

**Neuartige Reaktionen beim anaeroben Abbau von
Kohlenwasserstoffen – Verwertung von Ethylbenzol und
kurzkettigen Alkanen**

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

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen vorgelegt von

Olaf Kniemeyer
aus Bremen

Bremen 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Zeit von April 1998 bis September 2001 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel, Universität Bremen
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Johann Heider, Universität Freiburg

Tag des Promotionskolloquiums: 14. Dezember 2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Zusammenfassung	1
-----------------	---

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A	Einleitung	4
	1. Chemische Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen	4
	2. Vorkommen von Kohlenwasserstoffen	6
	2.1 Geologische Quellen von Kohlenwasserstoffen	6
	2.2 Biologische Quellen von Kohlenwasserstoffen	8
	2.3 Anthropogener Eintrag von Kohlenwasserstoffen in die Umwelt	9
	3. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen	10
	3.1 Abbau von Kohlenwasserstoffen unter oxischen Bedingungen	10
	3.2 Abbau von Kohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen	12
	3.2.1 Anaerober Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen	12
	3.2.2 Mechanismen des anaeroben Abbaus von monoaromatischen Kohlenwasserstoffen	14
	3.2.3 Anaerober Abbau von Alkanen	19
	3.2.4 Mechanismen des anaeroben Abbaus von Alkanen	20
	4. Bedeutung des anoxischen Abbaus von Kohlenwasserstoffen in der Umwelt	21
	5. Zielsetzungen der Arbeit	22
B	Ergebnisse und Diskussion	24
	1. Anaerober Abbau von Ethylbenzol	24
	1.1 Ethylbenzol-Dehydrogenase aus <i>Azoarcus</i> Stamm EbN1	24
	1.1.1 Aktivitäten der Ethylbenzol-Dehydrogenase in Stamm EbN1 und PbN1	24
	1.1.2 Reinigung und Charakterisierung der Ethylbenzol-Dehydrogenase aus <i>Azoarcus</i> Stamm EbN1	25
	1.1.3 Substratspezifische Proteinbildung der Stämme EbN1 und PbN1	26
	1.1.4 Vergleich der Ethylbenzol-Dehydrogenasen aus <i>Azoarcus</i> Stamm EbN1 und EB1	27
	1.2. (S)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase aus <i>Azoarcus</i> Stamm EbN1	29

1.2.1	Aktivitäten von 1-Phenylethanol-Dehydrogenase Isoenzymen in Stamm EbN1	29
1.2.2	Reinigung und Charakterisierung der (<i>S</i>)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase	29
1.2.3	Vergleich der (<i>S</i>)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase aus <i>Azoarcus</i> Stamm EbN1 mit anderen Alkohol-Dehydrogenasen	30
1.3.	Anaerober Abbau von Ethylbenzol durch ein neues sulfatreduzierendes Bakterium	32
1.3.1	Isolierung des sulfatreduzierenden Stammes EbS7	32
1.3.2	Phylogenetische Charakterisierung des Stammes EbS7	32
1.3.3	Morphologische und physiologische Charakterisierung des Stammes EbS7	33
1.3.4	Bestimmung von Intermediaten des anaeroben Ethylbenzol-metabolismus in Stamm EbS7	33
2.	Anaerober Abbau von Propan und Butan unter mesophilen und moderat thermophilen Bedingungen durch neuartige sulfatreduzierende Bakterien	35
2.1	Mikrobiologische Experimente	35
2.1.1	Anreicherung und Wachstum von sulfatreduzierenden Bakterien mit Propan oder Butan	35
2.1.2	Isolierung und Charakterisierung des mesophilen sulfatreduzierenden Stammes BuS5	38
2.2	Molekularbiologische Charakterisierung	39
2.2.1	Phylogenetische Charakterisierung des Stammes BuS5	39
2.2.2	Analyse der sulfatreduzierenden Anreicherungskulturen mittels 16 S rDNA-Klonierung	39
2.2.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung mit Spezies-spezifischen Sonden	43
2.3	Bedeutung des anaeroben Propan- und Butanabbaus	45
C	Literatur	47

Teil II: Publikationen

A	Publikationsliste mit Erläuterungen	62
B	Publikationen	
1	Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon- oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme	63
2	(<i>S</i>)-1-Phenylethanol dehydrogenase of <i>Azoarcus</i> sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism	88
3	Anaerobic degradation of ethylbenzene by a novel type of marine sulfate-reducing bacterium	107
C	Weitere Publikationen	134
D	Anhang	135

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ARB	Softwareprogramm für die Berechnung phylogenetischer Stammbäume
atm	Atmosphäre
bp	Basenpaar
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
But5-476	spezifische Sonde für das Isolat BuS5
But5-620	spezifische Sonde für das Isolat BuS5
°C	Grad Celsius
C _n	Kohlenstoffkette mit n Kohlenstoffatomen
¹³ C/ ¹⁴ C	markiertes Kohlenstoffatom
ca.	zirka
Cl [•]	freies Chlorradikal
CoA	Coenzym A
2D	zweidimensional
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
δ ¹³ C	Isotopenverhältnis ¹³ C/ ¹² C
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
16S rDNA	Gen, das für 16 S rRNA kodiert
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E ⁰	Redoxpotential
EB1	Ethylbenzol abbauender <i>Azoarcus</i> sp.Stamm
EbN1	Ethylbenzol abbauender <i>Azoarcus</i> sp.Stamm
EbS7	Ethylbenzol abbauender Sulfatreduzierer
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
et al.	und andere
ESR	Elektronenspinresonanz
Fe-S	Eisen-Schwefel
g/g	Erdbeschleunigung/Gramm
G+C	Guanin+Cytosin

GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
h	Stunde
ΔH^0	Reaktionsenthalpie
<i>iso</i>	<i>verzweigt</i>
K	Klon
K2-3-190	spezifische Sonde für eine <i>Desulfotomaculum</i> -Klonsequenz
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
K_m	Michaelis-Konstante
m/m	Meter/ <i>meta</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Mol
μ	Wachstumskonstante
$\mu\text{m}/\mu\text{M}$	Mikrometer/Mikromolar
mV	Millivolt
NAD(P) ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
NAD(P)H ₂	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nmol	Nanomol
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OH [•]	freies Hydroxylradikal
%	Prozent
<i>p</i>	<i>para</i>
PAUP4.0b8	Softwareprogramm für die Berechnung phylogenetischer Stammbäume
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pM	Pikomolar
16S rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
s(p)p.	Spezies
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
Tab.	Tabelle
Tat	Twin Arginine Translocation
TOPO TA	Kit der Firma Stratagene zur Klonierung von PCR-Produkten
V	Volt
w/w	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Das Interesse am anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Trotz der erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet sind viele grundlegende Fragen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung dieser reaktionsträgen Stoffklasse bisher noch nicht beantwortet. In der vorliegenden Dissertation wurde zwei Themen zum anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen nachgegangen. Einerseits wurde der anaerobe Abbau von Ethylbenzol, einem industriell wichtigen aromatischen Kohlenwasserstoff, sowohl in einem denitrifizierenden *Azoarcus* Stamm als auch in einem neuartigen Isolat eines sulfatreduzierenden Bakteriums untersucht. Andererseits wurde erstmals der anaerobe Abbau der unter Standardbedingungen gasförmigen Alkane Propan und Butan gezeigt, die mit Sulfat als Elektronenakzeptor oxidiert wurden.

1 Im denitrifizierenden *Azoarcus* Stamm EbN1 wird Ethylbenzol bei Abwesenheit von Sauerstoff im ersten Schritt zu (*S*)-1-Phenylethanol und nachfolgend zu Acetophenon oxidiert. Aus diesem Stamm wurde zur genaueren Untersuchung dieses neuartigen Stoffwechselweges die Ethylbenzol-Dehydrogenase, welche die initiale Reaktion im Ethylbenzol-Stoffwechsel katalysiert, gereinigt und charakterisiert. Das periplasmatische Enzym oxidierte (dehydrogenierte) Ethylbenzol in Abwesenheit von Sauerstoff mit Ferricenium als künstlichem Elektronenakzeptor zu (*S*)-1-Phenylethanol. Die Reaktion der Ethylbenzol-Dehydrogenase ist unter biochemischen Aspekten sehr interessant, da hier unter anoxischen Bedingungen eine organische Verbindung ohne funktionelle Gruppen aktiviert wird. Das Enzym hatte eine apparente Molekularmasse von 155 kDa, bestand aus drei Untereinheiten (96, 43 und 23 kDa) in einer $\alpha\beta\gamma$ Zusammensetzung und enthielt Molybdän, Eisen-Schwefel-Zentren und Cytochrom *b* als Cofaktoren. Der N-Terminus der großen Untereinheit wies die größte Ähnlichkeit mit dem der Selenat-Reduktase aus *Thauera selenatis* und dem anderer Molybdän-Enzymen aus der DMSO-Reduktase-Familie auf. Im zellfreien Extrakt war die Ethylbenzol-Dehydrogenase unempfindlich gegenüber Sauerstoff, nicht jedoch in gereinigter Form, wenn das Cytochrom *b* sich im reduzierten Zustand befand. Weiterhin wurde aus demselben Organismus eine (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase isoliert (s. nächster Absatz). Durch Kopplung dieses Enzyms mit der Ethylbenzol-Dehydrogenase konnte die stereospezifische Produktion von (*S*)-1-Phenylethanol durch die Ethylbenzol-Dehydrogenase nachgewiesen werden. In dem mit Stamm EbN1 eng verwandten *Azoarcus* Stamm

PbN1, der sowohl mit Ethylbenzol als auch *n*-Propylbenzol wächst, wurde die Aktivität einer Ethylbenzol-Dehydrogenase gemessen, die auch *n*-Propylbenzol mit hoher Rate umsetzte.

2 Eine NAD⁺-abhängige 1-Phenylethanol-Dehydrogenase katalysiert den zweiten Schritt im anaeroben Ethylbenzolverstoffwechsel des *Azoarcus* Stammes EbN1. In Extrakten aus Zellen, die auf Ethylbenzol gewachsen waren, war die Aktivität mit (*S*)-1-Phenylethanol 11fach höher als mit (*R*)-1-Phenylethanol. Die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase wurde gereinigt und charakterisiert. Das Enzym ist eine typische Alkohol-Dehydrogenase aus der Familie der „Short-Chain“-Dehydrogenasen/Reduktasen, die in der Regel keine Metallcofaktoren enthalten, und besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einer Molekularmasse von 25,5 kDa. Das Enzym katalysierte auch die Reduktion von Acetophenon und wurde durch höhere Konzentration von (*R*)-1-Phenylethanol gehemmt. Das Enzym zeigte niedrige apparente K_m -Werte für (*S*)-1-Phenylethanol und Acetophenon (1,6 μM bzw. 1,0 μM) und setzt nur einige sekundäre Alkohole wie 1-Phenylpropanol und Isopropanol, bzw. die dazugehörigen Ketone um.

3 Ein neuartiges sulfatreduzierendes Bakterium mit der Fähigkeit, den aromatischen Kohlenwasserstoff Ethylbenzol unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von Sulfat komplett zu CO₂ zu mineralisieren, wurde aus einer Anreicherungskultur mit Sediment aus dem Guaymas Becken isoliert. Das Bakterium, Stamm EbS7, gehört aufgrund von Sequenzanalysen des 16S rRNA Genes zur δ -Untergruppe der Proteobakterien. Die nächsten Verwandten sind zwei sulfatreduzierende Bakterien, die *m*-Xylol bzw. Naphthalin als Wachstumssubstrat nutzen (mXyS1 und NaphS2). Neben Ethylbenzol verwertete Stamm EbS7 auch Phenylacetat, 3-Phenylpropionat, *n*-Capronat, Formiat, Lactat und Pyruvat als Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen. Hingegen wurden 1-Phenylethanol und Acetophenon, die Intermediate des anaeroben Ethylbenzolmetabolismus in denitrifizierenden Bakterien, nicht verwertet. 1-Phenylethanol hemmte sogar spezifisch das Wachstum von Stamm EbS7 auf Ethylbenzol. In Kulturüberständen von auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen von Stamm EbS7 wurden (1-Phenylethyl)succinat und 4-Phenylpentansäure als mögliche Intermediärprodukte beim Abbau von Ethylbenzol nachgewiesen. Der anaerobe Abbau von Ethylbenzol verläuft somit anders als in denitrifizierenden Bakterien. Vorgeschlagen wird ein Stoffwechselweg analog zum anaeroben Hexanabbau in *Azoarcus* Stamm HxN1. Demnach würde Ethylbenzol in Stamm EbS7 durch Addition an Fumarat aktiviert und somit (1-Phenylethyl)succinat als erstes Intermediat gebildet werden. Nach einer Umlagerung des

Kohlenstoffgerüsts und Decarboxylierung würde 4-Phenylpentanoyl-CoA, der Thioester des gefundenen Intermediates, entstehen.

4 Mit Sediment aus dem Guaymas Becken wurden bei 28 °C und 60 °C Anreicherungskulturen mit den gasförmigen Alkanen Propan und *n*-Butan als einzigem organischen Substrat und mit Sulfat als Elektronenakzeptor erhalten, nicht jedoch mit Ethan. Aus einer mesophilen Anreicherungskultur mit Butan wurde ein neuartiges sulfatreduzierendes Bakterium, Stamm BuS5, isoliert. Aufgrund der Analyse der 16 S rRNA Gensequenz gehörte Stamm BuS5 zur δ -Untergruppe der Proteobakterien. Die größte Sequenzähnlichkeit zeigte Stamm BuS5 zu einer Klonsequenz eines endosymbiontischen sulfatreduzierenden Bakteriums aus dem Oligochaeten *Olavius algarvensis* (93,9 %). Stamm BuS5 wuchs auch mit Propan und Pentan, jedoch nicht mit Hexan, Ethan oder Isopropan als Substrat. Stamm BuS5 ist das erste nachgewiesene Bakterium, das unter anoxischen Bedingungen gasförmige Alkane verwertet. Die thermophile Anreicherungskultur mit Propan wurde von einem neuartigen *Desulfotomaculum* Stamm dominiert (92 % der Gesamtpopulation), was durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurde.

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

Kohlenwasserstoffe finden sich in der lebenden Natur, vor allem aber in Erdöl und Erdgas. Sie stellen die industriell wichtigste Stoffklasse natürlichen Ursprungs dar. Schon seit langem sind aerobe Mikroorganismen bekannt, welche die chemisch inerten Kohlenwasserstoffe mit Hilfe von molekularem Sauerstoff aktivieren und komplett zu CO_2 mineralisieren. Es war für Jahrzehnte trotz einiger Hinweise auf eine Oxidation von Kohlenwasserstoffen durch anaerobe Mikroorganismen (Bastin et al. 1926; ZoBell 1946; Rosenfeld 1947; Davis und Yarbrough 1966) jedoch gängige Lehrbuchmeinung, daß Kohlenwasserstoffe nur unter oxidischen Bedingungen durch Mikroorganismen abgebaut werden können. Erst vor etwa einem Jahrzehnt wurden erstmals Reinkulturen mit der Fähigkeit zum anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen wie Toluol (Lovley et al. 1989) oder Hexadecan (Aeckersberg et al. 1991) isoliert. Weitere Isolierungen von Bakterien, die Kohlenwasserstoffe unter anoxischen Bedingungen als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle nutzen, folgten. Inzwischen wurden sogar mehrere biochemische Details neuartiger Aktivierungsmechanismen von Kohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen aufgeklärt (Heider et al. 1999; Spormann und Widdel 2000; Widdel und Rabus 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde der anaerobe Abbau von Ethylbenzol, einem Kohlenwasserstoff mit einem aromatischen und gesättigten Teil, und von kurzkettigen, gasförmigen Alkanen näher untersucht. Auf diese Verbindungen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1. Chemische Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen

Kohlenwasserstoffe bestehen aus verzweigten oder unverzweigten Ketten oder aus Ringstrukturen, deren Grundgerüst nur durch Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zustande kommt. Aufgrund ihrer Strukturmerkmale und der Möglichkeit der Bildung von Einzel-, Doppel- und Dreifachbindungen sowie von zusätzlichen Konjugationsmöglichkeiten über π -Elektronen teilt man die Kohlenwasserstoffe in Alkane, Alkene, Alkine und aromatische Kohlenwasserstoffe ein.

Alkane enthalten nur apolare C—H-Bindungen und C—C-Bindungen und zeigen deshalb im Vergleich zu anderen organischen Verbindungen eine sehr geringe chemische Reaktivität. Methan, die einfachste Alkanverbindung, besitzt vier gleichwertige C—H-Bindungen. Um eine

dieser Bindungen homolytisch zu spalten, ist eine Dissoziationsenergie (ΔH^0) von 440 kJ/mol nötig. Die Bindungsdissoziationsenergie einer C—H Bindung im Ethan liegt mit 410 kJ/mol darunter. Noch etwas niedriger sind C—H-Bindungsenergien an sekundären und tertiären C—H-Bindungen (395,7 kJ/mol, bzw. 389 kJ/mol). Diese Unterschiede sind in der zunehmenden Stabilität der bei einer Spaltung entstehenden Alkylradikale in der Reihenfolge $\text{H}_3\text{C}^\bullet < \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2^\bullet < \text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ begründet. Die C—H-Bindungen von Alkanen lassen sich nur durch hohe Temperaturen (Pyrolyse), reaktive Radikale wie $^\bullet\text{Cl}$ oder $^\bullet\text{OH}$ (March 1992; Vollhardt und Schore 2000) oder an besonderen Komplexen einiger Übergangsmetalle aufbrechen (Corker et al. 1996).

Während Kohlenwasserstoffe mit C—C-Doppel- oder Dreifachbindungen relativ reaktiv sind, ist der ungesättigte Sechsring der aromatischen Kohlenwasserstoffe infolge der Mesomerie der π -Elektronen sehr stabil. Bei Raumtemperatur in Abwesenheit von Katalysatoren verhält sich Benzol gegenüber üblichen Säuren (nicht gegenüber Supersäuren), Wasserstoff, Brom und Kaliumpermanganat inert (Vollhardt und Schore 2000). Die C—H-Bindungen im Benzol besitzen mit 464 kJ/mol eine sehr hohe Bindungsdissoziationsenergie (March 1992). Hingegen wird die π -Elektronenwolke eines aromatischen Ringsystems leicht durch ein Elektrophil angegriffen. Daher ist die wichtigste Reaktion beim Benzol die elektrophile Substitution, wobei ein Wasserstoffatom am C-Atom durch das Elektrophil ersetzt wird. Bei der Reaktion entsteht ein stabilisiertes kationisches Zwischenprodukt (Fox und Whitesell 1995). Generell sind Carbokationen der Aromaten stabiler als die der Alkane (March 1992).

Aromatische Kohlenwasserstoffe mit aliphatischen Kohlenwasserstoff-Seitenketten werden als Alkylbenzole bezeichnet. Im Erdöl häufige und wichtige Vertreter sind das Methylbenzol (Toluol), die Dimethylbenzole (Xylole) und das Ethylbenzol. Bei diesen Verbindungen laufen viele Reaktionen an der Alkylseitenkette (bei Ethylbenzol am Nachbar-Kohlenstoffatom des Ringes) ab, da dort die C—H-Bindung relativ schwach ist. Radikale oder Ladungen in Nachbarstellung zum Benzolring können durch Resonanz stabilisiert werden: daraus folgt eine geringe C—H-Bindungsdissoziationsenergie, z. B. beträgt sie für die Methylgruppe des Toluols 364 kJ/mol (Vollhardt und Schore 2000).

Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, Kohlenwasserstoffe zu aktivieren und diese dem Stoffwechsel zuzuführen. Die Primärreaktion ist meist die Spaltung einer C—H-Bindung. Die Reaktionsmechanismen werden in Abschnitt 3 näher erläutert.

2. Vorkommen von Kohlenwasserstoffen

2.1 Geologische Quellen von Kohlenwasserstoffen

Der überwiegende Teil der Kohlenwasserstoffe entstand im Laufe der Erdgeschichte durch diagenetische und katagenetische Umwandlung sedimentierten organischen Materials. Die Menge an organischem Kohlenstoff auf der Erde, der in Sedimenten festgelegt ist, wird auf $6 \cdot 10^{15}$ Tonnen geschätzt (Ourisson et al. 1984; Tissot und Welte 1984). Dies entspricht ungefähr der 10.000fachen Menge des organischen Kohlenstoffs aller sich auf der Erde befindlichen Organismen. Ungefähr 90 % des festgelegten Kohlenstoffs liegt als Kerogen vor, ein komplexes Gemisch unlöslicher Kohlenstoffverbindungen (Ourisson et al. 1984). Etwa 10 %, d. h. $0,6 \cdot 10^{15}$ Tonnen könnten in Form von Kohlenwasserstoffen vorliegen. Die weltweite Menge an Erdöl in den als erschließbar betrachteten Lagerstätten beträgt schätzungsweise $250 \cdot 400 \cdot 10^9$ Tonnen (Tissot und Welte 1984).

Rohöl enthält eine Vielzahl von Verbindungen, deren Anteile je nach Herkunft des Öls stark variieren können. Durchschnittlich besteht Rohöl aus 33,3 % (w/w) *n*- und *iso*-Alkanen, 31,9 % (w/w) Cycloalkanen und 34,5 % (w/w) Aromaten. In der aromatischen Fraktion dominieren die alkylierten Derivate. Der Anteil an Aromaten mit 6-8 Kohlenstoffatomen beträgt im Rohöl 1-2,5 % und setzt sich aus Toluol, Xylolen und Ethylbenzol zusammen (Fishbein 1985). Bei der Alkanfraktion im Rohöl besitzen die Alkane mit 5-7 Kohlenstoffatomen den höchsten Anteil.

Bei den diagenetischen und katagenetischen Umwandlungsprozessen organischen Materials entstehen jedoch auch größere Mengen gasförmiger Alkane. Erdgas besteht zum weitestgrößten Teil aus Methan; der Anteil der C_2 - C_4 -Alkane kann zwischen 1-20 % variieren. Thermogen gebildetes Gas unterscheidet sich von biogen gebildetem Gas durch das Vorhandensein größerer Mengen von C_2 - C_4 -Alkanen. Aufgrund des C_1/C_2+C_3 -Verhältnisses können daher die Anteile biologischer und thermogener Bildungsweisen von Erdgas unterschieden werden (Tissot und Welte 1984).

Die Bildung von Erdöl vollzieht sich meist in einem geologischen Zeitraum von ca. 5-100 Millionen Jahren (Tissot und Welte 1984). An Hydrothermalquellen (Hot Vents) der Tiefsee kann Erdöl jedoch in einem viel kürzeren Zeitraum entstehen (< 5000 Jahre). Dieser Prozeß wurde im Guaymas Becken im Golf von Kalifornien genauer untersucht (Didyk und Simoneit

1989; Kennish et al. 1992; Simoneit 1993). Dort, an der Spreitungszone zwischen der Pazifischen und Nordamerikanischen Platte, laufen durch hydrothermal induzierte Fluidbewegungen geochemische Austauschprozesse zwischen Gesteinen bzw. Sedimenten und dem Meerwasser ab. Aus dem hochproduktiven Oberflächenwasser des Guaymas Beckens wird eine große Menge organischen Materials ins Sediment eingetragen. Die heißen Porenwässer der Hydrothermalquellen verursachen eine Pyrolyse des abgelagerten organischen Materials, wobei Erdölkohlenwasserstoffe entstehen. An diesem Standort lassen sich im Wasser und in den Oberflächensedimenten flüchtige und unter Standardbedingungen gasförmige Kohlenwasserstoffe wie Methan, Ethan, Propan, Butan, Toluol, Benzol, Xylol und Ethylbenzol nachweisen. Hochmolekulare Kohlenwasserstoffe finden sich vorwiegend in den die Hydrothermalquellen umgebenden Hügeln aus Mineralien- und Metallsulfidablagerungen (Simoneit und Lonsdale 1982; Simoneit 1985; Simoneit et al. 1988; Kennish et al. 1992; Simoneit et al. 1992).

Auch an kollidierenden Plattenrändern (konvergierenden Plattengrenzen) oder an passiven Kontinentalrändern können Porenwässer aus dem Meeresboden ausströmen. Die Fluide unterscheiden sich in der Temperatur kaum von der des Bodenwassers. Daher werden diese Orte als „Cold Vents“ oder „Cold Seeps“, bei Austritt von Kohlenwasserstoffen auch als „Cold Hydrocarbon Seeps“ bezeichnet (Aharon 1994). Ein gut untersuchtes „Cold Hydrocarbon Seep“-Gebiet liegt im nördlichen Golf von Mexiko (Anderson et al. 1983).

Methanhydrate, eisähnliche kristalline Substanzen aus Wasser und Methan, stellen ein weiteres beträchtliches Reservoir für gasförmige Alkane dar. Sie können am Meeresboden bei niedriger Temperatur, hohem Druck und einer Gaskonzentration über der Löslichkeitsgrenze entstehen. Stammt das Gas aus thermogenen Quellen, kann der Anteil an Ethan, Propan und Butan relativ zu Methan recht hoch sein (Kennicutt et al. 1993, Kvenvolden 1999).

2.2 Biologische Quellen von Kohlenwasserstoffen

Kohlenwasserstoffe werden nicht nur durch geologische Prozesse gebildet, sondern auch von lebenden Organismen synthetisiert. So lassen sich langkettige, unverzweigte Alkane (C_{15} , $n-C_{17}$ und $n-C_{19}$) und einfach oder mehrfach ungesättigte langkettige Alkene in Algen nachweisen (Blumer 1971, Volkman 1998). Für die Alkanbildung in Algen wurde die Decarbonylierung eines Aldehyds als Mechanismus vorgeschlagen (Dennis und Kolattukudy 1992). Auch in Bakterien wurden Alkane und Alkene gefunden, z.B. in *Micrococcus*-Arten (Morrison et al. 1971; Birch und Bachofen 1988), einem marinen, den Gattungen *Pseudomonas/Alteromonas* zuzuordnenden Stamm (De Rosa et al. 2000) und sulfatreduzierenden Bakterien (Bagaeva 1997). Wachse der Cuticula höherer Pflanzen enthalten große Anteile an n -Alkanen und Alkenen mit einer Kettenlänge von C_{21} - C_{37} und einer ungeraden Anzahl von C-Atomen (Birch und Bachofen 1988, de Leeuw und Largeau 1993). Insekten produzieren cuticuläre Alkane und Alkene der Kettenlänge C_{11} - C_{43} (Jackson und Blomquist 1976; Singer 1998; Brown et al. 2000). Bei Vögeln werden Alkane in einem speziellen Organ (Uropygialdrüse) synthetisiert (Cheesbrough und Kolattukudy 1988). Eine weitere Klasse natürlicher Kohlenwasserstoffe sind die Isoprenoide in Pflanzen, Tieren und Prokaryonten (Smith 1988; Sacchetti und Poulter 1997). Viele der erwähnten Alkane und Alkene lassen sich in Sedimenten nachweisen und können so als "Biomarker" Auskunft über die Herkunft organischen Materials geben (Giger et al. 1980; Wakeham 1990; Wakeham 1995; Wakeham 1996).

Durch die Aktivität methanogener Archaea gelangt Methan in größeren Mengen in die Atmosphäre (Gang und Jiang 1985), schätzungsweise werden 10^9 Tonnen Methan pro Jahr durch Methanogenese produziert (Wackett 2000). Doch auch die längerkettigen gasförmigen Alkane Ethan, Propan und Butan sind in vielen Gebieten verbreitet. In mehreren Untersuchungen wurden im Meerwasser pikomolare Konzentrationen an Ethen, Propen, 1-Buten, Ethan, Propan und Butan gemessen (Bonsang et al. 1988; Plass-Dülmer et al. 1995). Auch im anoxischen Tiefenwasser (Hypolimnion) eines alkalischen Sees wurden Ethan, Propan, n - und iso -Butan nachgewiesen (Oremland und Des Marais 1983). Die flüchtigen Kohlenwasserstoffe der Kettenlänge C_2 - C_6 sind vermutlich, zumindest teilweise ebenfalls biologischen Ursprungs. Jedoch ist der Mechanismus ihrer Entstehung bisher unbekannt, wenn auch Aktivitäten von Bakterien (Davis und Squires 1954; Oremland et al. 1988) und Phytoplankton als Ursache diskutiert werden. In Labor-

experimenten wurden Hexan und Isopren während des Phytoplanktonwachstums gebildet, während Ethan, Ethen, Propan und Propen erst bei der Autolyse des Phytoplanktons entstand (McKay et al. 1996). Eine Korrelation der Konzentration von flüchtigen Kohlenwasserstoffen im Meerwasser (C₂-C₆) mit der am Standort ermittelten Phytoplanktondichte ist aber nicht immer nachweisbar (Ratte et al. 1995).

Nicht nur aliphatische, sondern auch aromatische Kohlenwasserstoffe können biologisch produziert werden. Der monoaromatische Kohlenwasserstoff *p*-Cymol (*p*-Isopropyltoluol) kommt als Sekundärmetabolit in einigen Pflanzenölen vor (Hegnauer 1966; Pouloule und Croteau 1978) und Naphthalin wird von einigen Termitenarten zur "chemischen Verteidigung" eingesetzt (Chen et al. 1998). Einige aromatische Kohlenwasserstoffe entstehen auch durch mikrobielle Transformationsprozesse. So wird Toluol durch mikrobielle Aktivität im anoxischen Hypolimnion von eutrophierten Seen gebildet (Jüttner und Henatsch 1986). Durch die Isolierung des γ -Proteobakteriums *Tolomonas auensis* konnte die Produktion von Toluol aus Phenylalanin in einer Reinkultur nachgewiesen werden (Fischer-Romero et al. 1996). In methanogenen Anreicherungskulturen wurden die Monoterpene α -Phellandren und Sabinen zu *p*-Cymol aromatisiert (Harder und Foß 1999), eine Umwandlung von Monoterpenen zu *p*-Cymol findet auch unter denitrifizierenden Bedingungen statt (Hylemon und Harder 1999). Bakterien sind eventuell auch an der Aromatisierung von zyklischen Di- und Triterpenen beteiligt (Wakeham 1980).

2.3 Anthropogener Eintrag von Kohlenwasserstoffen in die Umwelt

Außer durch natürlichen Eintrag gelangen Kohlenwasserstoffe vermehrt durch menschliche Aktivitäten in die Umwelt. Eine ungewollte Verbreitung von Kohlenwasserstoffen kann bei der Förderung, dem Transport und der Lagerung von Erdöl, z. B. durch Störfälle und undichte Pipelines oder Lagertanks auftreten (U.S. Environmental Protection Agency 1986; Sorkhoh et al. 1992; Press 1995; Swannell et al. 1996; Zitko 2000). Schätzungsweise werden jährlich durch anthropogene Aktivitäten 6 Millionen Tonnen Rohöl und Raffinerieprodukte weltweit in die Ozeane eingetragen. Etwa 90 Millionen Tonnen Kohlenwasserstoffe werden in die Atmosphäre gebracht. Hauptquellen für diese Kohlenwasserstoffe sind Raffinerien, der Kraftfahrzeugverkehr und Müllverbrennungsanlagen (Merian und Zander 1982).

Einige Kohlenwasserstoffe wie die BTEX-Aromaten (Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole) werden in großem, industriellen Maßstab synthetisiert. So wurden 1996 allein in den USA 4,7 Millionen Tonnen Ethylbenzol produziert. Ethylbenzol wird hauptsächlich für die Produktion von Styrol verwendet, dient aber auch als Lösungsmittel (Fishbein 1985; Alexander 1999). Ethylbenzol wie auch die anderen BTEX-Aromaten sind aufgrund ihrer relativ guten Wasserlöslichkeit und ihres hohen Dampfdruckes sehr mobil und zählen zu den Grundwasser gefährdenden Stoffen (Lewandowski et al. 1997).

Der beschriebene Eintrag von Kohlenwasserstoffen in die Umwelt kann nicht nur Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben (Fishbein 1985; Birgersson et al. 1988; Wirth und Gloxhuber 1994; Greim und Deml 1996; Lundberg 1996; Lundberg 1997), sondern auch die Atmosphärenchemie beeinflussen. Gasförmige Alkane und andere flüchtige Kohlenwasserstoffe bewirken in der Atmosphäre bei gleichzeitigem Vorhandensein von Stickoxiden im Sonnenlicht die Entstehung von photochemischen Smog und somit von Ozon (Graedel und Crutzen 1994). BTEX Verbindungen inhibieren schon in geringen Konzentrationen die Ammoniumoxidation in Böden (Phelps und Young 2001).

3. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen

3.1 Abbau von Kohlenwasserstoffen unter oxidischen Bedingungen

Die Fähigkeit, Kohlenwasserstoffe in der Gegenwart von Sauerstoff als Substrate zu nutzen, ist bei vielen Bakterien, Pilzen und Hefen anzutreffen. Die Organismen nutzen dabei den molekularen Sauerstoff nicht nur als terminalen Elektronenakzeptor für die Atmung, sondern auch als Cosubstrat für den primären enzymatischen Angriff. An der einleitenden Oxygenierung von Kohlenwasserstoffen sind Monooxygenasen oder Dioxygenasen beteiligt. Monooxygenasen katalysieren den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Substrat, während das andere zu Wasser reduziert wird. Dioxygenasen inkorporieren beide Sauerstoffatome in das Substrat (Bühler und Schindler 1984; Harayama und Timmis 1992; van Beilen et al. 1994).

Für die Reaktion mit einem Kohlenwasserstoff muß der molekulare Sauerstoff aktiviert werden, da er gewöhnlich (im Triplet-Zustand) recht reaktionsträge ist. In Monooxygenasen ermöglicht erst die reduktive Bildung von reaktiven Sauerstoffatomen an Metallzentren (meist Eisen) den Angriff auf die apolaren C—H-Bindungen der Kohlenwasserstoffe (Groh und Nelson

1990; Harayama und Timmis 1992). Auch bei Dioxygenasen sind vermutlich Eisenzentren (Fe^{2+} oder Fe^{3+}) an der Aktivierung des Sauerstoffs beteiligt, jedoch ist der Reaktionsmechanismus weniger gut verstanden (Harayama und Timmis 1992; Harwood und Parales 1996).

In den meisten Mikroorganismen werden *n*-Alkane an einer Methylgruppe durch Monoxygenasen aktiviert, so daß sich ein primärer Alkohol bildet. Der Alkohol wird anschließend zum Aldehyd und dann weiter zur Carbonsäure oxidiert. Der weitere Abbau erfolgt über β -Oxidation. Bei einigen Hefen findet eine Oxidation der Methylgruppen an beiden terminalen Enden statt. Andere Organismen führen eine subterminale Oxidation durch und bilden sekundäre Alkohole. Diese werden häufig durch einen Mechanismus gemäß der chemischen Baeyer-Villiger-Reaktion zu Estern oxidiert, die zu Fettsäuren und Alkoholen hydrolysiert werden (Britton 1984; Bühler und Schindler 1984; Morgan und Watkinson 1994).

Kurzkettige, im Normalzustand gasförmige Alkane der Kettenlänge $\text{C}_2\text{-C}_4$ werden aerob hauptsächlich von Vertretern der Gram-positiven Gattungen *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium* und *Rhodococcus* verwertet. Ebenso wachsen jedoch auch einige *Pseudomonas*-Arten und ein Vertreter der Gattung *Thauera* (Anzai et al. 2000) auf kurzkettigen Alkanen. Die Aktivierung dieser Alkane erfolgt durch Monoxygenasen über terminale oder subterminale Oxidation. (Van Ginkel et al. 1987; Ashraf et al. 1994; Arp 1999; Hamamura et al. 1999; Hamamura und Arp 2000; Vangnai und Arp 2001).

Aromatische Kohlenwasserstoffe werden je nach Seitenketten und Mikroorganismotyp mittels Mono- oder Dioxygenasen aktiviert. Dabei oder in Folgeaktion entsteht meist als zentrales Intermediat Catechol, Protocatechuat oder Gentsat. Anschließend erfolgt eine Ringöffnung durch Dioxygenasen (Harayama und Timmis 1992; Smith 1994; Harwood und Parales 1996).

Beim aeroben Abbau von Alkylbenzolen wird entweder der Ring direkt hydroxyliert oder es wird vor Reaktionen am Ring die Alkylseitenkette modifiziert. Zum Beispiel verläuft die Startreaktion beim aeroben Ethylbenzolabbau in *Pseudomonas putida* und dem *Pseudomonas* Stamm NCIB 10643 über eine ringaktivierende Dioxygenase (Gibson et al. 1973; Smith und Ratledge 1989). Hingegen wird bei *Pseudomonas fluorescens* Stamm CA-4 und *Pseudomonas* Stamm Y2 Ethylbenzol zu 2-Phenylethanol umgewandelt und weiter zum Phenylacetat oxidiert (Utkin et al. 1991; Corkery et al. 1994). Eine gereinigte Naphtalen-Dioxygenase aus *Pseudomonas*-Stamm

NCIB 9816-4 oxidiert Ethylbenzol unspezifisch über (*S*)-1-Phenylethanol und Acetophenon zu 2-Hydroxyacetophenon (Lee und Gibson 1996).

3.2 Abbau von Kohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen

Methanogene Anreicherungskulturen lieferten 1987 die ersten eindeutigen Hinweise, daß der aromatische Kohlenwasserstoff Toluol als Elektronendonator und C-Quelle in Abwesenheit von Sauerstoff genutzt werden kann (Grbic-Galic und Vogel 1987). Ferner wurde der Abbau von Toluol und *m*-Xylol in anoxischen Säulenversuchen mit Nitrat als Elektronenakzeptor nachgewiesen (Zeyer et al. 1986). Später erfolgte dann die erste Isolierung eines Bakteriums mit der Fähigkeit, Toluol unter anoxischen Bedingungen abzubauen (Lovley et al. 1989).

Da der Mechanismus des anaeroben Abbaus von Toluol zuerst untersucht und am besten aufgeklärt wurde, wird hier zunächst auf den anaeroben Abbau der aromatischen Kohlenwasserstoffe eingegangen und anschließend auf den der Alkane.

3.2.1 Anaerober Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Am detailliertesten wurde bisher der anaerobe Abbau von Toluol untersucht. Viele denitrifizierende Stämme, die Toluol in Abwesenheit von Sauerstoff als Substrat verwerten können, wurden isoliert und charakterisiert (Dolfing et al. 1990; Evans et al. 1991; Schocher et al. 1991; Fries et al. 1994; Anders et al. 1995; Rabus und Widdel 1995a; Zhou et al. 1995; Hess et al. 1997; Song et al. 1998; Song et al. 1999). Alle Isolate aus Süßwasserstandorten gehören zu den Gattungen *Azoarcus* oder *Thauera* innerhalb der β -Untergruppe der Proteobakterien. Die marinen denitrifizierenden Stämme Col2 und TH1, die ebenfalls anaerob Toluol zu CO₂ mineralisieren, werden der γ -Untergruppe, bzw. der α -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet (Zengler 1999). Toluol wird unter anoxischen Bedingungen auch mit anderen Elektronenakzeptoren als Nitrat abgebaut. So wurden Sulfatreduzierer (Rabus et al. 1993, Beller et al. 1996), Eisen (III)-Reduzierer (Lovley et al. 1989; Lovley und Lonergan 1990) und ein anoxygenes phototrophes Bakterium mit Toluol als Substrat (Zengler et al. 1999a) isoliert. In Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen (Grbic-Galic und Vogel 1987; Edwards und Grbic-Galic 1994; Ficker et al. 1999) oder mit Manganoxid als Elektronenakzeptor (Langenhoff et al. 1997) ließ sich ebenfalls der anaerobe Abbau von Toluol nachweisen. Ein sulfatreduzierendes Bakterium baute in

syntropher Cokultur mit *Wollinella succinogenes* Toluol mit Fumarat oder Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor ab (Meckenstock 1999).

Einige der mit Toluol isolierten denitrifizierenden Stämme nutzen auch *m*-Xylol als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle (Dolfing et al. 1990; Fries et al. 1994; Hess et al. 1997). Andere Denitrifizierer (Rabus und Widdel 1995a; Hess et al. 1997) und der sulfatreduzierende Stamm mXyS1 (Harms et al. 1999b) wurden direkt mit *m*-Xylol als Substrat isoliert. Mit *o*-Xylol gelang die Isolierung des sulfatreduzierenden Stammes oXyS1 (Harms et al. 1999b). Eine anaerobe Oxidation von *p*-Xylol wurde zwar in Anreicherungskulturen nachgewiesen (Edwards et al. 1992; Häner et al. 1995), eine Reinkultur wurde aber bisher nicht gewonnen.

Auch Alkylbenzole mit einer längeren Seitenkette als Toluol werden anaerob oxidiert. Die denitrifizierenden Stämme EbN1 und PbN1 wurden mit Ethylbenzol, bzw. *n*-Propylbenzol als alleinigem Elektronendonator und Kohlenstoffquelle aus Süßwassersedimenten isoliert. Stamm EbN1 wächst mit den Kohlenwasserstoffen Ethylbenzol und Toluol, Stamm PbN1 mit Propylbenzol und Ethylbenzol. Gemäß 16S rRNA-Sequenzanalysen zeigen beide Stämme die größte Ähnlichkeit zu Vertretern der Gattung *Azoarcus* (Rabus und Widdel 1995a). Der auch zur Gattung *Azoarcus* gehörende Stamm EB1 wächst nur mit Ethylbenzol, aber nicht mit anderen Kohlenwasserstoffen (Ball et al. 1996). Chen und Taylor (1997) reicherten zwei Konsortien thermophiler Bakterien an, die Ethylbenzol und andere BTEX-Aromaten bei Temperaturen zwischen 45-75 °C abbauten. Aufgrund der Produktion von H₂S vermuteten die Autoren, daß sulfatreduzierende Bakterien am Prozeß beteiligt waren. Zwei Denitrifizierer wurden mit dem aromatischen Monoterpen *p*-Cymol (*p*-Isopropyltoluol) angereichert und isoliert (Harms et al. 1999a).

Ein anaerober Abbau von Benzol wurde lange Zeit nur an kontaminierten Standorten und in Anreicherungskulturen nachgewiesen (Lovley 2000), doch vor kurzem wurden zwei *Dechloromonas* Stämme isoliert, die Benzol unter denitrifizierenden Bedingungen zu CO₂ mineralisieren (Coates et al. 2001).

Bakterien mit der Fähigkeit polyaromatische Kohlenwasserstoffe in Abwesenheit von Sauerstoff abzubauen, wurden ebenfalls isoliert oder nachgewiesen. Der sulfatreduzierende Stamm NaphS2 (Galushko et al. 1999) und drei denitrifizierende Stämme (Rockne et al. 2000) wachsen mit Naphthalin als einziger Kohlenstoffquelle und Elektronendonator. Der Abbau anderer polyaromatischer Verbindungen unter anoxischen Bedingungen wurde vielfach nachge-

wiesen, bisher existieren aber keine Reinkulturen (Coates et al. 1996; Coates et al. 1997; Zhang und Young 1997; Annweiler et al. 2000; Rockne und Strand 2001).

3.2.2 Mechanismen des anaeroben Abbaus von monoaromatischen Kohlenwasserstoffen

Die meisten biochemischen und genetischen Details des anaeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen sind vom anaeroben Toluolstoffwechsel in denitrifizierenden Bakterien der Gattungen *Azoarcus* und *Thauera* bekannt. Der erste Reaktionsschritt (Abb. 1) ist eine Addition von Fumarat an die Methylgruppe des Toluols unter Bildung von Benzylsuccinat (Biegert et al. 1996; Beller und Spormann 1997a). Diese ungewöhnliche Reaktion wird durch die Benzylsuccinat-Synthase katalysiert (Biegert et al. 1996), ein cytoplasmatisches Enzym, das aus dem Stamm *Thauera aromatica* unter anoxischen Bedingungen gereinigt wurde. Es besitzt eine apparente Molekularmasse von 220 kDa, besteht aus drei Untereinheiten, welche als Heterohexamer ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) vorliegen, und enthält einen nicht näher identifizierten Flavin-Cofaktor. Die Benzylsuccinat-Synthase ist extrem sauerstoffempfindlich und benötigt für die Reaktion keine weiteren Cofaktoren (Leuthner et al. 1998). Die Reaktion des Enzyms ist stereospezifisch, so daß bei der Umsetzung von Toluol zu über 95 % *R*-(+)-Benzylsuccinat gebildet wird (Beller und Spormann 1998, Leutwein und Heider 1999).

Die für die Benzylsuccinat-Synthase codierenden Gene *bssCAB* aus *Thauera aromatica* und *tutFDG* aus *Thauera* sp. Stamm TI wurden kloniert und sequenziert (Coschigano et al. 1998; Leuthner et al. 1998; Coschigano 2000). Die Gene für die Untereinheiten der Benzylsuccinat-Synthase bilden zusammen mit zwei weiteren Genen ein Operon, dessen Transkription durch Toluol induziert wird. Sequenzvergleiche ergaben, daß die Benzylsuccinat-Synthase zur Familie der Glycylradikal-Enzyme gehört. Diese Familie umfasste zuvor nur Pyruvat-Formiat-Lyasen und anaerobe Ribonukleotid-Reduktasen (Stubbe und van der Donk 1998; Sawers 1999). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten und weiterer gemeinsamer Eigenschaften mit den anderen Glycylradikal-Enzymen wurde für die Benzylsuccinat-Synthase folgender Reaktionsmechanismus vorgeschlagen: Durch eine Aktivase wird ein Glycylradikal in der großen Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase generiert und vermutlich auf einen Cysteinrest übertragen. Dieses Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom vom Toluol. Das entstandene Benzylradikal greift die Doppelbindung des Fumarats unter Bildung des Benzylsuccinyl-Radikals an. Im letzten Schritt erhält das

Benzylsuccinyl-Radikal das zuvor an das Enzym gebundene Wasserstoffatom zurück, so daß Benzylsuccinat entsteht (Heider et al. 1999). Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wurde der beschriebene Mechanismus bestätigt, denn das ESR-Signal eines freien Radikals war in der aktivierten Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* (Leutwein 2000) und *Azoarcus* sp. Stamm T (Krieger et al. 2001) nachweisbar. Das von der Benzylsuccinat-Synthase gebildete R-(+)-Benzylsuccinat wird über β -Oxidation weiter zu Acetyl-CoA und Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat im anaeroben Aromaten-Stoffwechsel, umgesetzt (Leutwein und Heider 1999; Leuthner und Heider 2000; Leutwein 2000; Leutwein und Heider 2001).

Die initiale Aktivierung des Toluols durch Addition an Fumarat unter anoxischen Bedingungen wurde auch in permeabilisierten Zellen oder in Extrakten sulfatreduzierender Bakterien (Beller und Spormann 1997b; Rabus und Heider 1998), in permeabilisierten Zellen einer methanogenen Anreicherungskultur (Beller und Edwards 2000) und in Zellextrakten eines anoxygenen phototrophen Organismus (Zengler et al. 1999a) beobachtet. Dieser Reaktionsmechanismus beschränkt sich jedoch nicht nur auf Toluol; auch andere methylsubstituierte Aromaten werden analog zum Toluol anaerob aktiviert. In Zellextrakten von *Desulfobacterium cetonicum* wurde mit *m*-Cresol (Müller et al. 1999) oder *p*-Cresol (Müller et al. 2001) als Substrat die Bildung von Fumarat-Addukten nachgewiesen. *Azoarcus* sp. Stamm T (Krieger et al. 1999) bildet in Zellsuspensionen mit *m*-Xylol als Substrat das Intermediärprodukt 3-Methylbenzylsuccinat, und in einer sulfatreduzierenden Anreicherungskultur wurde in Kulturüberständen das Produkt einer Addition der Methylgruppe des 2-Methylnaphthalins an Fumarat identifiziert (Annweiler et al. 2000). Wahrscheinlich ist die Transformation von methylsubstituierten Aromaten durch enzymatische Addition an Fumarat im Stoffwechsel anaerober Bakterien weit verbreitet (Abb. 2).

Alkylsubstituierte Aromaten mit einer Ethyl- oder Propylseitenkette werden in denitrifizierenden Bakterien auf andere Weise aktiviert. In den denitrifizierenden *Azoarcus* Stämmen EB1 (Ball et al. 1996) und EbN1 (Rabus und Widdel 1995a) wird Ethylbenzol zuerst anaerob zu (*S*)-1-Phenylethanol oxidiert (dehydrogeniert). Anschließend erfolgt die Oxidation des (*S*)-1-Phenylethanol zum Acetophenon (Abb. 1). Diese ersten beiden Reaktionsschritte werden experimentell durch folgende Ergebnisse gestützt: 1-Phenylethanol und Acetophenon ließen sich als Intermediate des anaeroben Ethylbenzolmetabolismus in Kulturüberständen und in Zellsuspensionsversuchen von Stamm EbN1 und EB1 nachweisen (Ball et al. 1996; Champion et al. 1999). Beide Verbindungen werden auch als Wachstumssubstrate von Stamm EB1 und EbN1 genutzt (Rabus

und Widdel 1995a; Ball et al. 1996). Der Sauerstoff der Hydroxylgruppe des 1-Phenylethanol stammt aus dem Wasser und nicht aus möglichen Restspuren von O₂, was sich mit H₂¹⁸O-Experimenten und anschließender GC/MS-Analyse beweisen ließ (Ball et al. 1996). Zellfreie Extrakte aus auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen des Stammes EbN1 bildeten mit Nitrat als Elektronenakzeptor aus radioaktiv markiertem Ethylbenzol ebenfalls radioaktiv markiertes 1-Phenylethanol und Acetophenon (Rabus und Heider 1998). Die Aktivitäten einer Ethylbenzol-Dehydrogenase mit Benzochinon als Elektronenakzeptor und einer NAD⁺-abhängigen S-1-Phenylethanol-Dehydrogenase waren in zellfreien Extrakten des Stammes EB1 nachweisbar.

Das Ethylbenzol wurde in den Extrakten stereospezifisch zum (*S*)-1-Phenylethanol umgesetzt (Johnson und Spormann 1999). In Stamm EbN1 wurde in einem photometrischen Enzymtest mit Ferricenium-hexafluorphosphat als künstlichem Elektronenakzeptor die Aktivität einer Ethylbenzol-Dehydrogenase nachgewiesen (siehe Teil II). Die daran beteiligten Enzyme wurden bisher nicht genauer charakterisiert.

Für die weiteren Reaktionsschritte gibt es nur indirekte Beweise. Das Wachstum der Stämme EB1 und EbN1 mit Ethylbenzol und Acetophenon war abhängig von CO₂ (Ball et al. 1996; Champion et al. 1999). Dadurch erhärtet sich die Vermutung, daß Acetophenon zu Benzoylacetat (3-Oxo-phenylpropionat) carboxyliert wird (Rabus und Widdel 1995a; Ball et al. 1996). Das Benzoylacetat wird dann wahrscheinlich zum CoA-Thioester aktiviert und anschließend thiolytisch zu Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten. Propylbenzol wird vom Stamm PbN1 vermutlich analog zu Ethylbenzol anaerob abgebaut. Nach einer Dehydrogenierung zum 1-Phenylpropanol und Oxidation zu Propiophenon würden nach Carboxylierung und Aktivierung durch thiolytische Spaltung Benzoyl-CoA und Propionyl-CoA entstehen. In Übereinstimmung mit dem postulierten Abbauweg wurde ein Wachstum von Stamm PbN1 mit 1-Phenylpropanol und Propiophenon nachgewiesen (Rabus und Widdel 1995a).

Stamm EbN1 nutzt sowohl Toluol als auch Ethylbenzol als Substrat. In Zellsuspensionsexperimenten wurde gezeigt, daß Zellen, die mit Ethylbenzol oder Toluol angezogen wurden, sofort ihr jeweiliges Wachstumssubstrat umsetzten, aber erst mit einer Verzögerung das andere Alkylbenzol oxidierten. In Übereinstimmung damit ließen sich mit 2D-Gelelektrophorese für Toluol und Ethylbenzol substratspezifische Proteine nachweisen (Champion et al. 1999).

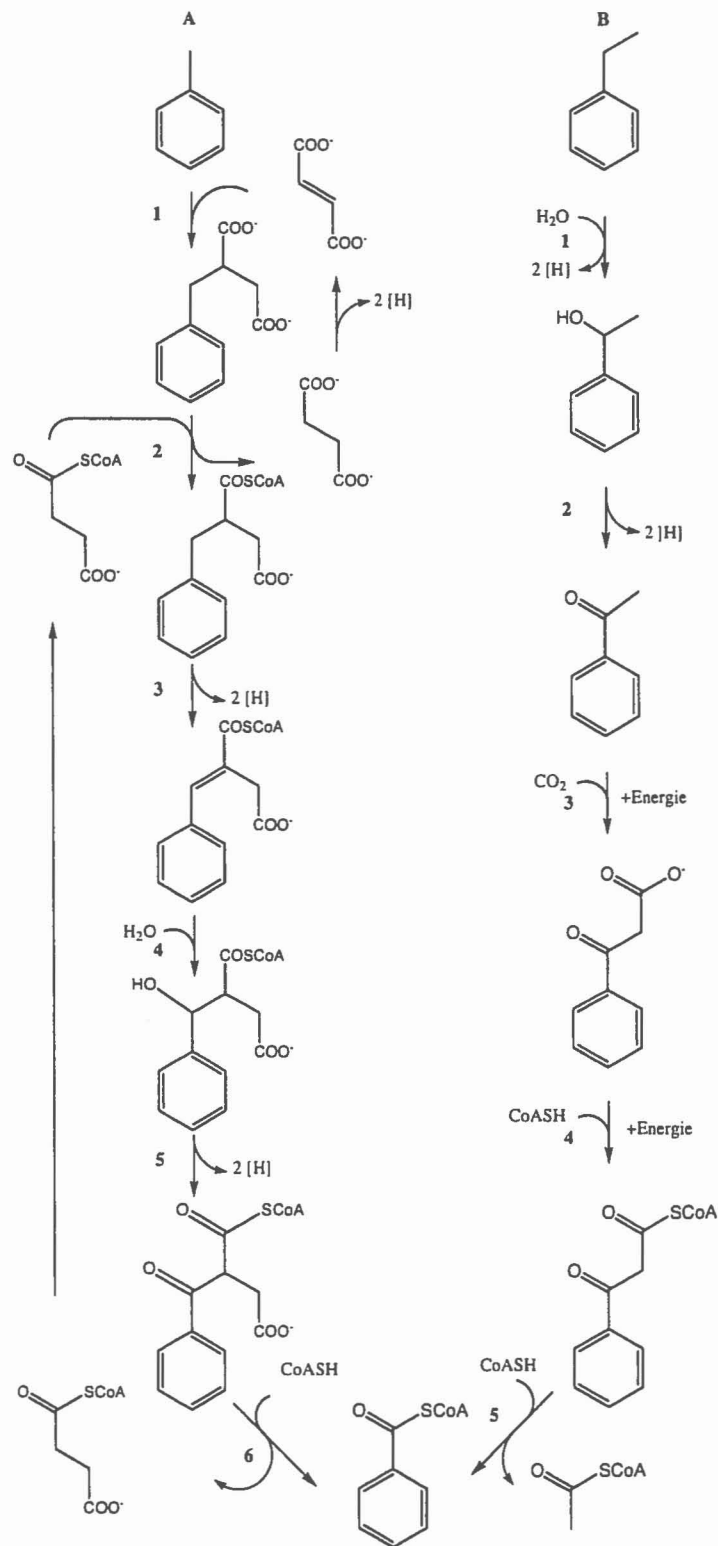


Abb. 1 Anaerober Abbau von Toluol und Ethylbenzol zu Benzoyl-CoA. An der anaeroben Toluoltransformation (A) sind folgende Enzyme beteiligt: Benzylsuccinat-Synthase (1), Benzylsuccinat-CoA-Transferase (2), Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase (3), Phenylitaconyl-CoA Hydratase (4), 3-Hydroxyl-CoA-Dehydrogenase (5), Benzylsuccinyl-CoA Thiolase (6). Postulierte Enzyme des Ethylbenzolabbaus (B): Ethylbenzol-Dehydrogenase (1), 1-Phenylethanol-Dehydrogenase (2), Acetophenon-Carboxylase (3), Benzoylacetat aktivierendes Enzym (4), Benzoylacetyl-CoA-Thiolase (5).

Die Aktivierungsmechanismen für Toluol und Ethylbenzol im denitrifizierenden Stamm EbN1 sind somit prinzipiell verschieden. Unter Bedingungen der bakteriellen Sulfatreduktion dagegen scheint Ethylbenzol wie Toluol durch Addition an Fumarat aktiviert zu werden. Ein entsprechendes Produkt ließ sich in Anreicherungskulturen mit Ethylbenzol und Sulfat nachweisen (Elshahed et al. 2001).

Der weitere Abbau des zentralen Intermediats des anaeroben Aromaten-Stoffwechsels, Benzoyl-CoA, wurde bisher in *Thauera aromatica* und *Rhodospseudomonas palustris* am eingehendsten untersucht. Erst erfolgt die Reduktion des Ringsystems (Boll und Fuchs 1995; Breese et al. 1998) und anschließend die Ringöffnung durch Hydrolyse. Danach werden die aliphatischen Intermediate durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA und weiter zu CO_2 umgesetzt (Harwood et al. 1999; Laempe et al. 1999).

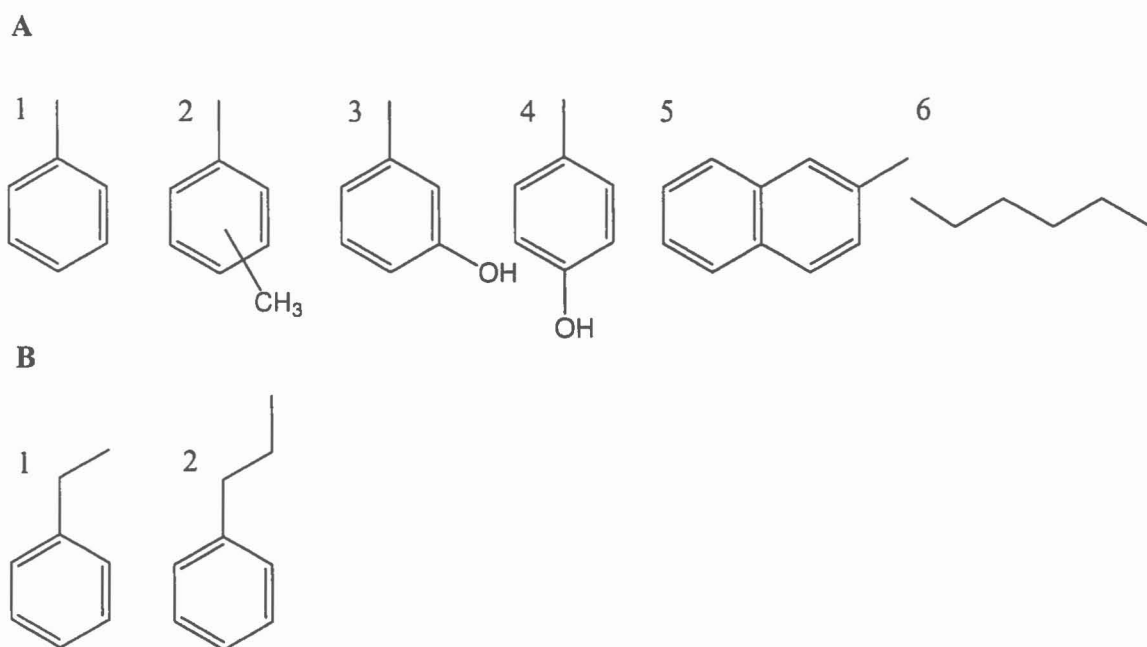


Abb. 2 (A) Strukturen von Verbindungen, bei denen unter anoxischen Bedingungen eine Aktivierung durch Addition an Fumarat wahrscheinlich ist oder nachgewiesen wurde: (1) Toluol; (2) Xylole; (3) *m*-Cresol; (4) *p*-Cresol; (5) 2-Methylnaphthalin; (6) Hexan. (B) Strukturen von Verbindungen, die in denitrifizierenden Bakterien durch Dehydrogenierung zum Alkohol aktiviert werden (B): (1) Ethylbenzol, (2) *n*-Propylbenzol.

3.2.3 Anaerober Abbau von Alkanen

Aus einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes wurde der mesophile sulfat-reduzierende Stamm Hxd3 isoliert, der Alkane der Kettenlänge C_{12} bis C_{20} verwertet (Aeckersberg et al. 1991). In quantitativen Wachstumsexperimenten mit Stamm Hxd3 wurde erstmals der eindeutige Nachweis geliefert, daß Alkane unter anoxischen Bedingungen zu CO_2 abgebaut werden können. Es folgten weitere Isolierungen von Sulfatreduzierern, die in Abwesenheit von Sauerstoff mit Alkanen wachsen. Die beiden aus marinen Sedimenten stammenden Stämme Pnd3 (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998) und AK-01 (So und Young 1999a) sind wie Stamm Hxd3 in der Lage, mit Alkanen der Kettenlänge C_{14} - C_{17} , bzw. C_{13} - C_{18} unter anoxischen Bedingungen zu wachsen. Der moderat thermophile Stamm TD3 aus Sedimenten des Guaymas Becken oxidiert auch Alkane mit kürzeren C_6 - C_{16} Ketten (Rueter et al. 1994). Alle bisher mit Alkanen isolierten Sulfatreduzierer gehören der δ -Untergruppe der Proteobakterien an.

Die Fähigkeit denitrifizierender Bakterien, Alkane als Wachstumssubstrat zu nutzen, wurde anhand dreier Reinkulturen, der Stämme HxN1, OcN1 und Stamm HdN1 gezeigt, die mit Alkanen der Kettenlänge C_6 - C_8 , C_8 - C_{12} und C_{14} - C_{20} wuchsen (Ehrenreich et al. 2000).

Anreicherungskulturen mit Alkanen wurden ferner unter Bedingungen der Methanogenese (Zengler et al. 1999b; Anderson und Lovley 2000; So und Young 2001) und Eisen(III)-Reduktion (So und Young 2001) erhalten. Das Spektrum der unter anoxischen Bedingungen abbaubaren Alkane ist jedoch noch breiter als bisher in Reinkulturen gezeigt werden konnte. Untersuchungen von mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten marinen Sedimenten zeigten, daß mit Sulfat als Elektronenakzeptor auch sehr langkettige Alkane mit einer Kettenlänge bis zu C_{34} abbaubar sind (Caldwell et al. 1998). Pristan, ein verzweigtes Isoprenoidalkan, wurde in Anreicherungskulturen und Mikrokosmos-Studien unter Bedingungen der Nitratreduktion (Bregnard et al. 1997) und Methanogenese (Grossi et al. 2000) abgebaut.

Seit einigen Jahren weckt auch die anaerobe Oxidation von Methan ein sehr großes Interesse. Dieses einfachste und stabilste Alkan wird vermutlich von einem Konsortium aus methanogenen Archaeen und sulfatreduzierenden Bakterien zu CO_2 mineralisiert (Hinrichs et al. 1999; Boetius et al. 2000; Orphan et al. 2001b). Die Möglichkeit eines anaeroben Abbaus der anderen, im Standardzustand gasförmigen Alkane, Ethan, Propan und Butan, wurde bisher noch nicht untersucht.

3.2.4 Mechanismen des anaeroben Abbaus von Alkanen

Erste Versuche zur Aufklärung des biochemischen Mechanismus der anaeroben Alkanaktivierung wurden mit dem Stamm Hxd3 durchgeführt. Zellen, die auf Hexadecan gewachsen waren, enthielten hauptsächlich Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen in der Kohlenstoffkette. Bei der Anzucht von Stamm Hxd3 mit Heptadecan ließen sich hauptsächlich Fettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen nachweisen. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß die anaerobe Aktivierung der Alkane eine Kettenverlängerung um eine C₁-Einheit einschließt (Aeckersberg et al. 1998), wobei eine Carbonylierung als initialer Reaktionsschritt diskutiert wurde. Mit dem sulfatreduzierenden Stamm Pnd3 und dem denitrifizierenden Stamm HdN1 konnten diese Resultate aber nicht bestätigt werden. Daher wurde die initiale Aktivierung eines subterminalen Kohlenstoffatoms als alternativer Reaktionsmechanismus diskutiert (Ehrenreich 1996; Aeckersberg et al. 1998).

Mit ¹³C oder Deuterium markierten Alkanen wurde der anaerobe Alkanmetabolismus im sulfatreduzierenden Stamm AK-01 genauer untersucht. Einige methylverzweigte Fettsäuren wurden spezifisch nur beim Wachstum auf Alkanen gebildet. Die Methylgruppe der verzweigten Fettsäuren stammte dabei aus der terminalen Methylgruppe des Alkans. Von den Autoren wurde wie zuvor schon von Aeckersberg et al. (1998) die Addition einer Kohlenstoffverbindung ans subterminale Ende (z.B. C-2-Atom) des Alkans als Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen (So und Young 1999b).

Die Analyse von Zellextrakten des Stammes HxN1 mittels 2D-Gelelektrophorese ergab, daß während des Wachstums mit Hexan spezifische Proteine synthetisiert wurden, die beim Wachstum auf Capronat nicht nachweisbar waren (Behrends 1999). Eines dieser Proteine wies am N-Terminus Ähnlichkeit mit der kleinen Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase auf. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, daß Alkane unter anoxischen Bedingungen analog zum anaeroben Toluolmetabolismus durch Addition an Fumarat aktiviert werden. Durch den Nachweis eines Fumaratadditionsproduktes in einer sulfatreduzierenden Anreicherungskultur mit Dodecan wurde diese Hypothese bestätigt (Kropp et al. 2000). Außerdem wurde in Kulturüberständen des Stammes HxN1 (1-Methylpentyl)succinat als Intermediat des anaeroben Hexanmetabolismus identifiziert. Nicht das terminale, sondern das zweite Kohlenstoffatom des Hexans wird demnach bei der initialen Aktivierung angegriffen (Abb. 3). Die wahrscheinliche Beteiligung eines

Glycil-Radikals bei dieser Reaktion wurde durch ESR-Spektroskopie bestätigt. Bei auf Hexan gewachsenen Zellen wurde das Signal eines freien organischen Radikals gemessen, welches bei auf Hexanoat angezogenen Zellen nicht vorhanden war (Rabus et al. 2001).

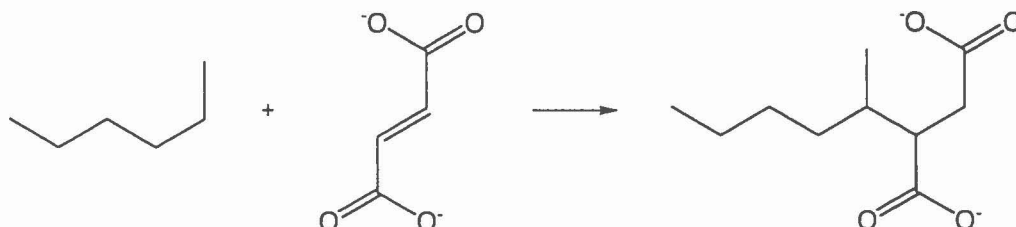


Abb. 3 Vorgeschlagene Reaktion von *n*-Hexan mit Fumarat in dem denitrifizierenden *Azoarcus* Stamm HxN1. Das Produkt der initialen Aktivierung ist (1-Methylpentyl)succinat.

Die Aktivierung von Kohlenwasserstoffen durch Addition an Fumarat ist ein weitverbreiteter Mechanismus im anoxischen Metabolismus von Bakterien. So unterschiedliche Kohlenwasserstoffe wie Toluol, 2-Methylnaphtalen und Hexan werden auf diesem Wege aktiviert. Inwieweit sich die Enzyme in strukturellen und mechanistischen Einzelheiten unterscheiden, ist bisher nicht bekannt.

4. Bedeutung des anoxischen Abbaus von Kohlenwasserstoffen in der Umwelt

In der Regel versucht man bei der biologischen Sanierung von Böden und Gewässern, den aeroben Abbau der vorhandenen Schadstoffe zu fördern. Doch an einigen Standorten ist Sauerstoff nicht vorhanden oder wird sehr schnell von der aeroben Bakterienpopulation verbraucht, so daß nur noch andere terminale Elektronakzeptoren zur Verfügung stehen (Alexander 1999). Viele mit Erdölbestandteilen verunreinigte Grundwasser leitende Gesteinsschichten (Aquifer) sind anoxisch. Hier wäre der Eintrag von Sauerstoff zur Förderung des Schadstoffabbaus technisch sehr aufwendig und kostenintensiv. Die Förderung anoxischer Transformationsprozesse durch Mikroorganismen wäre in solchen Fällen die wirtschaftlichere Alternative. In vielen Studien konnte gezeigt werden, daß Bakterienpopulationen in anoxischen Grundwasserleitern das Potential besitzen, Kohlenwasserstoffe abzubauen. Das Einbringen von Nitrat oder Sulfat in die Grundwasser leitenden Gesteinsschichten stimulierte in vielen Fällen den anaerobe Abbau von BTEX-Aromaten. Unter anoxischen Bedingungen ist aber vermutlich eine geringere Zahl von Erdöl-

kohlenwasserstoffen abbaubar als unter oxischen Bedingungen (Lovley 1997; Reinhard et al. 1997; Coates und Anderson 2000; Cunningham et al. 2000).

In der Erdölindustrie können die Abbauleistungen anaerober Bakterien aber auch Schwierigkeiten bereiten. Die Bildung von Schwefelwasserstoff durch sulfatreduzierende Bakterien bei der Erdölförderung ist ein seit Jahrzehnten bekanntes Problem. Schwefelwasserstoff kann die Ölqualität beeinträchtigen (Souring), Arbeiter gefährden und durch Metallsulfidausfällungen die Förderausbeute erniedrigen (Cord-Ruwisch et al. 1987; Odom 1993). Bakteriell gebildeter Schwefelwasserstoff spielt auch eine Rolle bei der anaeroben Korrosion von Pipelines (Bak et al. 1990). Anfänglich wurde vermutet, daß den sulfatreduzierenden Bakterien in Ölfeldern organische Säuren (Acetat, Benzoat) oder aerobe Oxidationsprodukte des Erdöls als Elektronendonatoren zur Verfügung stehen (Nazina et al. 1985; Cord-Ruwisch et al. 1987). In Anreicherungen und Reinkulturen wurde jedoch gezeigt, daß sulfatreduzierende (wie auch denitrifizierende) Bakterien direkt mit Rohöl als Quelle organischer Substrate wachsen können, wobei bevorzugt kurzkettigere Alkane und Alkylbenzole abgebaut wurden (Rueter et al. 1994; Rabus et al. 1996; Rabus et al. 1999; Wilkes et al. 2000).

Eine vieldiskutierte Frage bleibt, ob in Erdöllagerstätten aktive Bakterienpopulationen seit Jahrtausenden oder Jahrmillionen vorhanden sind oder ob diese erst bei der Erdölförderung eingetragen wurden (L'Haridon et al. 1995; Wellsbury et al. 1997; Magot et al. 2000). In den letzten Jahren wurden diverse anaerobe Bakterien aus Erdölreservoirs isoliert, doch ihre Rolle unter *in situ*-Bedingungen bleibt unklar (Rosnes et al. 1991; Stetter et al. 1993; Nazina et al. 1995; Nilsen et al. 1996b; Phillips und Lappin-Scott 1997; Magot et al. 2000; Orphan et al. 2000).

5. Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchung des anaeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen ist ein noch recht junges Forschungsgebiet. Jedoch konnten in den letzten Jahren viele interessante Einblicke in den anaeroben Metabolismus von Kohlenwasserstoffen in Bakterien gewonnen werden. Mit der Addition von Kohlenwasserstoffen an Fumarat wurde zum Beispiel ein neuartiger radikalischer Aktivierungsmechanismus in Bakterien nachgewiesen. Doch trotz der erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet bleiben immer noch viele Fragen offen.

Die Enzyme für den postulierten anaeroben Abbauweg von Ethylbenzol im denitrifizierenden Stamm EbN1 waren bisher nicht bekannt. Deshalb sollten für die ersten beiden Enzyme, Ethylbenzol-Dehydrogenase und Phenylethanol-Dehydrogenase, jeweils ein Enzymtest etabliert werden. Im weiteren sollten diese Enzyme aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Diese Charakterisierung wäre von besonderem Interesse, da sich die Aktivierung von Ethylbenzol in denitrifizierenden Bakterien grundlegend von der des Toluols unterscheidet. Außerdem sollte der Ethylbenzolmetabolismus in sulfatreduzierenden Bakterien untersucht werden, da es Hinweise darauf gab, daß Ethylbenzol unter sulfatreduzierenden Bedingungen über einen anderen Weg als in Denitrifizierern abgebaut wird. Ein Ziel war es daher, ein sulfatreduzierendes Bakterium zu isolieren, daß mit Ethylbenzol als einzigem Elektronendonator und Kohlenstoffquelle wachsen kann.

Derzeit weckt die anaerobe Methanoxidation besonderes Interesse. Die Möglichkeit eines anaeroben Abbaus der anderen im Standardzustand gasförmigen Alkane, Ethan, Propan und Butan, wurden bisher noch nicht untersucht, obwohl diese an einigen Standorten in größeren Konzentrationen vorkommen können. Deshalb sollte versucht werden, sulfatreduzierende Bakterien anzureichern und zu isolieren, die mit diesen kurzkettigen Alkanen wachsen.

B Ergebnisse und Diskussion

1. Anaerober Abbau von Ethylbenzol

Zur Thematik des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Beiträge geleistet. Einerseits wurden die ersten beiden Enzyme des Abbauweges, die Ethylbenzol-Dehydrogenase und die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase aus dem denitrifizierenden *Azoarcus* Stamm EbN1 gereinigt und charakterisiert. Andererseits wurde ein neuartiges sulfatreduzierendes Bakterium isoliert und charakterisiert, das Ethylbenzol unter strikt anoxischen Bedingungen als Substrat verwertet. Damit konnte der anaerobe Ethylbenzolmetabolismus in denitrifizierenden und sulfatreduzierenden Bakterien miteinander verglichen werden.

1.1 Ethylbenzol-Dehydrogenase aus *Azoarcus* Stamm EbN1

1.1.1 Aktivitäten der Ethylbenzol-Dehydrogenase in Stamm EbN1 und PbN1

In einem photometrischen Enzymtest mit Ferricenium-Hexafluorophosphat als künstlichem Elektronenakzeptor wurde in Extrakten aus Zellen des *Azoarcus* Stammes EbN1, die mit Ethylbenzol gewachsen waren, die Ethylbenzol-Dehydrogenase mit einer spezifischen Aktivität von $22 \pm 4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg Protein})^{-1}$ gemessen. Die Aktivität entsprach damit 79 % der für eine Verdopplungsrate von 11 Stunden und einem Ertrag von 79 g Zelltrockenmasse pro mol Ethylbenzol notwendigen Umsatzrate. Die Oxidation von Ethylbenzol konnte nach Zentrifugation bei $100.000 \times g$ nur im Überstand nachgewiesen werden, nicht aber in der Membranfraktion. Nach Herstellung von Sphäroplasten wurde die Ethylbenzol-Dehydrogenase in der periplasmatischen Fraktion nachgewiesen (Teil II, 1, Tab. 2). Hingegen wurde im Stamm EB1, der auch der Gattung *Azoarcus* angehört und mit Stamm EbN1 eng verwandt ist, eine Assoziation der Ethylbenzol-Dehydrogenase mit der Membran postuliert. Die Aktivität der Ethylbenzol-Dehydrogenase war in dieser Untersuchung mit *p*-Benzochinon als künstlichem Elektronenakzeptor nachgewiesen worden (Johnson und Spormann 1999).

Die Synthese der Ethylbenzol-Dehydrogenase wurde durch Ethylbenzol induziert. In cytosolischen Extrakten von Zellen des Stammes EbN1, die anaerob mit Phenylethanol oder Acetophenon, den ersten Intermediaten des anaeroben Ethylbenzolmetabolismus, gewachsen

waren, wurden nur geringe Aktivitäten der Ethylbenzol-Dehydrogenase gemessen. In auf Benzoat gewachsenen Zellen war keine Aktivität der Ethylbenzol-Dehydrogenase nachweisbar (Teil II, 1, Tab. 1).

Der mit Stamm EbN1 eng verwandte *Azoarcus* Stamm PbN1 wächst sowohl mit Ethylbenzol als auch mit *n*-Propylbenzol. Cytosolische Extrakte aus Zellen dieses Bakterienstammes, die auf Ethylbenzol oder *n*-Propylbenzol angezogen wurden, zeigten hohe Aktivitäten mit beiden Kohlenwasserstoffen. Die Dehydrogenase-Aktivität betrug mit *n*-Propylbenzol 62-66 % des mit Ethylbenzol ermittelten Wertes, unabhängig davon, ob Zellen mit Ethylbenzol oder *n*-Propylbenzol kultiviert wurden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß im Stamm PbN1 dasselbe Enzym an der Oxidation von *n*-Propylbenzol und Ethylbenzol beteiligt ist und kein eigenes Enzym für das jeweilige Alkylbenzol synthetisiert wird (Teil II, 1, Tab. 1)

Ethylbenzol wird von der Ethylbenzol-Dehydrogenase stereospezifisch zu (*S*)-1-Phenylethanol umgesetzt, was durch die Kopplung an eine aus demselben Organismus isolierten (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase nachgewiesen wurde. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde die Bildung desselben Enantiomers auch in Enzymtests mit *Azoarcus* Stamm EB1 gefunden (Johnson und Spormann 1999).

1.1.2 Reinigung und Charakterisierung der Ethylbenzol-Dehydrogenase aus *Azoarcus* Stamm EbN1

In einem zweistufigen chromatographischen Trennverfahren wurde die Ethylbenzol-Dehydrogenase aus Stamm EbN1 unter anoxischen Bedingungen gereinigt und weiter charakterisiert (Teil II, 1., Tab. 3 u. Abb. 3). Das Enzym mit einer apparenten Molekularmasse von 155 kDa enthält Molybdän, Eisen-Schwefel-Zentren und ein Cytochrom *b* (Teil II, 1, Abb. 4) und besteht aus drei Untereinheiten (96, 43 und 23 kDa) in einer $\alpha\beta\gamma$ Struktur. Schon seit längerem sind Molybdän-Enzyme bekannt, die im Stoffwechsel von Bakterien beim Abbau von Aromaten eine Rolle spielen (Fetzner 2000, Breese und Fuchs 1998, Rhee und Fuchs 1999). Neuartig ist bei der durch die Ethylbenzol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion jedoch, daß hier ein Kohlenwasserstoff, also eine organische Verbindung ohne funktionelle Gruppe, oxidiert wird. Weitere aromatische Verbindungen wie Toluol, *p*-Cymol, Phenylacetat, (*R/S*)-1-Phenylethanol oder 2-Phenylethanol

wurden von der Ethylbenzol-Dehydrogenase nicht umgesetzt. Der apparente K_m -Wert für Ethylbenzol war sehr niedrig und lag unter $2 \mu\text{M}$ (Teil II, 1 Abb. 5).

Der N-Terminus der α -Untereinheit wies die größte Ähnlichkeit mit der α -Untereinheit der Selenat-Reduktase aus *Thauera selenatis* (Macy et al. 1993, Schröder et al. 1997) und der α -Untereinheiten der Nitrat-Reduktasen aus *Haloarcula marismortui* und *Escherichia coli* (NarG) auf. Diese terminalen Reduktasen gehören zu der DMSO-Reduktase-Familie innerhalb der Klasse der Molybdän-Cofaktor-haltigen Enzyme (Kisker et al. 1997, Schröder et al. 1997). Aufgrund der Struktur- und Sequenzähnlichkeiten ist anzunehmen, daß die große α -Untereinheit der Ethylbenzol-Dehydrogenase den Molybdopterin-Cofaktor, die β -Untereinheit die Fe-S-Cluster und die kleine γ -Untereinheit das Cytochrom *b* enthält.

Erstaunlich war die Unempfindlichkeit der Ethylbenzol-Dehydrogenase im Extrakt gegenüber Sauerstoff; bei der weiteren Reinigung verlor sie diese Stabilität. Vermutlich wird das Enzym, wenn sich sein Haem *b*-Cofaktor im reduzierten Zustand befindet, durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies inaktiviert. Bei Anwesenheit des natürlichen Elektronenakzeptors im Extrakt könnte das Enzym im oxidierten Zustand gehalten werden und damit sauerstoffunempfindlich bleiben. Bei der Reinigung geht der Elektronenakzeptor vermutlich verloren und die Ethylbenzol-Dehydrogenase in den reduzierten Zustand über.

Da die Ethylbenzol-Dehydrogenase im periplasmatischen Raum lokalisiert ist, käme als möglicher natürlicher Elektronenakzeptor ein Cytochrom *c* in Betracht. Das Redoxpaar Ethylbenzol/1-Phenylethanol besitzt ein Redoxpotential von ca. $+ 0,03 \text{ V}$. Dennoch läuft die Oxidationsreaktion wahrscheinlich erst bei einer gewissen Entfernung vom Gleichgewicht (Überspannung) ab, also mit deutlich höherem Redoxpotential wie das von Ferricenium/Ferrocen ($E^0 = + 0,38 \text{ V}$). In denitrifizierenden Bakterien besitzen Cytochrome des *c*-Typs in der Regel Redoxpotentiale zwischen $+ 130 \text{ mV}$ und $+ 250 \text{ mV}$ (Bosma et al. 1987, Gilmour et al. 1991, Michalski et al. 1986).

1.1.3 Substratspezifische Proteinbildung der Stämme EbN1 und PbN1

Die durch Aktivitätsmessungen nachgewiesene Induktion der Ethylbenzol-Dehydrogenase wurde mittels eindimensionaler SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestätigt. Mit Ethylbenzol gewachsene Zellen des Stammes EbN1 enthielten mehrere Substrat-induzierte Polypeptide (96, 71,

44, 33, 24 und 23 kDa), die bei Zellen fehlten, die mit 1-Phenylethanol angezogen worden waren (Teil II, 1 Abb. 2). Auch mit 2D-Gelelektrophorese wurden für den Ethylbenzol-Stoffwechsel spezifische Proteine mit gleichen oder ähnlichen Molekularmassen nachgewiesen (siehe Anhang), und zwar im sauren und neutralen (33, 56, 70 und 71 kDa) ebenso wie im basischen Bereich (23, 44, und 96 kDa). Die drei Polypeptide mit einem basischen isoelektrischen Punkt besitzen interessanterweise die gleiche Molekularmasse wie die aus EbN1 gereinigte Ethylbenzol-Dehydrogenase. In einer vorherigen Studie mit Stamm EbN1 konnten diese Proteine im 2D-Gel vermutlich deshalb nicht nachgewiesen werden, weil bei der isoelektrischen Fokussierung kein immobilisierter und damit stabiler pH-Gradient verwendet worden war (Champion et al. 1999).

Extrakte aus Zellen des Stammes PbN1, die auf Ethylbenzol oder *n*-Propylbenzol kultiviert wurden, enthielten die gleichen substrat-induzierten Polypeptide im Vergleich zu auf Benzoesäure gewachsenen Zellen (96, 73, 34, 24, 23 kDa). Das identische Proteinmuster unterstützt die Annahme, daß ein einziges Enzym in Stamm PbN1 Ethylbenzol und *n*-Propylbenzol umsetzt.

1.1.4 Vergleich der Ethylbenzol-Dehydrogenasen aus *Azoarcus* Stamm EbN1 und EB1

Unabhängig wurde auch aus dem *Azoarcus* Stamm EB1 eine Ethylbenzol-Dehydrogenase gereinigt und charakterisiert. Zusätzlich wurde das dazugehörige Gen sequenziert (Johnson et al. 2001). Die Ethylbenzol-Dehydrogenase aus Stamm EB1 besitzt im wesentlichen die gleichen Eigenschaften wie das Enzym aus dem *Azoarcus* Stamm EbN1. Dabei stimmen die Aminosäuresequenzen der N-Termini der α - und γ -Untereinheit zu 100 % überein. Bei den N-terminalen Sequenzen der β -Untereinheiten wurden bisher keine Übereinstimmung erkannt, was jedoch an Unsicherheiten in der Sequenz aus Stamm EbN1 begründet sein kann. Die Konservierung der Aminosäuresequenz der Ethylbenzol-Dehydrogenase in beiden Stämmen zeigt sich auch auf DNA-Ebene. Die mittels degenerierter Primer für den N-Terminus der großen Untereinheit amplifizierten Region (72 bp) aus Stamm EbN1 ist zu 100 % identisch zur DNA-Sequenz aus Stamm EB1 (siehe Anhang).

Das Operon der Ethylbenzol-Dehydrogenase aus Stamm EB1 enthält drei offene Leseraster (*ebdA*, *ebdB* und *ebdC*), die für die drei Untereinheiten des Enzyms codieren (Johnson et al. 2001). Das Gen für die große Untereinheit enthält eine Molybdopterin-Bindedomäne und ein Signalpeptid mit Twin-Arginin-Motiv (DRRDFLK). Das für den Export zuständige Tat (twin-

arginin translocation)-System transportiert bereits vollständig gefaltete Proteine über die Cytoplasmamembran ins Periplasma (Berks et al. 2000). Dadurch wird die von Johnson und Spormann (1999) postulierte Membran-Lokalisation der Ethylbenzol-Dehydrogenase in Frage gestellt und vielmehr das mit dem Stamm EbN1 erzielte Ergebnis bestätigt.

Das für die γ -Untereinheit codierende Gen *ebdC* zeigte nur Sequenzähnlichkeit mit der kleinen Untereinheit der Selenat-Reduktase (Johnson et al. 2001), die nicht kovalent gebundenes Cytochrom *b* enthält (Krafft et al. 2000). Die periplasmatische Selenat-Reduktase gehört neben der periplasmatischen, strukturell ähnlichen Dimethylsulfid-Dehydrogenase (Hanlon et al. 1996) aus *Rhodovulum sulfidophilum* (früher *Rhodobacter sulfidophilus*), deren Gene noch nicht bekannt sind, zu den wenigen periplasmatischen, nicht membranassoziierten Enzymen, die ein Cytochrom *b* als Cofaktor enthalten (Krafft et al. 2000). Auch die Ethylbenzol-Dehydrogenase aus Stamm EbN1 gehört damit vermutlich dieser Enzymgruppe an, denn alle drei Untereinheiten zeigen die höchste Ähnlichkeit zur Selenat-Reduktase. Im Gegensatz dazu wurde in Stamm EB1 jedoch kein Cytochrom *b* nachgewiesen (Johnson et al. 2001).

Die Ethylbenzol-Dehydrogenase aus Stamm EB1 katalysiert sogar die Oxidation der Alkene 3-Methyl-2-penten und Ethylidencyclohexan (Johnson et al. 2001). Eine interessante Frage ist, ob die Aktivierung von Kohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen durch molybdopterinhaltige Dehydrogenasen nur auf wenige Verbindungen beschränkt ist und nur in einigen Denitrifizierern vorkommt oder ob dieser Aktivierungsmechanismus weiter verbreitet ist.

1.2 (S)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase aus *Azoarcus* Stamm EbN1

1.2.1 Aktivitäten von 1-Phenylethanol-Dehydrogenase Isoenzymen in Stamm EbN1

Mit NAD^+ , nicht aber mit NADP^+ als Elektronenakzeptor wurde die Aktivität einer 1-Phenylethanol-Dehydrogenase in Extrakten aus Zellen des Stammes EbN1, die auf Ethylbenzol gewachsen waren, gemessen. Beide Enantiomere des 1-Phenylethanol wurden im Enzymtest umgesetzt. Mit (*S*)-1-Phenylethanol wurde eine spezifische Aktivität von $67 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ nachgewiesen; sie lag damit um den Faktor 12 höher als mit (*R*)-1-Phenylethanol (Teil II, 2, Tab. 1). Die gemessene Aktivität mit (*S*)-1-Phenylethanol ist ausreichend, um die Wachstumsrate μ des Stammes EbN1 von $0,0011 \text{ min}^{-1}$ und einem Ertrag von 79 g/mol Ethylbenzol erklären zu können. Übereinstimmend mit der Bildung von (*S*)-1-Phenylethanol durch die Ethylbenzol-Dehydrogenase ist die Aktivität der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase in auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen vorherrschend. Wurde der Stamm EbN1 jedoch mit (*R*)-, (*S*)-1-Phenylethanol oder Acetophenon angezogen, stieg die (*R*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase Aktivität um ein Vielfaches (mindestens 10fach). (*R*)-1-Phenylethanol induziert vermutlich nicht oder nicht alleine die Synthese dieses Enzyms. Die (*R*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase könnte eine Entgiftungsfunktion für den Organismus besitzen und einen Überschuss an Acetophenon durch Reduktion zum weniger toxischen Alkohol beseitigen (Zengler 1996).

Mit Benzoat oder Acetat als Substrat wurde kaum eine Aktivität einer 1-Phenylethanol-Dehydrogenase gemessen.

1.2.2 Reinigung und Charakterisierung der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase

In Extrakten aus auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen konnten mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie die Enzyme für die beiden Enantiomere des 1-Phenylethanol voneinander getrennt werden. Über zwei weitere nachfolgende Chromatographieschritte wurde die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase gereinigt (Teil II, Tab. 2, Abb. 2). Das Enzym war nicht sauerstoffempfindlich, so daß alle folgenden Experimente unter oxidischen Bedingungen durchgeführt werden konnten.

Die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase bestand aus einer einzigen Untereinheit mit einer Molekularmasse von $25,5 \pm 0,5 \text{ kDa}$ und einem isoelektrischen Punkt bei pH 6,6. Die apparente

native Molekularmasse betrug 50 ± 5 kDa, so daß eine Homodimerstruktur (α_2) angenommen werden kann. Das Enzym wies am N-Terminus die größten Ähnlichkeiten mit der Oxoacyl-(Acylcarrier-Protein) Reduktase aus *Zymomonas mobilis* (66 % Identität) und Glucose-Dehydrogenase(n) aus *Bacillus megaterium* (65-69 % Identität) auf (Teil II, 2 Abb. 3).

Das apparente pH-Optimum für die Reduktion des Acetophenons lag bei pH 4, das für die Oxidation des (*S*)-1-Phenylethanol bei pH 8. Die apparenten K_m -Werte für die Substrate lagen für (*S*)-1-Phenylethanol bei $1,6 \pm 0,3$ μ M und für Acetophenon bei $1,0 \pm 0,04$ μ M. Diese niedrigen K_m -Werte unterstützen die Annahme, daß die gereinigte Alkohol-Dehydrogenase auch unter physiologischen Bedingungen die Funktion hat, Acetophenon und (*S*)-1-Phenylethanol umzusetzen.

Mit (*R*)-1-Phenylethanol wurde keine Aktivität gemessen, sondern das Enantiomer hemmte sogar die Oxidation des (*S*)-1-Phenylethanol. Nur wenige sekundäre Alkohole wie (*R,S*)-1-Phenylpropanol und Isopropanol und keine primären Alkohole wurden von der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase oxidiert (Teil II, 2, Tab. 3). Metallchelatoren und Thiolreagenzien hemmten die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase nicht. Vermutlich besitzt die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase keine leicht zugänglichen bivalenten Metalle (z.B. Zink) als Cofaktoren. Auch Cystein-Reste spielen bei der Katalyse wahrscheinlich keine Rolle, es sei denn, daß sie durch die Konformation des Enzyms gut abgeschirmt und damit für die Thiolreagenzien nicht erreichbar sind.

1.2.3 Vergleich der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase aus *Azoarcus* Stamm EbN1 mit anderen Alkohol-Dehydrogenasen

Aufgrund der N-terminalen Aminosäuresequenz, der Zusammensetzung und Größe der Untereinheit, des offensichtlichen Fehlens von Metallionen als Cofaktoren und der Spezifität für sekundäre Alkohole läßt sich die (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase in die große Familie der „Short-Chain“-Dehydrogenasen/Reduktasen einordnen. Die meisten „Short-Chain“-Dehydrogenasen, deren Untereinheiten aus kurzen Aminosäureketten bestehen, sind Dimere oder Tetramere und enthalten am N-Terminus eine konservierte NAD(H) oder NADP(H)-Bindungsstelle (Jörnvall et al. 1995).

Im Vergleich zu anderen gereinigten 1-Phenylethanol-Dehydrogenasen ist das aus Stamm EbN1 isolierte Enzym die erste NAD^+ -abhängige (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase. Aus *Lactobacillus brevis* und *L. kefir* konnten NADP^+ -abhängige „Short-Chain“-Alkohol-Dehydrogenasen isoliert werden, die spezifisch (*R*)-1-Phenylethanol umsetzen. Eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* gehört zu den Zink-haltigen Alkohol-Dehydrogenasen und reduzierte Acetophenon mit NADH spezifisch zu (*S*)-1-Phenylethanol (Hummel 1997).

In einer vorherigen Untersuchung wurde mit Hilfe der 2D-Elektrophorese ein spezifisch beim Wachstum auf Acetophenon induziertes Protein im Stamm EbN1 entdeckt, das anschließend per Edmann-Abbau sequenziert wurde (Champion et al. 1999). Die N-terminale Sequenz des 30 kDa Proteins zeigte Homologien zu „Short-Chain“-Dehydrogenasen, stimmte aber am N-Terminus nicht mit der aus EbN1 gereinigten (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase überein. Eventuell handelt es sich bei diesem Enzym um eine (*R*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase oder ein Isoenzym der (*S*)-1-Phenylethanol-Dehydrogenase. Hinweise auf weitere 1-Phenylethanol-Dehydrogenasen im Stamm EbN1 gab es auch bei der Auftrennung von Zellextrakten im nativen Gel und anschließender Aktivitäts-Färbung mit (*R*)- oder (*S*)-1-Phenylethanol, NAD^+ , Phenazinmethosulfat und Nitroblau-tetrazoliumchlorid (Daten nicht veröffentlicht).

1.3 Anaerober Abbau von Ethylbenzol durch ein neues sulfatreduzierendes Bakterium

1.3.1 Isolierung des sulfatreduzierenden Stammes EbS7

Als Inokulum zur Anreicherung von sulfatreduzierenden Bakterien, die mit Ethylbenzol als einzigem Elektronendonator und Kohlenstoffquelle wachsen, wurden Meeressedimente von mehreren Standorten Europas und Amerikas verwendet. Nach wiederholter Übertragung waren in allen Anreicherungskulturen ovale Zellen mit Gasvakuolen zu erkennen. Das schnellste Wachstum zeigte eine Anreicherungskultur mit Sediment aus dem Guaymas Becken (10 mM Sulfid nach 6 Wochen), weshalb diese für weitere Experimente und Isolierungsversuche verwendet wurde. In anoxischen Agarverdünnungsreihen mit Ethylbenzol wuchsen innerhalb von drei Monaten gelblich-bräunliche Kolonien. Diese wurden nach einer zweiten Agarverdünnungsreihe in Flüssigmedium überführt. Ein als Stamm EbS7 bezeichnetes Isolat, das mit Ethylbenzol als einzigem organischen Substrat in Gegenwart von Sulfat wuchs, wurde für weitere Charakterisierungen verwendet.

1.3.2 Phylogenetische Charakterisierung des Stammes EbS7

Stamm EbS7 gehört aufgrund von Sequenzanalysen des 16S rRNA Genes zu der δ -Untergruppe der Proteobakterien (Teil II, 3, Abb. 2). Die nächsten Verwandten sind Stamm NaphS2 (Galushko et al. 1999), der Naphthalin verwerten kann, und Stamm mXyS1 (Harms et al. 1999b), ein mit *m*-Xylol isoliertes sulfatreduzierendes Bakterium. Die Sequenzähnlichkeiten betragen 97,6 %, bzw. 96,2 %. Die G+C-Gehalte der DNA der sulfatreduzierenden Bakterien wurden mit 51,8 mol % für Stamm EbS7, 52,3 mol % für Stamm NaphS2 und 49 mol % für Stamm mXyS1 bestimmt. Diese drei Isolate können vermutlich als neue Gattung beschrieben werden.

Außerdem ergab ein Vergleich mit Sequenzen aus der Datenbank (NCBI) eine 100 %ige Übereinstimmung des 16S rRNA Gens in Stamm EbS7 mit einem über PCR-amplifizierten 16S rDNA-Fragment (550 bp) aus einer marinen, sulfatreduzierenden Anreicherungskultur mit Ethylbenzol (Nakagawa et al. 2001). Als Inokulum war Sediment aus der Bucht von Tokyo verwendet worden. Dieses Ergebnis und das Auftauchen desselben Morphotyps bei den Anreicherungen mit verschiedenen Sedimenten deutet auf eine weite Verbreitung dieses Organismenstyps hin.

1.3.3 Morphologische und physiologische Charakterisierung des Stammes EbS7

Zellen von Stamm EbS7 waren 2-2,3 μm lang und 1,5 μm im Durchmesser und bildeten Gasvesikel am Ende der Wachstumsphase (Teil II, 3 Abb. 1). Stamm EbS7 wuchs in einem Temperaturbereich von 12-35 °C mit einem Optimum bei 31-32 °C und in einem pH-Bereich von 6,1-7,8 mit einem Optimum um pH 7,5. Die Verdopplungszeit beim Wachstum auf Ethylbenzol betrug 12-20 Tage (Teil II, 3, Abb. 3). Neben Ethylbenzol verwertete Stamm EbS7 Phenylacetat, 3-Phenylpropionat, Formiat, Capronat, Lactat und Pyruvat, jedoch keine weiteren Kohlenwasserstoffe. Das schnellste und dichteste Wachstum wurde mit 3-Phenylpropionat beobachtet. 1-Phenylethanol, Acetophenon und Benzoat, die Intermediate des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in denitrifizierenden Bakterien, wurden nicht als Wachstumssubstrate genutzt. 1-Phenylethanol hemmte sogar spezifisch das Wachstum von Stamm EbS7 mit Ethylbenzol. Die Analogie zur Hemmung des anaeroben Toluolabbaus durch Benzylalkohol in sulfatreduzierenden (Rabus und Widdel 1995b) und denitrifizierenden Bakterien (Biegert und Fuchs 1995) ist somit offensichtlich.

In quantitativen Wachstumsexperimenten wurde gezeigt, daß Stamm EbS7 zur vollständigen Oxidation von Ethylbenzol zu CO_2 fähig ist (Teil II, 3, Tab. 1). Acetat oder andere kurzkettige Fettsäuren konnten in Wachstumsüberständen nicht nachgewiesen werden. Stamm EbS7 ist damit die erste Reinkultur eines sulfatreduzierenden Bakteriums, das Ethylbenzol unter anoxischen Bedingungen komplett zu CO_2 mineralisiert.

1.3.4 Bestimmung von Intermediaten des anaeroben Ethylbenzolmetabolismus in Stamm EbS7

Der Befund, daß Stamm EbS7 im Gegensatz zu denitrifizierenden Stämmen nicht mit 1-Phenylethanol und Acetophenon wächst, läßt vermuten, daß in diesem sulfatreduzierenden Stamm Ethylbenzol über einen alternativen Weg abgebaut wird. Unterstützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen von Elshahed et al. (2001), die in einem mit Ethylbenzol und Sulfat angereicherten Konsortium (1-Phenylethyl)-succinat (3-Phenyl-1,2-butandicarboxylat) nachwiesen. Somit wird Ethylbenzol in sulfatreduzierenden Bakterien wahrscheinlich analog zu Toluol durch Addition an Fumarat aktiviert (Biegert et al. 1996, Beller und Spormann 1997b). Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen zum Substratspektrum der Benzyl-

succinat-Synthase aus *Thauera aromatica*, die die erste Reaktion im anaeroben Toluol-Stoffwechsel katalysiert. In zellfreien Extrakten addiert das Enzym auch Ethylbenzol an ¹⁴C-markiertes Fumarat (Leuthwein 2000).

Zur Identifizierung von Metaboliten des Ethylbenzolmetabolismus wurden Kulturüberstände von auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen von Stamm EbS7 mit Dichlormethan extrahiert und anschließend mittels GC/MS analysiert. Im Vergleich zu Kontrollkulturen auf anderen Substraten (Capronat, 3-Phenylpropionat) wurden zwei für den anaeroben Ethylbenzolstoffwechsel spezifische Produkte nachgewiesen und anhand des Massenspektrums als (1-Phenylethyl)succinat und 4-Phenylpentansäure identifiziert (Teil II, 3 Abb. 4). Aufgrund der gefundenen Intermediate wurde ein anaerober Abbau von Ethylbenzol analog zum anaeroben Hexanabbau in *Azoarcus* Stamm HxN1 (Wilkes et al. 2001) vorgeschlagen. Genauso wie beim Ethylbenzol wird bei der Aktivierung von Hexan ein sekundäres Kohlenstoffatom an Fumarat addiert (Rabus et al. 2001). Nach Bildung von (1-Phenylethyl)succinat und anschließender Aktivierung zum CoA-Thioester würde durch eine Mutasereaktion, bei der eine Carboxylgruppe wandert, (2-Phenylpropyl)malonyl-CoA entstehen. Ein nachfolgender Carboxylierungsschritt würde das nachgewiesene Intermediat 4-Phenylpentansäure, bzw. dessen CoA-Thioester ergeben (Teil III, 3, Abb. 5)

Die Frage ist, warum die anaerobe Aktivierung von Ethylbenzol in denitrifizierenden und sulfatreduzierenden Bakterien nicht nach demselben biochemischen Prinzip erfolgt. Bei der Oxidation von Ethylbenzol zu (*S*)-1-Phenylethanol in Zellextrakten von Denitrifizierern sind Elektronenakzeptoren mit einem hohen positiven Redoxpotential notwendig ($E^0 = + 0,3 \text{ V} - + 0,4 \text{ V}$; s. Abschnitt 1.1.2). Elektronenakzeptoren mit einem so hohen positiven Redoxpotential können vermutlich im Metabolismus von sulfatreduzierenden Bakterien nicht bereitgestellt werden. Dahingegen kann eine Addition von Kohlenwasserstoffen an Fumarat auch bei niedrigen Redoxpotentialen stattfinden (Beller und Spormann 1997b, Rabus und Heider 1998). Für die homolytische Spaltung einer C-H-Bindung in der Methylengruppe der Seitenkette des Ethylbenzols muß mit 356 kJ/mol sogar weniger Energie aufgebracht werden als für die Aktivierung von Toluol (368 kJ/mol) und Hexan (401 kJ/mol) notwendig ist (McMillen und Golden 1982, Rabus et al. 2001).

2. Anaerober Abbau von Propan und Butan unter mesophilen und moderat thermophilen Bedingungen durch neuartige sulfatreduzierende Bakterien

Diese Arbeit wurde bislang nicht in Form eines Manuskriptes verfaßt. Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden von Dr. Katrin Knittel und Dr. Stefan Sievert durchgeführt.

In den letzten Jahren hat das Interesse an der anaeroben Oxidation von Methan stark zugenommen (Valentine und Reeburgh 2000). Dieser einfachste Kohlenwasserstoff wird neuesten Erkenntnissen zufolge von einem Konsortium, das aus sulfatreduzierenden Bakterien und methanogenen Archaeen besteht, zu CO₂ oxidiert (Boetius et al. 2000, Orphan et al. 2001). Die Isolierung dieser Mikroorganismen ist bisher noch nicht gelungen. Ein anaerober Abbau der anderen im Standardzustand gasförmigen Alkane Ethan, Propan und Butan wurde bislang noch nicht untersucht. Im Vergleich zu Methan lassen sich Ethan, Propan und Butan in den meisten marinen Sedimenten und in der Wassersäule nur in sehr geringen Konzentrationen (pM) nachweisen (Plass-Dülmer et al. 1993, 1995). Doch an natürlich vorkommenden "Gas- oder Hydrocarbon Seeps", wie zum Beispiel dem Guaymas Becken im Golf von Kalifornien, können Ethan, Propan und Butan im Vergleich zu Methan einen recht hohen Anteil haben. Die Konzentration der gasförmigen Alkane ist in tieferen Sedimentschichten am höchsten (> 5 m) und nimmt Richtung Sedimentoberfläche ab, was auf einen Verbrauch durch Mikroorganismen hindeutet (Simoneit et al. 1992). Als Inokulum zur Anreicherung sulfatreduzierender Bakterien, die mit Ethan, Propan oder Butan als einzigem Elektronendonator und Kohlenstoffquelle wachsen können, wurden daher Sedimente aus dem Guaymas Becken verwendet.

2.1 Mikrobiologische Experimente

2.1.1 Anreicherung und Wachstum von sulfatreduzierenden Bakterien mit Propan oder Butan

Zur Anreicherung sulfatreduzierender Bakterien wurde Sediment mit Sulfid reduziertem künstlichem Meerwassermedium (Bak und Widdel 1992) und 1 atm Ethan, Propan oder *n*-Butan in der Gasphase in 125 oder 150 ml Flaschen bei 28 oder 60 °C inkubiert. Eine detailliertere Beschreibung der Sedimentproben findet sich bei Weber und Jørgensen (2001). In der Anreicherungskultur mit Propan (60 °C) wurde nach 3 Monaten, in den Anreicherungskulturen mit Propan (28 °C) und Butan (28 und 60 °C) nach 6 Monaten eine Produktion von etwa 10 mM Sulfid im Vergleich

zu Kontrollen beobachtet. Die Anreicherungskulturen mit Ethan wiesen keine zusätzliche Sulfidbildung auf.

Tab. 1 Übersicht über die Sulfidbildung und Zellformen in den Anreicherungskulturen mit Propan und Butan.

Organisches Substrat	Temp. (°C)	Meßbare Sulfidbildung nach mehreren Transfers (~20 mM)	Zellformen
Propan	28	Nach 8-9 Wochen	Viele längere Stäbchen, einige kleine Stäbchen, Vibrios und Spirillen
	60	Nach 2-3 Wochen	Viele große lange Stäbchen, vereinzelt Vibrios und sehr dünne Stäbchen
Butan	28	Nach 8-9 Wochen	Viele ovale Stäbchen, einige kleine dünne Stäbchen, Vibrios und Spirillen
	60	Nach 12-16 Wochen	Kleine kurze Stäbchen, kleine Kokken

Nach mehreren Transfers in frisches Medium waren verschiedenste Morphotypen in den Anreicherungskulturen erkennbar (Tab. 1). Die Alkan-abhängige Sulfidproduktion in der Anreicherungskultur mit Propan (60 °C) und Butan (28 °) war schneller als in den anderen Anreicherungskulturen (Tab. 1). Die über Bestimmung der Sulfidproduktion ermittelte Verdopplungszeit betrug für die Anreicherungskultur bei 60 °C mit Propan 35 h und für die Anreicherungskultur bei 28 °C mit Butan 100 h (Abb. 1). Daher wurden für weitere Experimente und Isolierungsversuche die Anreicherungskulturen mit Propan (60 °C) und Butan (28 °C) verwendet. Zusätzlich wurden diese und die Anreicherungskultur mit Butan (60 °C) durch Klonierung der 16S rRNA-Gene molekularbiologisch charakterisiert.

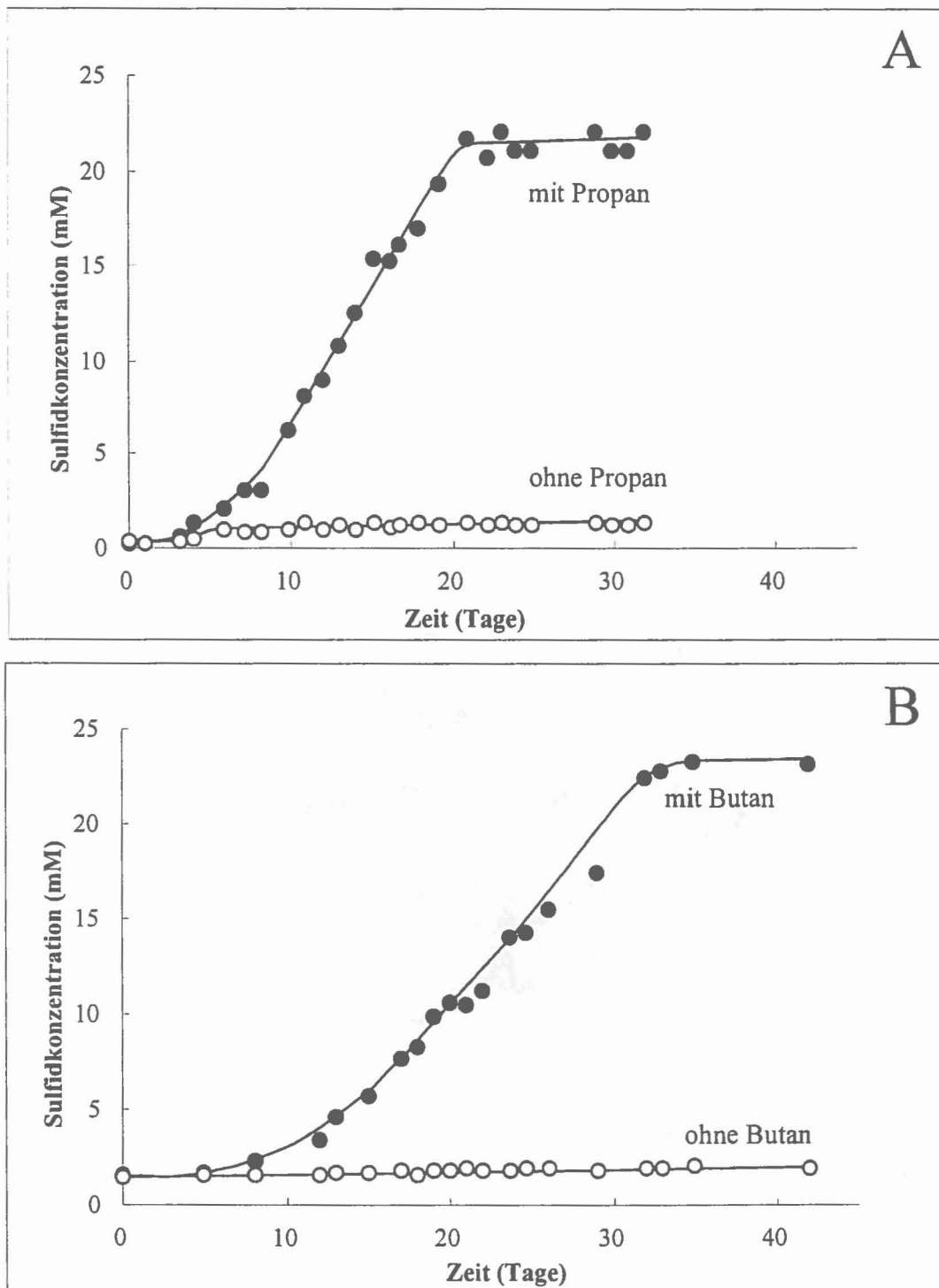


Abb. 4 Sulfidproduktion (●) in einer anaeroben Anreicherungskultur mit Propan bei 60 °C (A) oder Butan bei 28 °C (B) im Vergleich zu Kontrollkulturen (○) ohne Substrat

2.1.2 Isolierung und Charakterisierung des mesophilen sulfatreduzierenden Stammes BuS5

Nur in Agarverdünnungsreihen mit *n*-Butan, nicht aber mit Pyruvat, Butyrat, 1-Butanol und 2-Methylbutyrat bildete der vorherrschende Zelltyp aus der mesophilen Anreicherungskultur mit *n*-Butan nach 5 Monaten gelbliche bis leicht bräunliche Kolonien. Aus der vierten Verdünnungsstufe wurden Kolonien in Flüssigmedium mit Butan als Substrat übertragen. Diese wuchsen innerhalb von zwei Monaten wieder an, waren aber noch mit Spirillen kontaminiert. In einer weiteren Agarverdünnungsreihe mit Butan gelang es dann, eine Reinkultur zu isolieren. Die Zellen des isolierten Stammes BuS5 waren unbeweglich, 2,5-3,5 μm lang und 1,5-2 μm im Durchmesser (Abb. 5) und wuchsen gegen Ende der Wachstumsphase in Flocken. Sporenbildung wurde nie beobachtet. Stamm BuS5 wuchs auch mit Propan und *n*-Pentan (2% in einer organischen Trägerphase), jedoch nicht mit Isobutan, *n*-Hexan, Pyruvat und Butyrat. BuS5 ist das erste isolierte Bakterium, das die unter Standardbedingungen gasförmigen Alkane Propan und Butan unter anoxischen Bedingungen als Wachstumssubstrate verwertet.

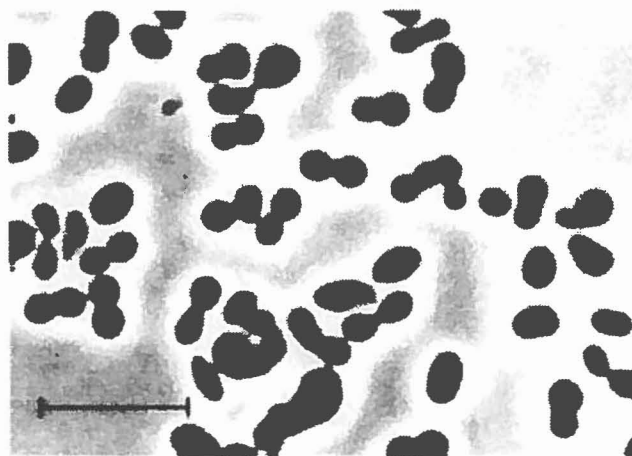


Abb. 5 Phasenkontrastaufnahme des neu isolierten sulfatreduzierenden Bakteriums BuS5, das mit Butan als Substrat angereichert und isoliert worden war. Größenbalken, 10 μm .

2.2 Molekularbiologische Charakterisierung

2.2.1 Phylogenetische Charakterisierung des Stammes BuS5

Der Stamm BuS5 wurde aufgrund von Sequenzanalysen der 16S rRNA-Gene als Angehöriger der δ -Proteobakterien erkannt. Die nächsten Verwandten von Stamm BuS5 waren eine 16S rRNA-Sequenz eines endosymbiontischen sulfatreduzierenden Bakteriums (Dubilier et al. 2001) aus dem Oligochaeten *Olavius algarvensis* (93,9%) und zwei Sequenzen mit der Bezeichnung Eel-36e1g12 und Eel-BE1b3 (93,7 und 93,1%) aus dem „Gas Seep“ Gebiet des Eel River Beckens (Abb. 7). Die Klonsequenzen aus dem Eel-River Becken und weitere Vertreter der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe sind vermutlich an der anaeroben Methanoxidation beteiligt (Orphan et al. 2001). Der sulfatreduzierende Stamm BuS5 kann als Vertreter einer neuen Abstammungslinie innerhalb der δ -Proteobakterien angesehen werden.

2.2.2 Analyse der sulfatreduzierenden Anreicherungskulturen mittels 16S rDNA

Klonierung

Zur Charakterisierung der Population der thermophilen Anreicherungskulturen mit Propan und Butan sowie der mesophilen Anreicherungskultur mit Butan wurden die 16S rRNA-Gene kloniert. DNA wurde aus 10 ml Kultur nach Ficker et al. (1999) extrahiert. Anschließend wurden die 16S rRNA-Gene unter Verwendung allgemeiner Primer für die Domänen Bacteria und Archaea mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte mit dem TOPO TA Klonierungskit (Invitrogen, San Diego, USA) kloniert. Ausgewählte Klone wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit dem im Softwarepaket ARB (Strunk et al. 2001) enthaltenen Programm ARB_ALIGN einem Alignment unterzogen. Die phylogenetische Analyse wurde entweder mit dem Softwarepaket ARB oder dem Softwarepaket PAUP 4.0b8 durchgeführt.

Thermophile Anreicherungskultur mit Propan und Sulfat

Bei der thermophilen Anreicherungskultur waren alle zehn analysierten bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen identisch und die als K2.3 bezeichnete Klonsequenz (Abb. 6) zeigte die höchste Ähnlichkeit zu 16S rRNA-Genen aus *D. thermocisternum* (92,3%), *Desulfotomaculum* sp. Stamm DSM 7476 (92,8%), *D. thermobenzoicum* (92,4%) und *Desulfotomaculum* sp. Stamm

DSM 7475 (92,3%). Alle diese Spezies gehören in die von Stackebrandt et al. (1997) vorgeschlagene Untergruppe Ic und Id der Gattung *Desulfotomaculum* (Stackebrandt et al. 1997). All diese *Desulfotomaculum* Arten besitzen ein Temperaturoptimum zwischen 55 und 68 °C, können aber keine Kohlenwasserstoffe verwerten (Min und Zinder 1990; Tasaki et al. 1991; Widdel 1992; Love et al. 1993; Tanimoto und Bak 1994; Nilsen et al. 1996).

Aus derselben Anreicherungskultur wurden insgesamt 14 archaeelle Klone näher untersucht, die in fünf verschiedene Typen eingeteilt werden konnten. Eine Klonsequenz zeigte die höchste Ähnlichkeit (99%) zu *Thermococcus mexicalis*, der aus dem Guaymas Becken isoliert wurde (unveröffentlichte Daten). Die weiteren Klonsequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu Euryarchaeota-Sequenzen aus Tiefseehydrothermalquellen (Takai und Horikoshi 1999) und aus der methanogenen Zone eines Aquifers, welches durch Kohlenwasserstoffe und chlorierte Lösungsmittel kontaminiert wurde (Dojka et al. 1998).

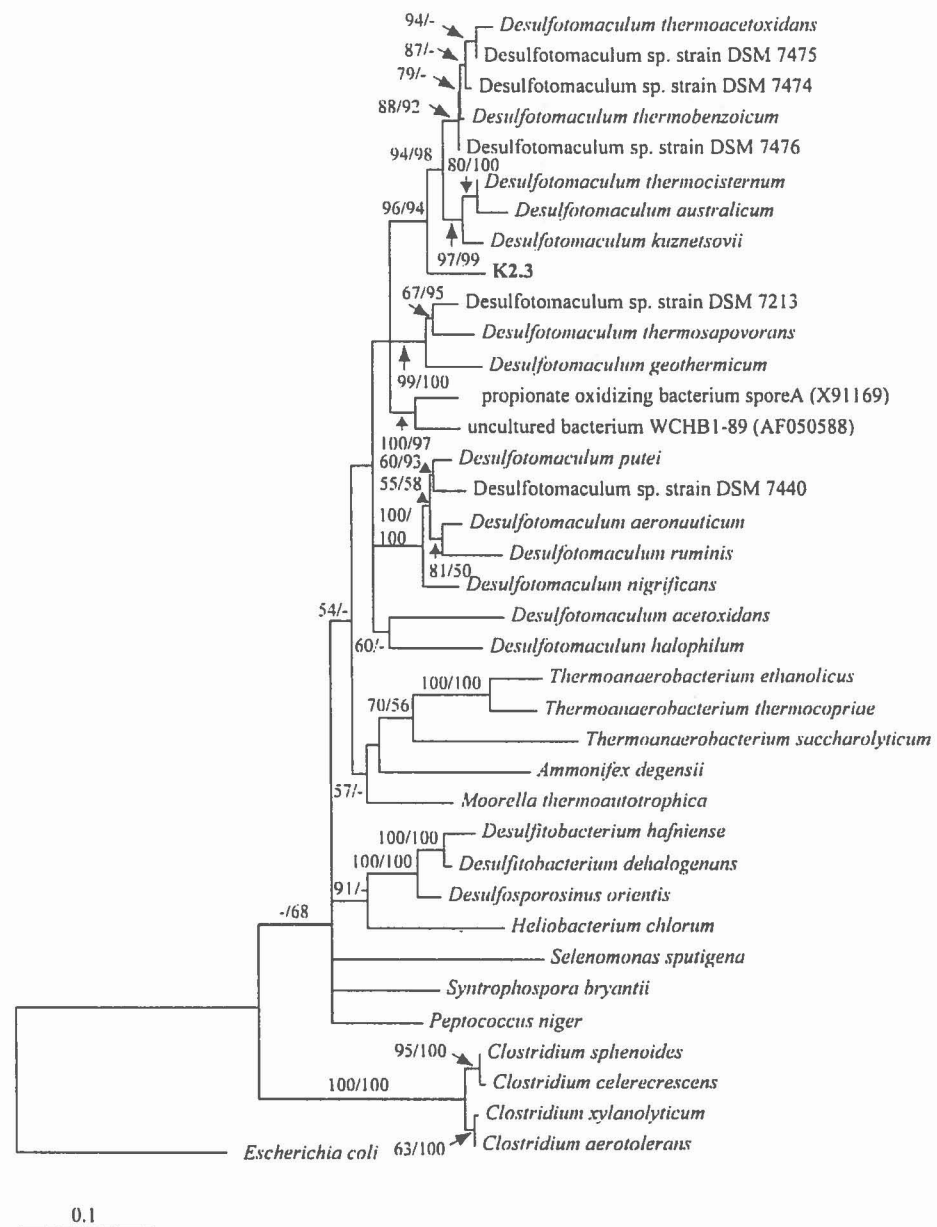


Abb. 6 Phylogenetische Verwandtschaft der aus der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan erhaltenen Klonsequenzen (K2.3) zu anderen 16S rRNA-Genen aus *Desulfotomaculum* spp. und ausgewählten Gram-positiven Bakterien. *E. coli* fungierte als „Outgroup“. Der Stammbaum wurde mittels Distanzanalyse in PAUP* (Version 4.0b8) mit „Minimal Evolution“ als Optimierungskriterium und Maximum-Likelihood als Distanzmatrix berechnet. Der mit „Maximum-Parsimony“ berechnete Baum zeigte insgesamt die gleiche Topologie. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen die „Bootstrap“-Werte (> 50 %) sowohl der Distanzanalyse (erste Zahl) als auch der Maximum-Parsimony-Analyse (zweite Zahl) ausgedrückt in Prozent dar. Der Größensbalken entspricht 10 % an geschätzten Sequenzunterschieden.

Mikrobielle Diversität in der mesophilen Anreicherungskultur mit Butan und Sulfat

Es wurden 27 Bakterien-Klone aus der mesophilen Anreicherungskultur mit Butan untersucht. Archaea-Klone wurden nicht erhalten. Von den bakteriellen Klonen gehörten 21 Sequenzen zu den δ -Proteobakterien und zeigten die größten Ähnlichkeiten zu Sequenzen aus dem *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Cluster. Fünf verschiedene 16S rRNA-Gen-Klone, von denen vollständige Sequenzen vorlagen, unterschieden sich nur in einigen Basenpaaren und wurden daher zusammenfassend als BmK bezeichnet (siehe Abb. 7). Sie besaßen die größte Sequenzähnlichkeit zu den bereits erwähnten Klonsequenzen Eel-36e1g12 und Eel-BE1b3 (92,1% und 91,8%) aus dem Eel River Becken, während die Ähnlichkeit zur 16S rRNA-Gensequenz des Isolates BuS5 90,9% betrug. Die der Klonsequenz BmK13 ähnlichsten 16S rRNA-Sequenzen waren die des Alkan abbauenden, sulfatreduzierenden Bakteriums AK01 (91%) (So und Young 1999) und eines endosymbiontischen Sulfatreduzierers (91,4%) aus *Olavius algarvensis* (Dubilier et al. 2001). Die restlichen Gensequenzen, die nicht zur δ -Untergruppe der Proteobakterien gehörten, zeigten Ähnlichkeiten mit 16S rRNA-Genen aus bisher unkultivierten Bodenbakterien und zu *Cytophaga* spp.

Keine der Klonsequenzen war mit der 16S rRNA-Sequenz des Stammes BuS5 identisch, obwohl letztere ebenfalls zum *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Cluster gehörte. Dies könnte dadurch zu erklären sein, daß eine nicht ausreichende Anzahl an Klonen analysiert oder die 16S rRNA Gensequenz des Isolates im PCR-Ansatz nicht amplifiziert wurde.

Mikrobielle Diversität in der thermophilen Anreicherungskultur mit Butan und Sulfat

Aus der thermophilen Anreicherung mit Butan wurden insgesamt 38 bakterielle und 26 archaeelle-Klone näher untersucht. Nur zwei unterschiedliche bakterielle Klonsequenzen, die vier Nukleotide voneinander abwichen, wurden erhalten. Repräsentativ wurde der Klon SRBButan60 phylogenetisch analysiert. Die Sequenz zeigte die höchste Ähnlichkeit mit der Klonsequenz OPB78 (86,6 %), welche aus dem Obsidian Pool, einer heißen Quelle im Yellowstone National Park (USA), erhalten wurde (Hugenholtz et al., 1998). Die phylogenetische Analyse zeigte, daß die Sequenz zum *Thermodesulforhabdus/Desulfacinum*-Cluster gehörte (Abb. 7). Wahrscheinlich stellt SRBButan60 eine neue Abstammungslinie innerhalb der Gram-negativen Sulfatreduzierer dar. Die Archaea-Klonsequenzen zeigten ähnlich wie die in der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan eine höhere Diversität als die bakteriellen Klonsequenzen. Sequenzähnlichkeiten gab

es zu *Thermococcus mexicalis* (>99%), *Thermococcus barossii* (90%), *Archaeoglobus profundus* (90%) und weiteren bisher unkultivierten Archaea.

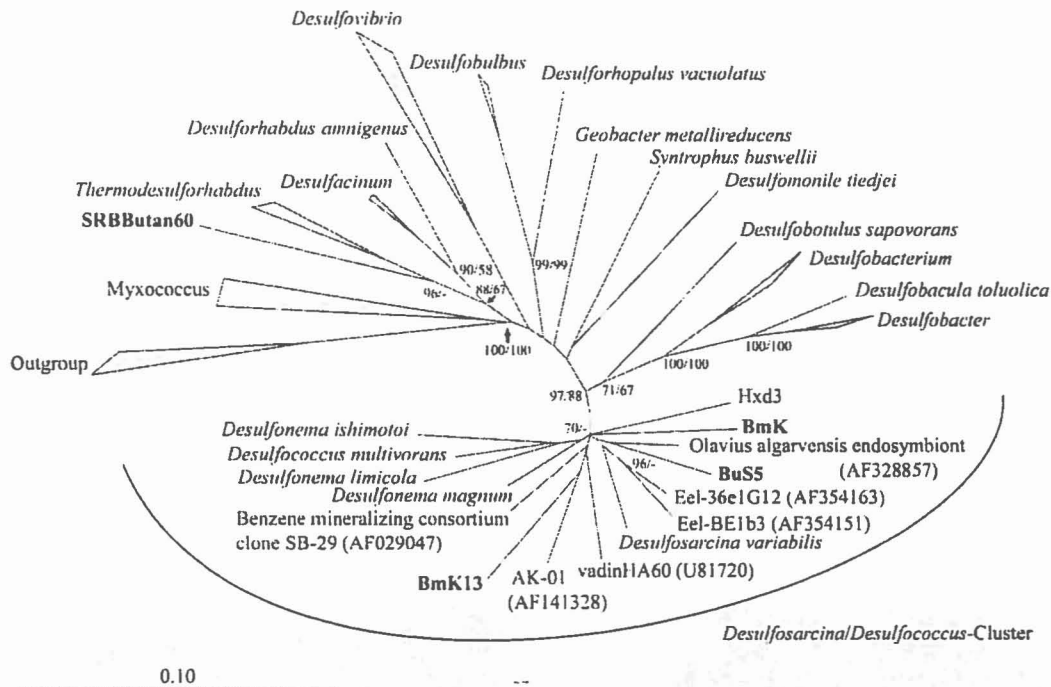


Abb. 7 Phylogenetische Verwandtschaft der aus der mesophilen bzw. thermophilen Anreicherung für Butan erhaltenen bakteriellen Klonsequenzen (Bmk und Bmk 13 bzw. SRBButan60) mit 16S RNA-Genen aus anderen δ -Proteobakterien basierend auf 1256 Positionen. Vertreter der γ -Proteobakterien fungierten als „Outgroup“. Der Stammbaum wurde mittels Distanzanalyse in ARB (Strunk et al. 2001) berechnet. Zur Bestimmung der Signifikanz der Abzweigungen wurden sowohl für die Distanzanalyse als auch für die Maximum-Parsimony-Analyse Bootstrap-Analysen mit jeweils 1000 Wiederholungen mit dem Softwarepaket PAUP* (Version 4.0b8) durchgeführt. Die Zahlen an den Abzweigungen stellen die Bootstrap-Werte ausgedrückt in Prozent der 1000 Wiederholungen dar. Sowohl die Bootstrap-Werte (>50%) der Distanzanalyse (erste Zahl) als auch der Maximum-Parsimony-Analyse (zweite Zahl) sind angegeben. Der Größenbalken entspricht 10% an geschätzten Sequenzunterschieden.

2.2.3 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Spezies-spezifischen Sonden

Um die Häufigkeit der *Desulfotomaculum*-Sequenz in der Anreicherungskultur mit Propan (60 °C) und der Sequenz des Isolates BuS5 in der Anreicherungskultur mit Butan (28 °C) zu überprüfen, wurden Spezies-spezifische Sonden konstruiert und diese in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt.

Häufigkeit der *Desulfotomaculum*-Klonsequenz in Zellen der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan

Zwei für die Sequenz des Klones K2.3 spezifische Sonden wurden in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung verwendet. Nur mit einer dieser Sonden wurden gute Hybridisierungs-Ergebnisse erzielt. Eine Quantifizierung mit der Sonde K2-3-190 ergab, daß die K2.3-Klonsequenz 92% aller Zellen in der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan repräsentiert (Abb. 8). Somit ist der *Desulfotomaculum*-Stamm vermutlich auch das Bakterium, welches Propan in der Anreicherungskultur anaerob oxidiert. Dies ist der erste eindeutige Hinweis darauf, daß auch Vertreter der Gattung *Desulfotomaculum* Kohlenwasserstoffe als Substrate nutzen können. Es wurden zwar einige thermophile *Desulfotomaculum*-Stämme aus Ölfeldern angereichert oder isoliert, jedoch wuchsen sie alle nicht mit Kohlenwasserstoffen (Rosnes et al. 1991; Nilsen et al. 1996; Leu et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein *Desulfotomaculum*-Stamm aus der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan in Reinkultur isoliert werden.

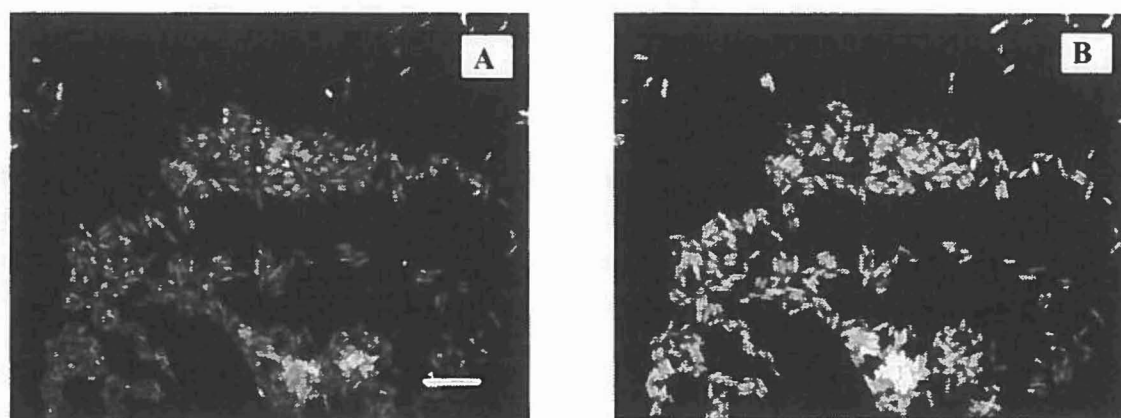


Abb. 8 Epifluoreszenzaufnahme der thermophilen Anreicherungskultur mit Propan aus dem Guaymas Becken. Die Bilder zeigen (A) mit DAPI gefärbte Zellen und (B) die mit der Sonde K2-3-190 (CCC TTT CCT CCC CTT CCC) hybridisierten Zellen. Die Fotos zeigen denselben Bildausschnitt. Größenbalken, 5 μm .

Häufigkeit des sulfatreduzierenden Stammes BuS5 in der mesophilen Anreicherungskultur mit Butan

Zwei für die 16S rRNA-Gensequenz des Stammes BuS5 spezifische Sonden wurden bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt (Sonden But5-620 und But5-476) und beide lieferten gute Hybridisierungs-Ergebnisse. Da jedoch die Zellen während des Wachstums Flocken

bildeten, war eine genaue Quantifizierung nicht möglich. Grob geschätzt ergaben 50% aller Zellen ein positives Signal (Abb. 9). Das Ergebnis zeigt, daß ein in der Anreicherungskultur dominierendes Bakterium isoliert wurde.

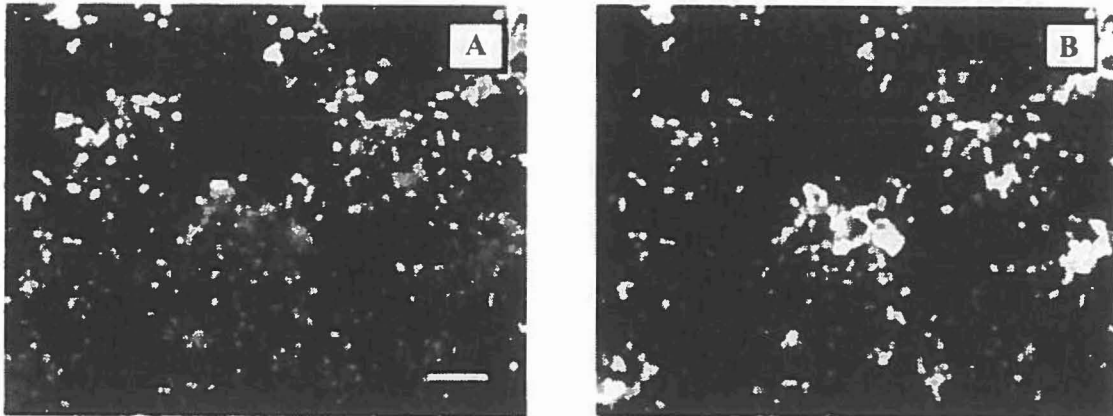


Abb. 9 Epifluoreszenzaufnahme der mesophilen Anreicherungskultur mit Butan aus dem Guaymas Becken. Die Bilder zeigen (A) mit DAPI gefärbte Zellen und (B) die mit der Sonde But5-620 (AAA CGC CCT TCC GGG GT) hybridisierten Zellen. Die Fotos zeigen denselben Bildausschnitt. Größenbalken, 5 μ m.

2.3 Bedeutung des anaeroben Propan- und Butanabbaus

Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, daß auch die unter Standardbedingungen gasförmigen Alkane Propan und Butan anaerob oxidiert werden können. Interessanterweise dominierten in den drei charakterisierten Anreicherungen mit gasförmigen Alkanen sulfatreduzierende Bakterien aus verschiedenen phylogenetischen Gruppen, und zwar Vertreter aus der Gruppe *Desulfosarcina/Desulfococcus* in der mesophilen Butananreicherung, *Desulfotomaculum* spp. in der thermophilen Propananreicherung und Vertreter aus der Gruppe *Thermodesulforhabdus/Desulfacinum* in der thermophilen Butananreicherung.

An Stellen im Meeresboden, an denen thermogen gebildetes Propan oder Butan austritt, könnte dieses in anoxischen Zonen von sulfatreduzierenden Bakterien des hier entdeckten Typs verwertet werden. Bei der phylogenetischen Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in Gashydraten aus dem Golf von Mexiko wurden durch 16S rDNA-Klonierung auch in dieser Untersuchung Klonsequenzen der *Desulfosarcina/Desulfococcus*-Gruppe gefunden (Lanoil et al. 2001). Diese Sequenzen zeigten die höchste Verwandtschaft zu dem Isolat BuS5 und zu den

Klonsequenzen Eel-36e1g12 und Eel-BE1b3 aus dem Eel River Basin (Orphan et al. 2001, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich deutete das Isotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$) von Propan in den Gashydraten aus diesem Gebiet auf einen Verbrauch durch Mikroorganismen hin (Lanoil et al. 2001). Der Prozeß der anaeroben Oxidation von Propan und Butan ist wahrscheinlich nicht nur auf das Guaymas Becken beschränkt, sondern könnte auch an anderen "Hydrocarbon Seeps" eine Rolle spielen (Anderson et al. 1983; Hornafius et al. 1999).

Propan und Butan könnten analog wie Hexan (Abb. 10) in denitrifizierenden und sulfatreduzierenden Bakterien durch Addition an Fumarat aktiviert werden (Kropp et al. 2000; Rabus et al. 2001). Im Gegensatz zu Propan und Butan wurde Ethan in Anreicherungskulturen unter den Bedingungen der Sulfatreduktion nicht verwertet. Vermutlich wäre eine Aktivierung dieses Substrates in einem analogen Mechanismus sehr schwierig, weil das Radikal an einem primären Kohlenstoffatom erzeugt werden müßte. Dies macht es wahrscheinlich, daß die Aktivierung von Ethan durch Addition an Fumarat nicht möglich ist.

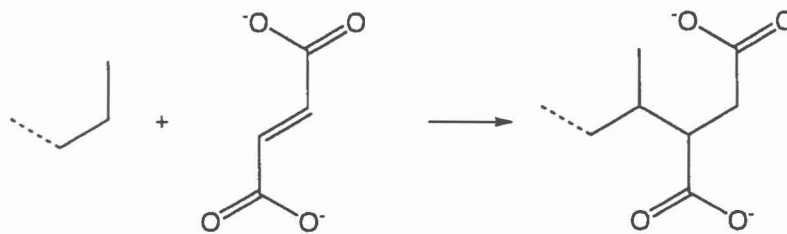


Abb. 10 Mögliche Aktivierung von Propan oder Butan mit Fumarat.

C Literaturverzeichnis

- Aeckersberg F, Bak F, Widdel F (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate reducing bacterium. Arch Microbiol 156:5-14
- Aeckersberg F (1994) Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation, Universität Bremen, Bremen
- Aeckersberg F, Rainey FA, Widdel F (1998) Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. Arch Microbiol 170:361-369
- Aharon P (1994) Geology and biology of modern and ancient submarine hydrocarbon seeps and vents – an introduction. Geo-Mar Lett 14:69-73
- Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego
- Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively members of the beta subclass of the Proteobacteria. Int J Syst Bacteriol 45:327-333
- Anderson RK, Scalan RS, Parker PL, Behrens EW (1983) Seep oil and gas of Mexico slope sediment. Science 222:619-621
- Anderson RT, Lovley DR (2000) Biogeochemistry – Hexadecane decay by methanogenesis. Nature 404:722-723
- Annweiler E, Materna A, Safinowski M, Kappler A, Richnow HH, Michaelis W, Meckenstock RU (2000) Anaerobic degradation of 2-methylnaphtalene by a sulfate-reducing enrichment culture. Appl Environ Microbiol 66:5329-5333
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Micr 50:1563-1589
- Arp DJ (1999) Butane metabolism by butane-grown *Pseudomonas butanovora*. Microbiology 145:1173-1180
- Ashraf W, Mihdhir A, Murrel JC (1994) Bacterial oxidation of propane. FEMS Microbiol Lett 122:1-6
- Bagaeva TV (1997) The ability of sulfate-reducing bacteria of various taxonomic groups to synthesize extracellular hydrocarbons. Microbiologiya (engl. Übers.) 66:666-668
- Bak F, Behrendt HG, Kleinitz W (1990) Bakterielle Korrosion einer Reinölleitung. Erdöl Erdgas Kohle 106:109-113
- Ball HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. J Bacteriol 178:5755-5761
- Bastin ES, Greer FE, Merritt CA, Moulton G (1926) The presence of sulphate-reducing bacteria in oil field waters. Science 63:21-24

- Behrends A (1999) Physiologie und substratspezifische Proteinbildung denitrifizierender Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation kurzkettiger Alkane. Dissertation, Universität Bremen, Bremen
- Beller HR, Spormann AM, Sharma PK, Cole JR, Reinhard M (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 62:1188-1196
- Beller HR, Spormann AM (1997a) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J Bacteriol* 179:670-676
- Beller HR, Spormann AM (1997b) Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl Environ Microbiol* 63:3729-3731
- Beller HR, Spormann AM (1998) Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *J Bacteriol* 180:5454-5457
- Beller HR, Edwards EA (2000) Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Appl Environ Microbiol* 66:5503-5505
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35:260-274
- Biegert T, Fuchs G (1995) Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch Microbiol* 163:407-417
- Biegert T, Fuchs G, Heider J (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* 238:661-668
- Birch LD, Bachofen R (1988) Microbial production of hydrocarbons. In: Rehm HJ (ed) *Biotechnology Vol 6b*. VCH, Weinheim, pp 71-99
- Birgersson B, Sterner O, Zimerson E (1988) *Chemie und Gesundheit: Eine verständliche Einführung in die Toxikologie*. VCH, Weinheim
- Blumer M, Guillard RL, Chase T (1971) Hydrocarbons of marine phytoplankton. *Mar Biol* 8:183-189
- Boetius A, Ravensschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407:623-626
- Boll M, Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism – ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234:921-933
- Bonsang B, Kanakidou M, Lambert G, Monfray P (1988) The marine source of C₂-C₆ aliphatic hydrocarbons. *J Atm Chem* 6:3-20
- Bosma G, Braster M, Strouthamer AH, van Verseveld HW (1987) Subfractionation and characterization of soluble *c*-type cytochromes from *Paracoccus denitrificans* cultured under various limiting conditions in the chemostat. *Eur J Biochem* 165:665-670

- Breese K, Boll M, Altmorbe J, Schagger H, Fuchs G (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. Eur J Biochem 256:148-154
- Breese K, Fuchs G (1998) 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Eur J Biochem 251:916-923
- Bregnard TPA, Häner A, Höhener P, Zeyer J (1997) Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. Appl Environ Microbiol 63:2077-2081
- Britton LN (1984) Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson DT (ed) Microbial degradation of organic compounds. Dekker, New York, pp 89-129
- Brown WV, Rose HA, Lacey MJ, Wright K (2000) The cuticular hydrocarbons of the giant soil-burrowing cockroach *Macropanesthia rhinoceros* Saussure (Blattodea: Blaberidae: Geoscaphenidae): respect to age, sex and location. Comp Biochem Physiol B 127:261-277
- Bühler M, Schindler J (1984) Aliphatic hydrocarbons. In: Kieslich K (ed) Biotransformations, Biotechnology Vol 6 A. VCH, Weinheim, pp 329-385
- Caldwell ME, Garrett RM, Prince RC, Suflita JM (1998) Anaerobic biodegradation of long chain *n*-alkanes under sulfate-reducing conditions. Environ Sci Technol 32:2191-2195
- Champion KM, Zengler K, Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate induced pathways. J Mol Microbiol Biotechnol 1:157-164
- Cheesbrough TM, Kolattukudy PE (1988) Microsomal preparation from an animal tissue catalyzes release of carbon monoxide from a fatty aldehyde to generate an alkane. J Biol Chem 263:2738-2743
- Chen CI, Taylor RT (1997) Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 48:121-128
- Chen J, Henderson G, Grimm CC, Lloyd SW, Laine RA (1998) Termites fumigate their nests with naphthalene. Nature 392:558-559
- Coates JD, Anderson RT, Lovley DR (1996) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. Appl Environ Microbiol 62:1099-1101
- Coates JD, Woodward J, Allen J, Philip P, Lovley DR (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbour sediments. Appl Environ Microbiol 63:3589-3593
- Coates JD, Anderson RT (2000) Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. Trends Biotechnol 18:408-412
- Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS, Achenbach LA (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. Nature 411:1039-1043
- Cord-Ruwisch R, Kleinitz W, Widdel F (1987) Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. J Petrol Technol, January 1987:97-106

- Corker J, Lefebvre F, Lécuyer C, Dufaud V, Quignard F, Choplin A, Evans J, Basset JM (1996) Catalytic cleavage of the C—H and C—C bonds of alkanes by surface organometallic chemistry: an EXAFS and IR characterization of a Zr-H catalyst. *Science* 271:966-969
- Corkery DM, O'Connor KE, Buckley CM, Dobson ADW (1994) Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. *FEMS Microbiol Lett* 124:23-27
- Coshigano PW, Wehrmann TS, Young LY (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl Environ Microbiol* 64:1650-1656
- Coshigano PW (2000) Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Appl Environ Microbiol* 66:1147-1151
- Cunningham JA, Hopkins GD, Lebron CA, Reinhardt M (2000) Enhanced anaerobic bioremediation of groundwater contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California. *Biodegradation* 11:159-170
- Davis JB, Squires RM (1954) Detection of microbially produced gaseous hydrocarbons other than methane. *Science* 119:381-382
- Davis JB, Yarbrough HF (1966) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Chem Geol* 1:137-144
- De Leeuw JW, Largeau C (1993) A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In: Engel MH, Macko SA (eds) *Organic geochemistry – principles and applications*. Plenum Press, New York, pp 23-72
- Dc Rosa S, Milonc A, Kujumgiev A, Stefanov K, Nechev I, Popov S (2000) Metabolites from a marine bacterium *Pseudomonas/Alteromonas*, associated with the sponge *Dysidea fragilis*. *Comp Biochem Physiol B* 126:391-396
- Dennis M, Kolattukudy PE (1992) A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5306-5310
- Didyk BM, Simoneit BRT (1989) Hydrothermal oil of Guaymas Basin and implications for petroleum formation mechanisms. *Nature* 342:65-69
- Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 64:3869-3877
- Dolfing J, Zeyer J, Binder Eicher P, Schwarzenbach RP (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch Microbiol* 154:336-341
- Dubilier N, Mülders C, Ferdelman T, de Beer D, Pernthaler A, Klein M, Wagner M, Erséus C, Thiermann F, Krieger J, Giere O, Amann R (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411:298-302
- Edwards EA, Wills LE, Reinhard M, Grbic-Galic D (1992) Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 58:794-800

- Edwards EA, Grbic-Galic D (1994) Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol* 60:313-322
- Ehrenreich P (1996) Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf *n*-Alkanen. Dissertation, Universität Bremen, Bremen
- Ehrenreich P, Behrends A, Harder J, Widdel F (2000) Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 173:58-64
- Elsahed MS, Gieg LM, McInerney MJ, Suflita JM (2001) Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environ Sci Technol* 35:682-689
- Evans PJ, Mang DT, Kim KS, Young LV (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl Environ Microbiol* 57:1139-1145
- Fetzner S (2000) Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: Molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. *Naturwissenschaften* 87:59-69
- Ficker M, Krastel K, Orlicky S, Edwards E (1999) Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol* 65:5576-5585
- Fischer-Romero C, Tindall BJ, Juettner F (1996) *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *Int J Syst Bacteriol* 46:183-188
- Fishbein L (1985) An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. IV. Ethylbenzene. *Sci Total Environ* 44:269-287
- Fox MA, Whitesell JK (1995) *Organische Chemie: Grundlagen, Mechanismen, bioorganische Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Fries M, Zhou J, Chee-Sanford J, Tiedje JM (1994) Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* 60:2802-2810
- Galushko A, Minz D, Schink B, Widdel F (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ Microbiol* 1:415-420
- Gang ZV, Jiang CH (1985) Concepts on the generation and accumulation of biogenic gas. *J Pet Geol* 8:405-422
- Gibson DT, Gschwendt B, Yeh WK, Kopal VM (1973) Initial reactions in the oxidation of ethylbenzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 12:1520-1528
- Giger W, Schaffner C, Wakeham SG (1980) Aliphatic and olefinic hydrocarbons in recent sediments of Greifensee, Switzerland. *Geochim Cosmochim Acta* 44:119-129
- Gilmour R, Goodhew CF, Pettigrew GW (1991) Cytochrome *c* of *Paracoccus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta* 1059:233-238
- Graedel TE, Crutzen PJ (1994) *Chemie der Atmosphäre: Bedeutung für Klima und Umwelt*. Springer, Heidelberg

- Grbic-Galic D, Vogel TM (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl Environ Microbiol* 53:254-260
- Greim H, Deml E (1996) *Toxikologie – Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*. VCH, Weinheim
- Groh S, Nelson M (1990) Mechanisms of activation of carbon-hydrogen bonds by metalloenzymes. In: Davies JA, Watson PL, Liebmann JF, Greenberg JA (eds) *Selective hydrocarbon activation*. VCH, Weinheim, pp 305-378
- Grossi V, Raphel D, Hirschler-Rea A, Gilewicz A, Mouzdahir A, Bertrand JC, Rontani JF (2000) Anaerobic biodegradation of pristane by a marine sedimentary bacterial and/or archaeal community. *Org Geochem* 31:7-8
- Hamamura N, Sorfa RT, Semprini L, Arp DJ (1999) Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:4586-4593
- Hamamura N, Arp DJ (2000) Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8. *FEMS Microbiol Lett* 186:21-26
- Häner A, Höhener P, Zeyer J (1995) Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 61:3185-3188
- Hanlon SP, Toh TH, Solomon PS, Holt RA, McEwan AG (1996) Dimethylsulfide:acceptor oxidoreductase from *Rhodobacter sulfidophilus*. The purified enzyme contains *b*-type haem and a pterin molybdenum cofactor. *Eur J Biochem* 239:391-396
- Harayama S, Timmis KN (1992) Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons. In: Sigel H, Sigel A (eds) *Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes*, Vol. 28. Dekker, New York, pp 99-156
- Harder J, Foss S (1999) Anaerobic formation of the aromatic hydrocarbon *p*-cymene from monoterpenes by methanogenic enrichment cultures. *Geomicrobiol J* 16:295-305
- Harms G, Rabus R, Widdel F (1999a) Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon *p*-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 172:303-312
- Harms G, Zengler K, Rabus R, Aeckersberg F, Minz D, Rossello-Mora R, Widdel F (1999b) Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:999-1004
- Harwood CS, Parales RE (1996) The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 50:553-590
- Harwood CS, Burchardt G, Herrmann H, Fuchs G (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22:439-458
- Hegnauer R (1966) *Chemotaxonomie der Pflanzen – Dicotylodoneae: Daphniphyllaceae – Lythraceae*, Vol. 4. Birkhäuser, Basel
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 22:459-473

- Hess A, Zarda B, Hahn D, Haner A, Stax D, Hohener P, Zeyer J (1997) In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl Environ Microbiol* 63:2136-2141
- Hinrichs KU, Hayes JM, Sylva SP, Brewer PG, DeLong EF (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* 398:802-805
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180:366-376
- Hummel W (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58:145-184
- Hylemon PB, Harder J (1999) Biotransformation of monoterpenes, bile acids and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 22:475-488
- Jackson LL, Blomquist GJ (1976) Insect waxes. In: Kolattukudy PE (ed) *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam, pp 201-233
- Johnson HA, Spormann AM (1999) In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *J Bacteriol* 181:5662-5668
- Johnson HA, Pelletier DA, Spormann AM (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol* 183:4536-4542
- Jörnwall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalezduarte R, Jeffery J, Ghosh D (1995) Short-chain dehydrogenases reductases (SDR). *Biochemistry* 34:6003-6013
- Jüttner F, Henatsch JJ (1986) Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature* 323:797-798
- Kennicutt MC, Brooks JM, Cox HB (1993) The origin and distribution of gas hydrates in marine sediments. In: Engel MH, Macko SA (eds) *Organic geochemistry – principles and applications*. Plenum Press, New York, pp 535-549
- Kennish MJ, Lutz RA, Simoneit BRT (1992) Hydrothermal activity and petroleum formation in the Guaymas Basin. *Rev Aquat Sci* 6:467-477
- Kisker C, Schindelin H, Rees DC (1997) Molybdenum-cofactor-containing enzymes – structure and mechanism. *Ann Rev Biochem* 66:233-267
- Krafft T, Bowen A, Theis F, Macy JM (2000) Cloning and sequencing of the genes encoding the periplasmatic-cytochrome *b*-containing selenate reductase of *Thauera selenatis*. *DNA Seq* 10:365-377
- Krieger CJ, Beller HR, Reinhard M, Spormann AM (1999) Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *J Bacteriol* 181:6403-6410
- Krieger CJ, Roseboom W, Albracht SPJ, Spormann AM (2001) A stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* strain T. *J Biol Chem* 276 12924-12927
- Kropp KG, Davidova IA, Suflita JM (2000) Anaerobic oxidation of *n*-dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* 66:5393-5398

- Kvenvolden KA (1999) Potential effects of gas hydrate on human welfare. Proc Natl Acad Sci USA 96:3420-3426
- L'Haridon S, Reysenbach AL, Glenat P, Prieur D, Jeanthon C (1995) Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. Nature 377:223-224
- Laempe D, Jahn M, 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
- Langenhoff AAM, Nijenhuis I, Tan NCG, Briglia M, Zehder AJB, Schraa G (1997) Characterization of a manganese-reducing, toluene-degrading enrichment culture. FEMS Microbiol Ecol 24:113-125
- Lanoil BD, Sassen R, La Duc MT, Sweet ST, Nealson KH (2001) Bacteria and Archaea physically associated with Gulf of Mexico gas hydrates. Appl Environ Microbiol 67:5143-5153
- Lee K, Gibson DT (1996) Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* strain NCIB 9816-4. Appl Environ Microbiol 62:3101-3106
- Leu JY, McGovern-Traa CP, Porter AJR, Harris WJ, Hamilton WA (1998) Identification and phylogenetic analysis of thermophilic sulfate-reducing bacteria in oil field samples by 16S rDNA gene cloning and sequencing. Anaerobe 4:165-174
- Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W, Schiltz E, Schägger H, Heider J (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica* – a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. Mol Microbiol 28:615-628
- Leuthner B, Heider J (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. J Bacteriol 182:272-277
- Leutwein C, Heider J (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. Microbiology 145:3265-3271
- Leutwein C (2000) Biochemische Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel. Dissertation, Universität Freiburg, Freiburg
- Leutwein C, Heider J (2001) Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. J Bacteriol 183:4288-4295
- Lewandowski J, Leitschuh S, Koss V (1997) Schadstoffe im Boden: Eine Einführung in Analytik und Bewertung. Springer, Berlin
- Love CA, Patel BKC, Nichols PD, Stackebrandt E (1993) *Desulfotomaculum australicum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from the Great Artesian Basin of Australia. Syst Appl Microbiol 16:244-251

- Lovley DR, Baedeker MJ, Lonergan DJ, Cozzarelli IM, Phillips EJP, Siegel OI (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* 339:297-300
- Lovley DR, Lonergan DJ (1990) Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl Environ Microbiol* 56:1858-1864
- Lovley DR (1997) Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J Ind Microbiol Biot* 18:75-81
- Lovley DR (2000) Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation* 11:107-116
- Lundberg P, Crookes MJ, Dobson S, Howe PD (1996) Ethylbenzene, Environmental Health Criteria, Vol. 186. World Health Organisation, Geneva
- Lundberg P, Crookes MJ, Dobson S, Howe PD (1997). Xylenes, Environmental Health Criteria, Vol. 190. World Health Organisation, Geneva
- Macy JM, Rech S, Auling G, Dorsch M, Stackebrandt E, Sly LI (1993) *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *Int J Syst Bacteriol* 43:135-142
- Magot M, Ollivier B, Patel BKC (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* 77:103-116
- March J (1992) Advanced organic chemistry. Wiley & Sons, New York
- McKay WA, Turner MF, Jones BMR, Halliwell CM (1996) Emissions of hydrocarbons from marine phytoplankton: Some results from controlled laboratory experiments. *Atmosph Environ* 30:2583-2593
- McMillen DF, Golden DM (1982) Hydrocarbon bond dissociation energies. *Ann Rev Phys Chem* 33:493-532
- Meckenstock RU (1999) Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol Lett* 177:67-73
- Merian E, Zander M (1982) Volatile aromatics. In: Hutzinger O (ed) *Anthropogenic compounds, The handbook of environmental chemistry Vol. 3*. Springer, Berlin, pp 117-161
- Michalski WP, Miller DJ, Nicholas DJD (1986) Changes in cytochrome composition of *Rhodopseudomonas sphaeroides* f. sp. *denitrificans* grown under denitrifying conditions. *Biochim Biophys Acta* 849:304-315
- Min H, Zinder SH (1990) Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* sp. nov. *Arch Microbiol* 153:399-404
- Morgan P, Watkinson RJ (1994) Biodegradation of components of petroleum. In: Ratledge C (ed) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 1-31
- Morrison SJ, Tornabene TG, Kloos WE (1971) Neutral lipids in the study of relationships of members of the family Micrococcaceae. *J Bacteriol* 108:353-358
- Müller JA, Galushko AS, Kappler A, Schink B (1999) Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Arch Microbiol* 172:287-294

- Müller JA, Galushko AS, Kappler A, Schink B (2001) Initiation of anaerobic degradation of *p*-cresol by formation of 4-hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. *J Bacteriol* 183:752-757
- Nakagawa T, Sato S, Yamamoto Y, Fukui M (2001) Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. Submitted to *Wat Res*
- Nazina TN, Rozanova EP, Kuznetsov SI (1985) Microbial oil transformation processes accompanied by methane and hydrogen-sulfide formation. *Geomicrobiol J* 4:103-130
- Nazina TN, Ivanova AE, Borzenkov IA, Belyaev SS, Ivanov MV (1995) Occurrence and geochemical activity of microorganisms in high-temperature, water-flooded oil fields of Kazakhstan and Western Siberia. *Geomicrobiol J* 13:181-192
- Nilsen RK, Beeder J, Thorstenson T, Torsvik T (1996a) Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 62:1793-1798
- Nilsen RK, Torsvik T, Lien T (1996b) *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir. *Int J Syst Bacteriol* 46:397-402
- Odom JM (1993) Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. In: Odom JM, Singleton R (eds) *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer, New York, pp 189-210
- Oremland RS, de Marais DJ (1983) Distribution, abundance and carbon isotopic composition of gaseous hydrocarbons in Big Soda Lake, Nevada: an alkaline, meromictic lake. *Geochim Cosmochim Acta* 47:2107-2114
- Oremland RS, Whiticar MJ, Strohmaier FE, Kiene RP (1988) Bacterial ethane formation from reduced, ethylated sulfur compounds in anoxic sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 52:1895-1904
- Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, DeLong EF (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66:700-711
- Orphan VJ, Hinrichs KU, Ussler W, Pauli CK, Taylor LT, Sylva SP, Hayes JM, DeLong EF (2001a) Comparative analysis of methane-oxidizing Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 67:1922-1934
- Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF (2001b) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293:484-487
- Ourisson G, Albrecht P, Rohmer M (1984) The microbial origin of fossil fuels. *Sci Am* 251:34-41
- Phelps CD, Young LY (2001) Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: A review. *Advan Agron* 70:329-357
- Phillips LE, Lappin-scott HM (1997) Enrichment and characterization of sulfate-reducing bacteria from sandstone rock cores from the UK continental shelf. *FEMS Microbiol Rev* 20:415-423

- Plass-Dülmer C, Khedim A, Koppmann R, Johnen FJ, Rudolph J, Kuosa H (1993) Emissions of light nonmethane hydrocarbons from the Atlantic into the atmosphere. *Global Biogeochem Cycles* 7:211-228
- Plass-Dülmer C, Koppmann R, Ratte M, Rudolph J (1995) Light nonmethane hydrocarbons in seawater. *Global Biogeochem Cycles* 9:79-100
- Poulose AJ, Croteau R (1978) Biosynthesis of aromatic hydrocarbons – conversion of γ -terpinen to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L.. *Arch Biochem Biophys* 187:307-314
- Press F (1995) *Allgemeine Geologie: Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59:1444-1451
- Rabus R, Widdel F (1995a) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163:96-103
- Rabus R, Widdel F (1995b) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Toll. *Arch Microbiol* 164:448-451
- Rabus R, Fukui M, Wilkes H, Widdel F (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62: 3605-3613
- Rabus R, Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 170: 377-384
- Rabus R, Wilkes H, Schramm A, Harms G, Behrends A, Amann R, Widdel F (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude-oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of Proteobacteria. *Environ Microbiol* 1:145-157
- Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, Widdel F (2001) Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)-succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J Bacteriol* 183:1707-1715
- Ratte M, Plass-Dülmer C, Koppmann R, Rudolph J (1995) Horizontal and vertical profiles of light hydrocarbons in sea water related to biological, chemical and physical parameters. *Tellus B* 47:607-623
- Reinhard M, Shang S, Kitanidis PK, Orwin E, Hopkins GD, Lebron CA (1997) In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environ Sci Technol* 31:28-36
- Rhee SK, Fuchs G (1999) Phenylacetyl-CoA:acceptor oxidoreductase, a membrane-bound molybdenum-iron-sulfur enzyme involved in anaerobic metabolism of phenylalanine in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 262:507-515

- Rockne KJ, Chee-Sanford JC, Sanford RA, Hedlund BP, Staley JT, Strand SE (2000) Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol* 66:1595-1601
- Rockne KJ, Strand SE (2001) Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Wat Res* 35:291-299
- Rosenfeld WD (1947) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J Bacteriol* 54:664-665
- Rosnes JT, Torsvik T, Lien T (1991) Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Appl Environ Microbiol* 57:2302-2307
- Rueter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey FA, Jannasch HW, Widdel F (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372:455-458
- Sacchettini JC, Poulter CD (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277:1788-1789
- Sawers G (1999) Biochemistry, physiology and molecular biology of glycyl radical enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 22:543-551
- Schocher RJ, Seyfried B, Vazquez F, Zeyer J (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 157:7-12
- Schröder I, Rech S, Krafft T, Macy JM (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J Biol Chem* 272:23765-23768
- Simoneit BRT, Lonsdale PF (1982) Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295:198-202
- Simoneit BRT (1985) Hydrothermal petroleum composition and utility as a biogenic carbon source. *Biol Soc Wash Bull* 6:49-56
- Simoneit BRT, Kawka OE, Brault M (1988) Origin of gases and condensates in the Guaymas Basin hydrothermal system (Gulf of California). *Chem Geol* 71:169-182
- Simoneit BRT, Leif RN, Sturz AA, Sturdivant AE, Gieskes JM (1992) Geochemistry of shallow sediments in Guaymas Basin, Gulf of California – hydrothermal gas and oil migration and effects of mineralogy. *Org Geochem* 18:765-784
- Simoneit BRT (1993) Hydrothermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems. In: Engel MH, Macko SA (eds) *Organic geochemistry – principles and applications*. Plenum Press, New York, pp 397-418
- Singer TL (1998) Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Amer Zool* 38:394-405
- Smith MR, Ratledge C (1989) Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:68-75
- Smith MR (1994) The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In: Ratledge C (ed) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 347-378
- Smith PF (1988) Archaeobacteria and other specialized bacteria. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) *Microbial lipids, Vol. 1*. Academic Press, London, pp 489-553

- So CM, Young LY (1999a) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl Environ Microbiol* 65:2969-2976
- So CM, Young LY (1999b) Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Appl Environ Microbiol* 65:5532-5540
- So CM, Young LY (2001) Anaerobic biodegradation of alkanes by enriched consortia under four different reducing conditions. *Environ Toxicol Chem* 20:473-478
- Song B, Young LY, Palleroni NJ (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *Int J Syst Bacteriol* 48:889-894
- Song B, Häggblom MM, Zhou J, Tiedje JM, Palleroni NJ (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:1129-1140
- Sorkhoh N, Al-Hasan R, Radwan S (1992) Self-cleaning of the Gulf. *Nature* 359:109
- Spormann AM, Widdel F (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11:85-105
- Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Pauker O, Hippe H (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:1134-1139
- Stetter KO, Huber R, Bloechl E, Kurr M, Eden RD, Fiedler M, Cash H, Vance I (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature* 365:743-745
- Stubbe J, van der Donk WA (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem Rev* 98:705-762
- Swannell RPJ, Lee K, McDonagh M (1996) Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev* 60:342-365
- Takai K, Horikoshi K (1999) Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* 152:1285-1297
- Tanimoto Y, Bak F (1994) Anaerobic degradation of methylmercaptan and dimethyl sulfide by newly isolated thermophilic sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60:2450-2455
- Tasaki M, Kamagata Y, Nakamura K, Mikami E (1991) Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov. *Arch Microbiol* 155:348-352
- Tissot BP, Welte DH (1984) Petroleum formation and occurrence. Springer, Berlin
- U.S. Environmental Protection Agency (1990) Underground motor fuel storage tanks: a national survey. Publication NTIS PB 8-216512, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Utkin IB, Yakimov MM, Matveeva LN, Kozlyak EI, Rogozhin IS, Solomon ZG, Bezborodov AM (1991) Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species V2. *FEMS Microbiol Lett* 77:237-242

- Valentine DL, Reeburgh WS (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environ Microbiol* 2:477-484
- Van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5:161-174
- Van Ginkel CG, Welten HGJ, De Bont JAM (1987) Oxidation of gaseous and volatile hydrocarbons by selected alkene-utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 12:2903-2907
- Vangnai AS, Arp DJ (2001) An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by *Pseudomonas butanovora*. *Microbiology* 147:745-756
- Volkman JK, Barrett SM, Blackburn SI, Mansour MP, Sikes EL, Gelin F (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. *Org Geochem* 29:1163-1179
- Vollhardt KPC, Schore NE (2000) *Organische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim
- Wackett LP (2000) The metabolic pathways of biodegradation. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes – an evolving electronic resource for the microbiological community* (www.prokaryotes.com). Springer, New York, pp 1-17
- Wakeham SG, Schaffner C, Giger W (1980) Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments – II. Compounds having derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochim Cosmochim Acta* 44:415-429
- Wakeham SG (1990) Algal and bacterial hydrocarbons in particulate matter and interfacial sediment of the Cariaco Trench, Caribbean Sea. *Geochim Cosmochim Acta* 54:1325-1336
- Wakeham SG (1995) Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns. *Deep-Sea Res* 42:1749-1771
- Wakeham SG (1996) Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Black Sea sediments. *Mar Chem* 53:187-205
- Weber A, Jørgensen BB (2001) Bacterial sulfate reduction in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin of California, Mexico. Submitted to *Deep-Sea Research I*
- Wellsbury P, Goodman K, Barth T, Cragg BA, Barnes SP, Parkes RJ (1997) Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* 388:573-576
- Widdel F (1992) The genus *Desulfotomaculum*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer Verlag, Berlin, pp 1792-1799
- Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer Verlag, Berlin, pp 3352-3378
- Widdel F, Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12:259-276
- Wilkes H, Boreham C, Harms G, Zengler K, Rabus R (2000) Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. *Org Geochem* 31:101-115

- Wilkes H, Rabus R, Fischer T, Armstroff A, Behrens A, Widdel F (2001) Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium: further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. Arch Microbiol in press
- Wirth W, Gloxhuber G (1994) Toxikologie. Thieme, Stuttgart
- Zengler K (1996) Anaerobe Oxidation von Xylolen, anderen Alkylbenzolen und Erdöl. Diplomarbeit, Georg August Universität zu Göttingen, Göttingen
- Zengler K (1999) Mikrobielle Diversität und neuartige Fähigkeiten beim anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen. Dissertation, Universität Bremen, Bremen
- Zengler K, Heider J, Rossello-Mora R, Widdel F (1999 a) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. Arch Microbiol 172:204-212
- Zengler K, Richnow HH, Rossello-Mora R, Michaelis W, Widdel F (1999 b) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. Nature 401:266-269
- Zeyer J, Kuhn EP, Schwarzenbach RP (1986) Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. Appl Environ Microbiol 52:944-947
- Zhang XM, Young LY (1997) Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. Appl Environ Microbiol 63:4759-4764
- Zhou J, Fries MR, Chee-Sanford J, Tiedje JM (1995) Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 45:500-506
- Zitko V (2000) Marine pollution. In: Wangersky PJ (ed) Marine chemistry, The handbook of environmental chemistry Vol. 5 D. Springer, Berlin, pp 75-109
- ZoBell CE (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol Rev 10:1-49

Teil II: Publikationen

A Publikationsliste mit Erläuterungen

Die Dissertation beruht zum großen Teil auf den folgenden drei Publikationen. Die angefügten Erläuterungen sollen meinen Beitrag an der jeweiligen Arbeit aufzeigen.

1. **Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme**

Olaf Kniemeyer, Johann Heider

Gemeinsame Entwicklung des Konzeptes mit J. Heider. Durchführung der biochemischen Versuche und Erstellung des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit J. Heider.

2. **(S)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism**

Olaf Kniemeyer, Johann Heider

Gemeinsame Entwicklung des Konzeptes mit J. Heider. Durchführung aller biochemischen Versuche. Erstellung des Manuskriptes mit J. Heider.

3. **Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium**

Olaf Kniemeyer, Frank Oliver Glöckner, Thomas Fischer, Heinz Wilkes, Friedrich Widdel

Entwicklung des Konzeptes. Durchführung aller mikrobiologischen Versuche. Erstellung des Manuskriptes unter redaktioneller Mitwirkung von F. Widdel

B Publikationen

**Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing
molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme**

Olaf Kniemeyer¹ and Johann Heider^{2*}

Journal of Biological Chemistry (2001) 276:21381-21386

¹ Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany

² Mikrobiologie, Institut für Biologie II, Universität Freiburg Schänzlestr. 1, 79104 Freiburg, Germany

*Corresponding author

Abstract

The initial enzyme of ethylbenzene metabolism in denitrifying *Azoarcus* strain EbN1, ethylbenzene dehydrogenase, was purified and characterized. The soluble periplasmic enzyme is the first known enzyme oxidizing a non-activated hydrocarbon without molecular oxygen as cosubstrate. It is a novel molybdenum/iron-sulfur/heme protein of 155 kDa, that consists of three subunits (96, 43 and 23 kDa) in an $\alpha\beta\gamma$ structure. The N-terminal amino acid sequence of the α -subunit is similar to that of other molybdenum proteins such as selenate reductase from the related species *Thauera selenatis*. Ethylbenzene dehydrogenase is unique in that it oxidizes the hydrocarbon ethylbenzene, a compound without functional groups, to (*S*)-1-phenylethanol. Formation of the product was evident by coupling to an enantiomer-specific (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase from the same organism. The apparent K_m of the enzyme for ethylbenzene is very low at $< 2 \mu\text{M}$. Oxygen does not affect ethylbenzene dehydrogenase activity in extracts, but inactivates the purified enzyme, if the heme b cofactor is in the reduced state. A variant of ethylbenzene dehydrogenase exhibiting significant activity also with the homologue *n*-propylbenzene was detected in a related *Azoarcus* strain (PbN1).

Introduction

Three bacterial species capable of anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon ethylbenzene are known to date. All of these are denitrifying bacteria that belong to the genus *Azoarcus* of the β -proteobacteria. For one of these strains, *Azoarcus* sp. EB-1, ethylbenzene is the only known hydrocarbon utilized as growth substrate (Ball et al. 1996). The other two strains utilize either ethylbenzene or an alternative hydrocarbon compound, namely toluene (strain EbN1) or *n*-propylbenzene (strain PbN1) (Rabus and Widdel 1995). The proposed pathway of anaerobic degradation of ethylbenzene by these bacteria is shown in Fig. 1. It is initiated by a novel biochemical reaction, namely an oxygen-independent oxidation of ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol. This intermediate is then further oxidized to acetophenone by an alcohol dehydrogenase (Rabus and Widdel 1995; Ball et al. 1996; Rabus and Heider 1998; Johnson and Spormann 1999). Activities of an ethylbenzene-oxidizing enzyme and an enantio-specific (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase have been reported in cell extracts of strain EB-1 (Johnson and Spormann 1999), and a substrate-specific (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase has been purified and characterized from strain EbN1¹. The intermediate acetophenone is apparently further degraded via carboxylation to benzoylacetate to eventually yield benzoyl-CoA and acetyl-CoA (Fig. 1; reviewed in Heider et al. 1999). The catabolic pathway of *n*-propylbenzene in strain PbN1 is supposed to be analogous to that of ethylbenzene, yielding benzoyl-CoA and propionyl-CoA as intermediates (Rabus and Widdel 1995). Toluene degradation in strain EbN1 proceeds via a completely different pathway and involves the formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate as initial reaction (Biegert et al. 1996; Beller and Spormann 1997; Rabus and Heider 1998)

In this report, we analyze the biochemical properties of the first enzyme of anaerobic ethylbenzene metabolism, ethylbenzene dehydrogenase. The enzyme was purified and shown to be a new periplasmic molybdenum/iron-sulfur/heme protein, which oxidizes ethylbenzene stereospecifically to (*S*)-1-phenylethanol. We also provide evidence that the same enzyme catalyses anaerobic oxidation of ethylbenzene and *n*-propylbenzene.

¹ Kniemeyer and Heider (2001) Arch Microbiol 176:129-135

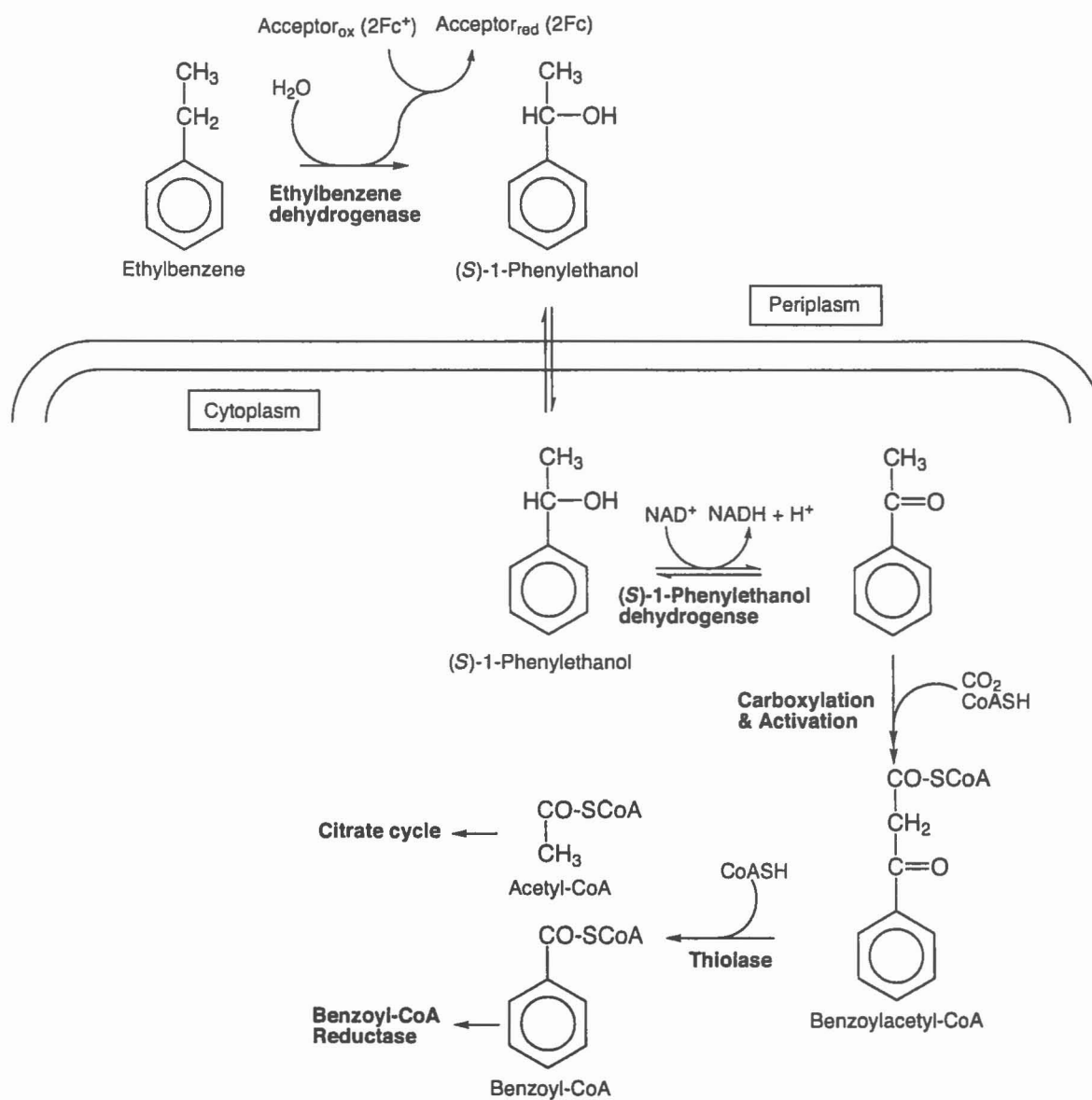


Fig. 1 Proposed anaerobic degradation pathway of ethylbenzene in strain EbN1. Fc⁺, ferricenium; Fc, ferrocene.

Material and methods

Growth of bacteria and preparation of cell extracts

Strain EbN1 was previously isolated from an enrichment culture on ethylbenzene by Rabus and Widdel (Rabus and Widdel 1995). Growth of the bacteria in 1 to 2 liter scale cultures was performed as described previously (Rabus and Widdel 1995; Rabus and Heider 1998). Cells were grown by subsequent transfer for at least 30 generations on the same substrate prior to harvesting for the described experiments. Harvesting was performed anoxically while the cultures were in the exponential growth phase. Fermenter cultures (200 liter) were set up as described previously (Rabus and Heider 1998) and run in fed-batch mode with a growth limiting and exponentially increasing feeding rate of nitrate and discontinuous supply of ethylbenzene. Growth rates of 0.015 to 0.025 h⁻¹ and cell yields of 200 to 300 g (wet mass) per fermenter were usually obtained. Extract preparation was usually performed aerobically. Cells (10 g, wet mass) were suspended in 10 ml of water and passed through a French pressure cell at 137 MPa. Cell debris and membranes were removed by ultracentrifugation (1 h at 100,000 × g). Washed membrane fractions were prepared from the supernatant of a 20,000 × g centrifugation step, which was centrifuged at 100,000 × g for 1 h. The pellet was washed and resuspended in the same volume of basal buffer [10 mM Tris-Cl; 1 mM MgCl₂; 10 % glycerol; pH 7.5]. For anaerobic extract preparation, all solutions were degassed and stored under nitrogen, and all handling steps were performed in an anaerobic glove box as described earlier (Rabus and Heider 1998). Strain PbN1 (Rabus and Widdel 1995) was grown in 2-l bottles under the same conditions as described for strain EbN1. The hydrocarbon substrates were added to the cultures in an inert carrier phase (2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane) containing 2% (v/v) ethylbenzene or 4 % (v/v) *n*-propylbenzene. Shortest doubling times of 10.5 h on ethylbenzene and 12 h on *n*-propylbenzene were recorded.

Enzyme assays

Ethylbenzene dehydrogenase was routinely assayed in 100 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5), containing 0.2 mM ferricenium hexafluorophosphate as electron acceptor. Enzyme solution was added and the reactions were started by adding ethylbenzene or *n*-propylbenzene (final concentration, 100 μM) from saturated aqueous solutions, which contain 2 mM ethylbenzene

(Dean 1992) or 1 mM *n*-propylbenzene (Mackay 1981). Decrease of absorption of the ferricenium ion was followed at 290 nm ($\Delta\epsilon = 9,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The tests were routinely performed under aerobic conditions, since identical activities were observed in control tests under anaerobic conditions. To assess the pH-optimum of ethylbenzene dehydrogenase, the enzyme assay was also performed in sodium phosphate buffers within a pH range of 6.0-8.0. Alternative assays for ethylbenzene oxidation were set up with dichlorophenol indophenol (0.1 mM) as electron acceptor in the presence and absence of the redox mediator phenazine methosulfate (0.05 mM). These tests were performed under anaerobic conditions as described above, and were monitored for dichlorophenol indophenol reduction at 546 nm. Reversibility of the ethylbenzene dehydrogenase reaction was tested under strictly anaerobic conditions in 100 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5), containing 1 mM methyl viologen and 0.5 mM dithionite. Oxidation of reduced methyl viologen was followed at 710 nm ($\epsilon = 2,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). After adding the enzyme, the reaction was started by adding 1 mM (*S*)-1-phenylethanol. The same buffer was also used to assess the purified enzyme for possible selenate reductase or nitrate reductase activities. In these cases, the reaction was started by addition of 1 mM of the respective electron acceptor. (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase activity was assayed in 100 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5), containing 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM NAD, 1 mM (*S*)-1-phenylethanol and enzyme. Malate dehydrogenase activity was measured in 100 mM potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7) containing 0.25 mM NADH, 0.2 mM oxaloacetate and cell extract. Reduction of NAD^+ or oxidation of NADH was followed photometrically at 365 nm ($\epsilon = 3.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Enzyme purification

All column chromatography steps were performed in an anaerobic glove box with an FPLC System (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Extract of ethylbenzene-grown cells of strain EbN1 (20 ml of a 100,000 g supernatant) was applied to a DEAE-Sepharose column (Pharmacia; diameter, 2.2 cm; volume, 50 ml), which had been equilibrated with basal buffer (2 mM Tris-acetate buffer, pH 8.0 and 10 % (w/v) glycerol). The column was washed at a flow rate of 5 ml min^{-1} for 2 column volumes and eluted with a gradient from 0 to 50 mM KCl in basal buffer over 500 ml. Fractions of 7 ml were collected. Ethylbenzene dehydrogenase activity eluted in a volume of 80 ml between 40 and 50 mM KCl. A yield of 77 % and an enrichment factor of 20

were obtained after this step (Table 3). The active fractions were applied on a ceramic hydroxyapatite column (10 ml; Bio-Rad, Hercules, CA), which had been equilibrated with basal buffer. The column was washed with two volumes of basal buffer. A gradient over 100 ml was then applied from 0 mM to 300 mM K-phosphate, and fractions of 5 ml were collected. Enzyme activity eluted in a volume of 40 ml when 160 to 250 mM K-phosphate was applied. Active fractions were pooled, and ethylbenzene dehydrogenase was concentrated by ammonium sulfate precipitation under anaerobic conditions (60 % saturation of ammonium sulfate).

Separation of subcellular compartments

Cells of strain EbN1 were grown and harvested as described above. Spheroplasts were formed by using a modification of previous procedures (Michel and Macy 1990; Rech and Macy 1992). Freshly harvested cells (0.8 g wet mass) were resuspended in 64 ml TS-buffer (30 mM Tris-Cl; 30% sucrose, pH 8). EDTA (9 mM final concentration) and lysozyme (2.6×10^6 U) were added, and the suspension was incubated on ice for 120 min to produce spheroplasts. Periplasmic proteins were prepared by centrifugation of the spheroplast suspension for 30 min at $16,000 \times g$. Most of the periplasmic proteins were recovered in the supernatant, whereas the pellet contained the intact spheroplasts. These were washed in TS-buffer, suspended in 25 ml buffer (20 mM Tris-Cl; 10 mM $MgCl_2$; 10 % glycerol, pH 8) containing 10 mg DNase I and lysed by one passage through a French Press cell. The membrane and soluble cytoplasmic fractions of the cell lysate were separated by centrifugation at $100,000 \times g$.

Other methods

Protein concentrations were determined according to Lowry (Coligan et al. 1999) or by the Coomassie dye binding test (Coligan et al. 1999) with bovine serum albumin as standard, and discontinuous SDS-PAGE was performed in 15 % (w/v) polyacrylamide gels according to standard procedures (Coligan et al. 1999). Molecular mass standards were phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, lactate dehydrogenase, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor and lysozyme. Gels were analyzed by the ImageMaster[®] 1D Software (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). UV-Visible spectra were recorded with a Lambda-2 photometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Cytochrome *c* content in subcellular fractions was

analyzed and calculated as described (Smith 1978). The native molecular mass of ethylbenzene dehydrogenase was determined by gel filtration on a calibrated Superdex 200 column (Amersham-Pharmacia), and by analysis of purified enzyme on native polyacrylamide gels. Gels containing five different polyacrylamide concentrations between 6 % and 8 % (w/v) were used, and ovalbumin and the monomer, dimer, trimer, and tetramer bands of bovine serum albumin were used as standards for a Ferguson plot (Coligan et al. 1999). Photometric quantitation of molybdenum, tungsten (Clark and Axley 1955), iron (Lovenberg et al. 1963) and inorganic sulfide (Beinert 1983) was performed by standard chemical techniques. Additionally, a simultaneous determination of 32 elements in purified enzyme was performed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), using a Jarrel Ash Plasma Comp 750 instrument at the center of Complex Carbohydrate Research, University of Georgia. For protein microsequencing cell extract or purified enzyme was separated by SDS-PAGE and blotted on a PVDF membrane (Pro Blott, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) using a Semi-Phor (Model TE77) semi-dry blotting device as described in Matsudeira (1987). Proteins on PVDF-membrane were stained by Coomassie Blue R 250. The proteins were subjected to Edman degradation microsequencing (Procise 492 Sequencer, Applied Biosystems) with repetitive yields of > 96 %. Ferricinium hexafluorophosphate was synthesised following a published procedure (Lehman et al. 1990); all other chemicals were from Fluka, Sigma (Deisenhofen, Germany) or Merck (Darmstadt, Germany) and were of the highest available purity.

Results

Ethylbenzene and *n*-propylbenzene dehydrogenase activities in strain EbN1

A photometric enzyme assay was developed for the first enzyme of anaerobic ethylbenzene degradation of strain EbN1, ethylbenzene dehydrogenase. The artificial electron acceptors dichlorophenol indophenol or phenazine methosulfate were tested without success for coupling to ethylbenzene oxidation. However, significant activity of an ethylbenzene dehydrogenase was detected in extracts of ethylbenzene-grown cells with the ferricenium cation as electron acceptor. The assay was dependent on the amount of protein, and a pH optimum of 7.0 was determined. Identical activities were obtained under oxic and strictly anoxic conditions, indicating that molecular oxygen is not required for ethylbenzene oxidation. No decrease in activity was recorded when extracts were adjusted to pH 5.5 or to pH 9.0 prior to starting the enzyme assay. Ethylbenzene dehydrogenase activity was exclusively detected in the soluble fraction after 100,000 × *g* centrifugation; no activity was found in washed membrane fractions. With untreated cell extracts, an ethylbenzene : ferricenium stoichiometry (ethylbenzene: electron ratio) of 1 : 3.9 was determined, indicating that ethylbenzene is oxidized to acetophenone in these assays. Assuming a stoichiometry of 1 : 4, the specific ethylbenzene oxidation rate in 100,000 × *g* supernatants was $22 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$. This value is close to a calculated minimum substrate degradation rate of $28 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$ required in growing cells at the time of harvesting (doubling time 11 h). Very low ethylbenzene dehydrogenase activity was recorded in extracts of cells grown on (*S*)-, (*R*)-, or racemic 1-phenylethanol, or on acetophenone, and none in benzoate-grown cells (Table 1). Clear activity was also observed when ethylbenzene was replaced by *n*-propylbenzene in the assays with ethylbenzene-grown cells, albeit only at about 15 % of the activity measured with ethylbenzene (Table 1).

Table 1 Ethylbenzene dehydrogenase and *n*-propylbenzene dehydrogenase activities in 100,000 × *g* extracts of differently grown cells of *Azoarcus* sp. strains EbN1 and PbN1. No activity was measured in washed membrane fractions. The values are means of at least two measurements; standard deviations were < 11 %. n. d. = not determined.

Strain	Growth substrate	Specific activity [nmol min (mg protein) ⁻¹] with	
		Ethylbenzene	<i>n</i> -Propylbenzene
EbN1	Ethylbenzene	22.1	3.5
EbN1	(<i>S</i>)-1-Phenylethanol	1.5	n. d.
EbN1	(<i>R</i>)-1-Phenylethanol	1.1	n. d.
EbN1	(<i>R/S</i>)-1-Phenylethanol	3.0	n. d.
EbN1	Acetophenone	1.4	n. d.
EbN1	Benzoate	<0.1	n. d.
PbN1	<i>n</i> -Propylbenzene	45.5	30.0
PbN1	Ethylbenzene	52.5	32.5
PbN1	Benzoate	<0.1	<0.1

Ethylbenzene and *n*-propylbenzene dehydrogenase activities in strain PbN1

Cells of strain PbN1, which were grown in 2-l cultures on ethylbenzene or *n*-propylbenzene were also tested for dehydrogenase activities for ethylbenzene and *n*-propylbenzene. Ethylbenzene-grown cells of strain PbN1 contained two times higher specific activities of ethylbenzene dehydrogenase than observed in strain EbN1 (Table 1). In extracts of strain PbN1, *n*-propylbenzene was oxidized at a rate of 62-66% of that measured with ethylbenzene. If strain PbN1 was grown on *n*-propylbenzene, the specific activity of the enzyme was slightly lower, but the ratio of the rates with *n*-propylbenzene or ethylbenzene as substrates was nearly the same as with ethylbenzene-grown cells (Table 1). These findings suggest that ethylbenzene and *n*-propylbenzene are oxidized by a common enzyme. Specific activities for both substrates were sufficient to explain the observed growth rates of strain PbN1 on either hydrocarbon.

Protein patterns of cells of strain EbN1 and PbN1 grown on different substrates

Ethylbenzene grown cells of strain EbN1 contained large amounts of several substrate-induced polypeptides, which were lacking in cells grown on 1-phenylethanol, the next intermediate of the metabolic pathway. The most prominent ethylbenzene-induced polypeptides visible in cell extracts separated by SDS-PAGE are shown in Fig. 2. Several other substrate-induced

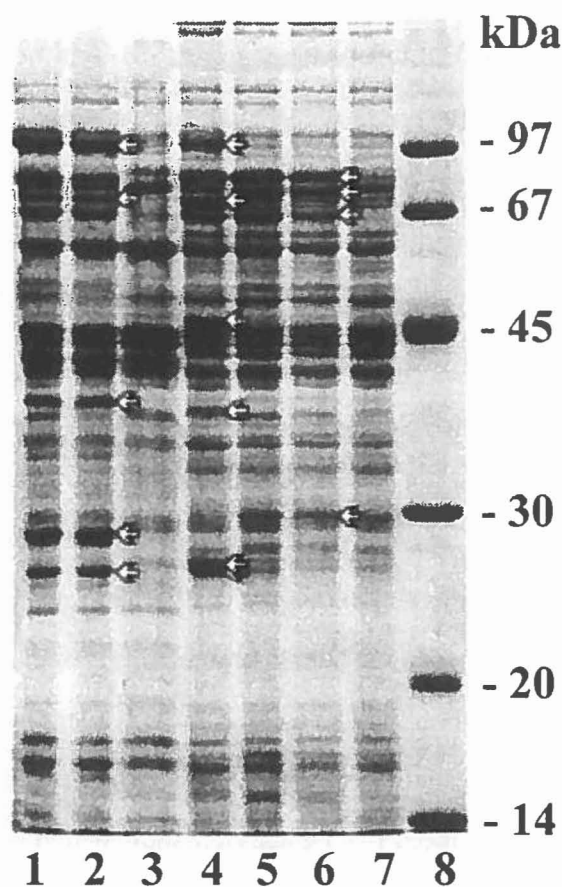


Fig. 2 Protein patterns of strains EbN1 and PbN1 cells grown on different substrates. Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide (12 % polyacrylamide; w/v) gel, in which cell extracts (40 μ g protein per lane) were separated. Substrate-induced polypeptides are indicated by arrows. Apparent masses of the alkylbenzene-induced polypeptides were 96, 71, 44, 33, 24 and 23 kDa in strain EbN1, and 96, 73, 34, 24 and 23 kDa in strain PbN1. Substrate-induced proteins in 1-phenylethanol- and acetophenone-grown cells of strain EbN1 had apparent masses of 81, 76, 66 and 29 kDa (see Champion et al. 1999). Lanes: (1 – 3) strain PbN1 grown on ethylbenzene (1), *n*-propylbenzene (2) and benzoate (3); (4 – 7) strain EbN1 grown on ethylbenzene (4), (*R,S*)-1-phenylethanol (5), acetophenone (6) and benzoate (7). Sizes of the marker proteins are in lane 8 indicated.

polypeptides were also observed in cells grown on 1-phenylethanol or acetophenone, when compared to benzoate-grown cells (Fig. 2), indicating sequential induction of the catabolic enzymes of anaerobic ethylbenzene metabolism. Extracts of ethylbenzene- or *n*-propylbenzene-

grown cells of strain PbN1 did not show any obvious difference in polypeptide patterns. Several prominent substrate-induced polypeptides of identical sizes were observed in cells grown on either hydrocarbon substrate, as compared to benzoate-grown cells (Fig. 2).

Stoichiometry and stereospecificity of ethylbenzene dehydrogenase

Proteins in extracts of ethylbenzene-grown cells of *Azoarcus* sp. strain EbN1 were initially separated by chromatography on DEAE-sepharose in 10 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5). Under these conditions, 100 % of ethylbenzene dehydrogenase activity was found in the flow-through fractions. (*R*)- and (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenases from the cell extract were retained on the column¹, thus allowing complete separation of the first two enzymes of ethylbenzene degradation. Using the separated enzymes, we determined whether the four-electron oxidation of ethylbenzene to acetophenone, as detected in cell extracts, is catalyzed by ethylbenzene dehydrogenase alone, or whether it depends on the subsequent (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase reaction. Enzyme assays with ethylbenzene dehydrogenase containing flow-through fractions, which are devoid of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase, showed an ethylbenzene : ferricenium stoichiometry of 1 : 2.3. The stoichiometry changed to 1 : 4.1 when the tests were supplied with NAD⁺ and purified (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase¹, and remained at 1 : 2.3 when the same experiment was performed in the absence of NAD⁺. Therefore, ethylbenzene dehydrogenase catalyses a two-electron oxidation of ethylbenzene and stereospecifically produces (*S*)-1-phenylethanol, which is subsequently oxidized to acetophenone by (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase in cell extract. The NADH generated by the alcohol dehydrogenase is apparently re-oxidized by an NADH: acceptor oxidoreductase with ferricenium as electron acceptor.

Subcellular localization of ethylbenzene dehydrogenase

After generating spheroplasts from freshly harvested cells of ethylbenzene-grown strain EbN1 by lysozyme/EDTA treatment in isotonic Tris-Cl/sucrose buffer, 94% of the ethylbenzene dehydrogenase was released into the medium (Table 2). The periplasmic marker protein cytochrome c was also largely released in these experiments, as determined from difference spectra (dithionite-reduced minus oxidized), whereas 93% of the cytoplasmic marker enzyme malate dehydrogenase was retained in the spheroplasts (Table 2). Determination of (*S*)-1-phenyl-

ethanol dehydrogenase activities in the subcellular fractions showed that 20 % of this enzyme were released and about 80 % were retained in the spheroplasts (Table 2). This indicated that ethylbenzene oxidation to (*S*)-1-phenylethanol occurs in the periplasm, whereas further oxidation of (*S*)-1-phenylethanol to acetophenone occurs in the cytoplasm. This is corroborated by the stoichiometries of ethylbenzene oxidation versus ferricenium reduction in the different subcellular fractions. In cytoplasmic fractions, an ethylbenzene: ferricenium stoichiometry of 1 : 3.2 was determined, indicating coupling of the residual ethylbenzene dehydrogenase activity with (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase, whereas the periplasmic fractions showed an ethylbenzene: ferricenium stoichiometry of 1 : 1.9.

Table 2 Subcellular distribution of ethylbenzene dehydrogenase in *Azoarcus* strain EbN1. Cells were grown anaerobically in the presence of nitrate and ethylbenzene. Specific activities are given in units [$1 \text{ nmol substrate min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]. Mean values of at least two measurements are given; standard deviations were $< 14 \%$.

Fraction	Ethylbenzene-DH (units)	Malate-DH (units)	(<i>S</i>)-1-Phenylethanol-DH (units)	Cytochrome c nmol (mg protein) ⁻¹
Periplasmic	75	2,400	19	1.9
Cytoplasmic	1.8	30,000	70	0.05

Purification of ethylbenzene dehydrogenase from strain EbN1

Because ethylbenzene dehydrogenase did not bind to DEAE-sepharose columns when 10 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5) was used, the elution buffer was changed to a chloride-free 2 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5). Under these conditions, the enzyme bound to the DEAE-column and was then eluted from the column by a linear KCl gradient. Although enzyme activity in extracts was not affected by air, enriched enzyme from the first column quickly lost activity under oxic conditions. Therefore, purification of the enzyme was performed under anoxic conditions, which resulted in typical yields of $> 75 \%$ and an enrichment factor of 20 after the first column (Table 3). Chromatography on ceramic hydroxyapatite (Bio-Rad) was performed as second purification step. The pooled enzyme eluted from the DEAE sepharose column was

directly applied on this column and eluted by a linear K-phosphate gradient (pH 7.5). A typical enrichment factor of 24 at a yield of 20 % was obtained after this step. The enzyme was essentially pure after the second column, as shown by SDS-PAGE. A summary of the purification scheme is given in Table 3.

Table 3 Purification of ethylbenzene dehydrogenase. A typical purification scheme is shown.

	Volume [ml]	Total activity [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Total protein [mg]	Specific activity [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Yield [%]	Enrichment [fold]
Extract	12	7,700	480	16	100 %	1
DEAE-sepharose	80	5,920	19	312	77 %	20
Hydroxyapatite	40	1,560	4	390	20 %	24

Molecular properties of ethylbenzene dehydrogenase

Ethylbenzene dehydrogenase consists of three subunits of 96, 43 and 23 kDa, as revealed by SDS-PAGE of the purified enzyme (Fig. 3). The apparent native molecular mass of the enzyme was determined as 155 ± 15 kDa by gel filtration and Ferguson plot analysis of native polyacrylamide gels. These values are consistent with an assumed $\alpha\beta\gamma$ composition of the enzyme. The N-terminal amino acid sequences of the three subunits were determined from enzyme that had been separated by SDS-PAGE. The N-terminus of the α subunit of purified ethylbenzene dehydrogenase was blocked, whereas short sequences of the β and γ subunits were obtained. However, a sequence of the α subunit was obtained when the ethylbenzene-induced 96 kDa polypeptide was cut out from blotted cell extracts and used for sequencing. The N-terminal amino acid sequence of the α subunit (GTKAPGYASWEDIYRKEWKW DKVN) was highly similar to that of other molybdoproteins, such as selenate reductase of *T. selenatis* (63 % identity) or several nitrate reductases (e. g. 63 % identity with nitrate reductase subunit 1 of *Haloarcula marismortui*). The sequences obtained for the other subunits (β : xGPxxYLRP, and γ : xKAKRVPGGKELLLDL) did not show significant matches with known proteins.

Additionally, molar contents of molybdenum, iron and acid-labile sulfide were determined in purified ethylbenzene dehydrogenase. Molybdenum content in ethylbenzene dehydrogenase was determined as $0.9 \pm 0.1 \text{ mol (mol enzyme)}^{-1}$ by colorimetric assay, and as $1.2 \pm 0.1 \text{ mol (mol enzyme)}^{-1}$ by ICP-OES. Iron was determined chemically at a stoichiometry of $17 \pm 2 \text{ mol (mol enzyme)}^{-1}$, compared to $16 \pm 1 \text{ mol iron (mol enzyme)}^{-1}$ determined by ICP-OES. Finally, colorimetric analysis of acid-labile sulfide yielded $12 \pm 4 \text{ mol S}^{2-} \text{ (mol enzyme)}^{-1}$. These values are consistent with the presence of one molybdenum, four $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ clusters, and one heme in ethylbenzene dehydrogenase, as previously reported for selenate reductase of *T. selenatis* (Schröder et al. 1997; Krafft et al. 2000). Other metals detected by ICP-OES in significant amounts were Mg and Ca (2.5 mol/mol each), but no further transition metals or selenium were present in purified enzyme.

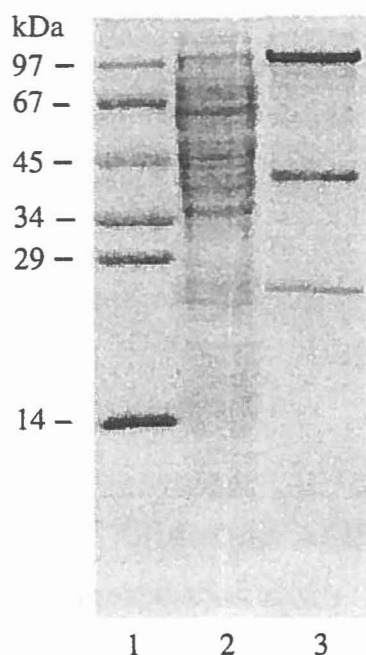


Fig. 3 SDS-PAGE of active pools during purification of ethylbenzene dehydrogenase. Lanes: (1) Marker proteins (sizes given on left margin); (2) crude extract (50 μg protein); (3) purified enzyme (10 μg) after chromatography on hydroxyapatite.

Spectral properties of ethylbenzene dehydrogenase

UV-visible spectroscopic analysis of purified ethylbenzene dehydrogenase showed a complex spectrum. The spectrum of the purified enzyme showed a shoulder around 400 nm, and in addition distinct absorption maxima at 424, 528 and 559 nm, which indicated the presence of a reduced heme b cofactor. After anaerobic oxidation of the enzyme by stoichiometric concen-

tations of ferricenium hexafluorophosphate, the α and β peaks of the tentatively identified heme at 559 and 528 nm disappeared and the Soret-band at 424 nm was shifted to 414 nm (Fig. 4).

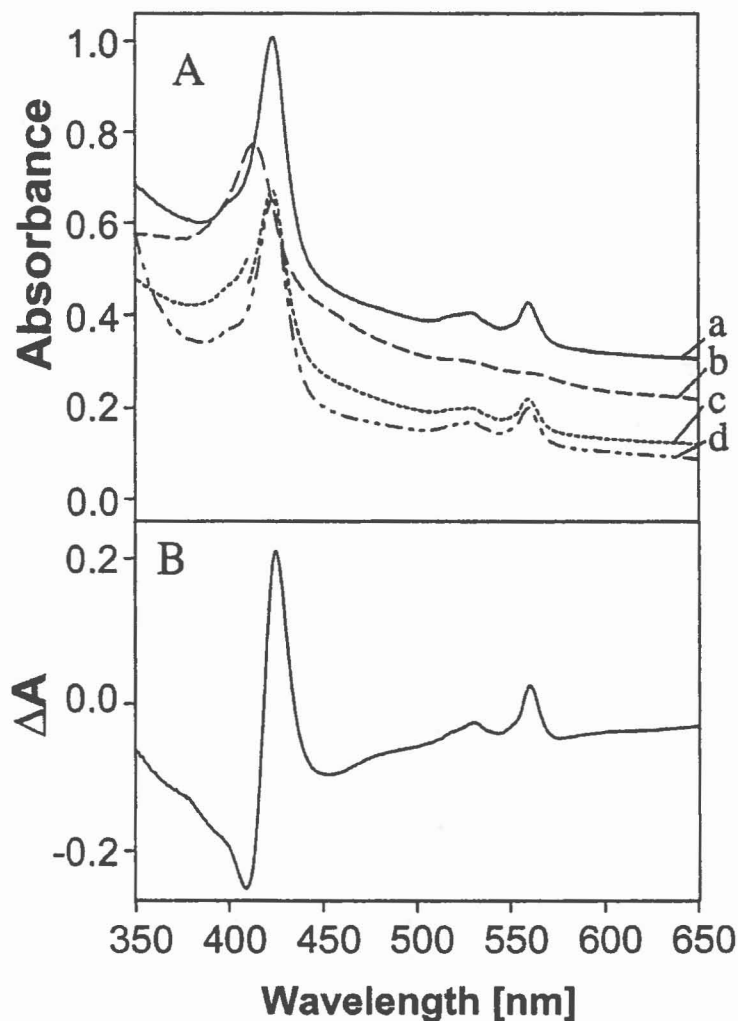


Fig. 4 UV-Vis spectrum of ethylbenzene dehydrogenase. A. Spectrum of purified enzyme (protein concentration 0.94 mg ml^{-1}) directly after isolation under anoxic conditions (a), after anaerobic oxidation with $15 \text{ } \mu\text{M}$ of ferricenium hexafluorophosphate (b), after re-reduction of ferricenium-oxidized enzyme with $10 \text{ } \mu\text{M}$ ethylbenzene (c), and after vigorous reduction with 0.2 mM dithionite (d). For better visibility, spectra (b) to (d) were offset along the y-axis. B. Difference spectrum of reduced enzyme (a) and ferricenium-oxidized enzyme (b).

The difference spectrum of reduced and oxidized enzyme was indeed indicative of the presence of a heme b cofactor (Fig. 4). Addition of stoichiometric concentrations of ethylbenzene to ferricenium-oxidized enzyme resulted in restoration of the spectrum of reduced enzyme (Fig. 4). The spectra of the substrate-reduced enzyme and the enzyme obtained from

the final column were identical, suggesting that ethylbenzene dehydrogenase was purified in the completely reduced form. Treatment of the reduced enzyme with 0.2 mM dithionite did not result in further reduction of the heme cofactor, but resulted in further bleaching of the absorption between 400 and 500 nm (Fig. 4). This is indicative of the presence of iron-sulfur clusters in ethylbenzene dehydrogenase. These clusters are obviously not completely reduced by the substrate and need a strong chemical reductant such as dithionite for being entirely reduced. The heme content of the enzyme was determined as 0.95 mol/mol from dithionite-reduced enzyme, using an ϵ of $34.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the α -band (Hanlon et al. 1996).

Catalytic properties of ethylbenzene dehydrogenase

Purified ethylbenzene dehydrogenase catalyzed the ferricenium-dependent oxidation of ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol. The specific activity recorded for purified enzyme corresponds to a very low catalytic number of 1.2 s^{-1} , a similar value as recorded for benzoyl-CoA reductase and phenylacetyl-CoA: acceptor oxidoreductase from *Thauera aromatica* (Boll and Fuchs 1995; Rhee and Fuchs 1999). Ethylbenzene dehydrogenase activity was already saturated at extremely low ethylbenzene concentrations, which prevented the accurate determination of the K_m value for ethylbenzene. An approximation of $< 2 \text{ }\mu\text{M}$ for the K_m value was derived from the residual substrate concentration under half-saturating turnover conditions (for estimation see Fig. 5). About 15% of the activity recorded with ethylbenzene was obtained when *n*-propylbenzene was used as substrate. The ratio of activities with the two substrates did not significantly change between cell extract and purified enzyme. Other aromatic substrates, such as toluene, *p*-cymene, phenylacetate, (*R,S*)-1-phenylethanol or 2-phenylethanol, were not oxidized by ethylbenzene dehydrogenase. The potential of ethylbenzene dehydrogenase to catalyze the reversed reaction was tested by an anaerobic enzyme assay with reduced methyl viologen as electron donor and (*S*)-1-phenylethanol as starting substrate. No reduction of (*S*)-1-phenylethanol to ethylbenzene was detected by this test, suggesting that the reaction of ethylbenzene dehydrogenase is irreversible under physiological conditions. Ethylbenzene dehydrogenase did also not catalyze methyl viologen dependent reduction of selenate or nitrate, despite the strong similarity of the N-terminal sequences of the respective α -subunits.

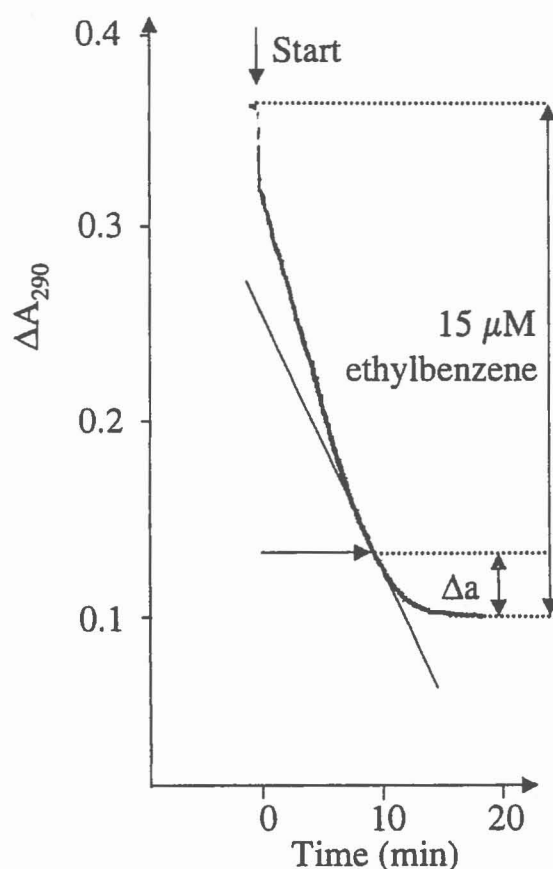


Fig. 5 Half-maximal activity of ethylbenzene dehydrogenase. A photometric assay was performed recording the reduction of ferricenium at 290 nm (initial ferricenium concentration: 200 μM). The reaction was started by addition of ethylbenzene (15 μM). The horizontal arrow marks the time point when the rate of absorbance decrease was half-maximal. The corresponding residual concentration of ethylbenzene was calculated from the absorbance difference of ferricenium (ΔA) between this time point and the end of the reaction.

Inhibition of ethylbenzene dehydrogenase

Ethylbenzene dehydrogenase was not inhibited in assays containing Na-azide or Na-cyanide (1 mM each). Addition of cyanide to assay buffer caused a strong non-enzymatic background reaction, probably by sequestering iron from the ferricenium into a cyanide complex, but enzyme activities were still reliably measurable after starting with ethylbenzene. Whereas ethylbenzene dehydrogenase activity in cell extracts was not affected by aerobic extract preparation and incubation in air for up to 12 hours, purified enzyme, which was apparently in the reduced state (see above), was irreversibly inactivated by incubation in air with a half-life time of 7 min. This inactivation was efficiently prevented by addition of the artificial electron acceptor ferricenium hexafluorophosphate (1 mM) to the enzyme preparations. Under these conditions, > 90 % of enzyme activity were still present after 2 h, and > 70 % after 6 h incu-

bation in air. Since ferricenium has been shown to convert the heme cofactor of ethylbenzene dehydrogenase to the oxidized form, it can be concluded that the reduced heme is most likely responsible for inactivation by oxygen. The enzyme is probably held oxidized in cell extracts by natural electron acceptors and acquires oxygen sensitivity when these electron acceptors are removed during purification.

Discussion

The pathway of anaerobic ethylbenzene metabolism is initiated by two consecutive two-electron oxidation steps of ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol and further to acetophenone (Rabus and Widdel 1995; Ball et al. 1996; Rabus and Heider 1998). In this study, we analyzed the first enzyme of the predicted pathway, ethylbenzene dehydrogenase. To our knowledge, ethylbenzene dehydrogenase is the first described enzyme which catalyses oxygen-independent hydroxylation of a hydrocarbon, viz. of an apolar compound without functional groups. Enantiomer specificity of ethylbenzene dehydrogenase was demonstrated by coupling the reaction to that of purified (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase. This matches the product previously reported for a different *Azoarcus* strain (Johnson and Spormann 1999). Ethylbenzene dehydrogenase was specifically induced in cells grown anaerobically on ethylbenzene, and only very low activities were measured in cells grown on 1-phenylethanol or acetophenone. Three of the ethylbenzene-induced polypeptides described in this study showed identical molecular masses as the subunits of ethylbenzene dehydrogenase (96, 43, and 23 kDa).

Cells of the ethylbenzene-metabolizing strain EbN1 contained an enzyme exhibiting *n*-propylbenzene dehydrogenase activity at 15% of the specific activity measured with ethylbenzene. In contrast, cells of the ethylbenzene- and *n*-propylbenzene-metabolising strain PbN1 contained an enzyme exhibiting high activity with either ethylbenzene or *n*-propylbenzene. Similar ratios of activity with the two hydrocarbons in cells grown on either substrate strongly suggest that the same enzyme is used for metabolism of ethylbenzene and *n*-propylbenzene. This assumption is supported by the apparent identity of the polypeptide patterns of ethylbenzene- and *n*-propylbenzene grown cells. Ethylbenzene dehydrogenase did not show any activity with toluene as substrate, which is consistent with previous observations that strain EbN1 catabolises toluene via a completely different pathway, namely the addition of the methyl group to fumarate (Biegert et al. 1996; Beller and Spormann 1997; Heider et al. 1999).

The present data suggest that ethylbenzene oxidation occurs in the periplasm, whereas the product, (*S*)-1-phenylethanol is further oxidized in the cytoplasm, as evident from the use of NAD⁺ as electron acceptor. It is unknown presently whether and how 1-phenylethanol is transported into the cytoplasm. A passive diffusion of 1-phenylethanol as a hydrophobic

compound via the cytoplasmic membrane appears principally possible. The advantage of a periplasmic location of ethylbenzene dehydrogenase for the organism is unknown. One may speculate that scavenging of the poorly water-soluble ethylbenzene is more effective outside of the cytoplasmic membrane. The low K_m value ($< 2 \mu\text{M}$) of ethylbenzene dehydrogenase supports the assumption that the capacity of the enzyme for effective substrate binding is an important factor in the metabolism of this hydrocarbon.

Even though the redox potential of the 1-phenylethanol/ethylbenzene couple is around $+0.03 \text{ V}$ relative to standard hydrogen electrode (estimated from thermodynamic data of other hypothetical alcohol/hydrocarbon couples), ethylbenzene oxidation was only observed in this study with an electron acceptor of significantly higher redox potential (Fc^+/Fc , $E^0 = +0.38 \text{ V}$). One may assume that redox centers in the enzyme as well as the natural electron acceptor have high redox potentials to achieve reasonable oxidation rates with the relatively inert hydrocarbon substrate. Redox centers of high midpoint potential in the enzyme may offer a possible explanation for the observed irreversibility of ethylbenzene dehydrogenation, even in tests with strongly reducing electron donors (e.g., MV^+/MV , $E^0 = -0.446 \text{ V}$). Since ethylbenzene dehydrogenase is a periplasmic enzyme, a possible natural acceptor in the *Azoarcus* strains could be cytochrome *c*. The properties of ethylbenzene dehydrogenase from strain EbN1 are in contrast to the recently reported benzoquinone-dependence of ethylbenzene oxidation in strain EB-1. Reaction rates in this strain were threefold lower than those reported here, and the enzyme was membrane-associated and not induced in ethylbenzene-grown cells (Johnson and Spormann 1999). Apparently, there are different types of ethylbenzene dehydrogenases in different strains of denitrifiers.

Ethylbenzene dehydrogenase is a new molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme, which is composed of three subunits. In analogy to other known three-subunit molybdoenzymes, it may be assumed that the α -subunit contains the molybdenum cofactor, whereas the β -subunits carries the Fe/S clusters, and the γ -subunit the heme cofactor. The enzyme, which is most similar to ethylbenzene dehydrogenase with respect to subunit composition, cofactor content and location is presumably the recently characterized selenate reductase from a closely related species, *T. selenatis* (Schröder et al. 1997; Krafft et al. 2000). However, ethylbenzene dehydrogenase did not catalyze reduction of selenate or nitrate. Another recently characterized molybdoprotein, phenylacetyl-CoA : acceptor oxidoreductase from *T. aromatica*, catalyses a

similar dehydrogenation reaction with a polar aromatic substrate, but this enzyme is membrane-bound, devoid of a heme cofactor, and apparently catalyses the four-electron oxidation of phenylacetyl-CoA to phenylglyoxylate, with coupling to quinones and without release of intermediates (Rhee and Fuchs 1999).

A striking finding is the discrepancy between the stability of ethylbenzene dehydrogenase under air in cell extracts and the fast inactivation of the purified enzyme by oxygen. We showed that the enzyme becomes relatively insensitive to air by anaerobic oxidation of the heme b cofactor, suggesting that the fully reduced heme in the enzyme may generate damaging oxygen metabolites. In cell extract, ethylbenzene dehydrogenase is probably kept oxidized by interaction with its natural electron acceptor and only becomes reduced when the electron acceptor is removed during purification.

Acknowledgements

We thank G. Fuchs (Universität Freiburg) and F. Widdel (MPI Bremen) for constant support and fruitful discussions. B. Auxier (UGA, Athens, GA) is thanked for ICP-OES analysis, and H. Schagger (Universität Frankfurt) and Toplab, Martinsried for N-terminal sequencing. Financial support for these studies was provided by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Max-Planck-Gesellschaft.

References

- Ball HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol* 178:5755-5761
- Beinert H (1983) Semi-micro methods for analysis of labile sulfide plus sulfane in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem* 131:373-378
- Beller HR, Spormann AM (1997) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J Bacteriol* 179:670-676
- Biegert T, Fuchs G, Heider J (1996) Evidence that oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* 238:661-668
- Boll M, Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism – ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234:921-933
- Champion KM, Zengler K, Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:157-164
- Clark LJ, Axley JH (1955) Molybdenum determination in soils and rocks with dithiol. *Anal Chem* 27:2000-2003
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (1999) *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley and Sons Inc., New York
- Dean JA (1992) *Lange's Handbook of Chemistry*, 14th Ed.. McGraw-Hill Inc., New York
- Hanlon SP, Toh T-H, Solomon PS, Holt RA, McEwan AG (1996) Dimethylsulfide:acceptor oxidoreductase from *Rhodobacter sulfidophilus*. The purified enzyme contains b-type haem and a pterin molybdenum cofactor. *Eur J Biochem* 239:391-396
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 22:459-473
- Johnson HA, Spormann AM (1999) In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *J Bacteriol* 181:5662-5668

- Krafft T, Bowen A, Theis F, Macy JM (2000) Cloning and Sequencing of the genes encoding the periplasmic-cytochrome *b*-containing selenate reductase of *Thauera selenatis*. DNA Seq 10:365-377
- Lehman TC, Hale DE, Bhala A, Thorpe C (1990) An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion. Anal Biochem 186:280-284
- Lovenberg W, Buchanan BB, Rabinowitz JL (1963) Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. J Biol Chem 238:3899-3913
- Mackay D, Shiu WY (1981) A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. J Phys Chem Ref Data 10:1175-1199
- Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted on polyvinylidene difluoride membranes. J Biol Chem. 262:10035-10038
- Michel TA, Macy JM (1990) Preparation of spheroplasts from the strict anaerobe *Selenomonas ruminantium*. J Microbiol Methods 11:37-41
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. Arch Microbiol 163:96-103
- Rabus R, Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. Arch Microbiol 170:377-384
- Rech SA, Macy JM (1992) The terminal reductases for selenate and nitrate respiration in *Thauera selenatis* are two distinct enzymes. J Bacteriol 174:7316-7320
- Rhee S-K, Fuchs G (1999) Phenylacetyl-CoA:acceptor oxidoreductase, a membrane-bound molybdenum-iron-sulfur enzyme involved in anaerobic metabolism of phenylalanine in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. Eur J Biochem 262:507-515
- Schröder I, Rech S, Krafft T, Macy JM (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. J Biol Chem 272:23765-23768
- Smith L (1978) Bacterial cytochromes and their spectral characterization. Meth Enzymol 23:202-212

(S)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism

Olaf Kniemeyer¹ and Johann Heider^{2*}

Archives of Microbiology (2001) 176:129-135

¹Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany

²Mikrobiologie, Institut für Biologie II, Universität Freiburg Schänzlestr. 1, 79104 Freiburg, Germany

*Corresponding author

Abstract

The initial steps in the anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon ethylbenzene by denitrifying bacteria are two sequential dehydrogenation reactions of ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol and further to acetophenone. The enzyme catalysing the second oxidation step, (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase, was analysed in the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain EbN1. An NAD⁺-dependent 1-phenylethanol dehydrogenase for each of the enantiomers of 1-phenylethanol was identified in this bacterium; the two enzymes were induced under different growth conditions. (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase from ethylbenzene-grown cells was purified and biochemically characterised. The enzyme is a typical secondary alcohol dehydrogenase and consists of two subunits of 25.5 kDa. The enantioselective enzyme catalyses the oxidation of (*S*)-1-phenylethanol or the reduction of acetophenone and is inhibited by high concentrations of (*R*)-1-phenylethanol. The enzyme exhibits low apparent K_m values for (*S*)-1-phenylethanol and acetophenone and is rather substrate-specific, using only a few chemically similar secondary alcohols, such as 1-phenylpropanol and isopropanol.

Introduction

Three denitrifying *Azoarcus* sp., strains EbN1, PbN1 and EB-1, are known to degrade the aromatic hydrocarbon ethylbenzene as sole carbon source and electron donor in the absence of oxygen (Rabus & Widdel 1995; Ball et al. 1996). Whereas strain EB-1 utilises ethylbenzene as the only aromatic hydrocarbon (Ball et al. 1996), strain PbN1 grows with either ethylbenzene or *n*-propylbenzene, and strain EbN1 with either ethylbenzene or toluene (Rabus and Widdel 1995). The degradation pathway of toluene in strain EbN1 is identical to that used by other anaerobic toluene-degrading bacteria and involves the formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate as the first step (Rabus and Heider 1998, Heider et al. 1999). However, anaerobic degradation of ethylbenzene (and *n*-propylbenzene) proceeds via a completely different pathway in all known denitrifying strains (reviewed in Heider et al. 1999). Ethylbenzene catabolism is initiated by an oxygen-independent oxidation of the methylene group to yield 1-phenylethanol, which is further oxidised to acetophenone (Rabus and Widdel 1995, Ball et al. 1996; Rabus and Heider 1998; Champion et al. 1999; Johnson and Spormann 1999). Further degradation of acetophenone apparently involves carboxylation to benzoylacetate, activation to the thioester and thiolytic cleavage, yielding acetyl-CoA and benzoyl-CoA as intermediates (Fig. 1; Ball et al. 1996; Champion et al. 1999). The first two steps of anaerobic ethylbenzene degradation in *Azoarcus* sp. strain EB-1 were recently investigated in more detail (Johnson and Spormann 1999). Whereas the enzymes involved have not been purified and characterised, stereospecific formation of (*S*)-1-phenylethanol as intermediate was reported, and the presence of an (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase was detected in extracts of ethylbenzene-grown cells of strain EB-1 (Johnson and Spormann 1999).

A number of (*S*)- and (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenases have been characterised to date from different microbial sources, together with some other enzymes of biotechnological interest for specific production of the (*S*)- or (*R*)-enantiomers of 1-phenylethanol. For example, NADP⁺-dependent (*R*)-1-phenylethanol-dehydrogenases were purified from *Lactobacillus* species (Hummel 1990; 1997; 1999). These enzymes belong to the short-chain family of alcohol dehydrogenases, whereas another purified NAD⁺-dependent (*S*)-1-phenylethanol-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* belongs to the medium chain, Zn²⁺-containing alcohol dehydrogenases (Hummel 1997). NAD⁺-dependent (*S*)- and (*R*)-1-phenyletha-

nol dehydrogenase activities were also found in crude extracts of an *Arthrobacter* sp. grown aerobically on racemic 1-phenylethanol, but the enzyme(s) were not purified and characterised further (Cripps et al. 1978). Stereospecific reduction of acetophenone to (*S*)-1-phenylethanol is also catalysed as a side reaction by a phenylacetaldehyde reductase from a *Corynebacterium* sp. (Itoh 1997) and by a “carbonyl reductase” from *Candida parapsilosis* (Peters 1993). Finally, a naphthalene dioxygenase from a *Pseudomonas* sp. is known to catalyse the non-specific oxidation of ethylbenzene via (*S*)-1-phenylethanol and acetophenone to 2-hydroxyacetophenone (Lee and Gibson 1996).

In this communication, we report the presence of 1-phenylethanol dehydrogenases in cells of *Azoarcus* sp. strain EbN1 grown anaerobically on ethylbenzene and different intermediates of the postulated metabolic pathway. An (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase apparently catalysing the second step of anaerobic ethylbenzene metabolism was purified and further characterised. The enzyme should also provide a source of auxiliary enzyme to reconstitute the initial ethylbenzene catabolic pathway in vitro.

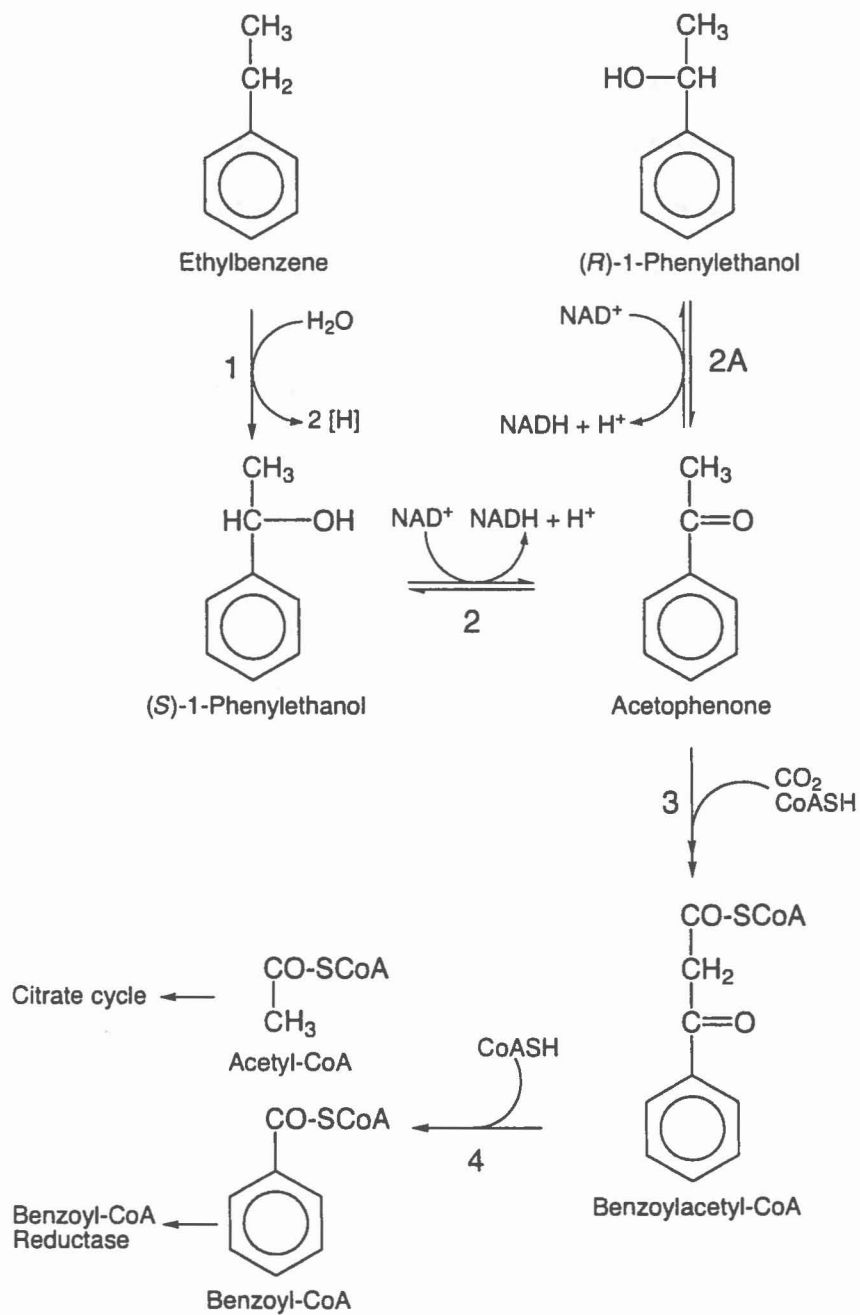


Fig. 1 Proposed catabolic pathway of ethylbenzene. Enzymes: (1) ethylbenzene dehydrogenase; (2) (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase; (2A) (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase; (3) acetophenone carboxylase and benzoylacetyl-CoA activating enzyme; (4) benzoylacetyl-CoA thiolase.

Materials and Methods

Cell growth and preparation of extract

Denitrifying *Azoarcus* sp. strain EbN1 was isolated by Rabus and Widdel (1995) from a freshwater enrichment culture on ethylbenzene. Bacteria were grown in 1–2–1 cultures as described previously (Rabus and Widdel 1995; Rabus and Heider 1998). These were harvested anoxically during the exponential growth phase at OD values of 0.30 to 0.34. Cultures on ethylbenzene were also grown in fed-batch mode in a 200-l fermenter, which allowed exponential growth up to optical densities of 2.0. Nitrate was fed continuously from a 1.5 M NaNO₃ stock solution with an exponentially increasing and growth-limiting rate, and ethylbenzene portions of 0.4 mol were discontinuously supplemented when the optical density of the culture increased by 0.4. Some experiments were also performed with cells harvested in the stationary phase, either from small scale experiments (OD values of 0.41 to 0.45) or from a fermenter run which was stopped feeding at an OD of 1.5. For extract preparation, 10 g (wet mass) of cells were suspended in 20 ml of basal buffer [25 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dithioerythritol, 10 % (w/v) glycerol]. Cells were lysed by two passages through a French pressure cell at 137 MPa. Cell debris and membranes were removed by ultracentrifugation (1 h 100,000 × g). Enzyme activities in aerobically and anaerobically prepared extracts reported in this communication were identical, and enzyme activity was not affected when dithioerythritol or MgCl₂ were omitted from the buffer.

Enzyme assays

Activity of (*R*)- and (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase was measured at 30 °C in 100 mM Tris-Cl buffer (pH 8) containing 2 mM MgCl₂ and 0.5 mM NAD⁺. Extract or column fractions (10 to 50 µl per ml assay) were added, and the reaction was started by addition of 1 mM substrate. For assaying the reverse reaction, NAD⁺ was replaced by NADH and the reaction was started with 1 mM acetophenone. To determine reaction stoichiometries, (*S*)-1-phenylethanol or acetophenone were added in low concentrations to the assays (40 µM each) and were allowed to react to completion. The stoichiometries were calculated from the applied substrate concentrations and the corresponding changes in pyridine nucleotide concentrations. To assess the pH optimum of purified (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase, the enzyme test

was performed in the following buffers (100 mM each): citric acid/Na₂HPO₄ (pH 3.5 – 6.0), Na-phosphate buffer (pH 6.0 – 8.0), and boric acid/NaOH buffer containing 100 mM KCl (pH 8.0 – 9.0). For determination of the reaction kinetics, the concentration of one substrate was varied, while the other was provided at a constant concentration ($\geq 10 \times K_m$). The range of substrate concentrations used was 1 - 30 μ M for 1-phenylethanol and acetophenone, 10 - 500 μ M for NAD⁺ and 0.6 - 10 μ M for NADH.

Purification of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase

All purification steps were performed under oxic conditions at 6 °C. Extract of cells of strain EbN1 grown on ethylbenzene (12 ml of a 100,000 \times g supernatant) was applied to a DEAE-Sepharose column (Pharmacia; diameter, 2.2 cm; volume, 30 ml), which had been equilibrated with basal buffer. The column was washed with the same buffer at a flow rate of 1 ml min⁻¹ for 4 column volumes. The column was eluted with a step gradient to 30 mM KCl, and a subsequent linear gradient from 30 to 200 mM KCl in basal buffer over 170 ml. Fractions of 5 ml were collected, and the activities of (*S*)- and (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase were monitored. (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase activity eluted between 40 and 90 mM KCl, whereas (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity eluted between 65 and 95 mM KCl. The fractions eluting between 40 and 60 mM KCl contained only (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity and were combined. The obtained pool of 50 ml contained 36 % of the total (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity and was used for further purification. Ammonium sulfate was added to a final concentration of 1 M, and the solution was applied to a TSK-butyl-fractogel column (Merck; 1.6 cm diameter; 15 ml volume) equilibrated with basal buffer containing 1 M ammonium sulfate. The column was washed with 70 ml of the same buffer and eluted with a step gradient to 0.5 M ammonium sulfate and a subsequent linear gradient from 0.5 to 0 M ammonium sulfate in basal buffer over 6 column volumes. Fractions of 3 ml were collected. (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase activity eluted from the column after the end of the gradient during washing with basal buffer in a volume of 12 ml, corresponding to 19 % of the initial activity. The active fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration with an exclusion limit of 30 kDa (Amicon 8400, with a PM-30 membrane). No loss of activity was recorded during the concentration step. Small aliquots (200 μ l) of the concentrated major pool of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity were further purified by gel filtration on a

Superose 6 column (Pharmacia; 1 cm diameter; 20 ml volume). The column, which was simultaneously used to determine the molecular mass of the native enzyme, was calibrated with ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa), alcohol-dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa) as molecular mass markers. Exclusion and inclusion volumes were determined with blue dextran and vitamin B₁₂, respectively. The column was equilibrated and eluted with basal buffer containing 100 mM NaCl at a flow rate of 0.2 ml min⁻¹, and fractions of 0.4 ml were collected. (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase eluted after 16.25 ml in a volume of 1.6 ml. Active fractions from this step were pooled, concentrated and stored at -70 °C.

Other methods

Protein concentrations were determined by the Coomassie-dye binding method with bovine serum albumin as standard, and discontinuous SDS-PAGE with 11 % (w/v) polyacrylamide gels was performed according to standard procedures (Coligan et al. 1999). Molecular mass standards were phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, lactate dehydrogenase and carbonic anhydrase. Purified enzyme (60 µg) was separated by two-dimensional gel electrophoresis, using the Immobiline Dry Strip system (linear pH gradient 3 to 10, 11 cm; Pharmacia) for the first dimension according to the manufacturer's protocol. The focused proteins in the gel strips were then separated in the second dimension by discontinuous SDS-PAGE as described above. For protein microsequencing, purified enzyme was blotted on a PVDF membrane (ProBlott; Applied Biosystems) after gel electrophoresis using a semi-dry blotting device (Semi-Phor TE77; Amersham Pharmacia Biotech) as described by Matsudaira (1982). Amino acid sequences were obtained via Edman-degradation (Procise 492 Sequencer; Applied Biosystems). Chemicals were purchased from Sigma, Fluka or Merck and were of the highest available purity.

Results

1-Phenylethanol dehydrogenase isoenzymes in cells of strain EbN1

Cell extracts of strain EbN1 grown on ethylbenzene and harvested during the exponential growth phase were tested for the presence of NAD⁺- or NADP⁺-coupled 1-phenylethanol dehydrogenases. Activity was only observed in assays with NAD⁺ as electron acceptor, not with NADP⁺. Enzyme activity was observed with both enantiomers of 1-phenylethanol, and no reaction occurred with the primary alcohol, 2-phenylethanol (data not shown). A specific activity of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase of 67 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹ was recorded, whereas the same extracts oxidised (*R*)-1-phenylethanol at a 12-fold lower rate (Table 1). Ethylbenzene-grown cells harvested in the stationary phase contained similar specific activities for (*S*)-1-phenylethanol, but twofold increased activities of (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase, compared to cells harvested in the exponential growth phase (Table 1).

Furthermore, enzyme activities were examined in extracts of cells grown on assumed intermediates of the ethylbenzene metabolism in strain EbN1. Cells grown on (*R*)- or (*S*)-1-phenylethanol, or acetophenone, contained (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase of similar specific activity as ethylbenzene-grown cells: the values were almost identical in (*S*)-1-phenylethanol-grown cells and were only slightly decreased in the other cell batches tested. However, the specific activity of (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase was drastically increased in all these cell extracts, even those grown on the (*S*)-enantiomer (Table 1). The presence of a highly efficient inducible isoenzyme for (*R*)-1-phenylethanol oxidation is consistent with a relatively short doubling time of 8 h for growth on (*R*)-1-phenylethanol, compared to 11 h for growth on ethylbenzene, and 13 h on (*S*)-1-phenylethanol. Almost no activity of either 1-phenylethanol dehydrogenase isoenzyme was present in extracts of benzoate- or acetate-grown cells (Table 1).

Table 1 1-Phenylethanol dehydrogenase activities in cells of strain EbN1 grown anaerobically with different organic substrates. Mean activities of at least two measurements are shown; the obtained standard deviations were < 10 %.

Growth substrate	Specific activity [nmol min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹]	
	(<i>R</i>)-1-Phenylethanol dehydrogenase	(<i>S</i>)-1-Phenylethanol dehydrogenase
Ethylbenzene (exponential)	6	67
Ethylbenzene (stationary)	11	73
(<i>S</i>)-1-Phenylethanol	125	63
(<i>R</i>)-1-Phenylethanol	90	46
(<i>S/R</i>)-1-Phenylethanol	104	27
Acetophenone	88	42
Benzoate	3	< 0.1
Acetate	4	< 0.1

Purification of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase

Proteins in extracts of ethylbenzene-grown cells were separated by chromatography on DEAE-sepharose, and the activities of (*S*)- and (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenases were monitored in the eluate fractions. Enzymes oxidising the different 1-phenylethanol enantiomers were separated by this chromatographic step. Most of the (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity eluted between 40 and 60 mM KCl with 36 % yield, and a mixture of (*R*)- and (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase eluted between 65 and 95 mM KCl with 130 % (apparent) yield of the (*R*)-specific isoenzyme and 21 % yield of the (*S*)-specific isoenzyme. The small amount of (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase was not purified further. Purification of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase was continued with the fractions containing the enzyme without contamination by (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase. These were pooled, mixed with ammonium sulfate to a concentration of 1 M and separated by chromatography on a TSK-butyl-fractogel column. (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase eluted between 20 and 0

mM ammonium sulfate with a yield of 19%. The active fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration; they appeared > 90% pure after SDS-PAGE (Fig. 2).

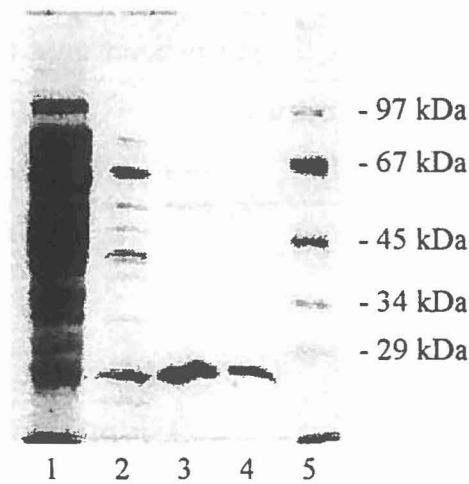


Fig. 2 SDS-PAGE of protein fractions containing (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity obtained during purification of the enzyme. An 11% (w/v) polyacrylamide gel is shown that was stained with Coomassie blue. Lanes: (1) cell extract; (2) pooled fractions from DEAE sepharose chromatography; (3) pooled fractions from butyl-TSK chromatography; (4) pooled fractions from gel filtration; (5) molecular mass markers. The masses of marker proteins are indicated in the right margin.

An aliquot was applied on a Superose-6 gel filtration column. Active fractions from this step were pooled, concentrated and stored at -70 °C. The gel filtration step caused some loss of activity and reduced the yield considerably, but removed the last minor contaminants (Fig. 2). The enzyme was 83-fold enriched and essentially pure after these three chromatographic steps. A summary of the purification procedure is given in Table 2.

Table 2 Purification of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase. Note that actual yield values and corrected yield values (in brackets) are given. The corrected values include the amounts of enzyme in side fractions that were not used for subsequent purification steps.

Purification step	Volume [ml]	Total activity [$\mu\text{mol min}^{-1}$]	Total protein [mg]	Specific activity [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Yield [%]	Enrichment [-fold]
Extract	12	29	623	0.046	100	1
DEAE-sepharose	50	10.5	23	0.46	36 (57)	10
Butyl-fractogel	12	5.5	1.8	3.1	19 (35)	67
Gel filtration	1.6	0.3	0.07	3.8	1 (11)	83

Molecular and catalytic properties of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase

(*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase from ethylbenzene-grown cells consisted of a single subunit of 25.5 ± 0.5 kDa and exhibited a pI of 6.6, as revealed by SDS-PAGE and two-dimensional gel electrophoresis (data not shown). The N-terminal sequence of the subunit was determined and compared with the protein sequence database. It was most similar to several short-chain alcohol dehydrogenases, which typically catalyse the oxidation of secondary alcohols (Fig. 3). The apparent native molecular mass of the enzyme was 50 ± 5 kDa, as determined by gel filtration. From the values obtained with purified enzyme, an α_2 (homodimer) composition can be assumed, as typically found for short-chain alcohol dehydrogenases. UV-visible spectroscopic analysis of the purified enzyme showed an absorption maximum at 280 nm with a shoulder at 290 nm, possibly originating from tryptophan residues, but no further absorption characteristics at longer wavelengths. The determined absorption coefficient at 280 nm (ϵ_{280}) was $94.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (relative to homodimeric enzyme).

Ebn1 1-PEDH:	1	TQRLKDKLAVITGGANGIGRAIAERF	26
Zm 3-OA-ACPR:	1	MRFQDKIVVITGGNGMGKAAAERF	25 (AAG02168)
Bm GDH:	2	YTDLKDKVVVITGGSTGLGRAMAVRF	27 (P39484)
At ADH-like:	33	SRKLEGKVAVITGGASGIGKATAEEF	58 (BAB01222)
Ta GDH-like:	2	FSDLRDKVVIVTGASMGIGRAIAERF	27 (CAC11888)
Pp DHD-DH:	3	NKRFQDKTAVITGAAQGIGRRVAERM	26 (AAD31450)
Rsp DHD-DH:	1	MRLKDEVVLVTGGCAGLGRAIVDRF	25 (AAB07754)
Bt ADH:	1	MSIEQKTAIVTGGANGIGKAIARAF	25 (BAA94092)
Ta 3-OA-ACPR:	2	SGKLEGKIALITGASKGLGRAIAEKF	27 (CAC11396)

Fig. 3 N-terminal amino acid sequence of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase. The N-terminal sequence of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase is given in the first line, those of the most similar proteins found in the data base are shown for comparison. Identical and chemically similar amino acids are printed in bold. Abbreviations for species names: *Zm*, *Zymomonas mobilis*; *Bm*, *Bacillus megaterium*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Ta*, *Thermoplasma acidophilum*; *Pp*, *Pseudomonas putida*; *Rsp*, *Rhodococcus* species; *Bt*, *Bacillus thermoleovorans*. Abbreviations for enzymes: 3-OA-ACPR, 3-oxoacyl-ACP reductase; GDH, glucose 1-dehydrogenase; ADH, short-chain alcohol dehydrogenase; DHD-DH: *cis*-dihydrodiol-dehydrogenase. Numbers indicate the positions of the first and last amino acids in the proteins. Database accession numbers are given in brackets.

The purified enzyme catalysed the NAD^+ -dependent oxidation of (*S*)-1-phenylethanol as well as the NADH-dependent reduction of acetophenone. The apparent pH optimum of the forward reaction was at pH 8.0, whereas the optimum for acetophenone reduction activity was at pH 4.0. Substrate-limited assays of the forward and reverse reactions yielded an (*S*)-1-phenylethanol : NAD^+ stoichiometry of 1.1 and an acetophenone : NADH stoichiometry of 0.7. Linear Lineweaver-Burk plots were obtained with up to 500 μM NAD^+ , 10 μM NADH, 30 μM (*S*)-1-phenylethanol, and 8 μM acetophenone. The calculated k_{cat} values per holoenzyme (α_2) were 2.0 s^{-1} for alcohol oxidation, and 1.6 s^{-1} for ketone reduction (both measured at pH 8). Apparent K_{m} values of the forward direction were $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for (*S*)-1-phenylethanol (at 0.5 mM NAD^+) and $51 \pm 6 \mu\text{M}$ for NAD^+ (at 1 mM (*S*)-1-phenylethanol). Apparent K_{m} values of the reverse direction were $1.0 \pm 0.04 \mu\text{M}$ for acetophenone (at 0.25 mM NADH), and $3.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ for NADH (at 10 μM acetophenone). Acetophenone inhibited its own reduction at higher concentrations, starting at 8 μM . No activity was measurable with (*R*)-1-phenylethanol as substrate. Racemic (*R,S*)-1-phenylethanol was only oxidised at 36 %

of the rate of (*S*)-1-phenylethanol, and (*S*)-1-phenylethanol oxidation was completely inhibited in the presence of tenfold higher concentrations of the (*R*)-enantiomer (Table 3).

Table 3: Substrate specificity and inhibition of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase. The reference value of specific activity (100%) was $4.0 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$. Only values obtained with tested secondary alcohols are shown. Primary alcohols were not oxidised by the enzyme

Substrate	Relative activity [%]
(<i>S</i>)-1-Phenylethanol	100
Mixtures of (<i>S</i>)- and (<i>R</i>)-1-phenylethanol	
[molar ratio 1:1]	36
[molar ratio 1:10]	< 1
(<i>S,R</i>)-1-Phenylpropanol	53
Isopropanol	3
Isoamyl alcohol	0

Substrate specificity of purified (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase was tested in enzyme assays with a number of substrate analogues. No activity was recorded with primary alcohols, such as ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-phenylethanol or benzyl alcohol, whereas the enzyme showed a similar rate with (*R,S*)-1-phenylpropanol as with racemic 1-phenylethanol, and had a low but definite activity with isopropanol (Table 3). The influence of metal ion chelators and thiol reagents on (*S*)-1-phenylethanol-dehydrogenase was studied in enzyme assays without added MgCl_2 . Presence of 10 mM EDTA (10 mM), 1 mM pyrazole or 1 mM 1,10-phenanthroline in enzyme assays did not affect the activity, indicating that the enzyme does not contain easily accessible bivalent metal ions. Likewise, (*S*)-1-phenylethanol oxidation was not inhibited by 0.1 mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 1 mM 4-hydroxymercuribenzoic acid or 1 mM *N*-ethylmaleimide, indicating that no accessible cysteine residues are required for catalysis.

Discussion

In this study, we analysed the induction pattern and substrate specificity of the second enzyme of the proposed pathway of anaerobic ethylbenzene metabolism, (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase. NAD⁺-dependent isoenzymes catalysing the oxidation of (*S*)- or (*R*)-1-phenylethanol to acetophenone were identified in cells of strain EbN1 grown on different organic substrates. The recorded activities in cell extracts are sufficient to explain the observed growth rates on the respective substrates. The doubling time of 11 h on ethylbenzene and a growth yield of 79 g dry cell mass per mol ethylbenzene dissimilated (Rabus 1995) require a minimum activity of 27 nmol·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (assuming a protein content of 50 % in dry mass). The stereo-specificity of the prevalent isoenzymes in ethylbenzene-grown cells is consistent with a catabolic pathway via (*S*)-, but not via (*R*)-1-phenylethanol. The (*S*)-enantiomer of 1-phenylethanol was also previously reported as intermediate of anaerobic ethylbenzene metabolism in another *Azoarcus* sp., strain EB-1 (Johnson and Spormann 1999).

Whereas only (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase activity was detected in ethylbenzene-degrading *Azoarcus* sp. strain EB-1 (Johnson and Spormann 1999), cells of strain EbN1 apparently synthesise differentially regulated (*R*)- and (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenases during growth on other substrates. Activity of (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase is very low in ethylbenzene-grown cells and apparently increases about twofold when cells become stationary, but this isoenzyme is present in much higher amounts in cells grown on either of the 1-phenylethanol enantiomers or on acetophenone. Remarkably, the highest (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase activities were detected in (*S*)-1-phenylethanol-grown cells, which indicates that the substrate, (*R*)-1-phenylethanol, is probably not the true inducer of synthesis of this isoenzyme. The high activities of (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase may also be connected with the observed growth inhibition of the organism by acetophenone concentrations > 2.6 mM (Zengler 1996). Since (*R*)- and (*S*)-1-phenylethanol are less toxic for strain EbN1 (growth inhibition at > 8mM; Zengler 1996), a possible additional function of both 1-phenylethanol dehydrogenases may be to reduce surplus acetophenone to the respective alcohols to avoid accumulation of toxic levels.

(*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1 is a soluble protein and catalyses the oxidation of (*S*)-1-phenylethanol with NAD^+ as electron acceptor and the reduction of acetophenone with NADH as electron donor. Low apparent K_m values for (*S*)-1-phenylethanol and acetophenone indicate that conversion of these compounds is indeed the physiological function of the enzyme. The enzyme also oxidises some secondary alcohols of similar chemical structure as 1-phenylethanol, whereas no primary alcohols are oxidized. (*R*)-1-phenylethanol is not metabolised by the enzyme, but inhibits (*S*)-1-phenylethanol oxidation in high concentrations. (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases, judging by its subunit size, composition and N-terminal sequence. Some catalytic properties of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase are also typical for this enzyme family, such as the apparent absence of metal ions in the active enzyme, lack of essential SH-groups and specificity for secondary alcohols. Compared to other purified 1-phenylethanol dehydrogenases (Hummel 1999), the characterised enzyme is the first NAD^+ dependent short chain alcohol dehydrogenase specific for (*S*)-1-phenylethanol.

Proteins specifically induced during growth of strain EbN1 on acetophenone were recently detected by two-dimensional gel electrophoresis (Champion et al. 1999), and N-terminal amino acid sequencing revealed a short-chain alcohol dehydrogenase among these proteins. However, the N-terminal sequence, isoelectric point and molecular mass of this protein were different from that of the presently purified enzyme. Therefore, the previously reported acetophenone-induced protein may well represent the recorded (*R*)-1-phenylethanol dehydrogenase or another isoenzyme of (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase.

Acknowledgements

The authors thank F. Widdel (MPI Bremen) and G. Fuchs (Universität Freiburg) for stimulating discussions and constant support. C. Leutwein (Universität Freiburg) is thanked for helpful advice in enzyme purification. The N-terminal sequencing was performed by TopLab, Martinsried, Germany. This research was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Ball HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol* 178: 5755-5761
- Champion KM, Zengler K, Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways. *J Molec Microbiol Biotechnol* 1: 157-164
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (1999) Current protocols in protein science. John Wiley & Sons Inc, New York
- Cripps RE, Trudgill PW, Whateley JG (1978) The metabolism of 1-phenylethanol and acetophenone by *Nocardia* T5 and an *Arthrobacter* species. *Eur J Biochem* 86: 175-186
- Heider J., Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 22: 459-473
- Hummel W (1990) Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 15-19
- Hummel W (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58: 146-184
- Hummel W (1999) Large-scale application of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol* 17: 487-492
- Itoh N, Morihama R, Wang J, Okada K, Mizuguchi N (1997) Purification and characterization of phenylacetaldehyde reductase from a styrene-assimilating *Corynebacterium* strain, ST-10. *Appl Env Microbiol* 63: 3783-3788
- Johnson HA, Spormann AM (1999) In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene metabolism. *J Bacteriol* 181: 5662-5668
- Lee K, Gibson DT (1996) Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 98164-4. *Appl Env Microbiol* 62: 3101-3106
- Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262:10035-10038

- Peters J, Minuth T, Kula MR (1993) A novel NADH-dependent carbonyl reductase with an extremely broad substrate range from *Candida parapsilosis*: purification and characterization. *Enzyme Microb Technol* 15: 950-958
- Rabus R (1995) Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation, Verlag Mainz, Aachen
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 164: 448-451
- Rabus R, Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 170: 377-384
- Zengler K (1996) Anaerobe Oxidation von Xylolen, anderen Alkylbenzolen und Erdöl. Diploma thesis, Universität Göttingen

Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing
bacterium

Olaf Kniemeyer¹, Frank Oliver Glöckner¹, Thomas Fischer², Heinz Wilkes³, Friedrich Widdel^{1*}

Manuscript submitted to Applied & Environmental Microbiology

¹ Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

² Institut für Erdöl und Organische Geochemie, Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich, Germany

³ GeoForschungsZentrum Potsdam, Telegrafenberg Haus B427, D-14473 Potsdam, Germany³

*Corresponding author

Abstract

Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon ethylbenzene was studied with sulfate as electron acceptor. Enrichment cultures with marine sediment samples from different locations showed ethylbenzene-dependent sulfate reduction to sulfide and always yielded a characteristic cell type that formed gas vesicles towards the end of growth. A pure culture of this cell type, strain EbS7, was isolated on ethylbenzene from sediment of Guaymas Basin (Gulf of California). Complete mineralization of ethylbenzene to carbon dioxide coupled to sulfate reduction was demonstrated in quantitative growth experiments with strain EbS7. Sequence analysis of the 16S rRNA gene of strain EbS7 revealed a close relationship with other (so far unnamed) marine isolates of sulfate-reducing bacteria (strains mXyS1 and NaphS2) that grow anaerobically with *m*-xylene or naphthalene (similarity values, 96.2 and 97.6%, respectively). In addition strain EbS7 also grew on phenylacetate, 3-phenylpropionate, *n*-hexanoate, formate, lactate and pyruvate as electron donors and carbon sources. Strain EbS7 was unable to grow on 1-phenylethanol and acetophenone, the first intermediates in the anaerobic ethylbenzene metabolism in the well characterized denitrifying *Azoarcus* strains EB1 and EbN1; this pointed at a pathway for ethylbenzene in the sulfate-reducing bacterium different from that in denitrifying bacteria. By gas chromatography-mass spectrometry of culture extracts, 4-phenylpentanoate was identified upon growth of strain EbS7 with ethylbenzene, but not with other organic substrates. Formation of 4-phenylpentanoate (possibly as thioester) can be explained as the result of a reaction sequence involving addition of fumarate to the benzyl carbon atom of ethylbenzene yielding (1-phenylethyl)succinate, carbon skeleton rearrangement and loss of a carboxyl group in analogy to reactions during anaerobic alkane degradation. This pathway was further supported by mass spectrometric evidence for the specific formation of (1-phenylethyl)succinate in culture extracts from ethylbenzene grown cells of strain EbS7 .

Introduction

Hydrocarbons have long been considered as inert under anoxic conditions. During the past decade, however, enriched bacterial populations and numerous pure cultures were shown to degrade aromatic or saturated hydrocarbons in the absence of oxygen with nitrate, ferrous iron or sulfate as electron acceptor, or under conditions of methanogenesis (Heider et al. 1999; Lovley 2000; Spormann and Widdel 2000; Zwolinski et al. 2000; Phelps and Young 2001; Widdel and Rabus 2001). Anaerobic degradation of toluene has been most intensely studied, and several details of the activation reaction with fumarate as the co-substrate and benzylsuccinate as the product and the first intermediate are known from studies with denitrifying bacteria (Biegert et al. 1996; Beller and Spormann 1997; Coschigano et al. 1998; Heider et al. 1999; Spormann and Widdel 2000). Also in anaerobes utilizing electron acceptors other than nitrate, toluene is apparently activated by the same mechanism (Beller and Spormann 1997; Rabus and Heider 1998; Zengler et al. 1999; Beller and Edwards 2000).

Among the higher homologues of toluene (higher alkylbenzenes), ethylbenzene has been also studied as a potential bacterial substrate under anoxic conditions. Ethylbenzene belongs to the BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes) group of industrially important aromatic hydrocarbons that are components of crude oil and fuels, and are used as solvents and raw chemicals. Because of their wide use and noticeable solubility in water, BTEX hydrocarbons are also of concern as environmental contaminants, especially in anoxic subsurface zones (Coates and Anderson 2000; Phelps and Young 2001). Hitherto isolated pure cultures of anaerobes that degrade ethylbenzene are all denitrifying bacteria (Rabus and Widdel 1995; Ball et al. 1996). In contrast to toluene, ethylbenzene in denitrifying strains is not activated with fumarate as co-substrate, but rather dehydrogenated to yield (*S*)-1-phenylethanol (Johnson and Spormann 1999; Johnson et al. 2001; Kniemeyer and Heider 2001). (*S*)-1-Phenylethanol is oxidized to acetophenone (Johnson and Spormann 1999; Kniemeyer and Heider 2001) and further metabolized presumably via carboxylation to 3-phenyl-3-oxo-propionate, activation as its thioester and thiolytic cleavage to benzoyl-CoA and acetyl-CoA (Rabus and Widdel 1995; Ball et al. 1996; Champion et al. 1999). Degradation of ethylbenzene with sulfate as electron acceptor was demonstrated in microcosms and enrichment cultures (Chen and Taylor 1997; Reinhard et al. 1997; Gieg et al. 1999; Phelps and Young 1999; Elshahed et al. 2001). Analysis of metabolites in sulfate-reducing populations fed with ethylbenzene did not provide evidence for a degradation pathway as in denitrifying bacteria. Rather, identification of 3-phenyl-1,2-butanedicarboxylate [(1-phenylethyl)succinate] pointed at an activation mechanism analogous to that of toluene with fumarate as a co-substrate (Elshahed et al. 2001).

The present study was undertaken to isolate and identify sulfate-reducing bacteria that are able to utilize ethylbenzene as electron donor and carbon source. Sulfate-reducing bacteria play a key role in the anaerobic mineralization of organic compounds in marine sediments, due to the abundance of sulfate as electron acceptor (28 mM) in sea water (Jørgensen 1982; Widdel 1988). Accordingly, the highest metabolic diversity of sulfate-reducing bacteria has been observed among marine isolates (Widdel and Bak 1992; Rabus et al. 2000). Therefore, we used marine sediment samples as starting inocula for the present study. They indeed allowed the enrichment and isolation of a metabolically novel type of sulfate-reducing bacterium that grows with ethylbenzene as the only organic substrate under anoxic conditions.

Materials and methods

Sources of bacteria

Enrichment of sulfate-reducing bacteria that utilize ethylbenzene was attempted with marine sediment samples from Canale Grande in Venice (Italy), from the Bay of Arcachon (France), from the wadden sea of the North Sea at Horemersiel (Germany), from Eel Pond in Woods Hole (Mass., USA), and from Guaymas Basin in the Gulf of California (Mexico). The latter sample was taken at station I during the R/V Atlantis II cruise in April/May 1998 using the submersible ALVIN (for details see Weber and Jørgensen 2001).

Media, cultivation techniques, and quantitative growth experiments

Techniques for preparation of media and for cultivation of sulfate-reducing bacteria under anoxic conditions were as described previously (Widdel and Bak 1992). In short, cultures were grown in defined bicarbonate-buffered (pH 7.3-7.5), sulfide-reduced artificial seawater medium. The volume of non-chelated trace element solution (Widdel and Bak 1992) added per liter of medium was 1 ml in the beginning and 2 ml after isolation of the pure culture. Viton rubber-sealed flat 250 ml-bottles or 20 ml-tubes containing 200 and 15 ml, respectively, of medium under a headspace of N₂-CO₂ (9:1 [vol/vol]) were used for routine cultivation and growth tests. Filter-sterilized (via solvent-resistant cellulose filters, pore size 0.2 µm) ethylbenzene and other hydrocarbons were diluted (0.5 to 5% [vol/vol]) in sterile, anoxic 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) as a carrier phase (4 ml per bottle; 0.5 ml per tube) to avoid toxic effects of the pure aromatic and aliphatic compounds (Rabus et al. 1993). The tubes with the overlaid insoluble hydrocarbon phases were incubated nearly horizontally to facilitate diffusion of substances into the aqueous medium. The sealed orifices were kept somewhat below the surface of the medium to avoid contact of the hydrocarbon phase with the stoppers (Aeckersberg et al. 1991; Rabus et al. 1993). Non-hydrocarbon substrates were added from sterile aqueous stock solutions so as to achieve the indicated concentrations.

The time course of sulfate reduction to sulfide with ethylbenzene as electron donor was measured in Viton rubber-sealed flat 250 ml-glass bottles as described above. Aliquots for determination of the optical density (OD, at 660 nm) and sulfide were withdrawn via the stoppers by means of sterile syringes. Sulfate and ethylbenzene consumed as well as formed sulfide and cell protein formed during growth of strain EbS7 were quantified in separate experiments using Viton rubber-sealed 100 ml-bottles with 70 ml medium, 2 ml HMN and ethylbenzene at the indicated amounts (Table 1).

For the characterization of metabolites, strain EbS7 was cultivated in stopper-sealed flat glass bottles (500 ml) containing 400 ml of artificial seawater medium under an anoxic head space. Cultures contained 4% (vol/vol) ethylbenzene in HMN and high (28 mM) or limiting concentrations (8 mM) of sulfate as electron acceptor. Fumarate (2 mM) was added to one parallel. In control experiments, strain EbS7 was incubated with 3 mM phenylpropionate (with 8 or 28 mM sulfate) or 4 mM *n*-hexanoate (28 mM sulfate). Cultures without sulfate or without cells served as negative controls.

Isolation, purity control and maintenance

Strain EbS7 was isolated via serial dilution in anoxic medium mixed with aqueous agar as gelling agent (Widdel and Bak 1992). The dilution of the artificial seawater medium by mixing with aqueous agar was compensated by the addition of a concentrated salt solution to each tube (Widdel and Bak 1992). The solidified agar was overlaid with 0.5 ml of heptamethylnonane containing 2% (vol/vol) ethylbenzene. In a subsequent agar dilution series for further purification ethylbenzene was replaced by 3-phenylpropionate (3 mM) as a soluble substrate that is applicable without a carrier phase.

The purity of the isolated strain was routinely checked by phase-contrast microscopy of cultures grown with ethylbenzene and other utilizable substrates. In addition, inoculated media containing glucose (5 mM), fructose (5 mM) or AC-medium (3 g/l; Difco Laboratories, Detroit, USA) were incubated and checked by microscopy. For maintenance, strain EbS7 was grown on ethylbenzene or 3-phenylpropionate and stored at 4°C; transfers were made every three months.

Sequence analyses of 16S rRNA gene

DNA was released from cells by repeated rapid freezing and thawing. Two primers, 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGG-3') and 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Buchholz-Cleven et al. 1997) were used for PCR amplification of the 16S rRNA gene. The PCR assay contained 1 µl of cell suspension, 0.4 µM of each primer, 200 µM dNTP-mix, 4 µl bovine serum albumin (2 mg/ml), 2 mM MgCl₂, and 5 µl REDTaq reaction buffer (Sigma, Deisenhofen, Germany); the final volume was adjusted to 50 µl with sterile water. REDTaq DNA Polymerase was added to the reaction mixture after a „hot start“ (96°C, 5 min). PCR products were resolved on an agarose gel (1%) in 1×TBE (8.9 mM Tris-borat buffer pH 8.2 with 2 mM EDTA) and visualized under UV light (366 nm) after staining with ethidium bromide (0.1%).

DNA was sequenced by GAG BioScience (Bremen, Germany) on an automated sequencer (ABI 377; Perkin Elmer, Langen, Germany) using dye-labeled dideoxynucleotides (Chen and Seeburg 1985)

The retrieved 16S rDNA sequence was added to the rDNA sequence database of the Technical University Munich (release December 1998) using the program package ARB (Strunk et al. 2001). The tool ARB_ALIGN was used for automatic sequence alignment. The resulting alignments were checked by eye and corrected manually, considering the secondary structure of the rRNA molecule. The ARB-database was supplemented by importing all of the available 16S rDNA sequences (July 2001) from the δ -subclass of *Proteobacteria*. Tree topologies were evaluated by performing maximum parsimony, neighbor joining, and maximum likelihood analysis. Only sequences that were at least 90% complete were used for treeing. Trees were calculated either without the application of filters or with a 50% filter. This filter takes only into account positions where at least 50% of the sequences in a selected cluster share the same residues.

Chemical and other analyses

A simple test with CuSO_4 (5 mM in 50 mM HCl) yielding CuS was routinely used for detection of formed sulfide in enrichment cultures in comparison to controls without organic substrate (Cord-Ruwisch 1985). Sulfide in quantitative growth experiments was determined colorimetrically using the methylene blue formation reaction (Cline 1969) in a modified microassay (Aeckersberg et al. 1991). Sulfate was determined gravimetrically as precipitated BaSO_4 (Aeckersberg et al. 1991).

Ethylbenzene in heptamethylnonane was measured by gas chromatography (Auto System; Perkin Elmer, Norwalk, USA). Hydrocarbons were separated on an Optima 5 column (0.32 mm by 50 m, 0.25 μm film thickness; Macherey&Nagel, Düren, Germany) with H_2 at a flow rate of 1.6 ml min^{-1} . The temperatures of the injection port and the flame ionization detector were 250 and 280°C, respectively; the oven (column) temperature was programmed from 80 °C (2 min isothermal) to 160°C at a heating rate of 5 °C min^{-1} , and from 160 °C (0.1 min isothermal) to 220 °C (12 min isothermal) at a heating rate of 30°C min^{-1} . Defined, freshly prepared solutions of ethylbenzene in heptamethylnonane were used for calibration.

Ethylbenzene in the aqueous phase was determined on a high performance liquid chromatography system (Sykam, Gilching, Germany) equipped with a reversed phase Grom-Sil ODS-2 FE column (4.6 by 250 mm; Grom, Herrenberg, Germany). Samples were eluted with acetonitrile-water mixture (80:20 [vol/vol]) with 0.75 mM phosphoric acid at a flow rate of 1 ml min^{-1} and a column temperature of 25 °C (Rabus and Widdel 1995). Detection was by UV absorption at 215 nm and 255 nm. Defined, freshly prepared solutions of ethylbenzene in an acetonitrile-water mixture (80:20 [vol/vol]) were used as standards. Possible production of organic acids was examined by an HPLC system (Sykam, Gilching/Munich, Germany) equipped with an

SS-100 H⁺-column (7.8 by 300 mm; Sierra Separations, Sparks, USA). Samples were eluted with 5 mM H₂SO₄ in water at a flow rate of 0.6 ml min⁻¹ and a column temperature of 60 °C. Fatty acids were detected by UV absorption at 210 nm (Sykam, Gilching/Munich, Germany).

Metabolites in cultures were analyzed as described previously (Rabus et al. 2001) with slight modification. Heat-inactivated cultures (400 ml) of strain EbS7 were extracted three times at pH 1.5 with dichloromethane (80 ml) instead of diethyl ether. Organic extracts were concentrated by evaporation to 4 ml and half of the volume were methylated using an ethereal solution of diazomethane that was freshly prepared from Diazald (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of methylated culture extracts was performed as described previously (Rabus et al. 2001). The identity of the major metabolite with an authentic standard of 4-phenylpentanoic acid (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) was verified by co-injection of the methyl esters on two different GC columns as described previously (Rabus et al. 2001). The structure of the standard was confirmed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy as described previously (Rabus et al. 2001).

Whole-cell protein was determined using an assay kit (Bio-Rad, Hercules, USA) based on the Coomassie brilliant blue dye binding method (Bradford 1976). To solubilize proteins prior to the assay, cells from 1 ml culture medium were centrifuged (11300 × g, 40 min) and mixed with 0.5 ml of a 0.25 M sodium hydroxide solution containing 5 mM EDTA. The cell suspension was incubated for 10 min at 95°C. Bovine serum albumin was used as a standard.

The G+C content of the DNA was determined by high-performance liquid chromatography according to the procedure of (Mesbah et al. 1989). DNA was isolated by chromatography on hydroxylapatite after cell disruption according to Cashion et al. (1977). The analysis was performed at the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), Braunschweig (Germany).

Nucleotide sequence accession number

The nearly complete 16S rRNA sequence of isolate EBS7 is available from EMBL under accession no. AJ 430774.

Results

Enrichment and isolation

Enrichment of ethylbenzene-degrading sulfate-reducing bacteria was attempted in 250 ml-bottles that were inoculated with anoxic marine sediment samples (20 ml) from five different locations in Europe and America. Distinct production of sulfide (≥ 4 mM) in the presence of ethylbenzene in comparison to sulfide production in controls (around 3 mM) was observed after 2-3 months (samples from Venice and Arcachon bay) and 6-7 months (other samples). After transfer of aliquots (20 ml, with proportional amount of sediment) to fresh media, ethylbenzene-dependent sulfide production became more rapid (10 mM after 6-8 weeks), whereas subsequent controls without ethylbenzene no longer produced sulfide. In all subcultures oval cells with gas vesicles were revealed by microscopy. Growth in further subcultures became most rapid with the enrichment culture from Guaymas Basin sediment, which was therefore selected for further experiments. When a sediment-free enrichment culture was obtained after three further transfers, the oval cell type with gas vesicles caused homogeneous turbidity.

Dilution series in anoxic agar overlaid with ethylbenzene in an inert carrier phase yielded small yellowish to brownish colonies after three month. Agar-tubes with a low dilution factor displayed a distinct band of tiny bacterial colonies (< 2 mm) in a distance of 1-2 mm from the overlying hydrocarbon phase, but no colonies towards the bottom of the tube. Agar tubes with high dilution factor showed fewer and bigger colonies (0.5 mm) that were distributed throughout the agar. Colonies transferred to liquid medium with ethylbenzene grew within two month. A few growth tests were carried out with polar aromatic compounds (benzoate, phenylacetate, 3-phenylpropionate; 3 mM each) to reveal substrates that can be applied in further agar dilution series directly in the medium without a carrier phase. Results showed that 3-phenylpropionate was used more rapidly than phenylacetate, whereas benzoate was not used. From colonies grown subsequently in agar with 3-phenylpropionate, six were isolated and first transferred to liquid media containing the same substrate. After growth in this medium, every of the six isolated strains was able to grow again on the original substrate, ethylbenzene. One strain, designated as EbS7, was used for further characterization.

Morphological and other characteristics

Cells of strain EbS7 were rod-shaped, non-motile and formed gas vesicles towards the end of growth (Fig. 1).

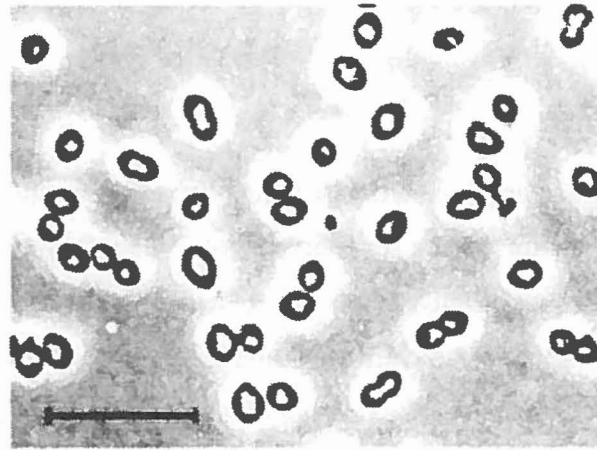


Fig. 1 Phase-contrast photomicrograph of the newly isolated marine sulfate-reducing strain EbS7 grown with ethylbenzene. Bar, 10 μm . Cells contain gas vesicles that are formed towards the end of growth.

Cells were 1.5 by 2-2.3 μm in size. Growth of strain EbS7 was observed within a temperature range of 12 to 35 $^{\circ}\text{C}$ (lower temperatures not tested) with an optimum around 31-32 $^{\circ}\text{C}$, and within a pH range of 6.1 and 7.8 with an optimum around 7.5. Growth was also observed if the original concentration of NaCl and MgCl_2 in the artificial seawater medium (26.4 and 5.7 g/l; see ref. (Widdel and Bak 1992)) was decreased to 10 and 1.7 g/l, respectively, but not in a freshwater medium containing only 1 and 0.4 g, respectively. Most rapid growth was observed with 2, 3 and 5% (vol/vol) ethylbenzene in the carrier phase (heptamethylnonane). With 2% ethylbenzene in the carrier phase, a concentration in the aqueous phase of around 25 μM was measured.

Relationships based on 16 S rRNA gene sequences, and G+C content

Analyses of sequences derived from the 16S rRNA gene revealed an affiliation of strain EbS7 with the δ -proteobacteria (Fig. 2). The closest relatives were sulfate-reducing strain NaphS2 (97.6% similarity) that has been isolated with naphthalene (Galushko et al. 1999), sulfate-reducing strain mXyS1 (96.2% similarity) that has been isolated with *m*-xylene (Harms et al. 1999) and a cloned 16S rRNA gene retrieved from Arctic sediment (Ravenschlag et al. 1999). Furthermore, the data base revealed identity with 550 base pairs of a 16S rRNA gene sequence retrieved from an enrichment culture with ethylbenzene and sediment of Tokyo Bay (Nakagawa et al. 2001). The G+C content of the DNA was 51.8 mol%. Reported G+C values of the aforementioned strains mXyS1 (Galushko et al. 1999) and NaphS2 (personal communication A. Galushko) were 49 and 53.2%, respectively (see Table 2).

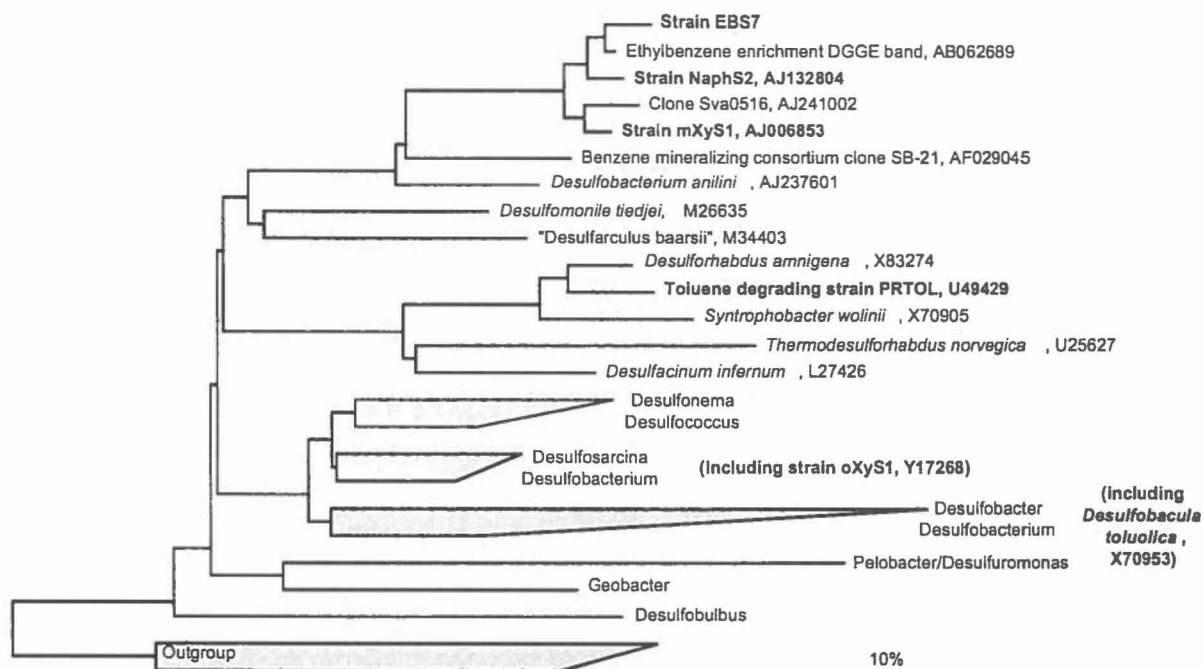


Fig. 2 Phylogenetic 16S rRNA-based tree reflecting the relationships of the newly isolated sulfate-reducing strain EbS7 to a selected number of members of the δ -proteobacteria. Only nearly full-length sequences (>1300 bases) were included for calculation. The tree was corrected by consideration of the different results obtained with various tree reconstruction algorithms. The bar indicates an estimated sequence divergence of 10%. Strains of sulfate-reducing bacteria originally isolated with aromatic hydrocarbons as growth substrates are indicated in bold.

Study of substrate utilization

Growth tests with various aromatic and aliphatic compounds instead of ethylbenzene revealed that strain EbS7 was able to grow also with phenylacetate (1 and 4 mM), 3-phenylpropionate (1 and 4 mM), formate (10 and 20 mM), *n*-hexanoate (1 and 4 mM), lactate (1 and 5 mM) and pyruvate (1 and 5 mM). Most rapid growth and highest cell densities and sulfide concentrations were observed with 3-phenylpropionate; with 4 mM of this substrate, sulfide concentrations of 18 mM were reached within 4-6 weeks, whereas sulfide concentrations with ethylbenzene were never higher than 9 mM within 10-12 weeks. As further hydrocarbons, benzene, toluene, *o*-ethyltoluene, *m*-ethyltoluene, *p*-ethyltoluene, *n*-propylbenzene, *m*-xylene, naphthalene, and ethylcyclohexane (1 and 2% in carrier phase) were tested but did not reveal growth. Also, no growth was observed with 1-phenylethanol (0.5 and 2 mM), acetophenone (0.5 mM), benzoate (1 and 4 mM), 2-phenylpropionate (1 and 2 mM), 4-phenylbutyrate (1, and 4 mM), 4-phenylpentanoate (0.5, 1 and 2 mM), mandelate (0.5 and 2 mM), phenol (0.5 and 2 mM), acetate (5 and 10 mM), succinate (1 and 5 mM), fumarate (1 and 5 mM), malate (1 and 5 mM), ethanol

(5 mM), 1-propanol (1 and 5 mM), 2-propanol (1 and 5 mM), glucose (5 mM) and fructose (5 mM).

Inhibition of ethylbenzene utilization by 1-phenylethanol

1-Phenylethanol, which was not utilized as growth substrate, was a specific inhibitor of growth of strain EbS7 on ethylbenzene. No growth occurred if 0.5 mM 1-phenylethanol was added to cultures with 2% ethylbenzene in the carrier phase. In contrast, growth of strain EbS7 on pyruvate (5 mM) was not affected by 1-phenylethanol (further substrates not tested). Acetophenone (0.5 mM) neither inhibited growth with ethylbenzene nor with pyruvate.

Quantitative growth experiments

Growth and the time course of sulfide production of strain EbS7 with ethylbenzene is shown in Fig. 3. There was no pronounced exponential growth phase; rather, the increase in cell density and sulfide appeared to be linear during nearly the whole growth phase. A semilogarithmic plot of time points from the beginning of growth depicted in Fig. 3 revealed much scattering, such that only a rough estimation of the doubling time was possible; estimates were between 12 and 20 days.

Consumption of organic substrate and sulfate and formation of cell protein during growth of strain EbS7 was quantified in separate experiments with a small and a large amount of ethylbenzene. Results are shown in Table 1. The small amount of ethylbenzene was completely consumed. The amount of ethylbenzene available as electron donor for sulfate reduction (viz. the dissimilated portion) was calculated by subtraction of the assimilated amount (estimated from formed cell protein) from the totally consumed amount. With the small amount of ethylbenzene, the ratio between the amount of electrons available from the dissimilated portion of substrate and the amount of electrons used for sulfate reduction was 1.08. With the high amount of ethylbenzene, the balance revealed a certain surplus of electrons. Volatile fatty acids (acetate, propionate) were not detected in the supernatant of the grown cultures.

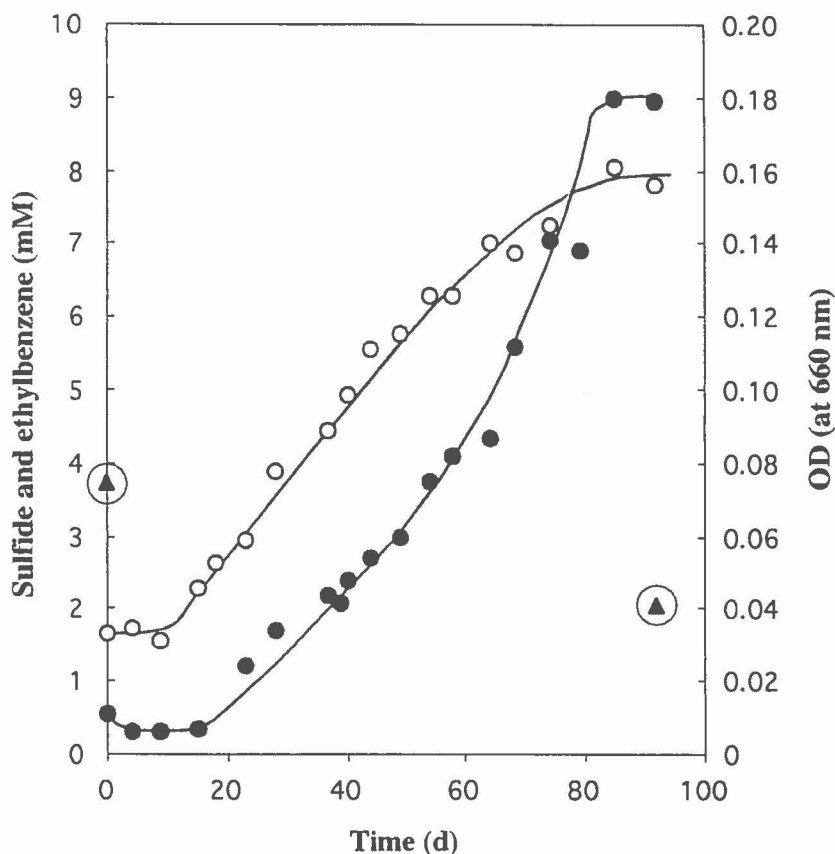


Fig. 3 Increase of cell density (●) and sulfide (○) concentration during anaerobic growth of strain EbS7 with ethylbenzene. Ethylbenzene was quantified only at the beginning and the end of growth (▲). Ethylbenzene was mainly dissolved in a carrier phase of heptamethylnonane, but for convenience the indicated concentration is calculated as attributed exclusively to the aqueous phase. The growth experiment was carried out in a flat 250 ml bottle with 200 ml medium and 0.13 ml ethylbenzene dissolved in 6 ml heptamethylnonane. OD, optical density.

Identification of metabolites

GC-MS analysis of methylated dichloromethane extracts from cultures of strain EbS7 revealed the formation of one major metabolite that was not detectable in cultures grown with *n*-hexanoate or 3-phenylpropionate. This peak was also absent in controls with ethylbenzene but without cells, however, it was present at low relative intensity in controls with ethylbenzene but without sulfate possibly due to residual activity of the cells. The mass spectrometric fragmentation pattern was in agreement with the structure of 4-phenylpentanoic acid methyl ester (Fig. 4). This was confirmed by co-injection experiments with an authentic standard on two different GC columns. In addition, very small relative amounts of two additional metabolites were detected which had significantly longer retention times than 4-phenylpentanoic acid methyl ester. The mass spectra of these two metabolites were very similar with characteristic fragment ions at m/z 250, 219, 190, 187, 177, 159, 145, 131, and 105. These mass spectra were similar to

those of succinic acid dimethyl esters identified as products of anaerobic xylene degradation (Wilkes et al. 2000). The mass spectra of the presently detected metabolites have base peaks at m/z 105. We therefore propose that the two peaks detected upon growth of strain EbS7 represent the two diastereomers of (1-phenylethyl)succinic acid dimethyl esters. Unequivocal assignment of these metabolites was not possible due to lack of authentic standards. The formation of diastereomers due to the activation of hydrocarbons at a non-terminal carbon atom has been demonstrated previously for *n*-hexane degradation by a denitrifying bacterium (Rabus et al. 2001). Benzoate was detected in extracts from cultures of strain EbS7 grown on 3-phenylpropionate, but not in those grown on ethylbenzene; cells of strain EbS7 grown on *n*-hexanoate did not reveal metabolites at detectable concentrations.

Table 1 Quantification of ethylbenzene and sulfate consumption and growth of strain EbS7. Incubation experiments were carried out in anoxic flat bottles with a culture volume of 70 ml. The medium was overlaid with 2 ml of heptamethylnonane as carrier phase for ethylbenzene.

Experiment	Ethylbenzene added (μmol)	Ethylbenzene disappeared (μmol)	Sulfate consumed (μmol)	Cell dry mass formed ^b (mg)	Ethylbenzene dissimilated ^c (μmol)	Electrons from ethylbenzene dissimilated ^d (μmol)	Electrons consumed by SO_4^{2-} reduction ^e (μmol)
Cells with limiting amount of ethylbenzene	44.3	44.3	190	1.26	39.3	1651	1520
Cells with excess amount of ethylbenzene	244.1	168.4	650	3.56	154.4	6485	5200
Cells without ethylbenzene (control)	0	0	33	<0.2			
Sterile medium without cells	242.6	0	0	0			

^aDifference between ethylbenzene added and ethylbenzene recovered at the end of incubation in the carrier phase and aqueous phase.

^bCell dry mass was determined via protein, assuming that the latter accounts for 50 % (wt/wt) of the dry mass.

^cDifference between ethylbenzene consumed and ethylbenzene used for cell synthesis. Ethylbenzene used for cell synthesis was calculated from the produced cell dry mass, assuming the equation $17 \text{ C}_8\text{H}_{10} + 32 \text{ HCO}_3^- + 32 \text{ H}^+ + 30 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 42 \text{ C}_4\text{H}_7\text{O}_3$. Hence, 3.93 μmol of ethylbenzene is required for 1 mg of cell dry mass.

^d42 mol of electrons are derived from 1 mol of ethylbenzene if oxidized to CO_2 .

^e8 mol of electrons are required for complete reduction of 1 mol of SO_4^{2-} to 1 mol of H_2S .

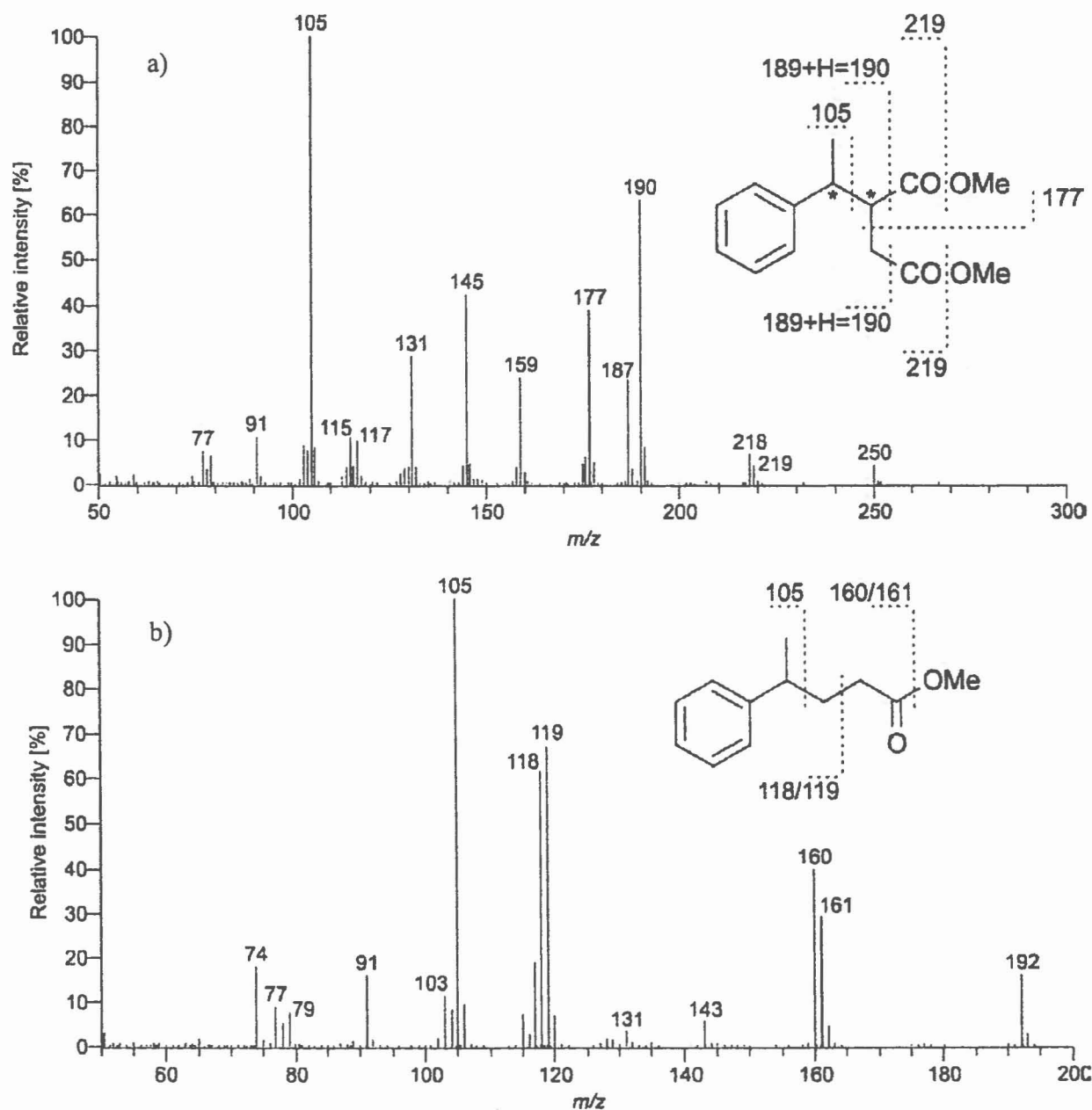


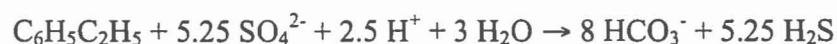
Fig. 4 Mass spectra of the metabolites that are specifically produced by cells of strain EbS7 during growth on ethylbenzene. (a) The metabolite is tentatively identified as (1-phenylethyl)succinate methyl ester. (b) Mass spectrum of 4-phenylpentanoic acid methyl ester.

Discussion

The newly isolated strain EbS7 is the first pure culture of a sulfate-reducing bacterium that grows with the aromatic hydrocarbon, ethylbenzene, as electron donor and carbon source. The same gas vesicle-forming cell type as strain EbS7 was enriched from marine sediment samples of different geographical location; this and the fact that an identical 16S rRNA partial sequence was retrieved from an enrichment culture from Tokyo Bay sediment with ethylbenzene (Nakagawa et al. 2001) suggests that this type is wide-spread in marine sediments. It may be locally enriched under long-term exposure to petroleum contamination.

Strain EbS7 and the closely related two other sulfate-reducing bacteria, strain NaphS2 and mXyS1 (Fig. 2) that utilize naphthalene and *m*-xylene, respectively, may be regarded as a genus. The G+C content of strains EbS7, NaphS2 and mXyS1 is rather similar (Fig. 2). The similarity value between 16S rRNA genes from strains EbS7 and NaphS2 (97.6%) makes it difficult to differentiate whether or not these organisms should be regarded as one species (Stackebrandt and Goebel 1994; Goodfellow et al. 1997). For definite classification in the future, additional characteristics, especially DNA-DNA hybridization data, should be taken into consideration. With respect to nutrition, there are clear differences between these three strains (Table 2). Strain EbS7 does not grow with the hydrocarbons utilized by strain NaphS2 (naphthalene) and mXyS1 (toluene, *m*-xylene, *m*-ethyltoluene), whereas the latter two strains do not utilize ethylbenzene.

The electron balance between the dissimilated portion of consumed ethylbenzene and reduced sulfate is close to 1.0 and can be only explained by assuming a complete oxidation according to the following equation:



This is further supported by the absence of short-chain fatty acids such as acetate in ethylbenzene-grown cultures of strain EbS7; acetate is the characteristic end product of sulfate-reducing bacteria that oxidize their substrates incompletely. The inability of strain EbS7 to grow with free acetate does not contradict an assumed capacity for complete oxidation. Several sulfate-reducing bacteria, which oxidize organic compounds other than acetate completely to CO₂, were also unable to grow on free acetate (Rabus et al. 2000), possibly due to the lack of a mechanism for acetate activation to acetyl-CoA. There is presently no explanation for the surplus of electrons from ethylbenzene. In the case of the high amount of ethylbenzene, the surplus corresponds to approximately 20% of the totally consumed substrate (2.3 mmol/l). If one assumes that this surplus is present in excreted organic metabolites, their concentration would have to be in the range of 400 μmol/l. Since metabolites at this concentration were not detectable with the presently ap-

plied analytical techniques, the deviation of the electron balance from 1.0 can presently not be explained. Also in other sulfate-reducing bacteria utilizing hydrocarbons, there was always a certain surplus of electrons from the consumed organic substrate (Rabus et al. 1993; Rueter et al. 1994; Beller et al. 1996).

In contrast to denitrifying strains that grow on ethylbenzene (Rabus and Widdel 1995; Ball et al. 1996), the sulfate-reducing strain EbS7 does not grow on 1-phenylethanol and acetophenone. If one assumes that these compounds as hydrophobic substances diffuse into the cell, the finding with strain EbS7 suggests that 1-phenylethanol and acetophenone are no free intermediates in the metabolism of ethylbenzene in this bacterium. In contrast, denitrifying bacteria oxidize ethylbenzene via free 1-phenylethanol and acetophenone that can be detected in culture supernatants (Ball et al. 1996; Rabus and Heider 1998; Champion et al. 1999). The assumption of an alternative route for ethylbenzene degradation in the sulfate-reducing bacterium is further supported by metabolite analyses in bacterial communities enriched with ethylbenzene and sulfate (Elshahed et al. 2001). 1-Phenylethanol and acetophenone were not detected, rather, 3-phenyl-1,2-butanedicarboxylate [(1-phenylethyl)succinate] was identified pointing at an activation analogous to that of toluene with fumarate as a co-substrate. Also specific formation of (1-phenylethyl)succinate and 4-phenylpentanoate during ethylbenzene degradation by strain EbS7 cannot be explained by an oxidation pathway via 1-phenylethanol and acetophenone. Rather, the formation of 4-phenylpentanoate would be in accordance with an ethylbenzene-activation with fumarate as co-substrate if one assumes that the activation product (1-phenylethyl)succinate undergoes carbon skeleton rearrangement (probably as thioester) and decarboxylation analogous to reactions in the anaerobic metabolism of *n*-alkanes (Wilkes et al. 2001). Rearrangement of (1-phenylethyl)succinyl-CoA (like rearrangement of succinyl-CoA during propionate fermentation) would yield (1-phenylpropyl)malonyl-CoA. The decarboxylation of this product (e.g. via a transcarboxylase) would yield 4-phenylpentanoyl-CoA, the thioester of the presently detected metabolite (Fig. 5). After one round of β -oxidation and thiolitic cleavage, the methyl branch in the resulting 2-phenylpropionate would prevent a next round of regular β -oxidation. A further carbon skeleton rearrangement may therefore take place, analogous to isomerization of isobutyryl-CoA to butyryl-CoA (Stieb and Schink 1989; Burkhardt et al. 1998; Zerbe-Burkhardt 1998); however, such a reaction in strain EbS7 is purely speculative at the present stage of results. 2-Phenylpropionate could also be further degraded via 2-phenylmalonic semialdehyde to phenylacetate analogous to reactions in the metabolism of isobutyrate in the sulfate reducing strain *Desulfococcus multivorans* (Stieb and Schink 1989).

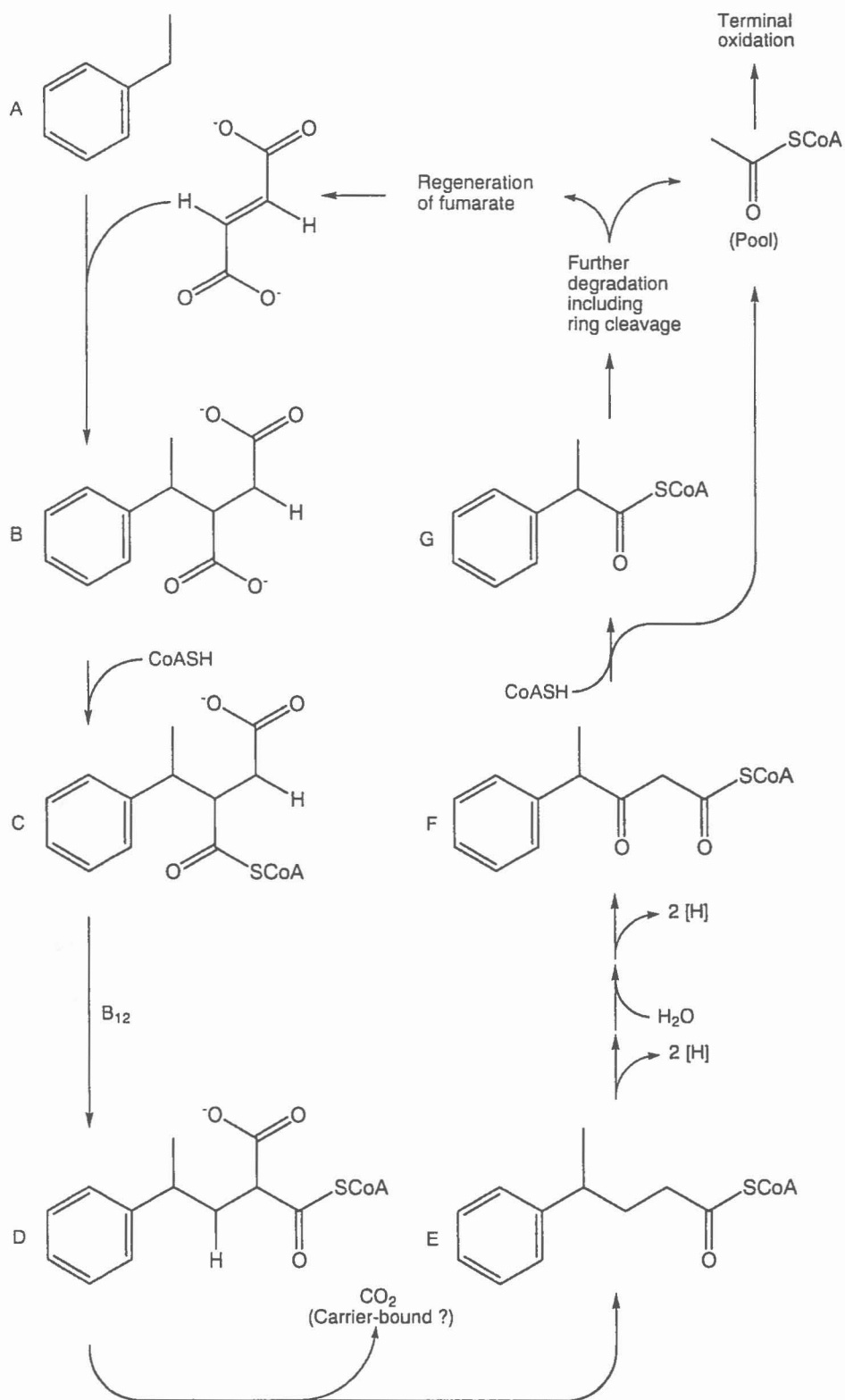


Fig. 5 Proposed pathway for the degradation of ethylbenzene by the sulfate-reducing strain EbS7: A, ethylbenzene; B, (1-phenylethyl)succinate; C, (1-phenylethyl)succinyl-CoA; D, (2-phenylpropyl)malonyl-CoA; E, 4-phenylpentanoyl-CoA; F, 3-oxopentanoyl-CoA; G, 2-phenylpropionyl-CoA.

The inhibition of growth on ethylbenzene by 1-phenylethanol not only confirms the assumed diffusion of this alcohol into the cell (see above), but is also another evidence for an initial reaction of ethylbenzene in strain EbS7 analogous to that of toluene in various anaerobes. The metabolism of toluene is specifically inhibited by benzyl alcohol (Rabus et al. 1993; Biegert and Fuchs 1995; Rabus and Widdel 1995). Likewise, 1-phenylethanol as the higher homologue of benzyl alcohol may interfere with the activation of ethylbenzene as the higher homologue of toluene.

The oxidation of ethylbenzene to 1-phenylethanol as it occurs in denitrifiers has a redox potential of -0.012 to +0.03 V (Johnson and Spormann 1999; Kniemeyer and Heider 2001). For effective conversion of ethylbenzene to 1-phenylethanol, the electron acceptor is expected to have an even more positive redox potential. In extracts of the denitrifiers, benzoquinone and ferricenium (standard redox potentials at pH 7, +0.293 and +0.38 V, respectively) could serve as artificial electron acceptors and the natural electron acceptor may have a similarly high redox potential. Electron acceptors with such positive redox potentials may not be compatible with the metabolism of a sulfate-reducing bacterium, where reaction occurs on the average at rather negative redox potentials. In contrast, an alternative activation mechanism of ethylbenzene involving addition to fumarate by a radical reaction would be also feasible at low redox potentials, as obvious from the formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate in sulfate-reducing bacteria (Beller and Spormann 1997; Rabus and Heider 1998). The radical is generated by a reductive mechanism (Heider et al. 1999; Spormann and Widdel 2000; Widdel and Rabus 2001.)

Table 2 Comparison of characteristics of the newly isolated strain EbS7 and the phylogenetically closely related strains NaphS2 (Galushko, Minz et al. 1999) and mXyS1 (Harms, Rabus et al. 1999).

	Strain		
	EbS7	NaphS2	mXyS1
Cell size (μm)	1.5×2-2.3	1.3×1.3-1.9	0.6-1×1-2
G+C content (mol%)	51.8	53.2 ^a	49.0
Tested as electron donor			
Toluene		-	- +
Ethylbenzene		+	- -
<i>m</i> -Xylene		-	- +
<i>m</i> -Ethyltoluene		-	- +
Naphtalene		-	+ -
Benzoate		-	+ +
Formate		+	- +
Acetate		-	+ +
Pyruvate		+	+ +
3-Phenylpropionate		+	+ ^a n.d.

^aPersonal communication A. Galushko

Acknowledgement

We are indebted to the crew of RV ATLANTIS (Woods Hole, USA) and to Karsten Zengler (Bremen) for providing sediment samples from Guaymas Basin. We thank Manabu Fukui (Tokyo) for stimulating discussions, Alexander Galushko for providing unpublished data and Carsten Bolm (Aachen) for NMR spectra of the 4-phenylpentanoate standard.

This work was supported by EU grant EVK3-1999-00043 (MATBIOPOL) and the Max-Planck-Gesellschaft.

References

- Aeckersberg F, Bak F, Widdel F (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate reducing bacterium. *Arch Microbiol* 156:5-14
- Ball, HA, Johnson HA, Reinhard M, Spormann AM (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J Bacteriol* 178:5755-5761
- Beller HR, Edwards EA (2000) Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Appl Environ Microbiol* 66:5503-5505
- Beller HR, Spormann AM (1997) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J Bacteriol* 179:670-676
- Beller HR, Spormann AM (1997) Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl Environ Microbiol* 63:3729-3731
- Beller HR, Spormann AM, Sharma PK, Cole JR, Reinhard M (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 62:1188-1196
- Biegert T, Fuchs G (1995) Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch Microbiol* 163:407-417
- Biegert T, Fuchs G, Heider J. (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur J Biochem* 238:661-668
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Buchholz-Cleven BEE, Rattunde B, Straub KL (1997) Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. *System. Appl Microbiol* 20:301-309
- Burkhardt K, Philippon N, Robinson JA (1998) Isobutyryl-CoA mutase from Streptomyces. In: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT (ed.) *Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins*. Wiley-VCH, Weinheim, p. 265-271
- Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochemistry* 81:461-466

- Champion KM, Zengler K, Rabus R (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate induced pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:157-164
- Chen CI, Taylor RT (1997) Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:121-128
- Chen EY, Seeburg PH (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170
- Cline JD (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr* 14:454-458
- Coates JD, Anderson RT (2000) Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends Biotechnol* 18:408-412
- Cord-Ruwisch R (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Meth* 4:33-36
- Coschigano PW, Wehrmann TS, Young LY (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl Environ Microbiol* 64:1650-1656
- Elshahed MS, Gieg LM, McInerney MJ, Suflita JM (2001) Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environ Sci Technol* 35:682-689
- Galushko A, Minz D, Schink B, Widdel F (1999) Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ Microbiol* 1:415-420
- Gieg LM, Kolhatkar RV, McInerney MJ, Tanner RS, Harris, SH, Sublette KL, Suflita JM (1999) Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminated aquifer. *Environ Sci Technol* 33:2550-2560
- Goodfellow M, Manfio GP, Chun J (1997) Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR (ed.) *The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp 25-59
- Harms G, Zengler K, Rabus R, Aeckersberg F, Minz D, Rossello-Mora R, Widdel F (1999) Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65:999-1004
- Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* 22:459-473

- Johnson HA, Pelletier DA, Spormann AM (2001) Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol* 183:4536-4542.
- Johnson HA, Spormann AM (1999) In vitro studies on the initial reactions of anaerobic ethylbenzene mineralization. *J Bacteriol* 181:5662-5668
- Jørgensen BB (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed-the role of sulphate reduction. *Nature* 296:643-645
- Kniemeyer O, Heider J (2001) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J Biol Chem* 276:21381-21386
- Kniemeyer O, Heider J (2001) (*S*)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch Microbiol* 176:129-135
- Lovley DR (2000) Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation* 11:107-116
- Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB (1989) Precise measurement of the G+C content of desoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39:159-167
- Nakagawa T, Sato S, Yamamoto Y, Fukui M. 2001. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Wat Res*, in press
- Phelps CD, Young LY (1999) Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10:15-25
- Phelps CD, Young LY (2001) Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: A review. *Advan Agron* 70:329-357
- Rabus R, Hansen T, Widdel F (2000) Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes, chapter 274. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenber E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed.) *The Prokaryotes-An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* (www.prokaryotes.com). Springer, New York, pp 1-87
- Rabus R, Heider J (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol* 170:377-384
- Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 59:1444-1451
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163:96-103
- Rabus R, Widdel F (1995) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch Microbiol* 164:448-451

- Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, Widdel F (2001) Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J Bacteriol* 183:1707-1715
- Ravenschlag K, Sahn K, Pernthaler J, Amann R (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 65:3982-3989
- Reinhard M, Shang S, Kitanidis PK, Orwin E, Hopkins GD, Lebron CA (1997) In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environ Sci Technol* 31:28-36
- Rueter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey FA, Jannasch HW, Widdel F (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372:455-458
- Spormann AM, Widdel F (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11:85-105
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849
- Stieb M, Schink B (1989) Anaerobic degradation of isobutyrate by methanogenic enrichment cultures and by a *Desulfococcus multivorans* strain. *Arch Microbiol* 151:126-132
- Strunk O, Gross O, Reichel B, May M, Hermann S, Stuckmann N, Nonhoff B, Lenke M, Ginhart T, Vilbig A, Ludwig T, Bode A, Schleifer K-H, Ludwig W (2001) ARB: a software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technische Universität München, Germany.
- Weber A, Jørgensen BB (2001) Bacterial sulfate reduction in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin of California, Mexico. *Deep-Sea Research I*, in press
- Widdel F (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur reducing bacteria. In: Zehnder, AJB (ed.) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, pp 469-585
- Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin W, Harder W, Schleifer K-H (ed.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer, Berlin, p. 3352-3378
- Widdel F, Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12:259-276

- Wilkes H, Boreham C, Harms G, Zengler K, Rabus R (2000) Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. *Org Geochem* 31:101-115
- Wilkes H, Rabus R, Fischer T, Armstroff A, Behrends A, Widdel F (2001) Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium: Further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Arch Microbiol* in press
- Zengler K, Heider J, Rossello-Mora R, Widdel F (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdes*. *Arch Microbiol* 172:204-212
- Zerbe-Burkhardt K, Ratnatilleke A, Philippon N, Birch A, Leiser A, Vrijbloed JW, Hess D, Hunziker P, Robinson JA (1998) Cloning, sequencing, expression, and insertional inactivation of the gene for the large subunit of the coenzyme B12-dependent isobutyryl-CoA mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *J Biol Chem* 273:6508-6517
- Zwolinski MD, Harris RF, Hickey WJ (2000) Microbial consortia involved in the anaerobic degradation of hydrocarbons. *Biodegradation* 11:141-158.

C Weitere Publikationen

1 Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on dimethylmalonate

Kniemeyer O, Probian C, Harder J (1999)

Applied & Environmental Microbiology 65: 3319-3324

D Anhang

1. Analyse induzierter Polypeptide bei Wachstum des Stammes EbN1 auf Ethylbenzol mittels 2D-Elektrophorese

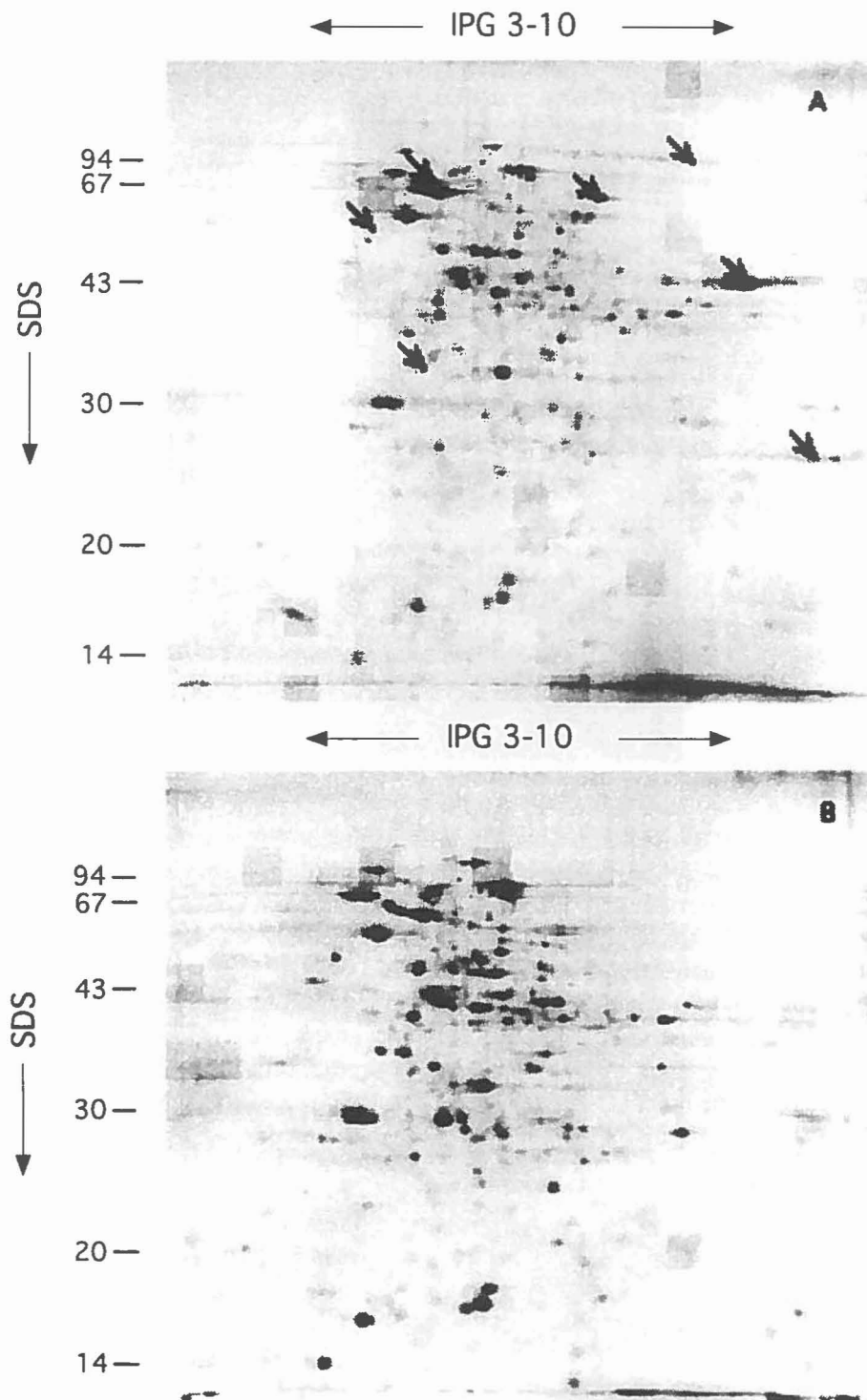


Abb. D1 Zweidimensionales gelelektrophoretisches Polypeptidmuster von (A) auf Ethylbenzol gewachsenen Zellen des Stammes EbN1 im Vergleich zu auf (B) 1-Phenylethanol gewachsenen Zellen. Die Zellproteine wurden in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (Trennung von links nach rechts) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekularmasse (Trennung von oben nach unten) aufgetrennt. Die Polypeptide wurden durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen die Polypeptide, die in Stamm EbN1 nur bei Wachstum auf Ethylbenzol zusätzlich vorhanden waren. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 180 μ g.

2. Amplifikation der N-terminalen Gensequenz der α -Untereinheit der Ethylbenzol-Dehydrogenase aus *Azoarcus* Stamm EbN1 mittels PCR

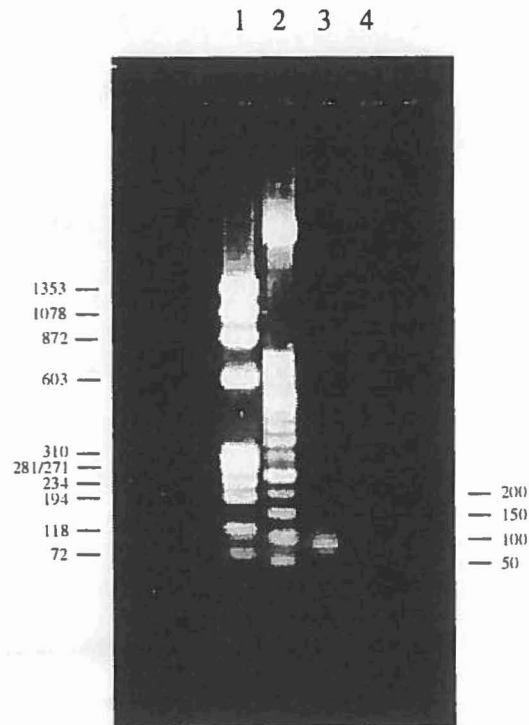


Abb. 2D Analyse eines PCR-Produktes nach Amplifikation der N-terminalen Sequenz der α -Untereinheit der Ethylbenzol-Dehydrogenase. Mit einem von der Aminosäuresequenz des N-Terminus abgeleiteten degeneriertem Primerpaar (Primer 1, 5'GGSACSAAGGCSCCSGGSTA 3'; Primer 2, 5'TTSACCTTRTCCCACCTTCCA 3') konnte ein 72 Basenpaare großes Fragment amplifiziert werden. Die Sequenzierung des PCR-Produktes ergab eine Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der Ethylbenzol-Dehydrogenase am N-Terminus. Dreißig Basenpaare (8.-17. Aminosäure des N-Terminus) konnten sequenziert werden: GCG AGT TGG GAA GAC ATC TAT CGC AAA GAG. Bahn 1 und 2, DNA Größenmarker; Bahn 3 erhaltenes PCR Produkt mit degeneriertem Primerpaar; Bahn 4 Negativkontrolle der PCR-Amplifikation ohne DNA-Template.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Widdel für die Betreuung der Arbeit bedanken. Er hatte bei Fragen und Problemen immer ein offenes Ohr.

Herr Prof. Fuchs gab seine Zustimmung für mehrere Forschungsaufenthalte in seinem Labor in Freiburg, und mit Priv.-Doz. Dr. Johann Heider hatte ich dort einen sehr netten und kompetenten Betreuer an meiner Seite, der viel dazu beitrug, daß meine Aufenthalte dort erfolgreich waren. Er war auch bereit, daß Zweitgutachten für diese Doktorarbeit zu schreiben. Dr. Martina Jahn half mir bei der Molekularbiologie und Christina Leutwein durch Ratschläge und "Sachmittel" bei der Biochemie. Die gesamte Arbeitsgruppe beeindruckte mich immer wieder durch ihre große Hilfsbereitschaft. Die Freiburg-Aufenthalte haben mir immer sehr viel Spaß gemacht. Allen sei hier herzlich gedankt.

Ein großer Dank gebührt auch allen inner- und außerhalb des Institutes durch die diese Arbeit erst ermöglicht wurde. Zu nennen wären da die ARB-, FISH- und Klonierungsexperten Stefan Sievert, Katrin Knittel und Frank Oliver Glöckner, die mir auch in der stressigen Endphase des Zusammenschreibens immer schnell helfen konnten. Heinz Wilkes und Thomas Fischer führten für mich die GC-MS-Analysen durch. Auch ihnen sei hierfür gedankt.

Mein Dank gilt weiterhin allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, die irgendwie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dank vieler netter Kollegen und Kolleginnen hatte ich bei der Arbeit, aber auch an so manchen Abenden eine Menge Spaß. Auch den Korrekturlesern Cathrin Wawer, Udo Heyen, Jens Harder und Ruth Meinke gebührt großer Dank.

Bei meinen Eltern und meiner "WG" möchte ich mich für die immer gewährte Unterstützung danken. Besonders großer Dank gilt Ruth für ihre großartige Hilfe und ihr Verständnis.

