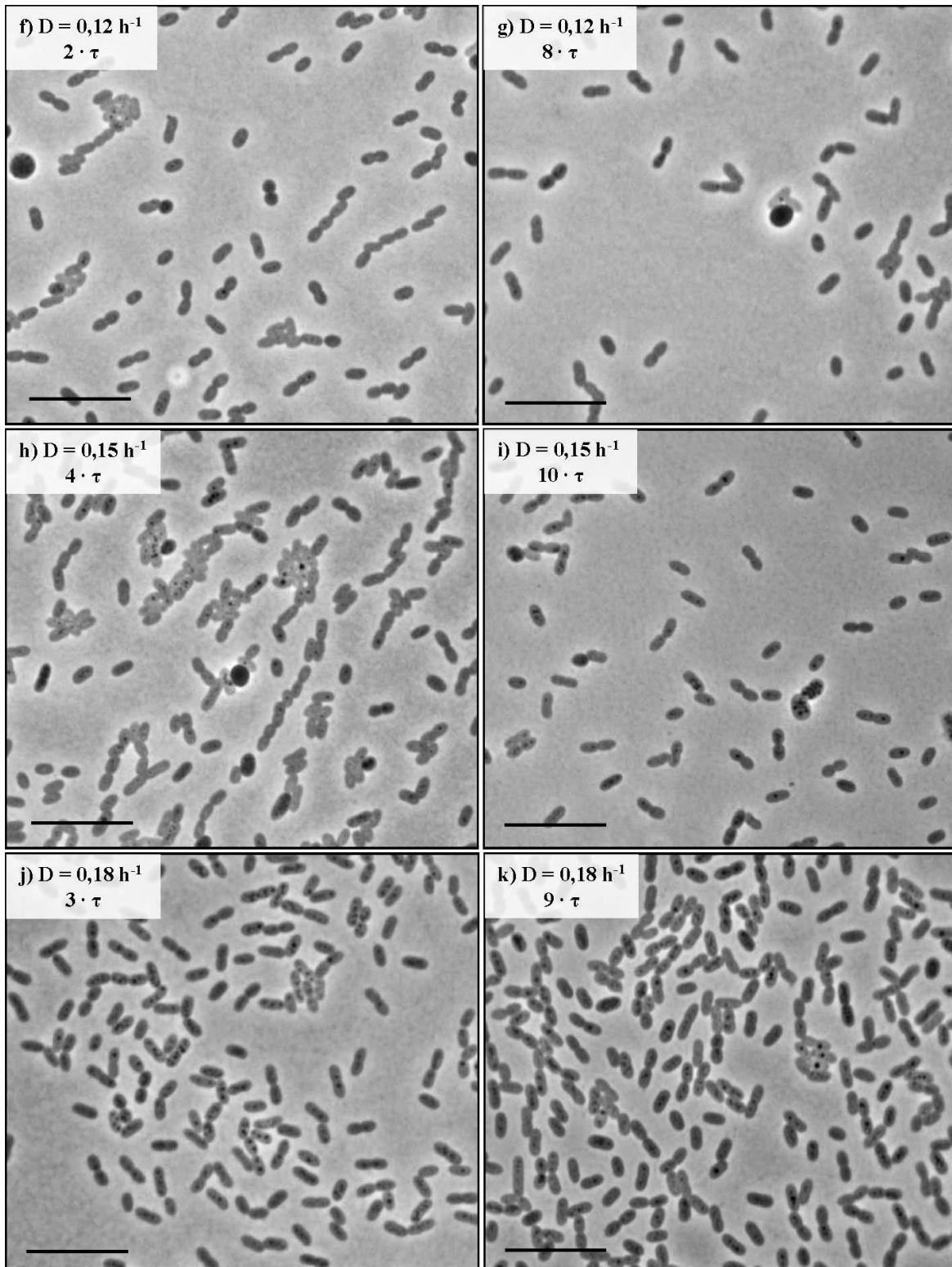
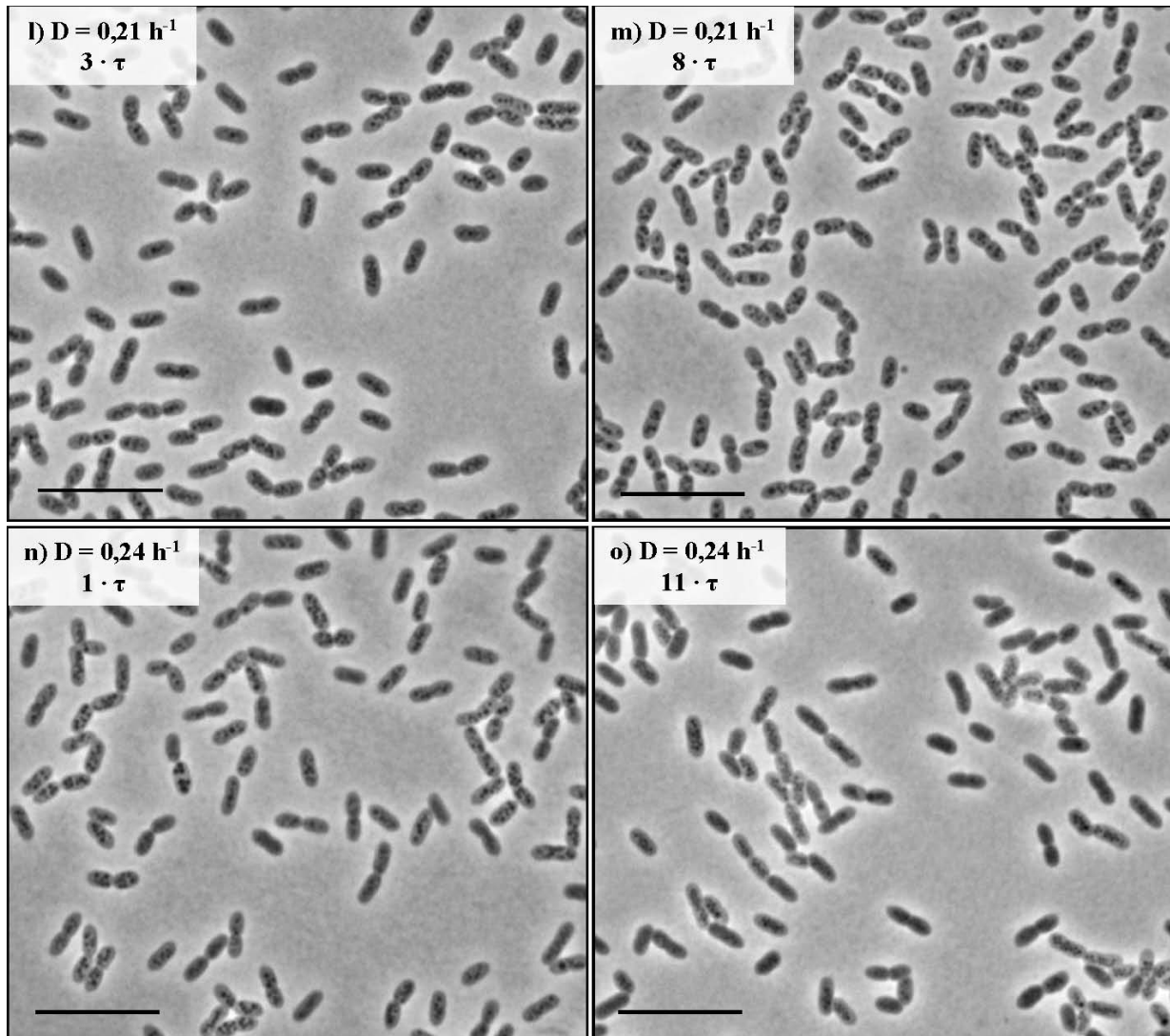


Abbildung 5: Beschreibung siehe Seite 44



**Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei verschiedenen Verdünnungsraten (D) im Chemostaten.** Stamm EbN1 wurde anaerob unter Acetat-limitierten Bedingungen kultiviert. Die Bilder wurden zu Beginn einer Verdünnungsrate und im Steady State aufgenommen (a-o). In der linken oberen Ecke ist jeweils die Verdünnungsrate (D) und die Anzahl an Volumenaustauschen, angegeben als mittlere Verweilzeit ( $\tau$ ), angegeben. Der Balken entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

zeigt ein Maximum bei einer Verdünnungsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$  von 22 mg TM/mmol Acetat und einen über die Verdünnungsraten ähnlichen Verlauf wie die Produktivität (Tabelle 1).

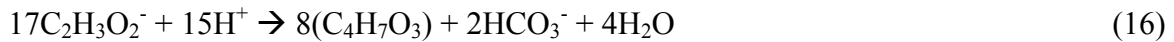
### 1.1.6 Zellmorphologie

Bei jeder Probenahme wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. In Abbildung 5 sind Aufnahmen der Zellen zu Beginn und zum Ende einer Verdünnungsrate dargestellt, sowie vor dem Starten der kontinuierlichen Kultivierung. Zu Beginn des Versuchs (Abbildung 5b)

konnten verschiedene Zellformen identifiziert werden, wobei die Kultur durch riesige ovale Zellen dominiert wurde. Die Pleomorphie der Kultur konnte schon nach der Batchanzucht im Chemostaten beobachtet werden (Abbildung 5a) und auch während eines vorherigen Chemostatenversuchs unter vergleichbaren Bedingungen (Appendix Abbildung S4). Neben den großen ovalen Zellen sind zusätzlich kleinere mehr stäbchenförmige Zellen zu beobachten, die jedoch ebenfalls verhältnismäßig groß sind. Die großen ovalen Zellen hatten teilweise Durchmesser von bis zu 4  $\mu\text{m}$ . Zusätzlich befinden sich auf den Aufnahmen in vielen Zellen granuläre Einschlüsse, die als schwarze Punkte unter dem Mikroskop zu erkennen sind. Bei diesen Einschlüssen handelt es sich vermutlich um Speicherstoffe, wie etwa Polyhydroxybutyrat (PHB). Vor dem Umschalten auf die nächst höhere Verdünnungsrate, hat sich die Zellgröße drastisch verringert und ebenfalls die Pleomorphie (Abbildung 5c). Vereinzelt sind noch große Zellen zu erkennen, jedoch sind selbst diese relativ kleiner. Zudem sind nur noch vereinzelt Zellen mit Einschlüssen zu beobachten. Die Aufnahmen der Verdünnungsraten von 0,09  $\text{h}^{-1}$  bis 0,24  $\text{h}^{-1}$  zeigen keine morphologischen Besonderheiten, wobei die Länge der Zellen jedoch mit steigender Verdünnungsrate zuzunehmen scheint. Dies basiert vermutlich auf der erhöhten Teilungsrate der Bakterien. Über die einzelnen Verdünnungsraten ist ebenfalls eine Zunahme der zellulären Einschlüsse zu erkennen. Am Ende einer Verdünnungsrate von 0,21  $\text{h}^{-1}$  weisen fast sämtliche Zellen zelluläre Einschlüsse auf. Bei der nächsten Verdünnungsrate von 0,24  $\text{h}^{-1}$  scheint es bereits einen rückläufigen Trend zu geben. Die durchgeführten FISH-Analysen und Substrattests zeigen, dass es sich bei den untersuchten Proben ausschließlich um den Stamm EbN1 handelt (Appendix Abbildung S7 und S8).

#### 1.1.7 Assimilation und Dissimilation

Aus den in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Meßparametern wurde das Verhältnis zwischen der Acetat Assimilation und Dissimilation bestimmt. Die verwendeten Verbrauchs- und Produktionsraten wurden aus den ermittelten Konzentrationen durch einfache Multiplikation mit der jeweiligen Verdünnungsrate berechnet. Über die Konzentrationen weiterer Zwischenprodukte der Denitrifikation lagen keine Daten vor, weshalb davon ausgegangen wurde, dass das Nitrat prinzipiell vollständig zu  $\text{N}_2$  reduziert wurde. Für die Berechnung des Verhältnisses von Assimilation zu Dissimilation wurden die folgende Reaktionsgleichung aufgestellt:



Diese wurde mit einer Gleichung aus der Literatur verglichen (Galushko and Schink, 2000). Mit Hilfe der Gleichung 16 wurden die Verhältnisse zwischen Assimilation des aus Acetat stammenden Kohlenstoffs, sowie der vollständigen Dissimilation zu Kohlendioxid berechnet. Anhand der in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse konnte die theoretisch konsumierte Menge an Acetat berechnet und mit dem tatsächlich gemessenen Verbrauch verglichen werden (Tabelle 2). Die Ergebnisse zeigen, dass bei Verdünnungsraten von 0,06 bis 0,12 h<sup>-1</sup> rund 70 % des Acetats dissimiliert und etwa 30 % als Zellmasse assimiliert wurden. Bei der Verdünnungsrate der höchsten Produktivität (0,15 h<sup>-1</sup>) war das Verhältnis etwa gleich, d.h. etwa die Hälfte des verbrauchten Acetats wurde als Zellmasse assimiliert. Dies spiegelt sich auch in dem Wachstumsertrag ( $Y_{X/S}$ ) wieder, der bei  $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$  sein Maximum von 21 mg TM/mmol Acetat erreicht (Tabelle 1). Bei den nächsten beiden Verdünnungsraten von 0,18 h<sup>-1</sup> und 0,21 h<sup>-1</sup> wurde nur etwa 25 % des konsumierten Acetats assimiliert und bei einer Verdünnungsrate von 0,24 h<sup>-1</sup> lediglich etwa 20 %. Die berechneten Verhältnisse zeigen, dass mit steigender Verdünnungsrate mehr Acetat in den Energiestoffwechsel und weniger in den Baustoffwechsel fließt. Vergleicht man den theoretischen mit dem gemessenen Acetatverbrauch, so befinden sich die Werte in guter Näherung zueinander. Es fällt jedoch auf, dass der gemessene Verbrauch bei den hohen Verdünnungsraten bis zu 26 % höher ist, als der theoretische. Dies könnte auf der Bildung von Speicherstoffen in Form von PHB beruhen, welches man zumindest qualitativ auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennt (Abbildung 5).

## 1.2 Wachstumskinetik

### 1.2.1 Monodkinetik

Entsprechend dem von Monod (1949) beschriebenen Modell für das bakterielle Wachstum wurden die spezifischen Wachstums- bzw. Verdünnungsraten als Funktion der im Kulturüberstand gemessenen Acetatkonzentrationen aufgetragen (Abbildung 6). Der graphische Verlauf entspricht einer Monodkinetik (rektanguläre Hyperbel).

Tabelle 2: Stoffwechselraten im Steady State der untersuchten Verdünnungsraten.

D	PRODUKTIVITÄT <sup>1</sup>	ACETAT- VERBRAUCH (THEORETISCH)	ACETATE DISSIMILIERT	ACETATE ASSIMILIERT	ACETAT- VERBRAUCH (GEMESSEN)	DIFFERENZ ACETAT- VERBRAUCH <sup>4</sup>
[h <sup>-1</sup> ]	[mmol TM/ l·h] <sup>2</sup>	[mmol/ l·h]	[%] <sup>3</sup>	[%] <sup>3</sup>	[mmol/ l·h]	[%]
0,06	0,07	0,42	64	36	0,44	4
0,09	0,11	0,74	68	32	0,66	-12
0,12	0,15	0,93	67	33	0,84	-11
0,15	0,20	0,93	54	46	0,97	4
0,18	0,14	1,09	73	27	1,20	9
0,21	0,15	1,17	74	26	1,35	13
0,24	0,07	0,64	78	22	0,86	26

<sup>1</sup> Für die Berechnung der Biomasse (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>) in mmol wurde ein Molekulargewicht von MW = 103 g/mol angenommen.

<sup>2</sup> TM: Trockenmasse

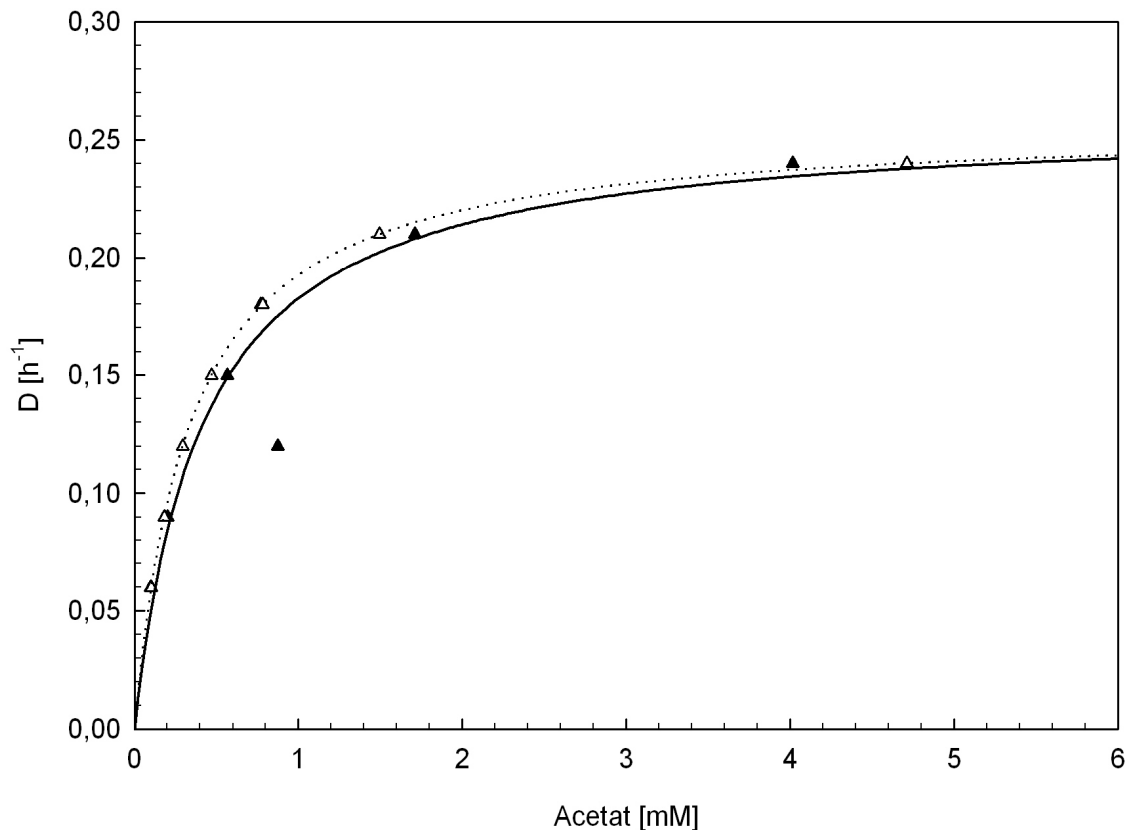
<sup>3</sup> Die Procente beziehen sich auf den theoretischen Acetatverbrauch

<sup>4</sup> Differenz zwischen theoretischen und gemessenem Acetatverbrauch

### 1.2.2 Wachstumsparameter $\mu_{\max}$ und $K_S$

Zur Ermittlung der maximalen Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) und der Substrataffinitätskonstanten ( $K_S$ ) wurden die aus der Enzymkinetik bekannten Linearisierungsmethoden verwendet, deren theoretischer Hintergrund in der Einleitung dargestellt wurde. Um einen Vergleich der einzelnen Methoden zu ermöglichen, wurden alle vier vorgestellten Methoden auf die erzielten Ergebnisse angewandt. Eine graphische Darstellung dieser Methoden findet sich in der Abbildung 7, die daraus abgeleiteten Wachstumsparameter in der Tabelle 3. Wie zuvor in der Einleitung dargestellt, eignen sich drei der vier beschriebenen Verfahren nur mit einer geeigneten statistischen Gewichtung der Messdaten zur Ermittlung kinetischer Parameter (Hanes, 1932; Lineweaver and Burk, 1934; Eadie, 1942). Da auf die hier gewonnen Daten aufgrund fehlender Replikate keine Statistik angewandt werden konnte, wurde hier auf das Verfahren der direkten linearen Auftragung nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) zur Ermittlung der Wachstumsparameter zurückgegriffen. Bei diesem Verfahren werden die gewonnen Daten nicht extrapoliert, sondern direkt zur Ermittlung der Parameter verwendet. Zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Methoden wurden auch die durch anderen Methoden gewonnen Ergebnisse dargestellt. Ein Vergleich zeigt, dass sich hier nur die





**Abbildung 6: Darstellung der Wachstumskinetik im Chemostaten nach Monod.** Die gefüllten Dreiecke entsprechen den im Kulturüberstand gemessenen Substratkonzentrationen. Bei den leeren Dreiecke handelt es sich um theoretische Werte, die mit Hilfe der Gleichung 5 berechnet wurden. Die zur Berechnung verwendeten Parameter  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  wurden mit der Methode der direkten linearen Auftragung (Eisenthal und Cornish-Bowden) bestimmt.

verwendete Linearisierung nach Hanes (1932) und das von Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) entwickelte Verfahren eignen  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  einigermaßen exakt aus dem Datensatz der vorliegenden Arbeit zu bestimmen. Die theoretisch berechnete Kurve in Abbildung 6 deutet auf zu niedrig bestimmte Acetatkonzentrationen bei hohen Verdünnungsraten hin. Dies wirkt sich besonders auf die Bestimmung der Parameter mit dem Verfahren nach Eadie und Hofstee (1952) und dem nach Lineweaver und Burk (1934) aus. Die Ergebnisse der Methode nach Lineweaver und Burk weichen sehr stark von den experimentell beobachteten Werten ab. Hier wird die in der Einleitung beschriebene Verzerrung hin zu niedrigen Messwerten sehr deutlich, da die Werte der Parameter offensichtlich stark unterhalb der Tatsächlichen liegen. Die Auswirkung der niedrigen Werte wird auch in der Abbildung 7a deutlich. Zusätzlich zeigt der Graph auch die durch das Verfahren entstehende verminderte Streuung der Messdaten. Auch die Methode nach Eadie und Hofstee (1952) macht den Einfluss zu geringer Acetat-

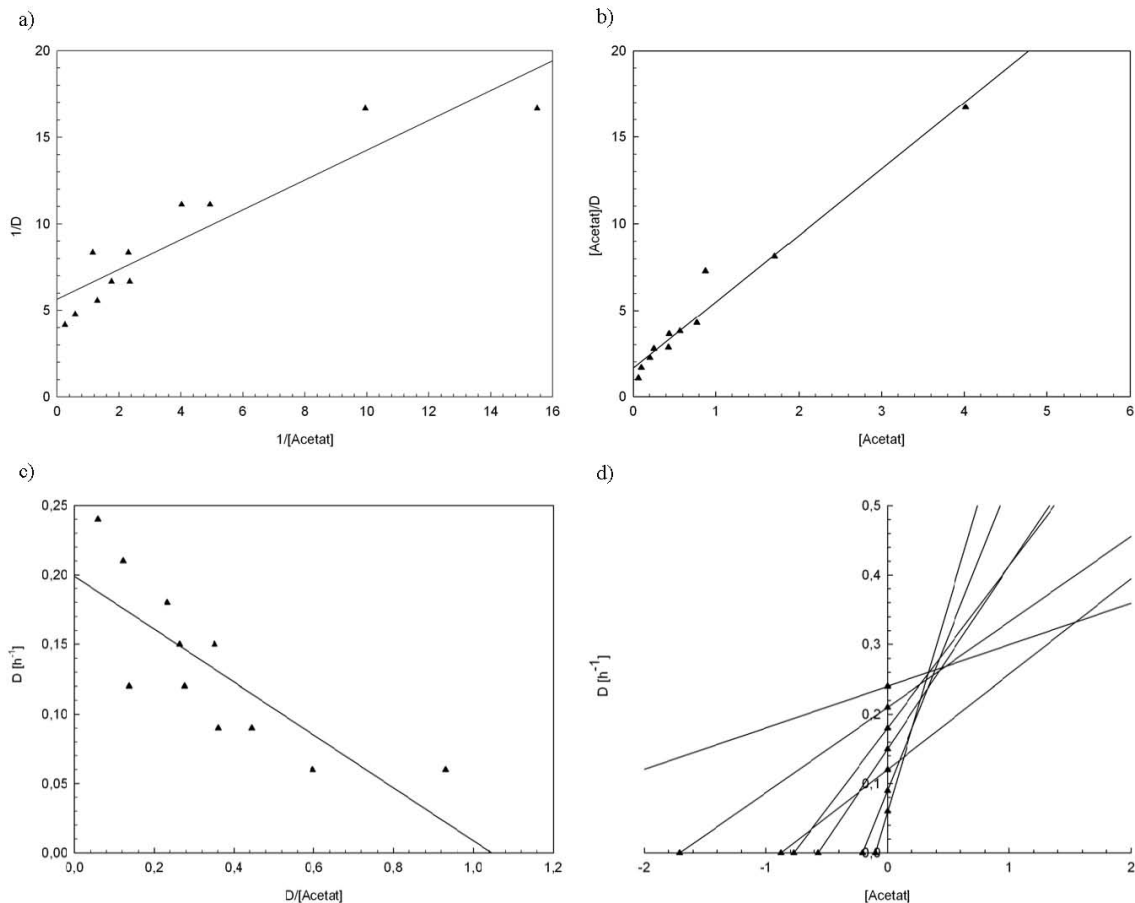
**Tabelle 3: Wachstumsparameter  $\mu_{\max}$  und  $K_S$ .** Fett markierte Werte für  $K_S$  und  $\mu_{\max}$  wurden für die theoretische Berechnung der Monod-Kinetik verwendet (Abbildung 6).

WACHSTUMS- PARAMETER	LINEWEAVER & BURK	HANES	EADIE & HOFSTEE	EISENTHAL & CORNISH- BOWDEN	EXPERIMENTELL BEOBACHTET <sup>1</sup>
$\mu_{\max}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,18	0,26	0,20	<b>0,26</b>	~ 0,25
$K_S$ [mM]	0,15	0,44	0,19	<b>0,34</b>	~ 0,40

<sup>1</sup> Die gezeigten Daten wurden in Abbildung 6 graphisch bestimmt

Werte bei hohen Verdünnungsraten deutlich (Abbildung 6). Diese scheinen die Gerade künstlich nach rechts außen zu verschieben, was zu einem niedrigeren Wert für  $\mu_{\max}$  führt und ebenfalls Einfluss auf den  $K_S$ -Wert hat. Die maximale spezifische Wachstumsrate kann neben den beschriebenen Verfahren auch experimentell über die Verdünnungsrate analysiert werden. Da die Verdünnungsrate bei Substratlimitation der spezifischen Wachstumsrate entspricht, kann bei entsprechend kleinen Intervallen der Verdünnungsrate davon ausgegangen werden, dass beim Auswaschen der Zellen die maximale spezifische Wachstumsrate ungefähr der kritischen Verdünnungsrate ( $D_{\text{krit.}}$ ) entspricht, wenn die Substratkonzentration um ein vielfaches über dem  $K_S$ -Wert liegt. In diesem Experiment kam es bei einer Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  zu einem langsamen Auswaschen der Zellen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die maximale Wachstumsrate von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 für Acetat ungefähr in diesem Bereich liegt. Dies konnte durch das Verfahren von Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) bestätigt werden, bei dem eine maximale spezifische Wachstumsrate von  $0,26 \text{ h}^{-1}$  und eine Substratsaffinitätskonstante von  $0,34 \text{ mM}$  ermittelt wurde (Tabelle 3). Neben diesem Verfahren, lieferte auch das Verfahren nach Hanes (1932) Ergebnisse, welche nahe an den experimentell beobachteten Werten für  $\mu_{\max}$  und  $K_S$  liegen (Tabelle 3).

Die Ergebnisse zeigen, dass es generell möglich ist, das denitrifizierende Bakterium „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 unter anaeroben Bedingungen im Chemostaten mit Acetat zu kultivieren. Wie die Abbildung 4 zeigt, kam es während der Anfangsphase zum Einbruch der Zellzahl und damit einhergehend zu Schwankungen im Nitrat-, Nitrit- und Acetatgehalt im Kulturüberstand sowie ebenfalls zu einem Anstieg im DNA- und Proteingehalt der Zellen



**Abbildung 7: Linearisierungsmethoden zur grafischen Ermittlung der Wachstumsparameter  $\mu_{\max}$  und  $K_S$ .** Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Verfahren nach a) Lineweaver und Burk, b) Hanes, c) Eadie und Hofstee und d) die direkt lineare Auftragung nach Eisenthal und Cornish-Bowden. Für weitere Details wird auf die Einleitung verwiesen.

(Appendix Abbildung S6). Die Schwankungen zu Beginn der kontinuierlichen Kultivierung lassen sich vermutlich durch die sich ändernden Kultivierungsbedingungen beim Starten der kontinuierlichen Kultivierung erklären und der Anpassung an die künstlich eingestellte Wachstumsrate. Interessant ist jedoch die extreme Pleomorphie der Startkultur (Abbildung 5a und b). Diese Pleomorphie dominiert auch während der ersten 50 Stunden der Kultivierung und korreliert mit dem anfänglichen Einbruch der Zellzahl. Mit steigender Zellzahl verschwinden diese riesigen Zellen fast vollkommen und es dominieren kleinere Stäbchenförmige Zellen (Abbildung 5). Vermutlich hängt die extreme Zellgröße mit einer Störung des Zellzyklus zusammen, was sich auch in dem hohen DNA- und Proteingehalt der einzelnen Zellen widerspiegelt (Appendix Abbildung S6). Dies wurde schon früher mit der Zellgröße in Verbindung gebracht (Schaechter et al., 1958). Vermutlich überstieg die DNA-

Replikationsrate die der Zellteilung, wodurch die Zellen größer wurden. Der hohe DNA-Gehalt korreliert zudem in beiden Chemostatläufen mit dem Auftreten der großen Zellformen (Abbildung 5 und Appendix Abbildung S2, S4 und S6). Desweiteren zeigten diese Zellen auch eine große Menge an zellulären Einschlüssen (Abbildung 5) bei denen es sich vermutlich um Polyhydroxybutyrat (PHB) handelt (Trautwein et al., 2008). Der mit steigender Verdünnungsrate ebenfalls ansteigende DNA-Gehalt konnte schon früher bei Wachstum von *Salmonella typhimurium* beobachtet werden und wurde mit unterschiedlichen physiologischen Zuständen der Zellen während verschiedener Wachstumsraten in Verbindung gebracht (Schaechter et al., 1958).

Die Ergebnisse der Acetatkonzentration im Kulturüberstand wurden entsprechend der von Monod (1949) beschriebenen Kinetik aufgetragen (Abbildung 6). Die verwendeten Daten entsprechen jeweils den charakteristischen Konzentrationen im Steady State der eingestellten Verdünnungsraten. Der Verlauf der Kurve zeigt die charakteristische rektangulären Hyperbel für mikrobielles Wachstum (Monod, 1949). Durch die Ähnlichkeit der Kinetik zu der von Michaelis und Menten (1913) beschriebenen Enzymkinetik, bestand für Monod kein Zweifel daran, dass die von ihm entwickelte Wachstumskinetik vermutlich ursächlich durch die Kinetik eines oder mehrerer Enzyme bedingt ist (Monod, 1949). Es wurde lange diskutiert, ob die Substrataffinitätskonstante ( $K_S$ ) durch die Affinität des Transportproteins oder eines Geschwindigkeits-bestimmenden Enzyms des nachfolgenden Metabolismus hervorgerufen wird (Kovarova-Kovar and Egli, 1998; Ferenci, 1999; Liu, 2007). In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte für *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* eine Beziehung zwischen dem  $K_S$  der Kultur und dem  $K_m$  eines Transportproteins hergestellt werden (Snoep et al., 2009). Damit konnte die Substrataffinität und somit die Organismus-spezifische Wachstumsrate  $\mu$  eines Organismus durch die enzymkinetische Eigenschaft eines Transportproteins beschrieben werden.

Bei einer Verdünnungsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  kam es zum Auswaschen der Zellen aus dem Chemostaten, d.h. die Verdünnungsrate ( $D$ ) überstieg die maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) von Stamm EbN1 unter Acetat-limitierten Bedingungen. Über das Verfahren nach Eisenthal und Cornish-Bowden (1974) konnte für die maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) ein Wert von  $0,26 \text{ h}^{-1}$  ermittelt werden. Dieser Wert liegt in guter Näherung zum experimentell beobachteten Wert (Tabelle 3). Auffällig ist die nur geringfügig höher Wachstumsrate mit Acetat ( $0,26 \text{ h}^{-1}$ ) verglichen mit Benzoat ( $0,22 \text{ h}^{-1}$ , K. Trautwein unveröffentlichte Daten), bedenkt man den enzymatisch weitaus aufwendigeren Abbauweg

für Benzoat (Abbildung 1). Vergleichbare spezifische Wachstumsraten mit Acetat konnten für aerobes Wachstum anderer fakultativ anaerober Organismen, wie etwa *Thiosphaera pantotropha* ( $\mu_{\max} = 0,32 \text{ h}^{-1}$ ), *Paracoccus denitrificans* ( $\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ ) (Robertson and Kuenen, 1992) oder *E. coli* ( $\mu_{\max} = 0,22 \text{ h}^{-1}$ ) (Paalme et al., 1997) beobachtet werden. Leider lagen keine Werte für Denitrifizierer unter anaeroben Wachstum auf Acetat vor. Die Substrataffinitätskonstante zeigt, dass Stamm EbN1 eine verhältnismäßig geringe Affinität für Acetat besitzt ( $K_S = 0,34 \text{ mM}$ ). Andere denitrifizierende Organismen, welche Acetat als Substrat verwerten können, zeigen eine um den Faktor 10 höhere Affinität. Es fanden sich z. B.  $K_S$ -Werte von  $28 \text{ }\mu\text{M}$  (*T. pantotropha*) und  $63 \text{ }\mu\text{M}$  (*P. denitrificans*) (Robertson and Kuenen, 1992). Beim Benzoat-limitierten Wachstum von Stamm EbN1 im Chemostaten scheint der  $K_S$ -Wert um den Faktor 1000 geringer ( $K_S < 1 \text{ }\mu\text{M}$ , K. Trautwein unveröffentlichte Daten), d.h. es besteht eine sehr viel höhere Affinität zu Benzoat. Die höhere Affinität zu Benzoat lässt vermuten, dass Stamm EbN1 ein Spezialist für die Aufnahme und Metabolisierung monoaromatischer Verbindungen ist. Diese sind bezogen auf den Stoffwechsel schwerer zugänglich, liefern aber ein Vielfaches der Energie von Acetat. Die vollständige Oxidation von einem Molekül Benzoat zu  $\text{CO}_2$  z. B. liefert theoretisch 29 Reduktionsäquivalente, wohingegen die Oxidation von Acetat theoretisch nur 8 Reduktionsäquivalente liefert. Dies spiegelt sich auch in dem höheren Wachstumsertrag ( $Y_{X/S}$ ) beim Wachstum mit Benzoat wieder ( $Y_{X/S} \approx 40 \text{ mg TM/mmol Benzoat}$ , K. Trautwein unveröffentlichte Daten). Für Acetat liegt dieser Wert im Schnitt nur bei  $Y_{X/S} \approx 15 \text{ mg TM/mmol Acetat}$  (Tabelle 1).

Wie zuvor erwähnt wurde scheint die Substrataufnahme eine entscheidende Rolle für die Substrataffinität eines Organismus zu spielen (Snoep et al., 2009). Die Genomanalyse des Stamms EbN1 führte zur Identifikation zweier putativer Acetattransportsysteme (ebA165 und ebA3537) der „Solute:Na<sup>+</sup> Symporter Family“ (Rabus et al., 2005b; Tamang et al., 2009), diese zeigen beide Homologie zu der Membran Permease ActP (Gimenez et al., 2003). Vermutlich ist aber nur ebA165 am Acetattransport beteiligt, da dieser in einem Operon mit dem Gen der Acetyl-Coenzym A Synthetase (ebA172) in Stamm EbN1 liegt. Der zweite putative Transporter ist vermutlich, aufgrund von Sequenzvergleichen, eher an der Aufnahme von Phenylacetat beteiligt. Die Permeasen verschiedener Organismen zeigen interessanterweise viel geringe  $K_m$ -Werte ( $\sim 5,4 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Gimenez et al., 2003; Jolkver et al., 2009), haben jedoch auch geringere Homologie zum putativen Acetattransporter (ebA165) im Stamm EbN1 (Rabus et al., 2005a). Falls die Acetataufnahme tatsächlich den größeren Einfluss auf den  $K_S$  Wert hat, so scheint die geringe Affinität von Stamm EbN1 für Acetat

nicht allein durch den Transportmechanismus erklärt werden zu können. Der hohe  $K_S$ -Wert für das „weitverbreitete“ Substrat Acetat könnte auch durch ein auf den Transport folgendes Enzym bedingt sein, wie z. B. durch die erwähnte Acetyl-Coenzym A Synthetase, für die in *E. coli* ein  $K_m$ -Wert von 200  $\mu\text{M}$  ermittelt wurde (Brown et al., 1977). Dieser Wert liegt näher an dem beobachteten  $K_S$ -Wert von Stamm EbN1, als die bei anderen Organismen beobachteten  $K_m$ -Werte des Acetattransporters ActP (Gimenez et al., 2003; Jolkver et al., 2009). Die Acetyl-Coenzym A Synthetase aktiviert Acetat zu Acetyl-CoA unter Verwendung eines Moleküls ATP und könnte als Wachstumsraten-limitierendes Enzym agieren. Bereits bekannt ist, dass die Verfügbarkeit von Coenzym A ein limitierender Faktor bakteriellen Wachstums sein kann (Wolfe, 2005). Für Benzoat müsste demnach ein ähnlich hoher  $K_S$ -Wert existieren, der sehr niedrige Wert lässt demnach auf eine andere Ursache des hohen  $K_S$ -Wertes für Acetat schließen.

Bei einer Verdünnungsrate von  $0,15 \text{ h}^{-1}$  ist das Verhältnis der Acetat-Assimilation zur Acetat-Dissimilation etwa 50 %. Eine weitere Besonderheit von  $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$  ist ein langsames Absinken der Zellzahl hin zur nächst höheren Verdünnungsrate  $D = 0,21 \text{ h}^{-1}$ . Das Verhältnis von Energie- und Baustoffwechsel verschiebt sich dabei immer mehr Richtung Dissimilation, d. h. mehr Acetat wird zur Energiegewinnung und weniger zum Aufbau von neuen Zellen verwendet. Zu dem kommt es auch zur vermehrten Bildung von PHB (Abbildung 5). Die Bildung von PHB als Elektronenspeicher regeneriert  $\text{NAD}^+$ , sowie Coenzym A (Bormann, 2000; Trautwein et al., 2008). Der hohe Nitritgehalt bei  $D = 0,18 \text{ h}^{-1}$  könnte die Ursache des scheinbar Wachstums-inhibierenden Effekts sein. Es scheint, dass eine stetige Nitrit-Akkumulation die Nitratreduktion inhibierte, während Nitrit weiter reduziert wurde. Dies führte zu einer Akkumulation von Nitrat (Abbildung 4,  $D: 0,18 - 0,24 \text{ h}^{-1}$ ). Dies könnte im Zusammenhang mit der stetigen Zunahme an PHB stehen, da die Nitritreduktase und möglicherweise auch die nachfolgenden Enzyme der Denitrifikation nicht alleine die durch Acetat-Oxidation freigesetzten Elektronen „aufnehmen“ können. Die PHB Bildung bei einem Überschuss an Redoxäquivalenten konnte schon bei *T. panthotropha* beobachtet werden (van Niel et al., 1995). Zusätzlich wurde eine Bildung von PHB bereits bei Stamm EbN1 aufgrund verminderter Denitrifikationsraten unter Lösungsmittelstress beobachtet (Trautwein et al., 2008).

**Tabelle 4: Maximalen spezifischen Wachstumsraten bei Nitritstress.** Daten entsprechen den Mittelwerten der maximalen spezifischen Wachstumsraten aus drei parallelen Ansätzen in Gegenwart von 10 mM Acetat. Fett gedruckt sind die Werte der Referenzen mit Nitrat als Elektronenakzeptor und 10 mM Acetat. Wachstumskurve s. Appendix Abbildung S9.

	6 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	8 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	12 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	14 mM NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	7 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	16 mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
μ [h <sup>-1</sup> ]	0,15	0,16	0,17	0,17	0,17	<b>0,26</b>	<b>0,24</b>

### 1.3 Nitrit-Stress Experiment

Der Einfluss von Nitrit auf die maximale spezifische Wachstumsrate wurde mit Batchkulturen untersucht (Appendix Abbildung S9 und Tabelle 4), da der Nitritgehalt im Kulturüberstand während der kontinuierlichen Kultivierung auf relativ hohe Werte über 10 mM anstieg und diese Konzentration bereits als Wachstums- bzw. Enzym-inhibierend beschrieben wurden (Verseveld et al., 1977; Almeida et al., 1995; Neubauer and Gotz, 1996). Die eingesetzten Nitritkonzentrationen (6 - 14 mM) zeigten keinen Einfluss auf die maximale spezifische Wachstumsrate (Tabelle 4). Jedoch war die maximale spezifische Wachstumsrate mit Nitrat fast doppelt so hoch als mit Nitrit (Tabelle 4). Es konnte für *Pseudomonas fluorescens* gezeigt werden, dass die Aktivität der Nitratreduktase doppelt so hoch wie die der Nitritreduktase ist (Almeida et al., 1995). Da beide Enzyme um den Elektronendonator konkurrieren, kommt es durch die höhere Aktivität der Nitratreduktase zu einer Akkumulation von Nitrit (Betlach and Tiedje, 1981; Hernandez and Rowe, 1988; Almeida et al., 1995; Neubauer and Gotz, 1996). Außerdem konnte zumindest für eine cytosolische Nitritreduktase gezeigt werden, dass hohe Nitritkonzentrationen deren Aktivität mindern, die hier vorliegenden Konzentrationen aber nur einen geringen Einfluss haben (Neubauer and Gotz, 1996). Jedoch war die „Lag“-Phase beim Wachstum mit Nitrit deutlich länger als mit Nitrat (Appendix Abbildung S9). Dies liegt wahrscheinlich an der höheren Rate der Nitrat- im Vergleich zur Nitritreduktase, so dass eine schnellere Zunahme an Biomasse möglich war.

Die Akkumulation von Nitrit war vermutlich ein Effekt der unterschiedlichen Aktivitäten der Nitrat- und Nitritreduktase während des Wachstums bei hohen Verdünnungsraten. Jedoch kann hiermit nicht die Akkumulation von Nitrat erklärt werden. In früheren Chemostatstudien mit anderen denitrifizierenden Bakterien wurde zunächst Nitrat vollständig aufgebraucht, bevor das akkumulierte Nitrit verwendet wurde (Betlach and Tiedje, 1981; Hernandez and

Rowe, 1988; Almeida et al., 1995; Neubauer and Gotz, 1996). Vermutlich resultierte die Akkumulation aufgrund einer Repression durch Nitrit. Das putative Regulationssystem der Denitrifikation in Stamm EbN1 basiert auf dem Zwei-Komponentensystem NarX/NarL (Rabus et al., 2005a). In Gegenwart von Nitrat wird über das Protein NarL („Response-Regulator“) die Expression der für die Denitrifikation benötigten Gene induziert. Nitrit und Nitrat konkurrieren um die Bindestelle von NarX, da beide an diese binden können (Stewart, 1993). Nitrit ist dabei in *E. coli* ein eher schwaches Signal der NarL-vermittelten Genexpression (Rabin and Stewart, 1993). Es konnte jedoch auch gezeigt werden das der Promotor der Nitritreduktase in die *Pseudomonas aeruginosa* Nitrit sensitiv ist (Zumft, 1997). Eventuell wurde im Stamm EbN1 die durch NarL ausgelöste Genexpression zwar durch Nitrit verringert, die Expression der Nitritreduktase jedoch aufrecht erhalten. Dies würde auch das langsame Auswaschen erklären, da wie in dem Nitritstress-Experiment gezeigt wurde die maximale spezifische Wachstumsrate mit Nitrit geringer ist als mit Nitrat (Tabelle 4).



## **2. Dynamik und Induktion des anaeroben Benzoatstoffwechsels in „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten**

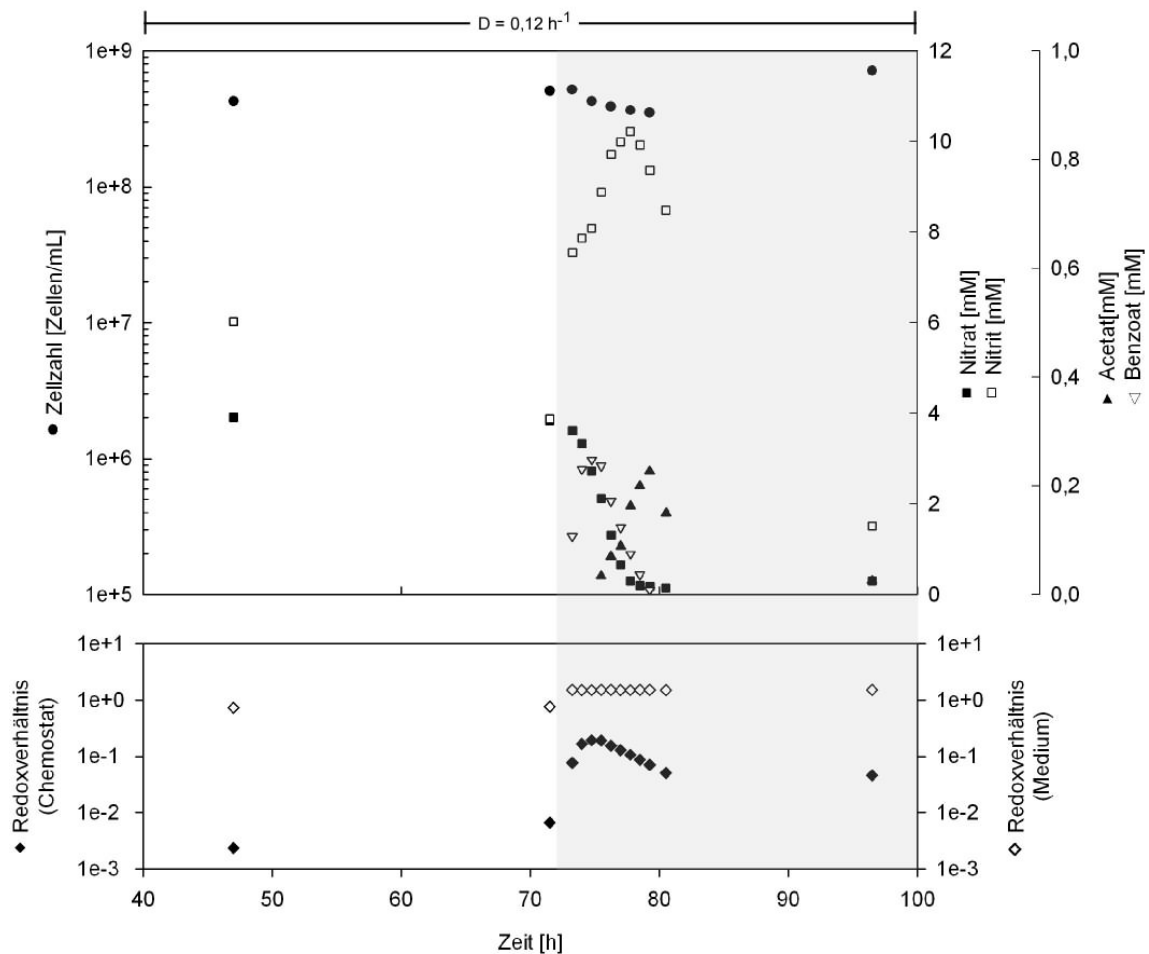
Basierend auf den Ergebnissen der Wachstumscharakterisierung mit Acetat als limitierendem Substrat, wurde ein Substratshift-Experiment im Chemostaten durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden die Bakterien mit einer Verdünnungsrate von  $0,12 \text{ h}^{-1}$  bis zum Erreichen des Steady States mit Acetat kultiviert. Diese Verdünnungsrate wurde gewählt, da hier bei Acetat und Benzoat etwa halbmaximales Wachstum beobachtet wurde. Nachdem der Steady State erreicht war, wurde das Acetat-haltige Medium durch ein Medium ersetzt, welches Acetat und Benzoat enthielt. Um den Verlauf des Anstiegs der Benzoatkonzentration im Chemostaten bis Konzentration im Medium zu ermitteln wurde ein steriles Kontrollexperiment im Chemostaten durchgeführt. Leider lagen bei Abschluss der Arbeit noch keine Ergebnisse der Benzoatkonzentrationen für diesen Versuch vor. Im Folgenden wurden 2,0 mM bzw. 0,5 mM Benzoat im Medium neben 8 mM mit Acetat verwendet. In diesen Experimenten sollte die Induktionzeit bzw. die Benzoatschwellenkonzentration bestimmt werden. Voraussetzung hierfür ist ein co-metabolischer Verbrauch beider Kohlenstoffquellen, welcher zuvor in Batchkulturen (K. Trautwein, unveröffentlichte Daten) nachgewiesen wurde.

### **2.1 Substratshift mit 2 mM Benzoat**

Der Verlauf des Experiments wurde über etwa 100 Stunden verfolgt, wobei das Hauptaugenmerk auf den Start des Substratshifts gerichtet wurde (Abbildung 8 und Tabelle 5). Ab dem Startzeitpunkt wurden Proben in 45 Minuten Intervallen bis zum Erreichen eines kompletten Mediaustauschs im Chemostaten (8,3 h bei  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ) genommen. Es wurden die  $OD_{660}$  (nicht dargestellt), die Zellzahl, die Acetat- und Benzoatkonzentrationen, sowie die Nitrat- und Nitritkonzentrationen bestimmt. Reinheitskontrollen erfolgten wie zuvor mittels FISH und Substrattests (Abbildungen siehe Appendix).

#### 2.1.1 Zellzahl.

Wie in der Abbildung 8 zu erkennen ist, erreichte die Zellzahl vor dem Starten des Substratshifts einen Wert von  $5,1 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Tabelle 5). Nachdem Start des Substratshifts kam es in den ersten sieben Stunden zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellzahl bis um das 1,5-Fache des Ausgangswerts auf  $3,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Abbildung 8 und Tabelle 5). Am Ende des Experiments erreichte die Zellzahl jedoch ein neues Maximum von



**Abbildung 8: Wachstum von „*A. aromatoleum*“ Stamm EbN1 während des Substratshift-Experiments mit 2,0 mM Benzoat im Chemostaten ( $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ).** Im oberen Teil der Abbildung sind die Konzentrationen von Acetat, Benzoat, Nitrat und Nitrit, sowie die Zellzahl über die Zeit dargestellt. Im unteren Teil sind die Redoxverhältnisse zwischen Elektronendonoren (Acetat und Benzoat) und dem Elektronenakzeptor Nitrat bzw. Nitrit dargestellt. Die Phase des Substratshifts ist grau hinterlegt. Vor dem Shift enthielt das Medium 8,0 mM Acetat und 16,0 mM Nitrat, während des Shifts zusätzlich noch 2,0 mM Benzoat. Der Substratshift wurde bei 72,3 h gestartet.

$7,1 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Wie schon während der Wachstumscharakterisierung zu beobachten war, korreliert auch hier die Abnahme der Zellzahl mit einem relativ hohen Gehalt an Nitrit.

### 2.1.2 Acetat

Die Konzentration von Acetat im Kulturüberstand blieb bis zum Starten des Substratshifts unterhalb des Detektionslimits von  $25 \mu\text{M}$  (Tabelle 5). Aus der Wachstumscharakterisierung (Abbildung 4) wäre ein Wert von etwa 0,30 mM zu erwarten gewesen. Mit Beginn des Substratshifts kam es nach etwa vier Stunden zu einer stetigen, fast linear aufsteigenden

**Tabelle 5: Konzentrationen von C-Quellen und Elektronenakzeptor während des Substratshifts mit 2,0 mM Benzoat.** Die Werte im oberen Teil beziehen sich auf die Inkubationsphase (Steady State) und der untere Teil auf die Phase des Shifts. Dargestellt ist eine Auswahl Messzeitpunkten. Der Substratshift wurde nach 72,3 Stunden gestartet.

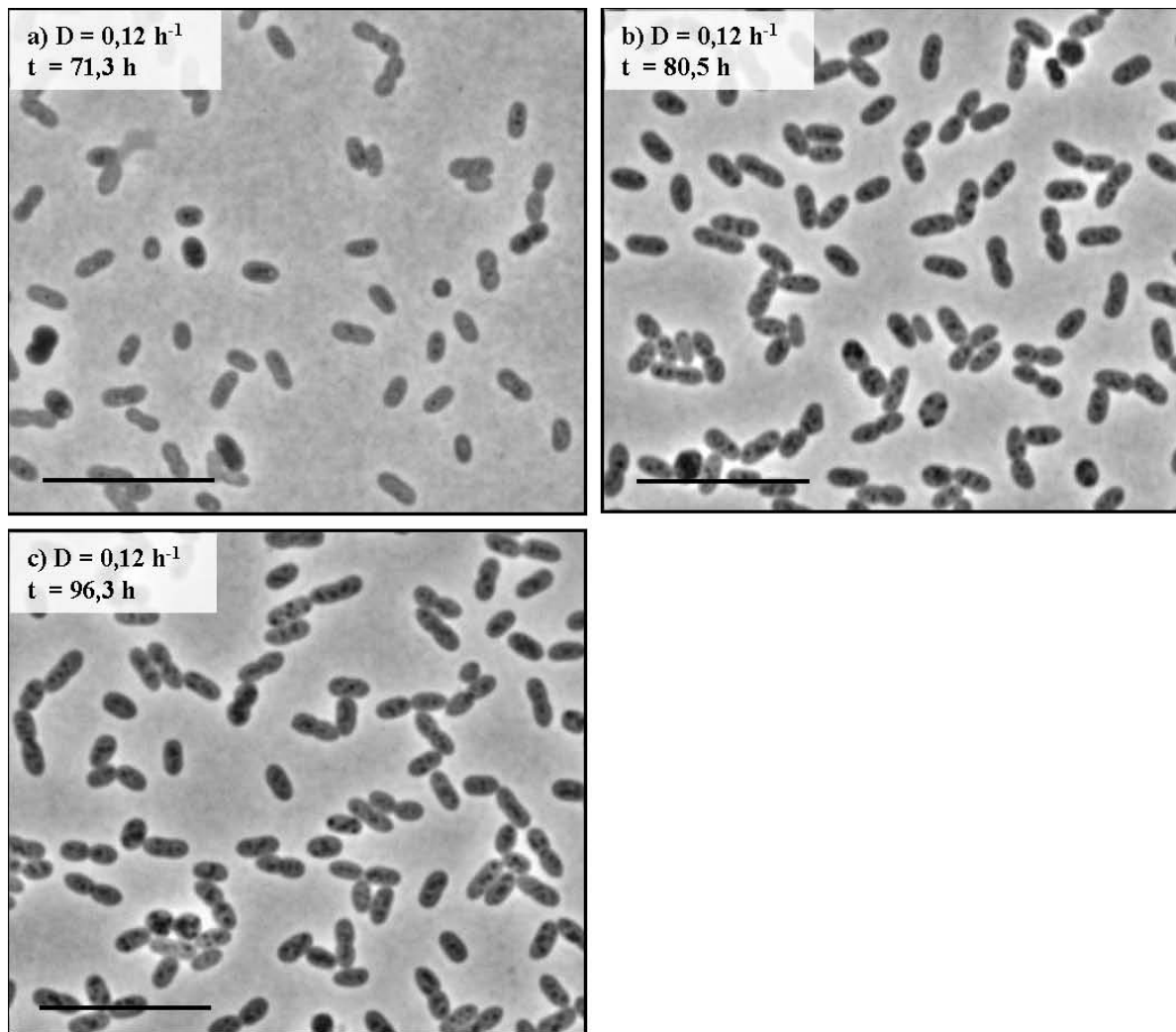
	ZEIT	ACETAT	BENZOAT	NITRAT	NITRIT	ZELLZAHL
	[h]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[mM]	[mM]	[Zellen/ml]
Steady State	71,5	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	3,8	3,9	$5,1 \cdot 10^8$
	73,3	u. D. <sup>1</sup>	110	3,6	7,6	$5,2 \cdot 10^8$
Substratshift	74,8	u. D. <sup>1</sup>	250	2,7	8,1	$4,3 \cdot 10^8$
	76,3	70	170	1,3	9,7	$3,9 \cdot 10^8$
	77,8	160	80	0,3	10,2	$3,7 \cdot 10^8$
	79,3	230	u. D. <sup>1</sup>	0,2	9,4	$3,5 \cdot 10^8$
	96,5	26	u. D. <sup>1</sup>	0,3	1,5	$7,1 \cdot 10^8$

<sup>1</sup> u. D.: unter Detektionslimit

Akkumulation von Acetat im Chemostaten (Abbildung 8). Dessen Maximum von 0,23 mM wurde etwa sieben Stunden nach Start des Substratshift erreicht und sank zum Ende des Experiments wieder auf einen Wert unterhalb des Detektionslimits (Tabelle 5). Der beobachtete Anstieg der Acetatkonzentration korrelierte mit dem Absinken des zuvor akkumulierten Benzoats, welches im Folgenden beschrieben wird.

### 2.1.3 Benzoat

Mit Start des Substratshifts kam es innerhalb der ersten 100 Minuten zu einem annähernd linearen Anstieg des Benzoatgehalts im Kulturüberstand (Abbildung 8), bis nach etwa 2,5 Stunden ein Maximum von 250  $\mu$ M erreicht wurde. Danach sank die Benzoatkonzentration stetig ab, bis diese nach weiteren 3,5 Stunden unter dem Detektionslimit ( $\sim 8 \mu$ M) lag (Tabelle 5). Die Konzentrationsmaxima von Benzoat und Acetat erschienen um etwa 4,5 Stunden versetzt voneinander (Abbildung 8 und Tabelle 5). Aufgrund zeitlicher Limitation konnte die sensitivere Methode zur Bestimmung der Benzoatkonzentrationen mit einer

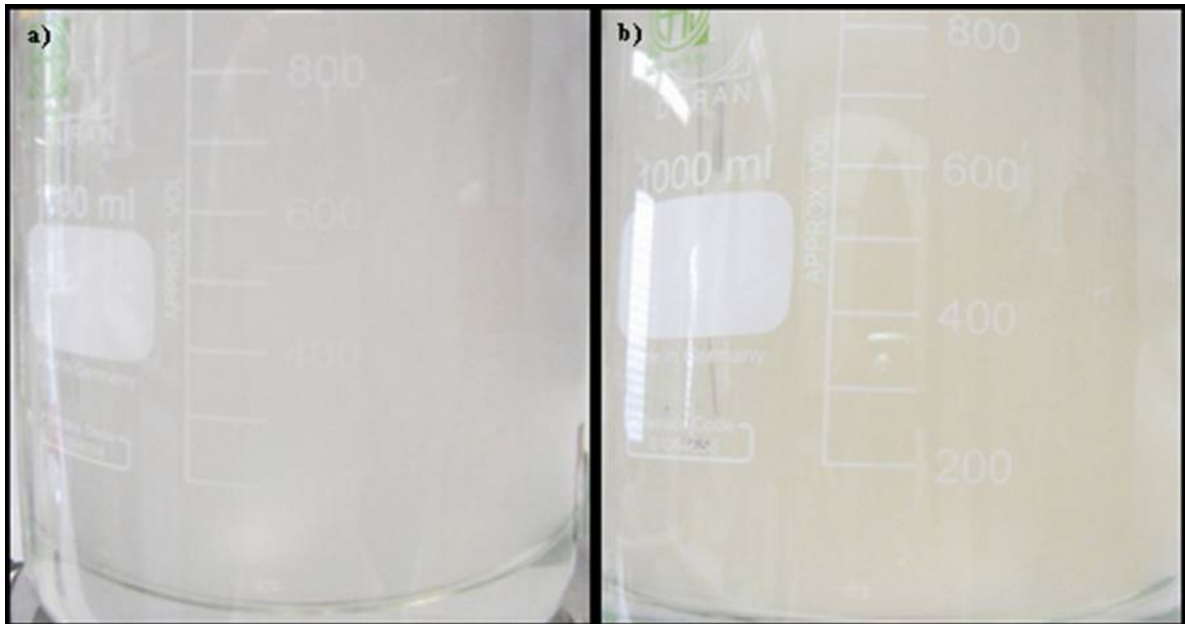


**Abbildung 9:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 während des Substratshifts mit 2,0 mM Benzoesäure. (a) Nach Erreichen des Acetat-limitierten Steady-States, (b,c) während des Substratshifts. In der linken oberen Ecke sind Verdünnungsrate ( $D$ ) und Inkubationszeit zum Zeitpunkt der Aufnahmen aufgeführt. Start des Substratshifts war nach 72,3 Stunden. Der Balken entspricht einer Länge von 10 µm.

Reversed-Phase-HPLC (Dörries, 2009) im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt werden.

#### 2.1.4 Nitrat bzw. Nitrit

Der Nitrat im Kulturüberstand blieb nach dem Erreichen des Steady States relativ konstant. Lediglich der Nitritgehalt zeigte einen Rückgang von etwa 6 mM auf 4 mM (Abbildung 8). Nach Start des Substratshifts erfolgte sofort eine stetige Abnahme des Nitratgehalts bis auf ein Minimum von 0,2 mM sieben Stunden nach Start des Substratshifts (Tabelle 5). Zum Ende des Experiments stabilisierte sich die Nitratkonzentration auf 0,3 mM. Das Absinken der

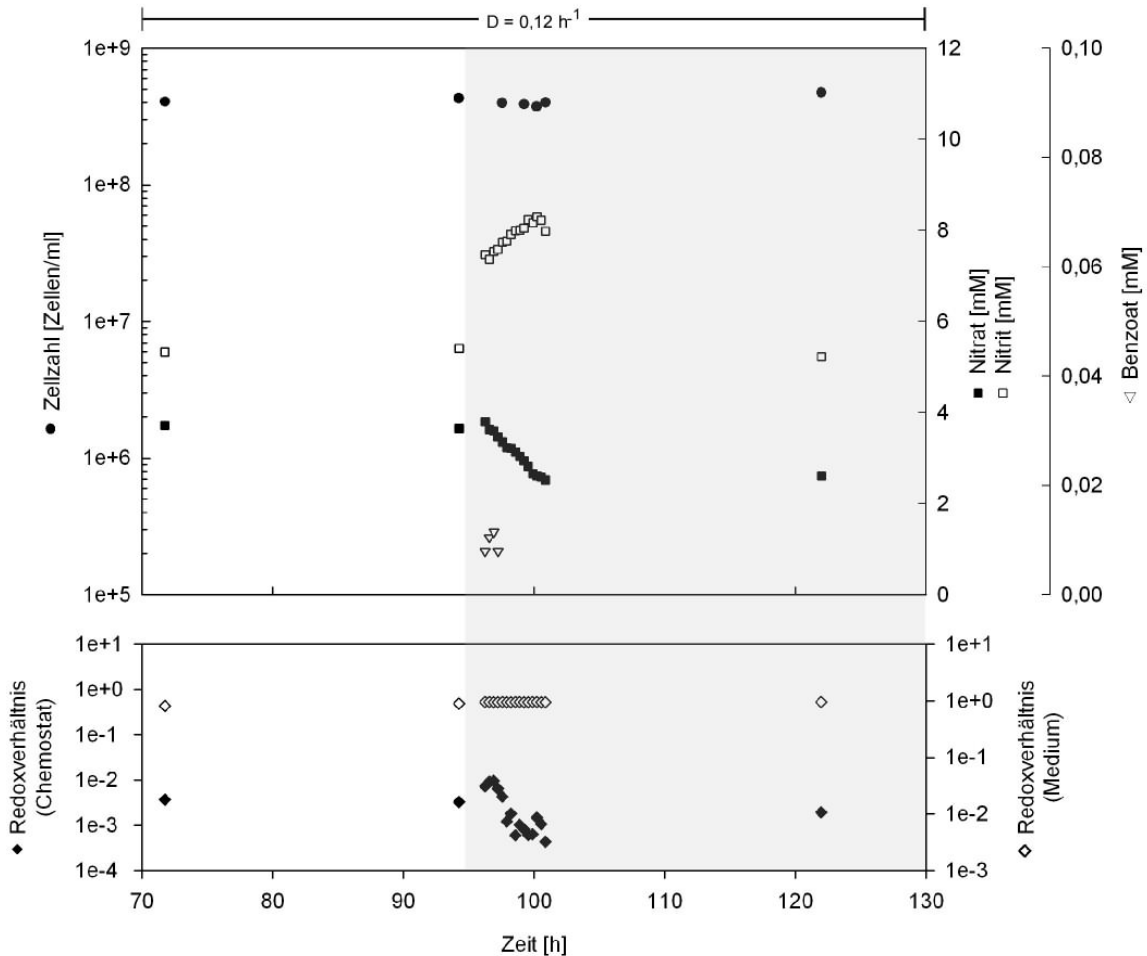


**Abbildung 10: Kulturgefäß während des Substratshift-Experiments mit 2,0 mM Benzoat. a) Zu Beginn (72 h) und b) am Ende (97 h) des Experiments.**

Nitratkonzentration verläuft in etwa parallel zum Absinken des zuvor akkumulierten Benzoats. Desweiteren kam es ebenfalls parallel zum Rückgang des Nitrats zu einer Akkumulation von Nitrit im Kulturüberstand bis zu einem Maximum von 10,2 mM. Anschließend fiel der Nitritgehalt, um sich am Ende auf einem Wert von 1,5 mM zu stabilisieren. Die Nitritakkumulation verläuft in etwa parallel zur der von Acetat (Abbildung 8).

### 2.1.5 Zellmorphologie

Die Zellen zeigen keine auffälligen morphologischen Veränderungen während der gesamten Inkubationszeit (Abbildung 9). Es ist jedoch klar zu erkennen, dass vermehrt PHB in den Zellen gebildet wurde (Abbildung 9). Das Auftreten der PHB korreliert zeitlich mit dem Absinken der Benzoatkonzentration, sowie mit dem Absinken des zuvor akkumulierten Acetats bei etwa 80 Stunden (Abbildung 8).



**Abbildung 11: Abbildung 8: Wachstum von „*A. aromatoleum*“ Stamm EbN1 während des Substratshift-Experiments mit 0,5 mM Benzoat im Chemostaten ( $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ).** Im oberen Teil der Abbildung sind die Konzentrationen von Benzoat, Nitrat und Nitrit, sowie die Zellzahl über die Zeit dargestellt. Die Acetatkonzentration lag in dem dargestellten Bereich unterhalb des Detektionslimits. Im unteren Teil sind die Redoxverhältnisse zwischen Elektronendonoren (Acetat und Benzoat) und dem Elektronenakzeptor Nitrat bzw. Nitrit dargestellt. Die Phase des Substratshifts ist grau hinterlegt. Vor dem Shift enthielt das Medium 8,0 mM Acetat und 16,0 mM Nitrat, während des Shifts zusätzlich noch 2,0 mM Benzoat. Der Substratshift wurde bei 95,9 h gestartet.

### 2.1.6 Färbung der Kulturbrühe

Acetat-limitierte Chemostaten von Stamm EbN1 sind weißlich-gefärbt, wohingegen Benzoat-limitierte Chemostaten eine milchig-gelbe Färbung zeigten (K. Trautwein, unveröffentlichte Daten). Mit Start des Substratshift-Experiments konnte ebenfalls eine ähnliche Veränderung in der Kulturfärbung beobachtet werden. Die Acetat metabolisierende Kultur zeigte im Steady State eine deutlich weiße Färbung (Abbildung 10a). Etwa 6 Stunden nach Start des Substratshifts zeigte die Kultur eine gelbe Färbung (Abbildung 10b).

**Tabelle 6: Konzentrationen von C-Quellen und Elektronenakzeptoren während des Substratshifts mit 0,5 mM Benzoat.** Die Werte im oberen Teil bezogen auf die Inkubationphase (Steady State) vor dem Start des Substratshifts und der untere Teil auf die Phase während des Shifts. Dargestellt ist eine Auswahl von Messzeitpunkten. Start des Substratshifts war nach 95,9 Stunden.

	ZEIT	ACETAT	BENZOAT	NITRAT	NITRIT	ZELLZAHL
	[h]	[ $\mu$ M]	[ $\mu$ M]	[mM]	[mM]	[Zellen/mL]
Steady State	94,3	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	3,7	5,4	$4,3 \cdot 10^8$
	96,3	u. D. <sup>1</sup>	8	3,8	7,5	n. a. <sup>2</sup>
Substratshift	96,9	u. D. <sup>1</sup>	12	3,6	7,5	n. a. <sup>2</sup>
	97,3	u. D. <sup>1</sup>	8	3,5	7,6	n. a. <sup>2</sup>
	97,6	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	3,4	7,8	$4,0 \cdot 10^8$
	99,2	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	3,0	8,1	$3,9 \cdot 10^8$
	100,2	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	2,6	8,3	$3,7 \cdot 10^8$
	122,0	u. D. <sup>1</sup>	u. D. <sup>1</sup>	2,6	5,2	$4,8 \cdot 10^8$

<sup>1</sup> u. D.: unter Detektionslimit

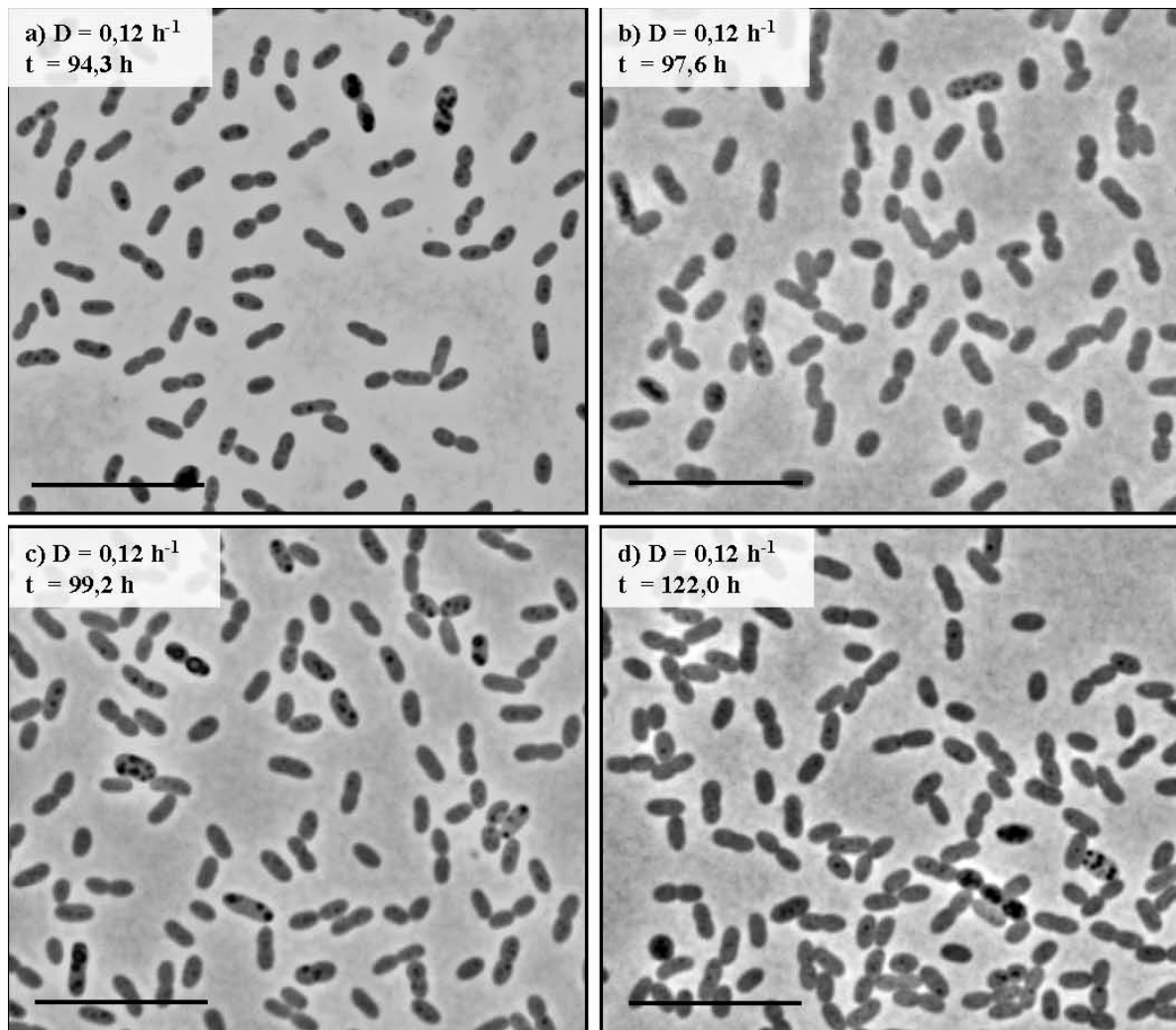
<sup>2</sup> n. a.: nicht analysiert

## 2.2 Substratshift mit 0,5 mM Benzoat

Der Verlauf des Experiments wurde über etwa 120 Stunden verfolgt, wobei das Hauptaugenmerk wie zuvor auf den Start des Substratshifts gerichtet wurde (Abbildung 11 und Tabelle 6). Dieser wurde mit höherer Auflösung infolge kürzerer Probenahmeintervallen von nur 20 Minuten untersucht.

### 2.2.1 Zellzahl

Die Zellzahl erreichte im Steady State des Acetat-limitierten Wachstums einen Wert von  $4,3 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Tabelle 6). Nach Start des Substratshifts, kam es ebenfalls zu einer stetigen Abnahme der Zellzahl um das 1,2-Fache auf von  $3,7 \cdot 10^8$  Zellen/ml (Abbildung 11 und Tabelle 6). Die Abnahme korrelierte ebenfalls mit relativ hohen Nitritkonzentrationen im Kulturüberstand von 8,3 mM. Die Zellzahl erreichte am Ende des Experiments ein, im Vergleich zum zuvor beschriebenen Substratshift mit 2 mM Benzoat, niedrigeres Maximum von  $4,8 \cdot 10^8$  Zellen/ml.



**Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 während des Substratshifts mit 0,5 mM Benzoat.** (a) Nach Erreichen des Acetat-limitierten Steady-States, (b,c und d) während des Substratshifts. In der linken oberen Ecke sind Verdünnungsrate ( $D$ ) und Inkubationszeit zu Zeitpunkt der Aufnahmen aufgeführt. Start des Substratshifts nach 95,9 Stunden. Der Balken entspricht einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.2 Acetat

Die Auswertung der Acetatkonzentration ergab, dass alle Konzentrationen der gemessenen Proben unter dem Detektionslimit von 25  $\mu\text{M}$  lagen.

### 2.2.3 Benzoat

Wie erwartet kam es mit Start des Shifts zunächst zu einer relativ linearen Akkumulation des Benzoats im Chemostaten. Ein Absinken der Benzoatkonzentration ist hier aber schon nach etwa 40 Minuten zu beobachten (Abbildung 11). Innerhalb der ersten Stunde erreichte das



Benzoat sein Maximum von 12  $\mu\text{M}$ , um anschließend innerhalb einer weiteren Stunde auf einen Wert unterhalb des Detektionslimit ( $< 8 \mu\text{M}$ ) zu fallen (Abbildung 11 und Tabelle 6). Wie schon zuvor erwähnt stehen auch hier noch weitere Analysen mit sensitivere Verfahren aus.

#### 2.2.4 Nitrat bzw. Nitrit

Der Nitrat- und Nitritgehalt im Kulturüberstand blieb im Steady State konstant bei 3,7 mM Nitrat und 5,4 mM Nitrit (Abbildung 11 und Tabelle 6). Mit Start des Substratshifts kam es zu einer sofortigen Abnahme des Nitratgehalts. Jedoch fiel dieser lediglich auf ein Minimum von 2,6 mM und blieb bis zum Ende des Experiments konstant. Der Nitritgehalt folgte wie erwartet einem gegenläufigen Trend mit einem Maximum von 8,3 mM und fiel im Anschluß auf einen Wert von 5,2 mM ab (Tabelle 6).

#### 2.2.5 Zellmorphologie

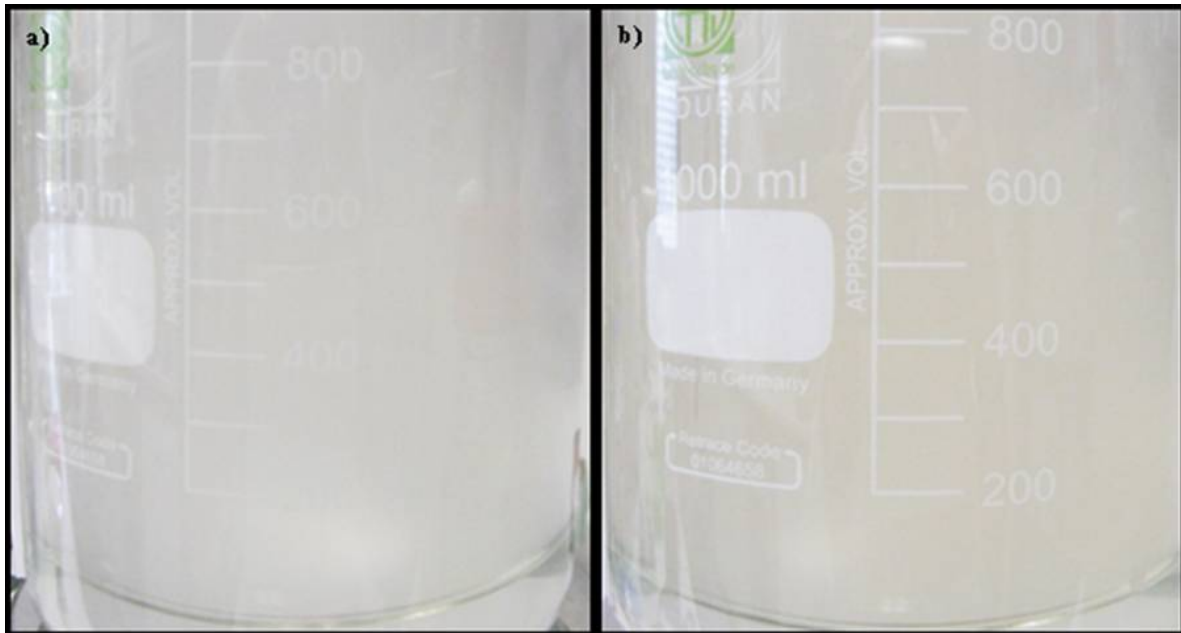
Die Zellen zeigen ebenfalls keine morphologischen Veränderungen während und am Ende des Experiments. Außerdem kam es während des Experiments zu keiner offensichtlichen vermehrten Akkumulation von PHB in den Zellen (Abbildung 12).

#### 2.2.6 Färbung der Kulturbrühe

Auch während des Verlauf dieses Experiments veränderte die Kulturfärbung (Abbildung 13). Sie fiel jedoch schwächer aus als zuvor beobachtet (Abbildung 10). In der „Acetat“-Phase war die Kultur weiß (Abbildung 13a), in der „Shift“-Phase gelb gefärbt (Abbildung 13b).

### **2.3 Diskussion der Substratshift-Experimente**

In der Natur kommt es bei Bakterien wohl eher selten zu einem ausbalanzierten Wachstum, wie es durch Campbell (1957) definiert wurde (Campbell, 1957). Bakterien sehen sich eher gezwungen ihren Metabolismus auf die sich ständig ändernden Umweltbedingungen anzupassen. Für ein Verständnis der Ökologie mikrobiellen Wachstums ist es daher wichtig, die zellulären Prozesse während solcher Änderungen (z.B. Nährstoffversorgung, Redoxbedingungen etc.) zu erforschen. Bereits zahlreiche Studien untersuchten das



**Abbildung 13: Kulturgefäß während des Substratshift-Experiments mit 0,5 mM Benzoat.** a) Zu Beginn (72 h) und b) am Ende (122 h) des Experiments.

mikrobielle Verhalten basierend auf Änderungen der Kultivierungsbedingungen, wie etwa dem Wechsel von Wachstumssubstraten (Standing et al., 1972; Gottschal et al., 1981; Gottschal, 1993), den Einfluss des verwendeten Mediums und der Temperatur (Kjeldgaard et al., 1958; Schaechter et al., 1958) oder Auswirkungen von Hungerzuständen (Holmquist and Kjelleberg, 1993). Der Chemostat eignet sich für solche Studien besonders gut, da man das Verhalten von Mikroorganismen auf schnelle wie auch langsame Änderungen sehr gut beobachten kann.

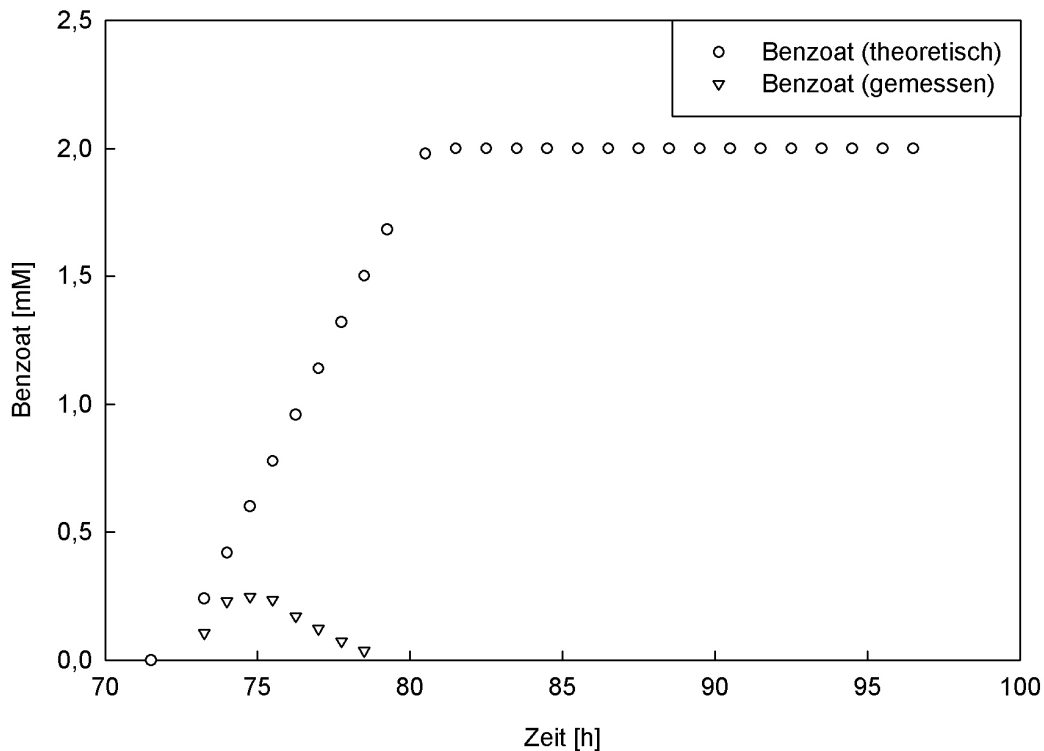
Die Substratshift-Experimente dienen dazu, tiefere Einblicke in die Induktion des Benzoatstoffwechsels von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 zu erlangen. Anhand der ersten Experimente sollte der Induktionszeitraum sowie die induktiv wirksame Substratkonzentration für den Benzoatstoffwechsel ermittelt werden. Dazu wurde Stamm EbN1 jeweils auf Acetat im Chemostaten mit  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$  bis zum Erreichen des Steady States kultiviert. Im Anschluss wurde neben Acetat noch Benzoat in verschiedenen Konzentrationen als zusätzliche Kohlenstoffquelle dem Medium zugesetzt.

Ein während des Experiments sehr auffälliges Phänomen war die Veränderung der Kulturfarbe nach Start des Substratshifts (Abbildung 10 und 13). Dabei ist der Kulturüberstand klar und nur das Zellpellet verfärbt. Eine gelbe Zellfärbung konnte schon

öfter bei Wachstum auf aromatischen Verbindungen beobachtet werden, eine genaue Erklärung wurde jedoch nicht gegeben (Tausson, 1929; Claus and Walker, 1964; Williams and Murray, 1974; Kong and Sayler, 1983).

Die Acetat-limitierten Kulturen verhielten sich während der Etablierung des Steady States bei  $D = 0,12 \text{ h}^{-1}$  erwartungsgemäß. Die Zellzahlen, sowie der Nitrat- und Nitritgehalt im Kulturüberstand waren bei beiden Experimenten (2 mM und 0,5 mM Benzoat) vergleichbar zu den Ergebnissen der vorherigen Wachstumscharakterisierung (Abbildung 4). Der Acetatgehalt lag jedoch unterhalb des Detektionslimits, obwohl ein Wert von etwa 0,3 mM Acetat zu erwarten gewesen wäre. Ein möglicher Grund könnte der Wechsel der HPLC-Trennsäule sein. Die neue Trennsäule könnte aufgrund einer anderen Kapazität die Auftrennung der sehr heterogenen Chemostatenproben, nicht aber die der Standards beeinflusst haben (Appendix Abbildung S19). Mit Start des ersten Shiftexperiments mit 2 mM Benzoat war eine mit der Aufnahme des Benzoats korrelierende Akkumulation von Acetat zu beobachten (Abbildung 8). Dies könnte auf die Verfügbarkeit von Coenzym A zurückzuführen sein, dessen zelluläre Konzentration relativ konstant ist (Wolfe, 2005). Für die Aktivierung von Benzoat und Acetat wurde möglicherweise dieser Pool erschöpft, sodass freies Coenzym A limitiert war und zu dessen Regeneration aus Acetyl-CoA Acetat gebildet wurde. Letzteres würde von den Zellen exkretiert werden und im Medium akkumulieren. Dies ist als „Acetat-Switch“ bekannt und wurde schon für verschiedene Organismen nachgewiesen (Wolfe, 2005). Für die Herkunft des akkumulierten Acetats sind zwei Möglichkeiten denkbar: (i) Benzoat reprimiert die Aufnahme von Acetat in die Zelle, sodass das Acetat aufgrund der kontinuierlichen Mediumzufuhr akkumuliert. Dafür spricht der fast linear Anstieg der Acetatkonzentration. Dagegen spricht die hier und in Batchversuchen beobachtete Ko-Metabolisierung von Acetat und Benzoat (K. Trautwein, unveröffentlichte Daten). (ii) Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das akkumulierende Acetat aus Acetyl-CoA stammt, welches zuvor durch den Abbau von Benzoat gebildet wurde.

Unter sterilen Bedingungen sollte es in der Substratshift-Phase zunächst zu einem linearen Anstieg der Benzoatkonzentration im Chemostaten kommen. Eine theoretische Akkumulationskurve für Benzoat ist in der Abbildung 14 zusammen mit der gemessenen Konzentration dargestellt. Mit Start des ersten Shiftexperiments stieg zunächst die Benzoatkonzentration im Chemostaten an. Der fast lineare Anstieg, der annähernd dem theoretisch berechneten entsprach (Abbildung 14), könnte darauf schließen lassen, dass noch kein Benzoat konsumiert wurde. Nach der anfänglich Akkumulation des Benzoats, kam es im



**Abbildung 14: Theoretische und gemessene Benzoatakkumulation während des Substratshifts mit 2,0 mM Benzoat.** Für die Berechnung der theoretischen Benzoatakkumulation im Chemostaten wurde die folgende Formel verwendet:  $S = D \cdot S_R \cdot \Delta t$ .

2,5 Stunden nach Start des Experiments schien der Benzoatverbrauch der Zellen und die Versorgung mit Benzoat im Gleichgewicht zu stehen, dies wird anhand des Maximums der Benzoatkurve ersichtlich (Abbildung 8). Im zweiten Shiftexperiment (0,5 mM Benzoat) konnte aufgrund des engeren Probenahmeintervalles schon nach etwa 40 Minuten ein Rückgang der Akkumulation beobachten werden (Abbildung 11 und Tabelle 6). Da aber die Benzoatakkumulation langsamer verlief als die theoretisch berechnete, kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, ob Benzoat nicht schon früher aufgenommen wurde. Daher wurde versucht anhand der Änderung des Nitrat- und Nitritgehalts der Proben (als indirekten Marker) den Beginn der Benzoatverwertung zu bestimmen. Im ersten Experiment mit 2 mM Benzoat im Mediumvorrat konnte mit der ersten Probenahme eine Stunde nach Beginn des Shifts bereits ein Rückgang der Nitratkonzentration, sowie eine Akkumulation von Nitrit beobachtet werden (Abbildung 8). Im Experiment mit 0,5 mM Benzoat fand dies bei der zweiten Probenahme nach 40 Minuten statt (Abbildung 11). Zu dieser Zeit sollte die theoretische Benzoatkonzentration im Chemostaten bei 240  $\mu\text{M}$  (mit 2 mM im Medium) und

bei 40  $\mu\text{M}$  (mit 0,5 mM im Medium) liegen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zeit vom Erkennen des Benzoats bis zur Aufnahme und Abbau durch Stamm EbN1 deutlich unter 40 Minuten liegen muss. Es konnte gezeigt werden, dass bei anaerobem Wachstum von *Thauera aromatica* mit Acetat bereits eine basale Menge der Benzoyl-CoA Reduktase synthetisiert wird. Für die Benzoyl-CoA-Ligase konnte zusätzlich eine scheinbar semikonstitutive Expression nachgewiesen werden (Heider et al., 1998). Im Falle des nahverwandten Bakteriums *Azoarcus* sp. Stamm CIB wurde jedoch während des Wachstums auf Succinat keine Aktivität der Benzoat-CoA-Ligase beobachtet (Lopez Barragan et al., 2004). Stamm CIB zeigt jedoch auch eine Katabolitrepression für Acetat (Barragán et al., 2004), die bei Stamm EbN1 nicht vorliegt. Proteomische Studien mit anaerob Acetat- und Benzoat-adaptierten Zellen von Stamm EbN1 zeigten eine Induktion der Benzoyl-CoA Reduktase (BcrCBAD) bei Wachstum mit Benzoat, allerdings lagen auch geringe Konzentrationen der vier Untereinheiten der Bcr in Proteinextrakten Acetat-gewachsener Zellen vor (Affeldt, 2005). Das Phänomen des schnellen Benzoatabbaus konnte auch schon während eines Substratshifts in Batchkultur beobachtet werden. Quantitative Reverse Transkriptase-PCR-Analysen (qRT-PCR) zeigten zusätzlich, dass kein Unterschied im Expressionsmuster des Gens einer Untereinheit der Benzoyl-CoA Reduktase (*bcrD*) im Vergleich zum Referenzzustand mit Acetat vorliegt (Affeldt, 2005). Vergleichbare Chemostatenversuche mit *Chelatobacter heinzii* mit Glucose und Nitritotriacetat (Bally and Egli, 1996) und *E. coli* mit Glucose und Xylose (Standing et al., 1972), zeigten eine eher langsame Induktion von mehreren Stunden. Für aromatische Verbindungen liegen zur Zeit keine vergleichbaren Studien vor. Es konnte jedoch in mehreren Fällen gezeigt werden, dass Kohlenstoff-limitiertes Wachstum im Chemostaten zu einer höheren physiologischen Flexibilität durch Derepression verschiedener Stoffwechselwege führt (Matin et al., 1976; Egli et al., 1980; Sepers, 1984; Lendenmann and Egli, 1995; Ihssen and Egli, 2005). Dies könnte erklären, warum eine derart rapide Aufnahme und Verwertung des Benzoats zu beobachten war.

Vor Kurzem konnte die Funktion eines Regulatorproteins (BzdR) des anaeroben Benzoatabbaus in einem nahverwandten Bakterium *Azoarcus* sp. Stamm CIB aufgeklärt werden. Eine homologe DNA-Sequenz findet sich auch vor dem Operon der Gene des anaeroben Benzoatabbaus in Stamm EbN1 (Rabus et al., 2005a). Die Bindung erfolgt dabei an repetitive Sequenzen im Promotorbereich des Operons für den anaeroben Benzoatabbau (Barragán et al., 2005). Diese repetitiven Sequenzen liegen im Genom von Stamm EbN1 in verminderter Zahl, verglichen mit *Azoarcus* sp. Stamm CIB, vor. Eventuell hat dies einen

Einfluss auf die Repression von BzdR in Stamm EbN1. Vielleicht beruht der schnelle Benzoatabbau aber auch auf einer höheren physiologischen Flexibilität von Stamm EbN1 während der Kultivierung im Chemostaten, wie es auch schon bei anderen Organismen beobachtet wurde (Matin et al., 1976; Egli et al., 1980; Sepers, 1984; Lendenmann and Egli, 1995; Ihssen and Egli, 2005).

## **D Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Eindrücke der Dynamik und Induktion des Benzoatstoffwechsels im Chemostaten bei Substratshift-Experimenten gewonnen werden. Eine genaue Auflösung des Induktionszeitraums sowie eine Bestimmung der induktiv wirksamen Benzoatkonzentration für die Induktion konnte jedoch nicht erreicht werden, da sensitive Benzoatnachweismethoden im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen nicht eingesetzt werden konnten. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen scheint die Schwellenkonzentration für die Induktion des Benzoatstoffwechsels unerwartet niedrig zu sein, daher ist bei zukünftigen Experimenten in Bezug auf die verwendeten Materialien und Lösungen besondere Vorsicht angebracht, da Konzentrationen im sub- $\mu$ M Bereich für die Induktion des Benzoatstoffwechsels bereits ausreichend zu sein scheinen. Die Analyse der Daten sollte dabei durch sensitivere Verfahren, wie der Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase) oder der flüssig-chromatographischen Massenspektroskopie (LC-MS) erfolgen. Proteomische Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten des Substratshifts könnten helfen die Induktion noch genauer zu verfolgen. Zudem würden diese bei der Ermittlung der Benzoatschwellenkonzentration helfen. Im Sinne der Substratshift-Experimente könnten quantitative Mikroarrays zur parallelen Expressionsanalyse mehrerer Gene des Benzoatoperons hergestellt werden. Hierdurch könnte die Genexpression des Benzoatstoffwechsels zu verschiedenen Zeitpunkten des Substratshifts analysiert werden. Jedoch sollten die Ergebnisse solcher Verfahren mit Vorsicht betrachtet werden, da das Vorliegen von mRNA nicht heißt, dass auch Proteine entstehen.

## E Literaturverzeichnis

- Affeldt, K. (2005) Regulation von Enzymen des anaeroben Alkylbenzol-Abbaus unter oxischen Bedingungen in einem denitrifizierenden Bakterium, Stamm EbN1. In *Biotechnologie*. Hamburg: Hochschule für Angewandte Wissenschaften
- Almeida, J.S., Reis, M.A.M., and Carrondo, M.J.T. (1995) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 476-484.
- Bally, M., and Egli, T. (1996) Dynamics of substrate consumption and enzyme synthesis in *Chelatobacter heintzii* during growth in carbon-limited continuous culture with different mixtures of glucose and nitrilotriacetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 133-140.
- Barragán, M.J.L., Blázquez, B., Zamarro, M.T., Mancheno, J.M., Garcia, J.L., Diaz, E., and Carmona, M. (2005) BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **280**: 10683-10694.
- Barragán, M.J.L., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G. et al. (2004) The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J. Bacteriol.* **186**: 5762-5774.
- Betlach, M.R., and Tiedje, J.M. (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 1074-1084.
- Boll, M., Fuchs, G., and Heider, J. (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 604-611.
- Bormann, E.-J. (2000) Stoichiometrically calculated yields of the growth-associated production of polyhydroxybutyrate in bacteria. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1437-1442.
- Bowley, A. (1928) FY Edgeworth's contributions to mathematical statistics In. London: Royal Statistical Society, p. 101.
- Brown, T.D.K., Jones-Mortimer, M.C., and Kornberg, H.L. (1977) The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 327-336.
- Campbell, A. (1957) Synchronization of cell division. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **21**: 263-272.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A. et al. (2009) Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**: 71-133.



- Claus, D., and Walker, N. (1964) The decomposition of toluene by soil bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **36**: 107-122.
- Collier, L.S., Nichols, N.N., and Neidle, E.L. (1997) benK encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter sp.* strain ADP1. *J. Bacteriol.* **179**: 5943-5946.
- Cornish-Bowden, A. (1979) *Fundamentals of enzyme kinetics*. London: Butterworths.
- Demain, A.L., Davies, J.E., and Atlas, R.M. (1999) Manual of industrial microbiology and biotechnology. In. Washington D.C., USA: ASM Press, p. 151.
- Dorner, E., and Boll, M. (2002) Properties of 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from *Thauera aromatica* and its role in enzymatic reduction of the aromatic ring. *J. Bacteriol.* **184**: 3975-3983.
- Dörries, M. (2009) Wachstum des denitrifizierenden Bakteriums *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 im Chemostat: HPLC und membranproteomische Untersuchungen. In *Fakultät V - Mathematik und Naturwissenschaften*. Bachelor thesis: Universität Oldenburg.
- Dowd, J.E., and Riggs, D.S. (1965) A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chem.* **240**: 363-369.
- Eadie, G.S. (1942) The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *J. Biol. Chem.* **146**: 85-93.
- Ebenau-Jehle, C., Boll, M., and Fuchs, G. (2003) 2-oxoglutarate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Azoarcus evansii*: properties and function in electron transfer reactions in aromatic ring reduction. *J. Bacteriol.* **185**: 6119-6129.
- Egli, T., Dijken, J.P., Veenhuis, M., Harder, W., and Fiechter, A. (1980) Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* **124**: 115-121.
- Eisenthal, R., and Cornish-Bowden, A. (1974) The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* **139**: 715-720.
- El Hassan, G.A., Zablotowicz, R.M., and Focht, D.D. (1985) Kinetics of denitrifying growth by fast-growing cowpea Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 517-521.
- Esteve-Núñez, A., Rothermich, M., Sharma, M., and Lovley, D. (2005) Growth of *Geobacter sulfurreducens* under nutrient-limiting conditions in continuous culture. *Environ. Microbiol.* **7**: 641-648.
- Ferenci, T. (1999) 'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res. Microbiol.* **150**: 431-438.

- Fuchs, G. (2008) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**: 82-99.
- Galushko, A.S., and Schink, B. (2000) Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* **174**: 314-321.
- Gimenez, R., Nunez, M.F., Badia, J., Aguilar, J., and Baldoma, L. (2003) The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 6448-6455.
- Gottschal, J., Pol, A., and Kuenen, J. (1981) Metabolic flexibility of *Thiobacillus A 2* during substrate transitions in the chemostat. *Arch. Microbiol.* **129**: 23-28.
- Gottschal, J.C. (1993) Growth kinetics and competition - some contemporary comments. *Antonie Leeuwenhoek* **63**: 299-313.
- Haldane, J.B.S., and Stern, K.G. (1932) Allgemeine Chemie der Enzyme. In. Dresden & Leipzig: Steinkopff, p. 119.
- Hanes, C.S. (1932) Studies on plant amylases I. The effect of starch concentration upon velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* **26**: 1406-1421.
- Healey, F.P. (1980) Slope of the Monod equation as an indicator of advantage in nutrient competition. *Microb. Ecol.* **5**: 281-286.
- Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U. et al. (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **170**: 120-131.
- Herbert, D., Elsworth, R., and Telling, R.C. (1956) The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 601-622.
- Hernandez, D., and Rowe, J.J. (1988) Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. *J. Biol. Chem.* **263**: 7937-7939.
- Hofstee, B.H.J. (1952) On the evaluation of the constants  $V_m$  and  $K_M$  in enzyme reactions. *Science* **116**: 329-331.
- Holmquist, L., and Kjelleberg, S. (1993) Changes in viability, respiratory activity and morphology of the marine *Vibrio sp.* strain S14 during starvation of individual nutrients and subsequent recovery. *FEMS Microbiol. Ecol.* **12**: 215-223.
- Ihssen, J., and Egli, T. (2005) Global physiological analysis of carbon- and energy-limited growing *Escherichia coli* confirms a high degree of catabolic flexibility and preparedness for mixed substrate utilization. *Environ. Microbiol.* **7**: 1568-1581.

- Johansen, G., and Lumry, R. (1961) Statistical analysis of enzymic steady-state rate data. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* **32**: 185-214.
- Jolkver, E., Emer, D., Ballan, S., Kramer, R., Eikmanns, B.J., and Marin, K. (2009) Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **191**: 940-948.
- Kjeldgaard, N.O., Maaloe, O., and Schaechter, M. (1958) The transition between different physiological states during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**: 607-616.
- Kong, H.L., and Sayler, G.S. (1983) Degradation and total mineralization of monohalogenated biphenyls in natural sediment and mixed bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 666-672.
- Kovarova-Kovar, K., and Egli, T. (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **62**: 646-666.
- Laempe, D., Jahn, M., and Fuchs, G. (1999) 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **263**: 420-429.
- Laempe, D., Eisenreich, W., Bacher, A., and Fuchs, G. (1998) Cyclohexa-1,5-diene-1-carboxyl-CoA hydratase, an enzyme involved in anaerobic metabolism of benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **255**: 618-627.
- Lendenmann, U., and Egli, T. (1995) Is *Escherichia coli* growing in glucose-limited chemostat culture able to utilize other sugars without lag? *Microbiology* **141**: 71-78.
- Lineweaver, H., and Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
- Liu, Y. (2007) Overview of some theoretical approaches for derivation of the Monod equation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 1241-1250.
- Lobry, J., Flandrois, J., Carret, G., and Pave, A. (1992) Monod's bacterial growth model revisited. *Bull. Math. Biol.* **54**: 117-122.
- Lopez Barragan, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G. et al. (2004) The *bzd* Gene Cluster, Coding for Anaerobic Benzoate Catabolism, in *Azoarcus* sp. Strain CIB. *J. Bacteriol.* **186**: 5762-5774.
- Lottspeich, F., and Engels, J.W. (2006) *Bioanalytik*. München, Germany: Spektrum akademischer Verlag.

- Lovley, D.R., and Chapelle, F.H. (1995) Deep subsurface microbial processes. *Rev. Geophys.* **33**: 365-381.
- Matin, A., Grootjans, A., and Hogenhuis, H. (1976) Influence of dilution rate on enzymes of intermediary metabolism in two freshwater bacteria grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **94**: 323-332.
- Menzel, K., Zeng, A.-P., Biebl, H., and Deckwer, W.-D. (1996) Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 549-560.
- Michaelis, L., and Menten, M.L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**: 333-369.
- Monod, J. (1949) The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* **3**: 371-394.
- Monod, J. (1950) La technique de culture continue: théorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* **79**: 390-410.
- Neubauer, H., and Gotz, F. (1996) Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* **178**: 2005-2009.
- Novick, A., and Szilard, L. (1950) Description of the chemostat. *Science* **112**: 715-716.
- Paalme, T., Elken, R., Kahru, A., Vanatalu, K., and Vilu, R. (1997) The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie Leeuwenhoek* **71**: 217-230.
- Postma, E., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1988) Adaptation of the kinetics of glucose transport to environmental conditions in the yeast *Candida utilis* CBS 621: a continuous-culture study. *J Gen Microbiol* **134**: 1109-1116.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1989) Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 468-477.
- Rabin, R.S., and Stewart, V. (1993) Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**: 3259-3268.
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**: 96-103.
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2005a) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **183**: 27-36.

- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., and Reinhardt, R. (2005b) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* **183**: 27-36.
- Rabus, R., Wöhlbrand, L., Lange, D., Meyer, M., Reinhold-Hurek, B., Widdel, F., and Kämpfer, P. (2008) *Aromatoleum* gen. nov., a novel genus accomodating the phylogenetic lineage including *Azoarcus evansii* and related species, and proposal of *A. aromaticum* sp. nov., *A. petroleum* sp. nov., *A. bremensis* sp. nov., *A. toluolicum* sp. nov., and *A. diolicum* sp. nov. *unpublished*.
- Richards, F.J. (1959) A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* **10**: 290-301.
- Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1992) The effect of electron acceptor variations on the behaviour of *Thiosphaera pantotropha* and *Paracoccus denitrificans* in pure and mixed cultures. In, pp. 221-228.
- Schaechter, M., Maaloe, O., and Kjeldgaard, N.O. (1958) Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **19**: 592-606.
- Schlegel, H.G., Lengeler, J.W., and Drews, G. (1999) *Biology of the prokaryotes*. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag.
- Schlesinger, W.H., and Andrews, J.A. (2000) Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* **48**: 7-20.
- Sepers, A.B.J. (1984) The uptake capacity for organic compounds of two heterotrophic bacterial strains at carbon-limited growth. *Z. Allg. Mikrobiol.* **24**: 261-267.
- Snoep, J.L., Mrwebi, M., Schuurmans, J.M., Rohwer, J.M., and Teixeira de Mattos, M.J. (2009) Control of specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **155**: 1699-1707.
- Standing, C.N., Fredrickson, A.G., and Tsuchiya, H.M. (1972) Batch- and continuous-culture transients for two substrate systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **23**: 354-359.
- Starai, V.J., and Escalante-Semerena, J.C. (2004) Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *Cell. Mol. Life Sci.* **61**: 2020-2030.
- Stewart, V. (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**: 425-434.
- Tamang, D., Rabus, R., Barabote, R., and Saier, M. (2009) Comprehensive analyses of transport proteins encoded within the genome of “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *J. Membr. Biol.* **229**: 53-90.

- Tausson, W.O. (1929) Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien. *Planta* **7**: 735-758.
- Trautwein, K., Kuhner, S., Wohlbrand, L., Halder, T., Kuchta, K., Steinbuchel, A., and Rabus, R. (2008) Solvent stress response of the denitrifying bacterium "Aromatoleum aromaticum" strain EbN1. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2267-2274.
- Tschech, A., and Fuchs, G. (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **148**: 213-217.
- van Niel, W.J., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995) Rapid short-term poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Thiosphaera pantotropha* in the presence of excess acetate. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 977-982.
- Verhulst, P.F. (1845) Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Mem. Acad. Sci. Lett. Belg.* **18**: 1-38.
- Verhulst, P.F. (1847) Deuxième mémoire sur la loi d'accroissement de la population. *Mem. Acad. Sci. Lett. Belg.* **20**: 1-18.
- Verseveld, H.W., Meijer, E.M., and Stouthamer, A.H. (1977) Energy conservation during nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Microbiol.* **112**: 17-23.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W. et al. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol. Appl.* **7**: 737-750.
- Wick, L.M., Weilenmann, H., and Egli, T. (2002) The apparent clock-like evolution of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics. *Microbiology* **148**: 2889-2902.
- Widdel, F. (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. In. Ph. D. thesis: University of Göttingen.
- Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wilkinson, G.N. (1961) Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem. J.* **80**: 324-332.
- Williams, P.A., and Murray, K. (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **120**: 416-423.
- Winterling, S. (2009) Ganz-Zell-Hybridisierungs- und durchflusszytometrische Untersuchungen von Chemostatenproben des Denitrifizierers "Aromatoleum aromaticum" Stamm EbN1 In. Bachelor thesis: Universität Oldenburg.

Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., and Rabus, R. (2007) Functional proteomic view of metabolic regulation in "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. *Proteomics* **7**: 2222-2239.

Wolfe, A.J. (2005) The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 12-50.

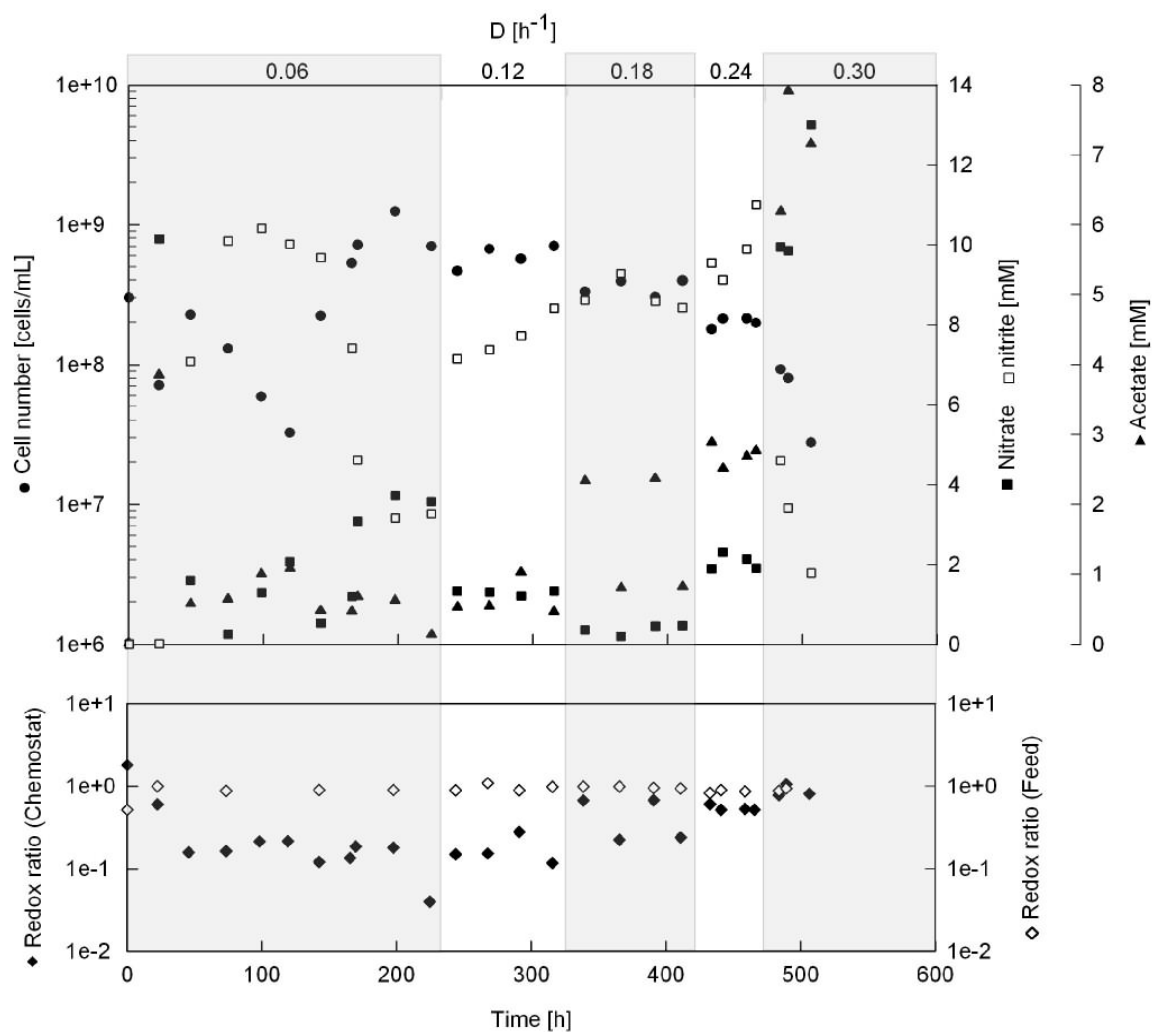
Xiu, Z.-L., Zeng, A.-P., and Deckwer, W.-D. (1998) Multiplicity and stability analysis of microorganisms in continuous culture: Effects of metabolic overflow and growth inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 251-261.

Zevenboom, W., and Mur, L.R. (1981) Simultaneous short-term uptake of nitrate and ammonium by *Oscillatoria agardhii* grown in nitrate- or light-limited continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 355-363.

Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **61**: 533-616.

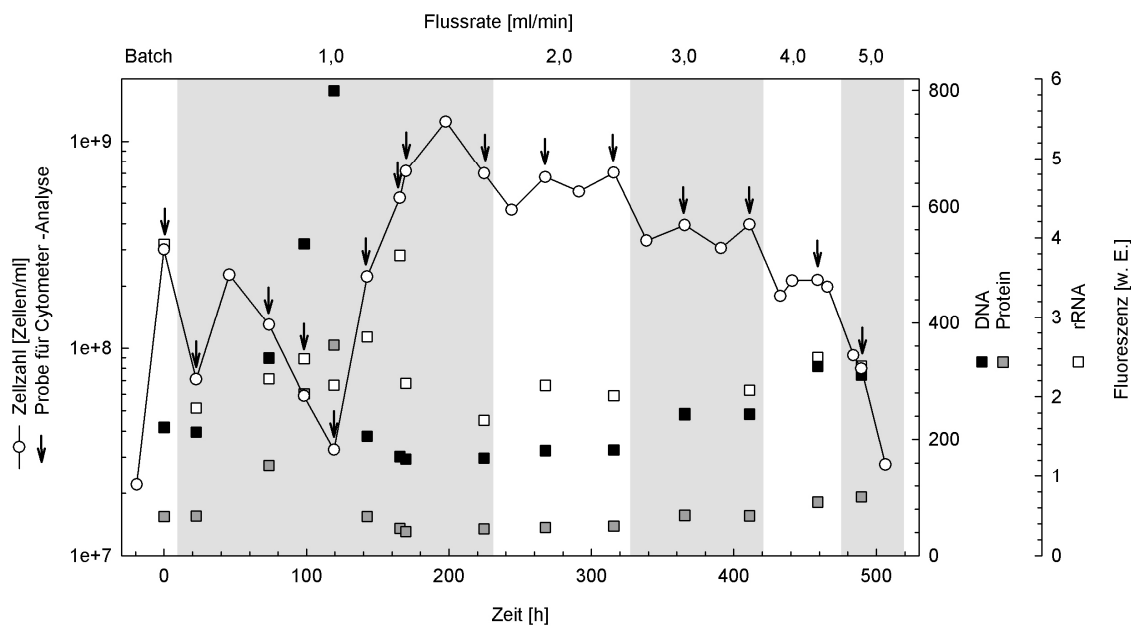
## F Appendix

### Chemostat 01/2009: 10 mM Acetat, 16 mM Nitrat

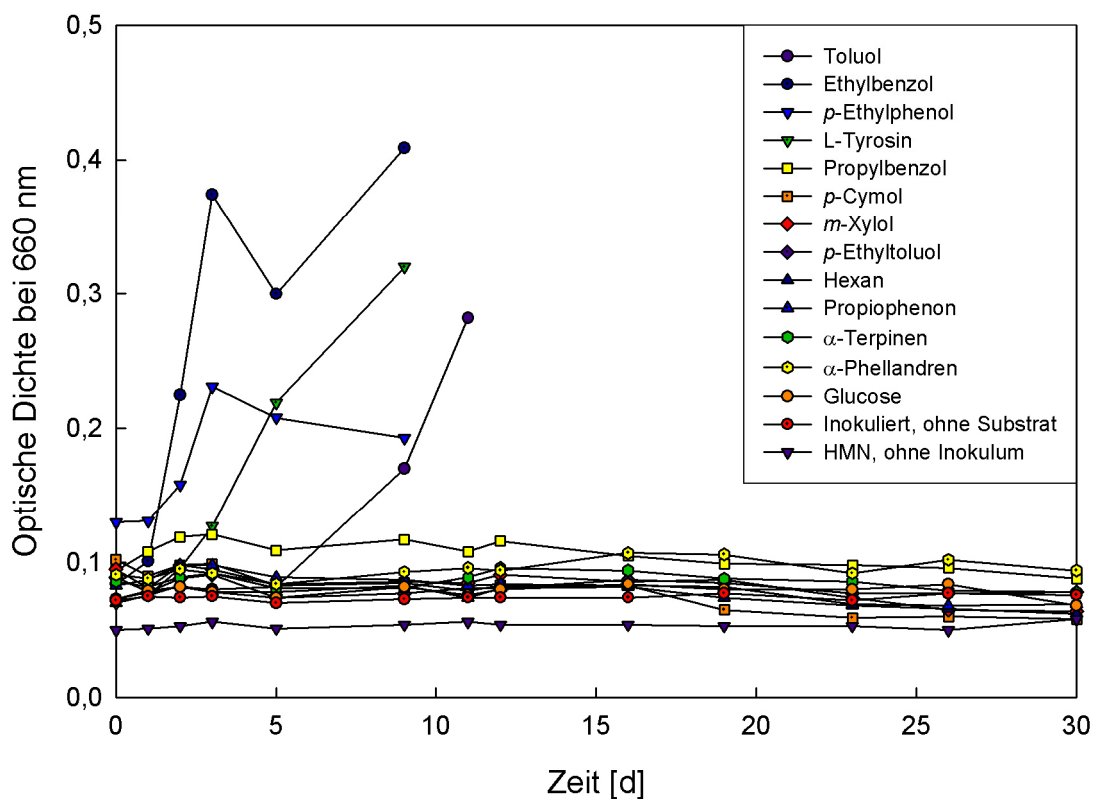


**Abbildung S1: Acetat-limitiertes anaerobes Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten.** Im oberen Teil der Abbildung sind die Konzentrationen von Acetat, Nitrat und Nitrit, sowie die Zellzahl über die Zeit dargestellt. Die verschiedenen Verdünnungsraten (0.06 bis 0.30 h<sup>-1</sup>) sind grau bzw. weiß hinterlegt. Im unteren Teil sind die Redoxverhältnisse zwischen Acetat und Nitrat im Chemostaten (Erklärung s. Kapitel C), sowie im zulaufenden Medium dargestellt. Das zulaufende Medium enthielt 10 mM Acetat und 16 mM Nitrat.





**Abbildung S2:** FACS-Ergebnisse von DNA-, rRNA- und Proteingehalt des Acetat-limitierten anaeroben Wachstums von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten. w. E. willkürliche Einheiten, Abbildung stammt aus der Bachelorarbeit von S. Winterling.



**Abbildung S3:** Wachstumskurven von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei Substrattests. Stamm EbN1 verwendet bekanntermaßen Toluol, Ethylbenzol, *p*-Ethylphenol und L-Tyrosin, nicht aber die anderen eingesetzten Verbindungen. Chemostatenkultur 01/2009.

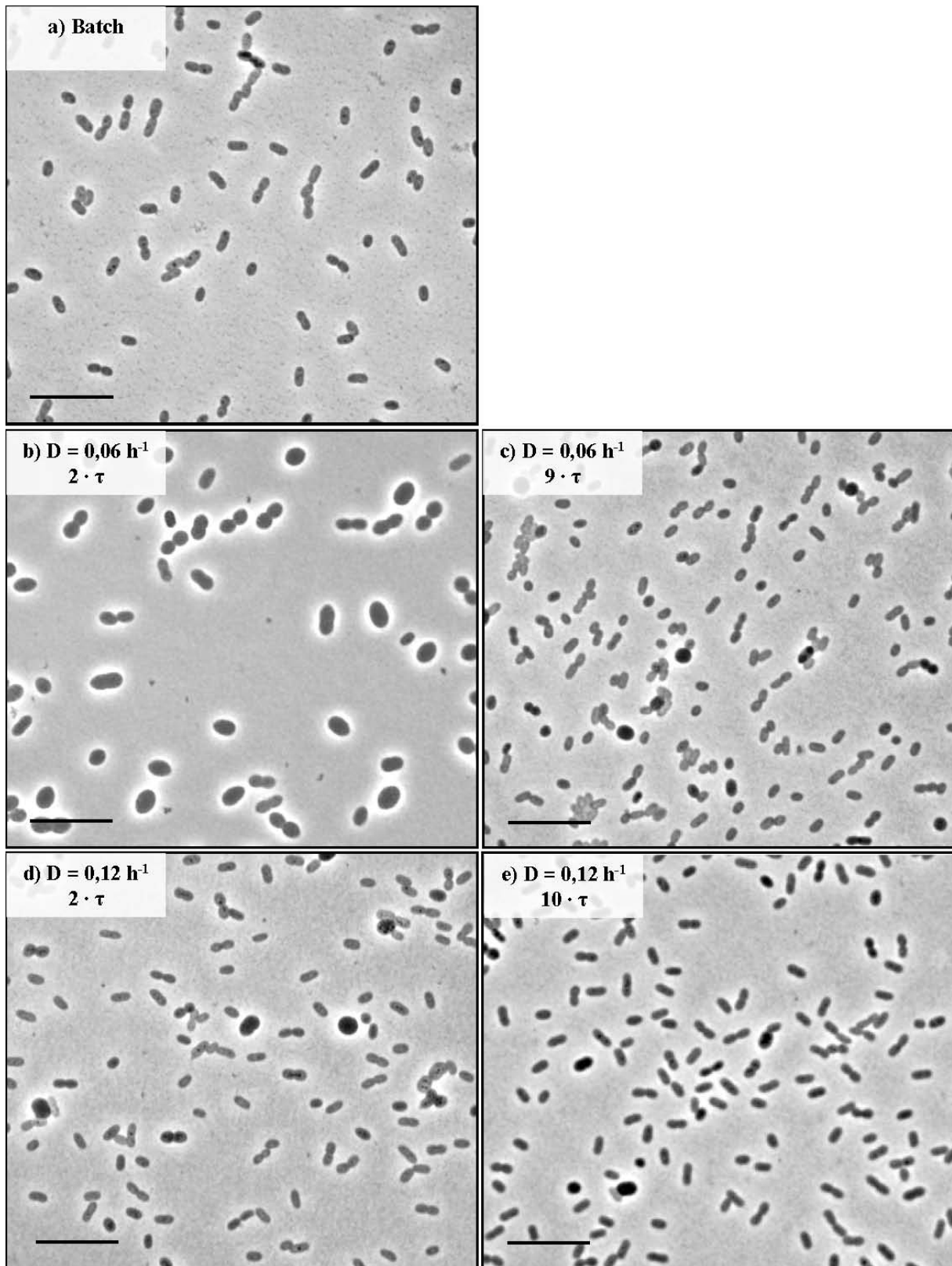
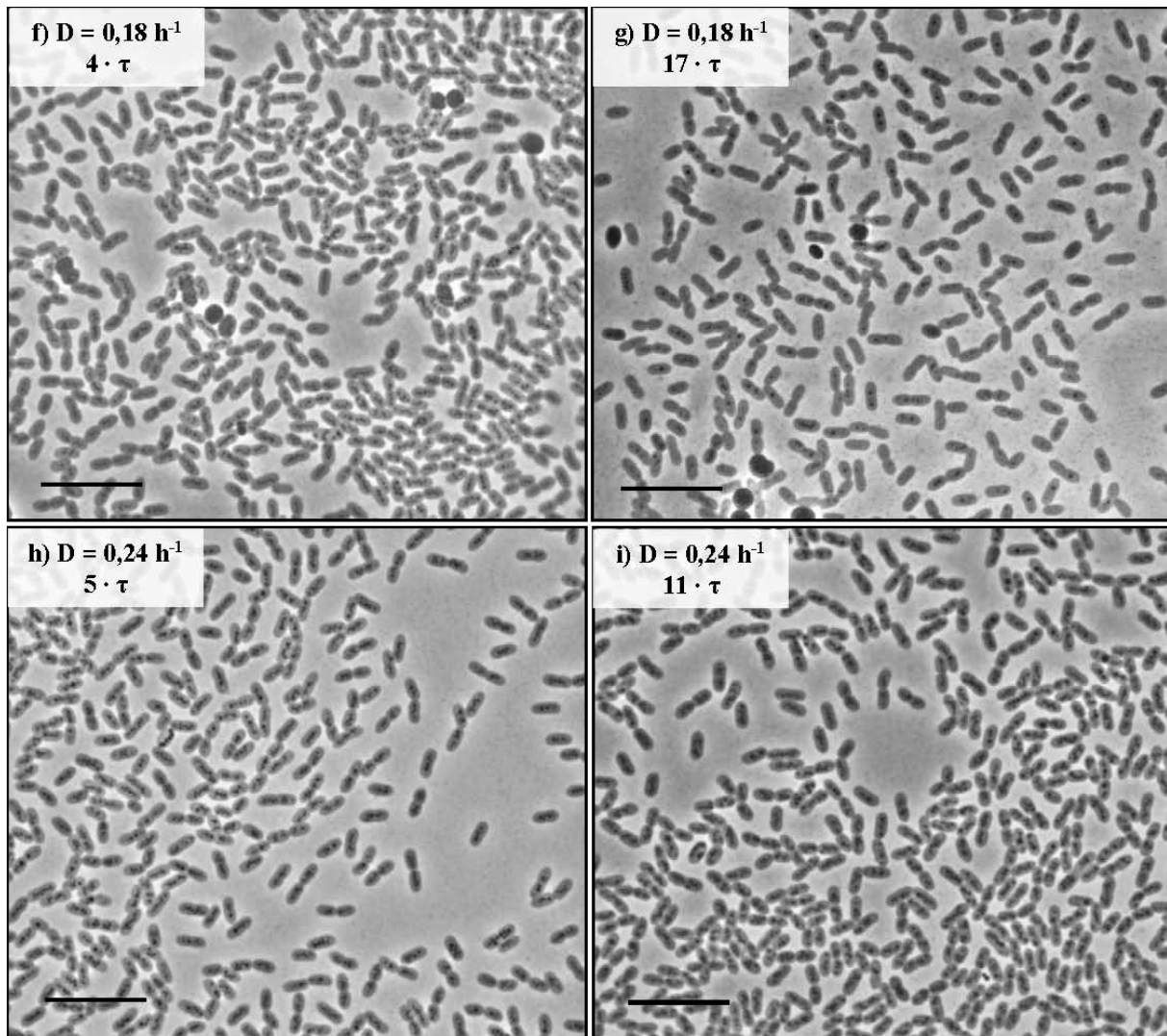


Abbildung S4: Beschreibung siehe S.82



**Abbildung S4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei verschiedenen Verdünnungsraten (D) im Chemostaten.** Dargestellt sind Bilder der Zellen zu Beginn einer Verdünnungsrate und im Steady State (a-i). In der linken oberen Ecke ist jeweils die Verdünnungsrate (D) und die Anzahl an Volumenaustauschen, angegeben als mittlere Verweilzeit ( $\tau$ ), zu finden. Der Balken entspricht einer Länge von  $10 \mu\text{m}$ .

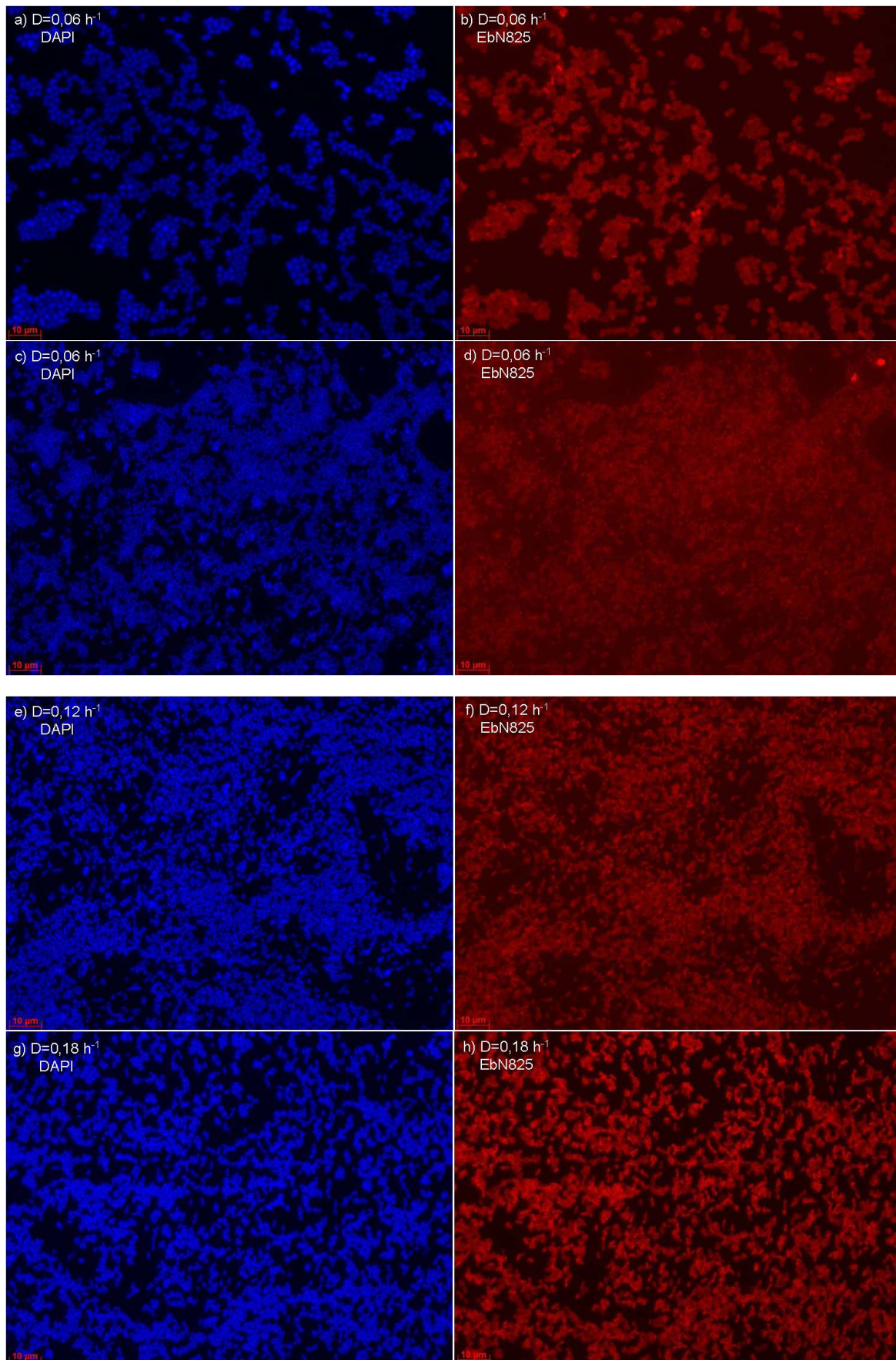
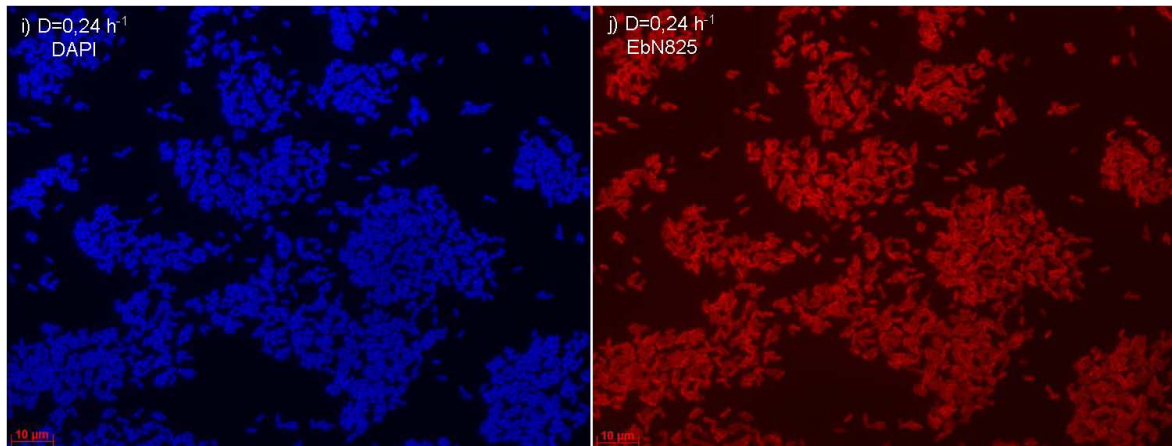
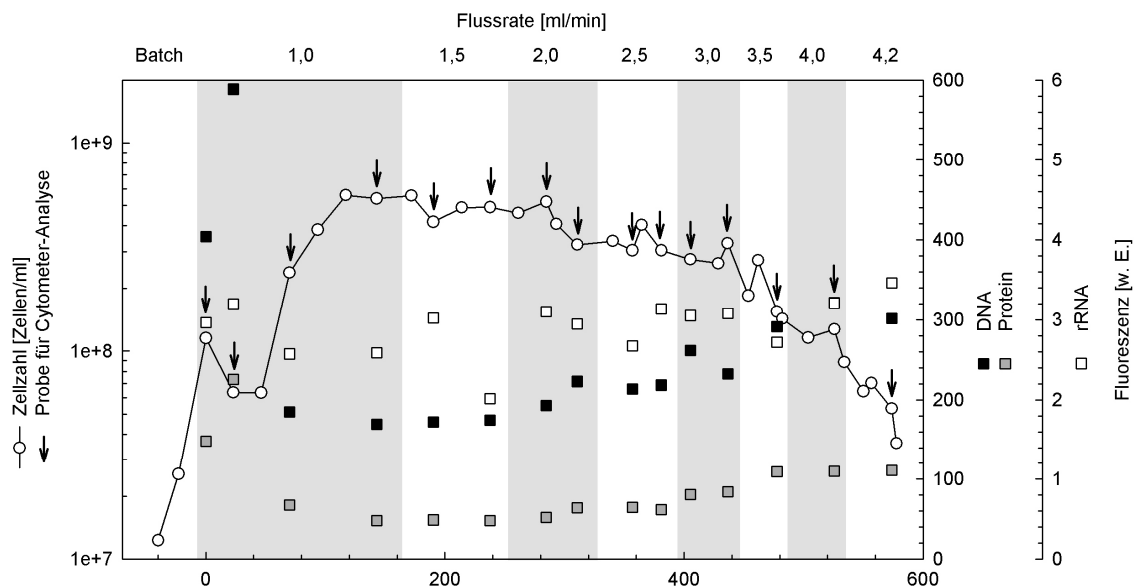


Abbildung S5: Beschreibung S. 84



**Abbildung S5: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 (Chemostat 01/2009).** In der oberen linken Ecke ist die jeweilige Verdünnungsrate sowie die Färbemethode angegeben (die Bezeichnung EbN825 kennzeichnet die verwendete Oligonukleotidsonde). Für weitere Details siehe Bachelorarbeit S. Winterling.

### Chemostat 02/2009: 8 mM Acetat, 16 mM Nitrat



**Abbildung S6: FACS-Ergebnisse von DNA-, rRNA- und Proteingehalt des Acetat-limitierten anaeroben Wachstums von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 im Chemostaten.** w. E. willkürliche Einheiten, Abbildung stammt aus der Bachelorarbeit von S. Winterling.

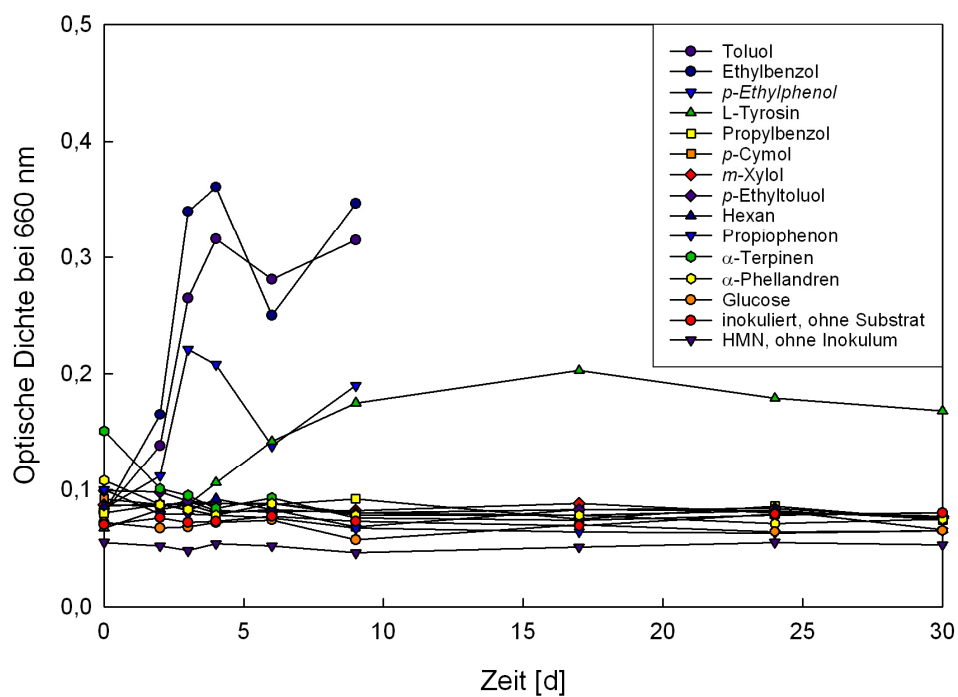


Abbildung S7: Wachstumskurven von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei Substrattests. Stamm EbN1 verwertet bekanntermaßen Toluol, Ethylbenzol, *p*-Ethylphenol und L-Tyrosin, nicht aber die anderen eingesetzten Verbindungen. Chemostatenkultur 02/2009.

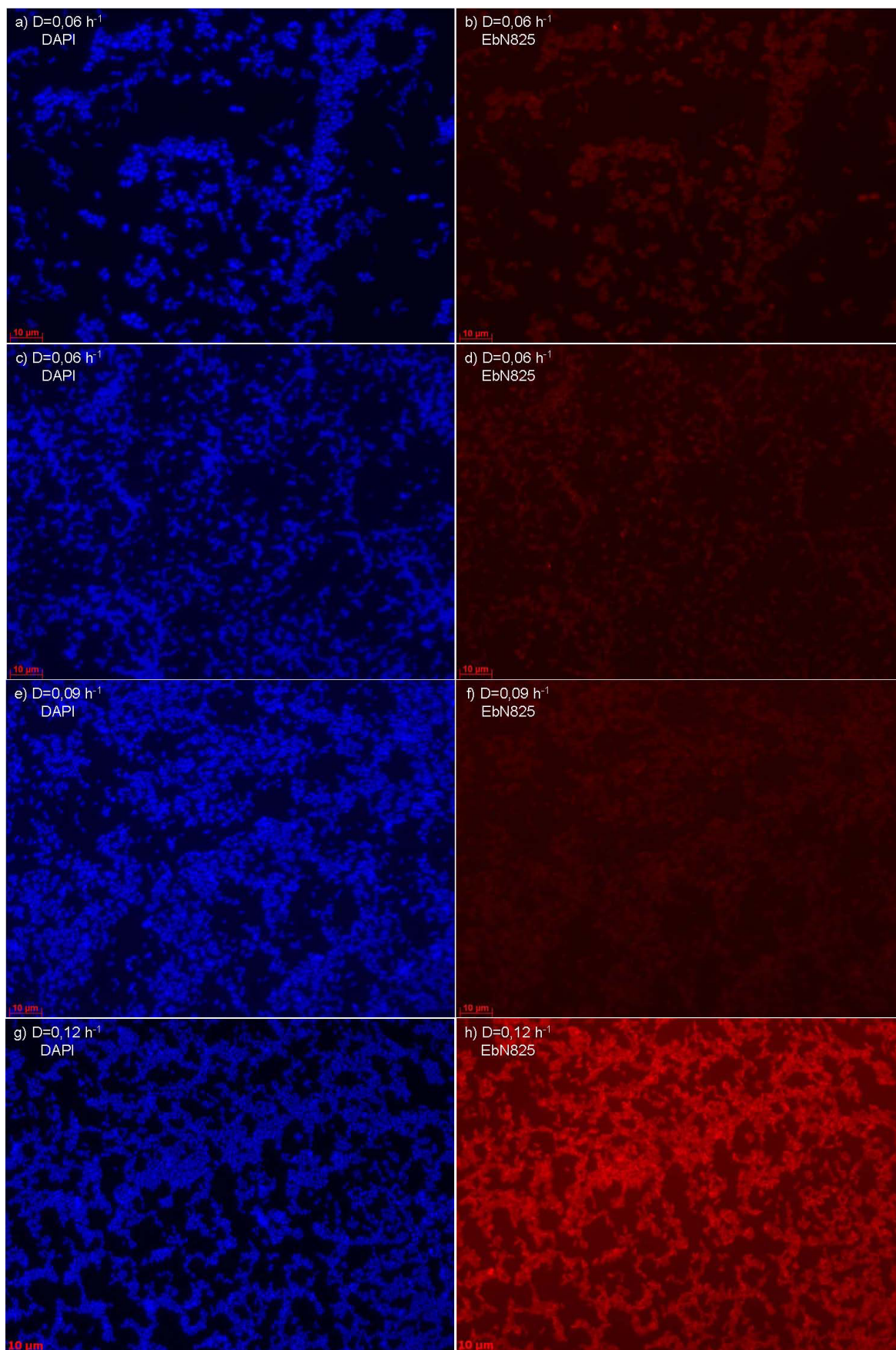


Abbildung S8: Beschreibung siehe S.87

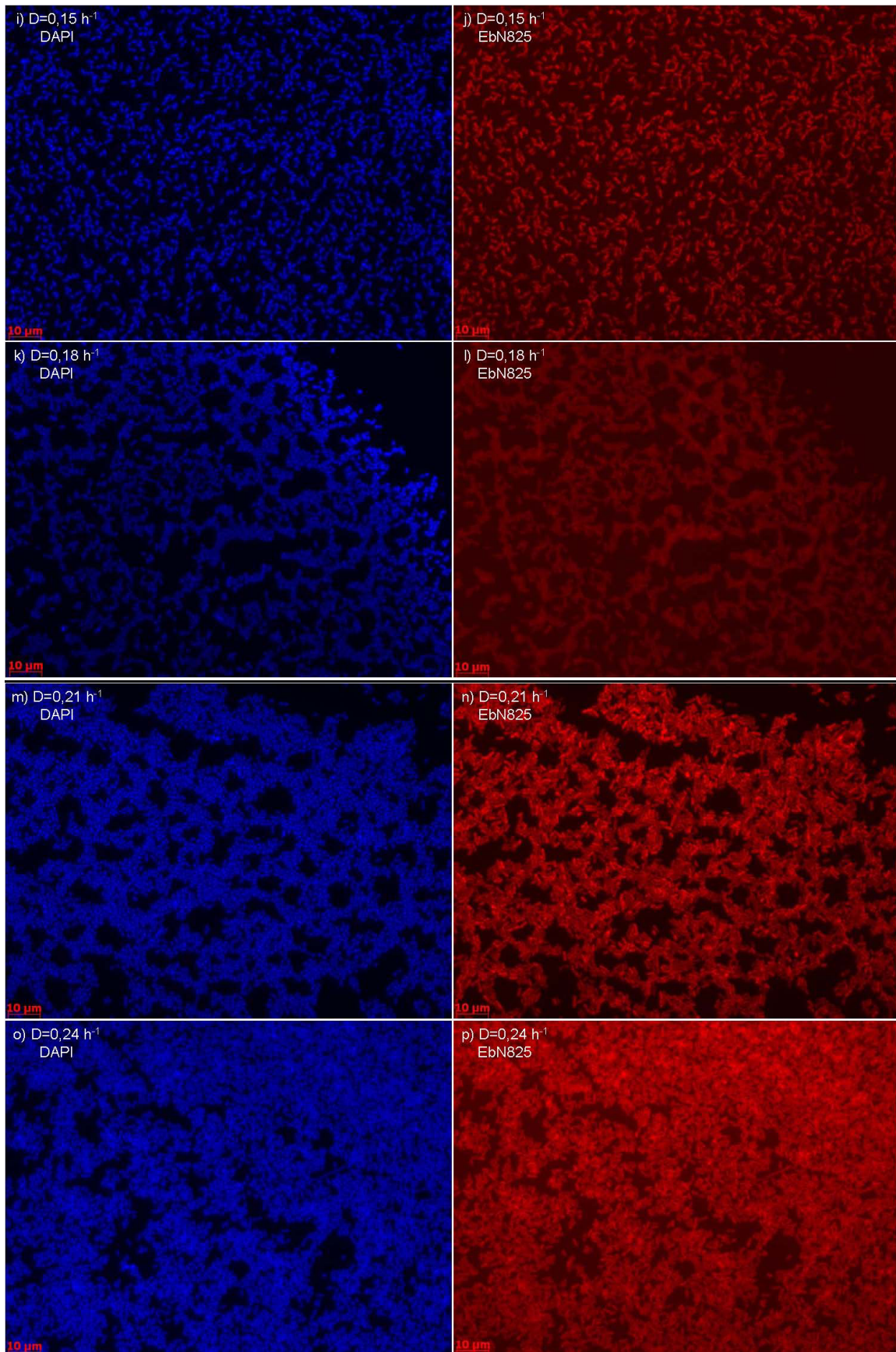
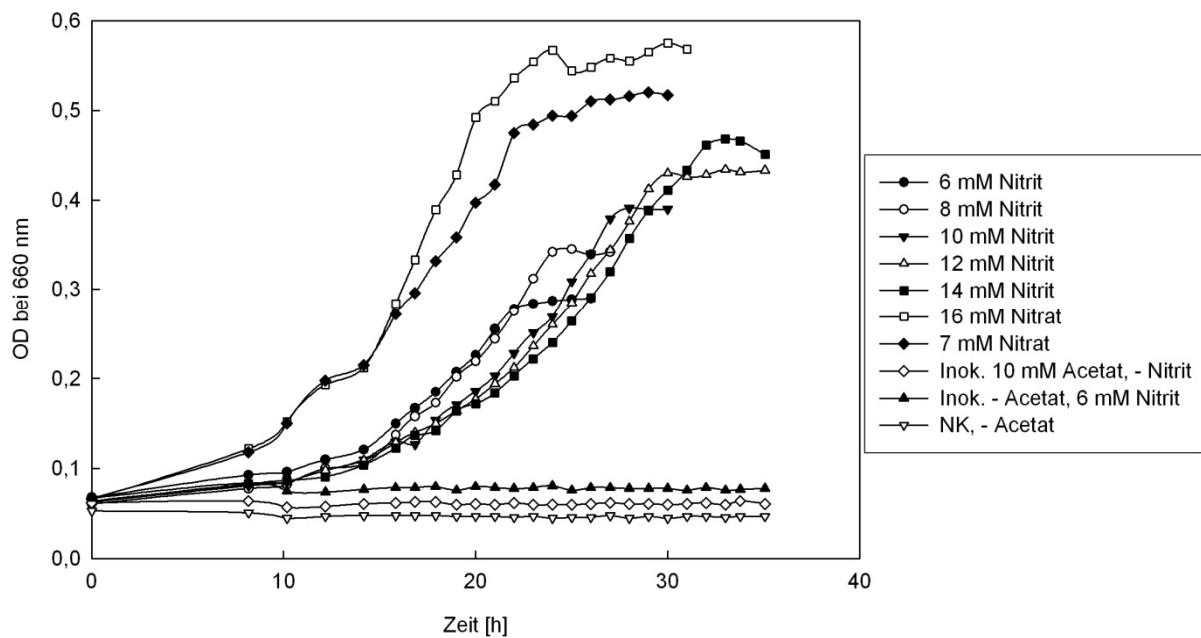
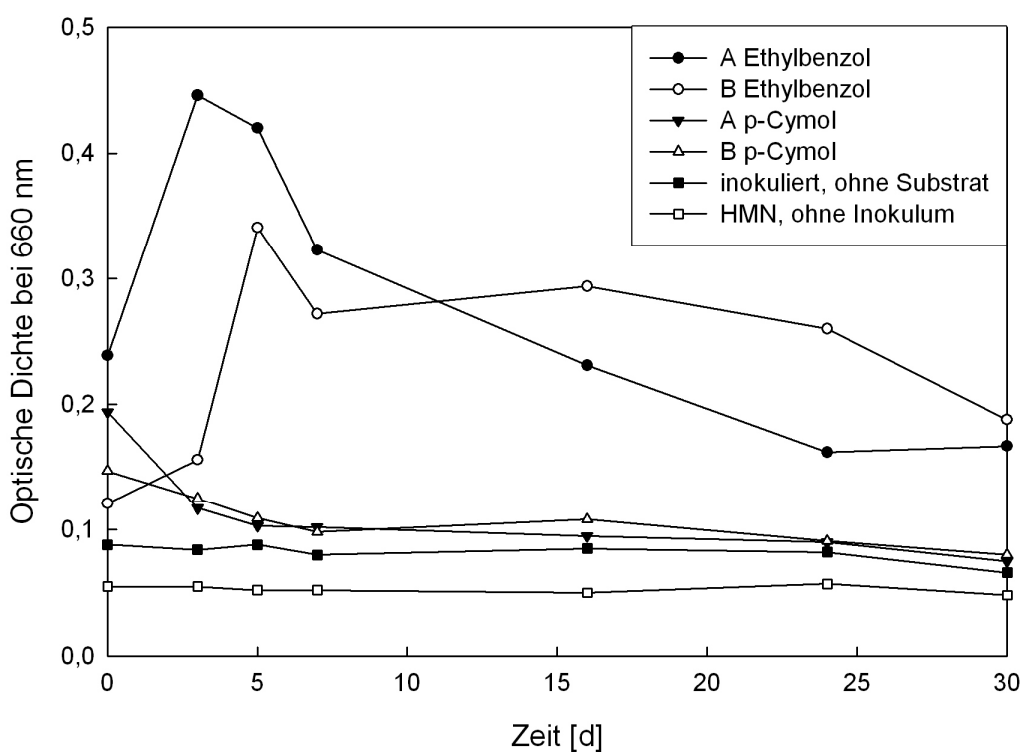


Abbildung S8: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 (Chemostat 02/2009). In der oberen linken Ecke ist die jeweilige Verdünnungsrate sowie die Färbemethode angegeben (die Bezeichnung EbN825 kennzeichnet die verwendete Oligonukleotidsonde). Für weitere Details siehe Bachelorarbeit S. Winterling.

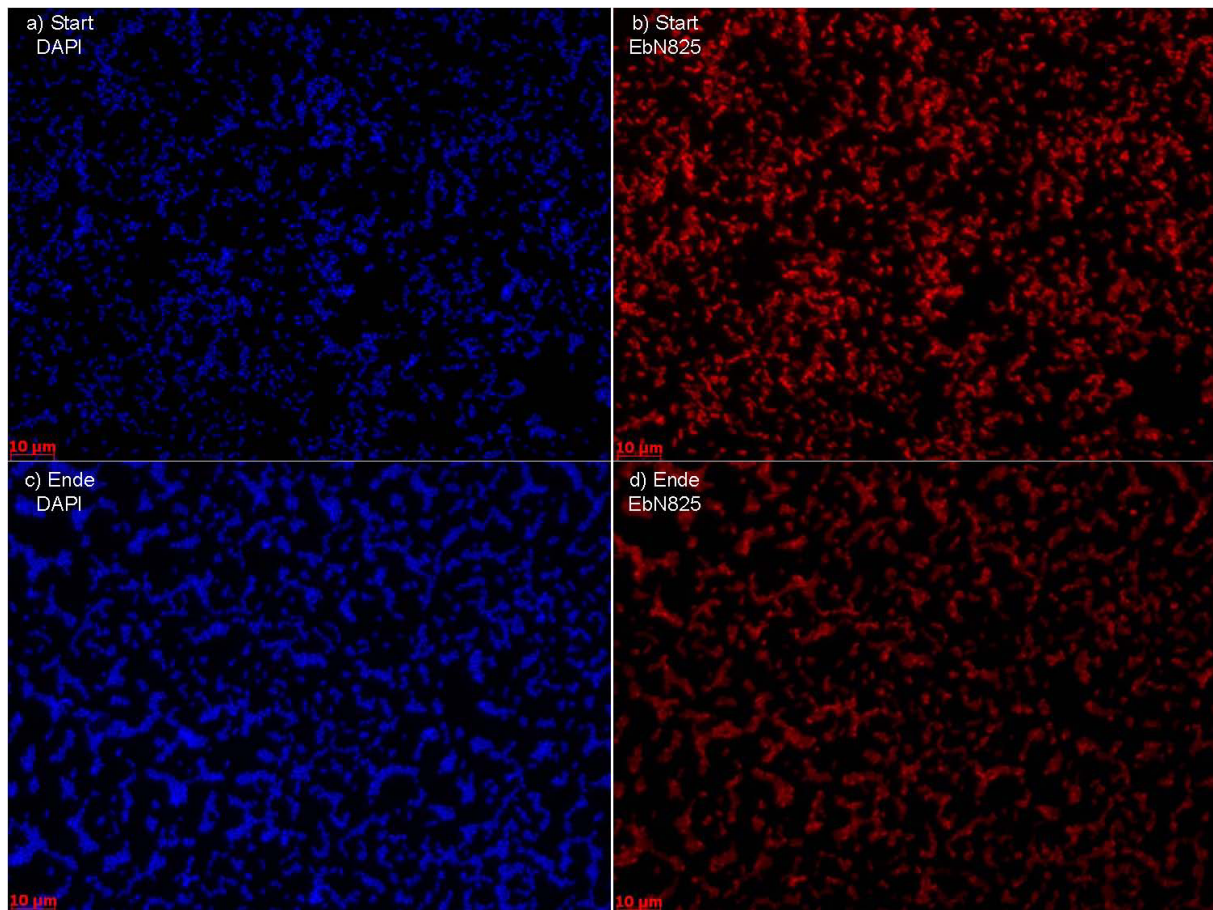


**Nitrit-Stress-Experiment**

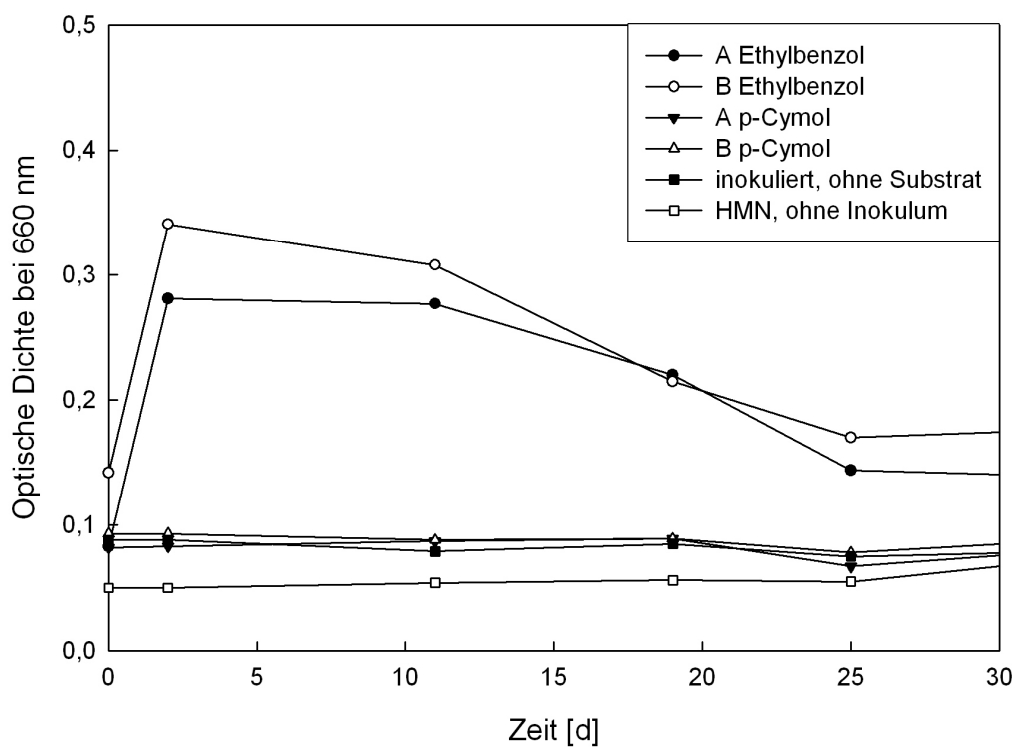
**Abbildung S9:** Wachstumskurven von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei Nitritstress. Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte (OD) bei 660 nm während des Wachstums mit 10 mM Acetat und verschiedenen Nitrit bzw. Nitratkonzentrationen.

**Substratshift-Experiment mit 2 mM Benzoat**

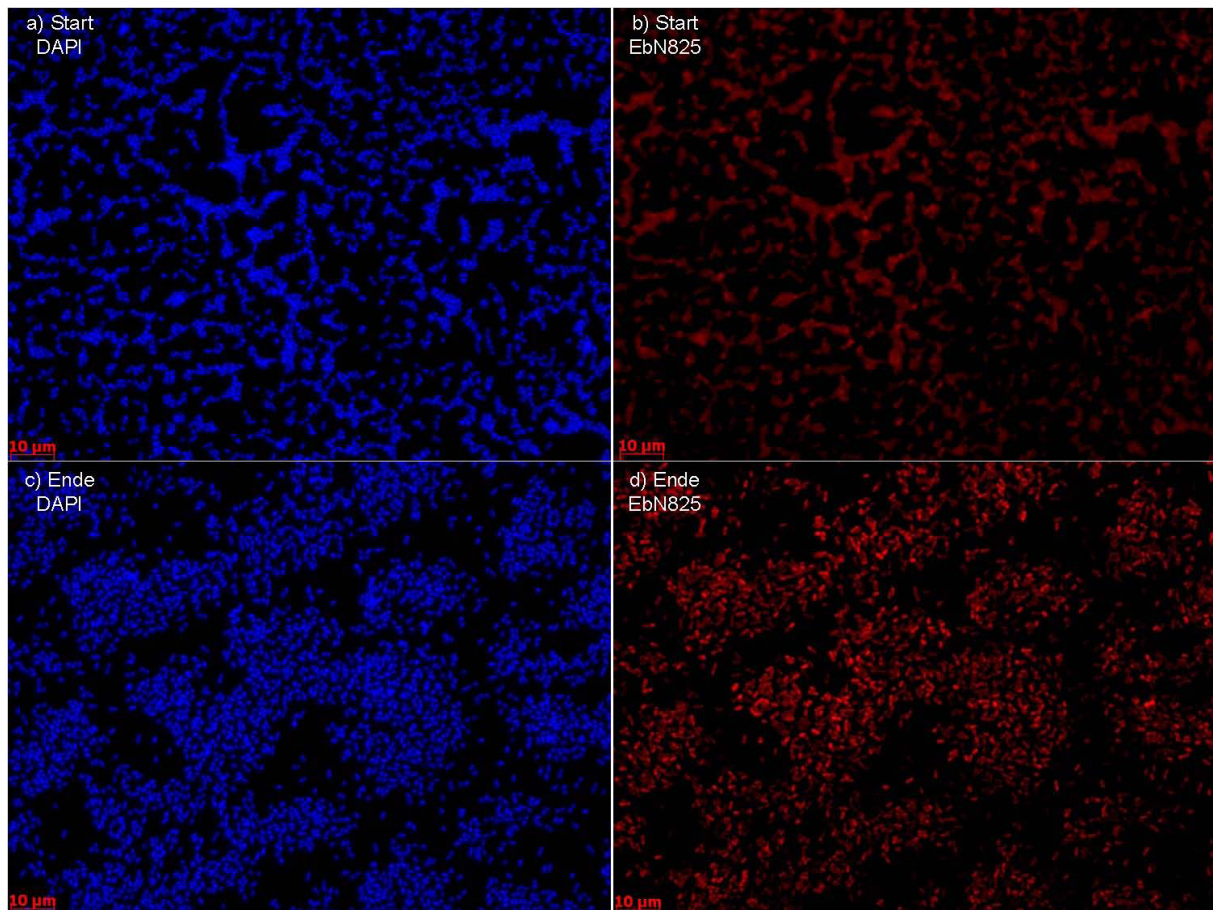
**Abbildung S10: Wachstumskurven von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei Substrattests.** Stamm EbN1 verwertet bekanntermaßen Ethylbenzol nicht aber *p*-Cymol. Chemostatenkultur des 2 mM Benzoatshifts.



**Abbildung S11: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 (Shift mit 2 mM Benzoat).** In der oberen linken Ecke ist die jeweilige Verdünnungsrate sowie die Färbemethode angegeben (die Bezeichnung EbN825 kennzeichnet die verwendete Oligonukleotidsonde). Für weitere Details siehe Bachelorarbeit S. Winterling.

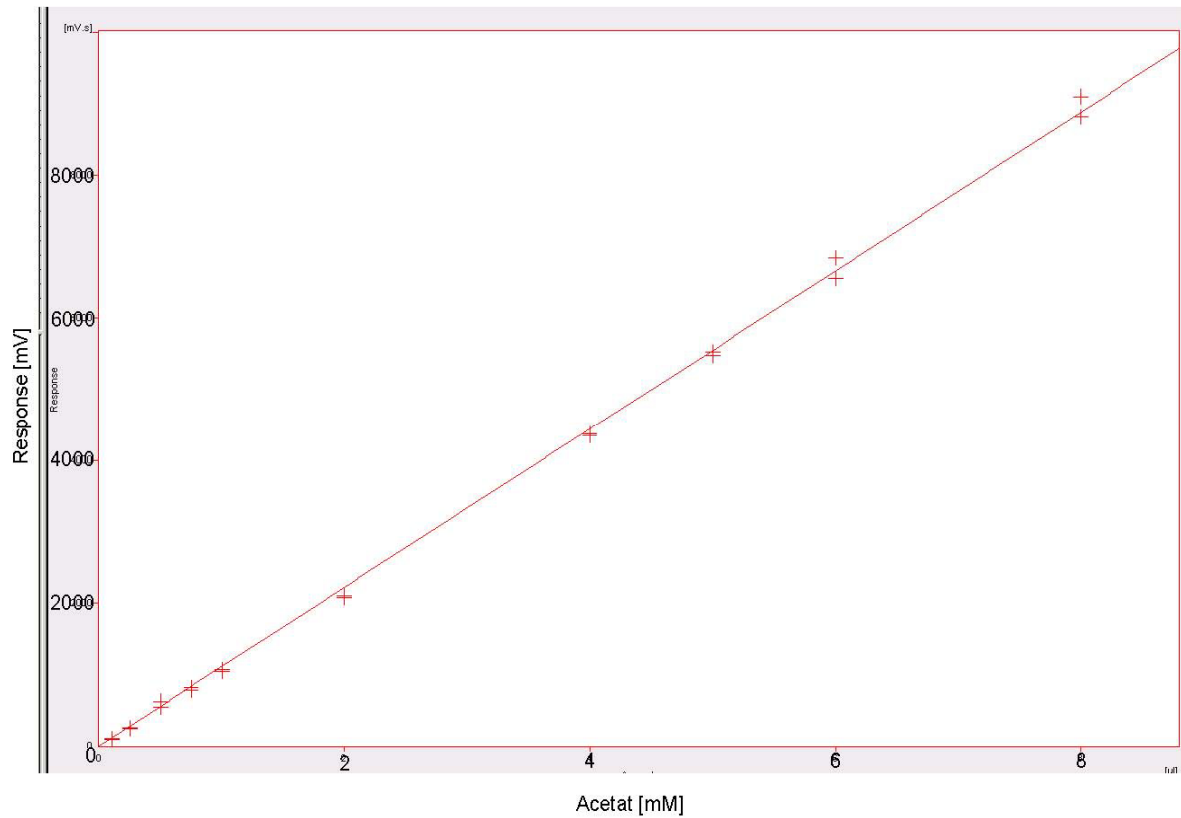
**Substratshift-Experiment mit 0,5 mM Benzoat**

**Abbildung S12: Wachstumskurven von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 bei Substrattests.** Stamm EbN1 verwertet bekanntermaßen Ethylbenzol nicht aber *p*-Cymol. Chemostatenkultur des 0,5 mM Benzoatshifts.

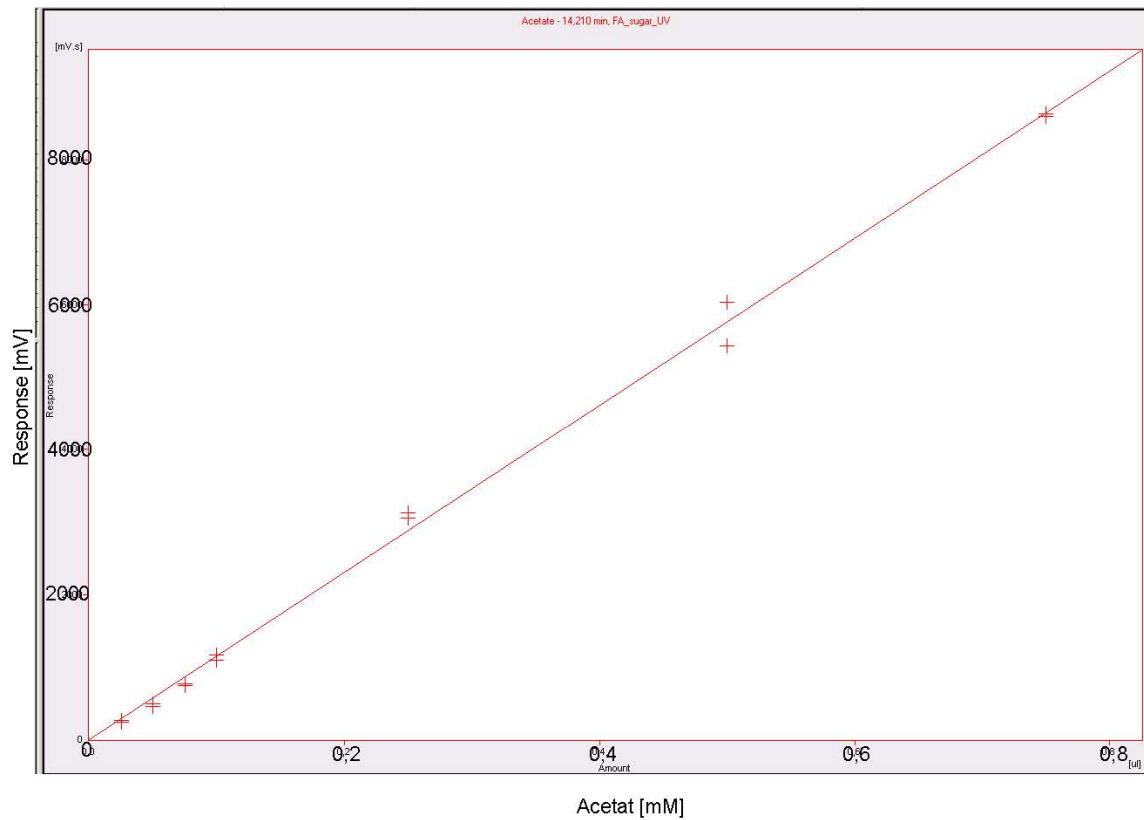


**Abbildung S13: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 (Shift mit 0,5 mM Benzoat).** In der oberen linken Ecke ist die jeweilige Verdünnungsrate sowie die Färbemethode angegeben (die Bezeichnung EbN825 kennzeichnet die verwendete Oligonukleotidsonde). Für weitere Details siehe Bachelorarbeit S. Winterling.

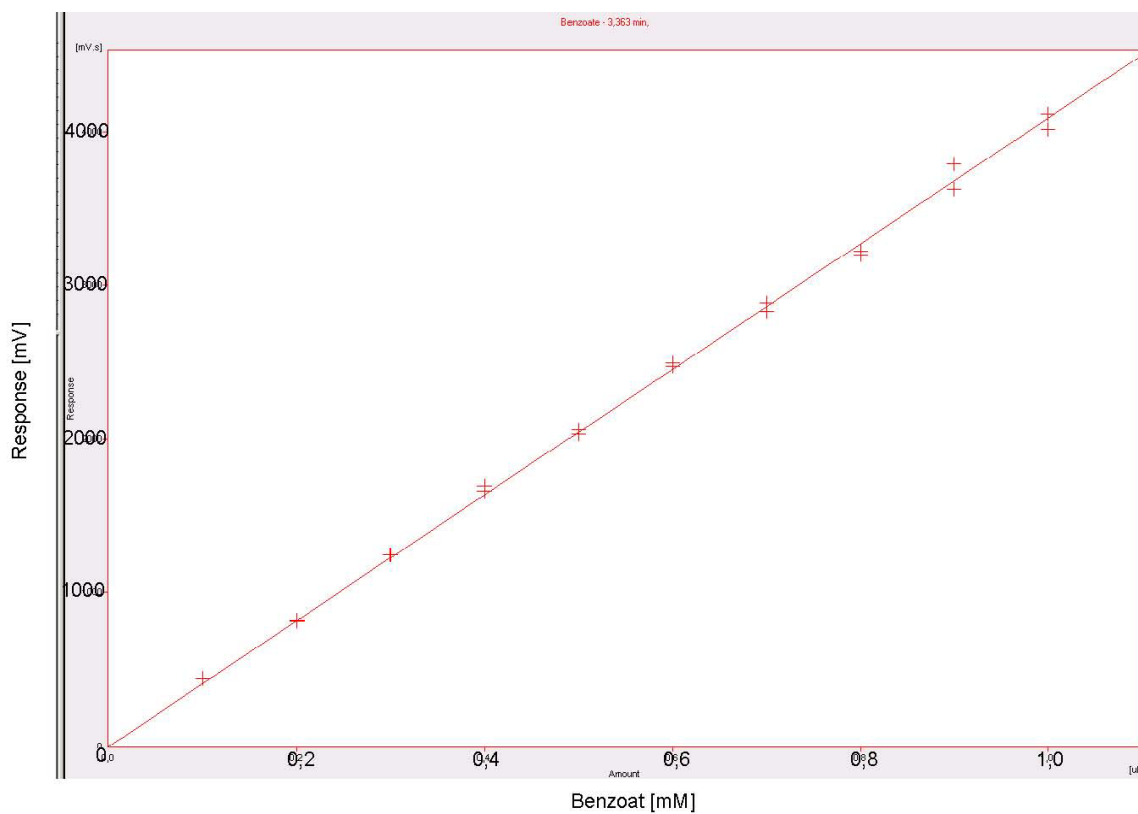
## Kalibrationskurven HPLC



**Abbildung S14: Kalibrationskurve der HPLC-Analyse kurzkettiger Fettsäuren.** Für die Kalibrationskurve wurden Acetatstandards (0,1 – 8,0 mM) in Chemostatenmedium verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 nm mit einer Signalverstärkung (Range) von 0,1 im UV-Detektor.

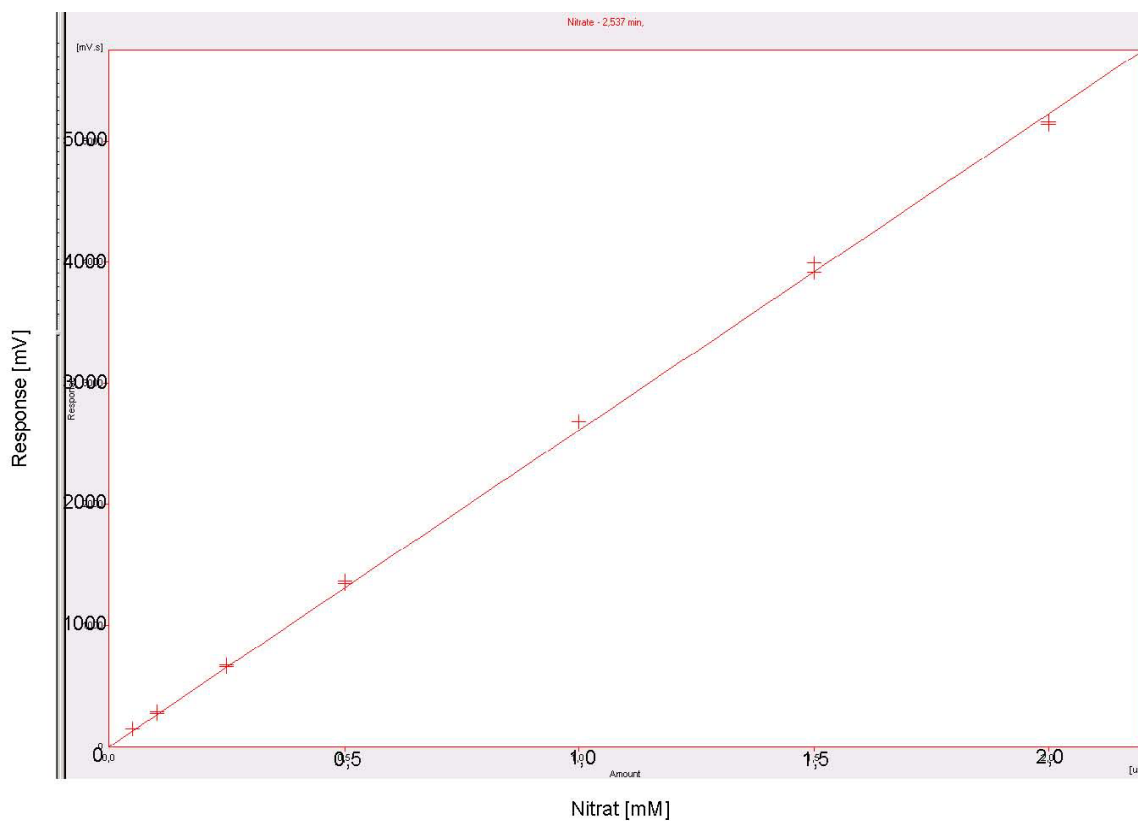


**Abbildung S15: Kalibrationskurve der HPLC-Analyse kurzkettiger Fettsäuren.** Für die Kalibrationskurve wurden Acetatstandards (0,025 – 0,750 mM) in Chemostatenmedium verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 nm mit einer Signalverstärkung (Range) von 0,05 im UV-Detektor.

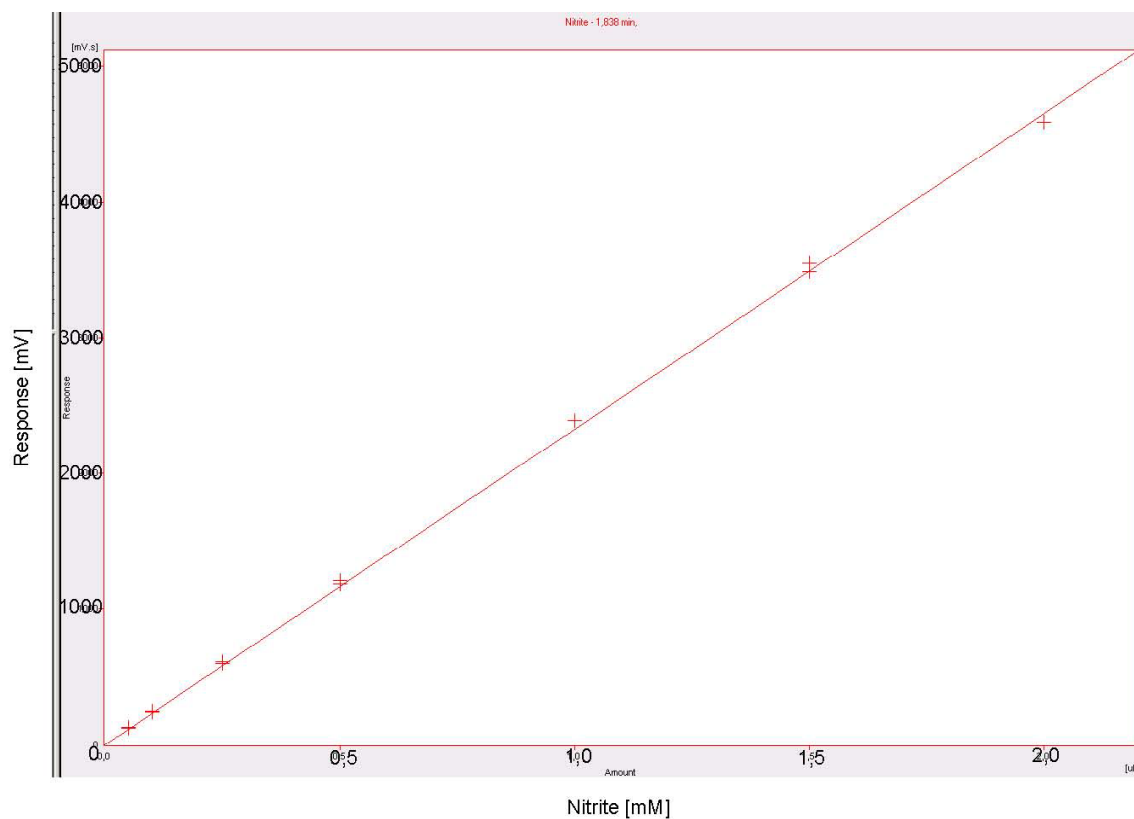


**Abbildung S16: Kalibrationskurve der HPLC-Analyse von Benzoat.** Für die Kalibrationskurve wurden Benzoatstandards (0,1 – 1,0 mM) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm mit einer Signalverstärkung (Range) von 0,1 im UV-Detektor. Im gleichen Ansatz wurde auch Nitrat und Nitrit gemessen.

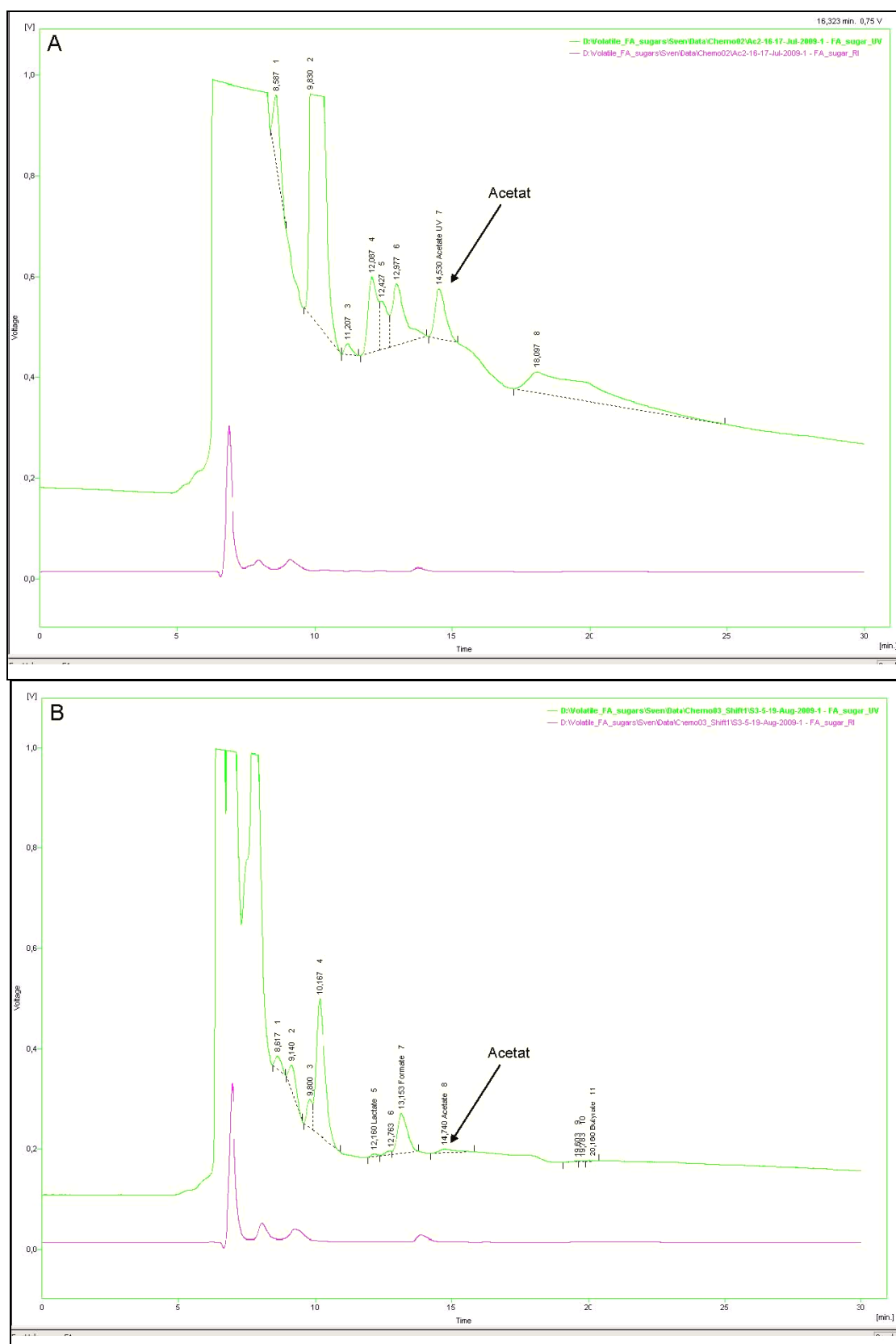




**Abbildung S17: Kalibrationskurve der HPLC-Analyse von Nitrat.** Für die Kalibrationskurve wurden Nitratstandards (0,05 – 2,0 mM) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm mit einer Signalverstärkung (Range) von 0,1 im UV-Detektor. Im gleichen Ansatz wurde auch Nitrit und Benzoat gemessen.



**Abbildung S18: Abbildung S17: Kalibrationskurve der HPLC-Analyse von Nitrit.** Für die Kalibrationskurve wurden Nitratstandards (0,05 – 2,0 mM) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm mit einer Signalverstärkung (Range) von 0,1 im UV-Detektor. Im gleichen Ansatz wurde auch Nitrat und Benzoat gemessen.



**Abbildung S19: Chromatogramme der HPLC zur Acetatbestimmung.** (A) Chromatogramm einer Chemostaten Probe bei  $D=0,12 \text{ h}^{-1}$ . (B) Chromatogramm einer Probe des Substratshift-Experiments mit 2 mM Benzoat und 8 mM Acetat. Die Pfeile markieren die Peaks bei einer für Acetat-spezifischen Retentionszeit. Die Analyse erfolgte dabei mit zwei unterschiedlichen Chargen der gleichen Aminex-Trennsäulen (s. Teil B) unter gleichen Bedingungen bei 210 nm und einer Signalverstärkung (Range) von 0,1 im UV-Detektor.

## **G Danksagung**

Ich bedanke mich ganz herzlich bei der kompletten Abteilung Mikrobiologie des MPI für marine Mikrobiologie für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Ich danke ganz herzlich Prof. Friedrich Widdel für die interessanten Vorlesungen an der Universität Bremen und die Möglichkeit meine Diplomarbeit am MPI in Bremen anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein Besonderer Dank gilt Prof. Ralf Rabus für das spannende Thema meiner Diplomarbeit und die engagierte und kompetente Betreuung. Des Weiteren möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe als Hilfwissenschaftler tätig gewesen zu sein. Ich habe während dieser Zeit eine Menge gelernt und mein Interesse für die Mikrobiologie wurde noch weiter geweckt. Außerdem danke ich ihm für die Betreuung und Begutachtung meiner Diplomarbeit und hoffe auf eine weitere gute Zusammenarbeit.

Ich danke ganz herzlich Daniela Lange für die Betreuung während meiner Tätigkeit als Hilfwissenschaftler und ihrer Unterstützung während der Diplomarbeit. Eine gute Seele braucht jedes Labor.

Zutiefst dankbar bin ich Kathleen Trautwein für die exzellente Betreuung meiner Diplomarbeit, die vielen netten und lustigen Gespräche beim Kaffee und ein immer offenes Ohr bei Fragen. War der Tag auch noch so lang, wurde einem immernoch ein Lächeln geschenkt.

Ich danke Saskia für die Analysen meiner Proben im Rahmen ihrer Bachelorarbeit sowie Nicolle und Marvin für die Unterstützung bei der RP-HPLC und wünsche allen weiterhin viel Erfolg.

Weiterhin danke ich Ramona Appel und Christina Propian für ihre oft sehr humorvolle Hilfe und Unterstützung bei der HPLC.

Ich danke meinem Büro für die tolle Atmosphäre und die interessanten Gespräche. Ein ganz besonderer Dank gilt Alexander Galushko für seine Hilfe bei der Aufstellung von Bilanzierungsreaktionen. Ich wünsche dir viel Erfolg und Spaß im schönen Wien.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die tolle Unterstützung auf allen meinen Wegen. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen. Meinen Mitbewohnern möchte ich

danke, dass sie immer ein offenes Ohr haben und immer da sind wenn man sie braucht. Meiner Band möchte ich für die schöne Zeit und die Unterstützung während meines Studiums danken.