

**Physiologie und substratspezifische Proteinbildung
denitrifizierender Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben
Oxidation kurzkettiger Alkane**

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen

vorgelegt von

Astrid Behrends

aus Varel

Bremen 1999

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Zeit von Juli 1995 bis September 1998 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek

Tag des Promotionskolloquiums: 30. April 1999

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

I.	Einleitung	1
	1. Gesättigte Kohlenwasserstoffe - ein Überblick	1
	1.1. Struktur und Eigenschaften	1
	1.2. Vorkommen	3
	2. Mikrobieller Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen (<i>n</i> -Alkane) und alizyklischen Kohlenwasserstoffen (Cycloalkane)	5
	2.1. Mikrobieller Abbau von <i>n</i> -Alkanen in Gegenwart von Sauerstoff	6
	2.2. Mikrobieller Abbau von Cycloalkanen in Gegenwart von Sauerstoff	9
	2.3. Mikrobieller Abbau von Alkanen in Abwesenheit von Sauerstoff	10
	3. Zielsetzungen	12
II.	Material und Methoden	14
	1. Chemikalien und Gase	14
	2. Mikrobiologische Methoden	14
	2.1. Probenmaterial und Mikroorganismen	14
	2.2. Kulturmedien	15
	2.2.1. Zusammensetzung und Herstellung von Medium für die anaerobe Kultivierung	15
	2.2.2. Herstellung fester Nährböden	16
	2.2.3. Medienzusätze	17
	2.2.3.1. Vitamin- und Spurenelementlösungen	17
	2.2.3.2. Ascorbat-Lösung als Reduktionsmittel	18
	2.2.3.3. Eisen(II)sulfid-Suspension	19
	2.2.3.4. Natriumbicarbonat-Lösung	19
	2.2.3.5. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen	20
	2.2.3.6. Elektronenakzeptoren	23
	2.3. Isolierung und Anreicherung von nitratreduzierenden Mikroorganismen	24
	2.3.1. Anreicherung	24
	2.3.2. Isolierung	24
	2.3.2.1. Agarverdünnungsreihen	24
	2.3.2.2. Bottle Plates	25

2.3.2.3. Flüssige Verdünnungsreihen	26
2.4. Kultivierungsmethoden in unterschiedlichen Experimenten	26
2.4.1. Stammhaltung	26
2.4.2. Reinheitskontrollen	27
2.4.3. Zellanzucht zur physiologischen Charakterisierung	27
2.4.3.1. Bestimmung des Temperaturoptimums	27
2.4.3.2. Bestimmung des pH-Optimums	27
2.4.3.3. Substratspektrum	28
2.4.3.4. Ermittlung des Vitaminbedarfs	28
2.4.3.5. Aerobe Wachstumstests	28
2.4.4. Zellanzucht zur Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation	28
2.4.5. Massenanzuchten für biochemische und genetische Untersuchungen	29
2.4.6. Zellernte	30
2.5. Herstellung von Zellsuspensionen für Induktionsstudien	30
2.6. Herstellung von Zellextrakten für gelelektrophoretische Analysen	31
2.7. Herstellung von Zellextrakten für enzymatische Tests	32
2.8. Bestimmung von Zelltrockenmasse	33
3. Analytische Methoden	33
3.1. Nachweis von Nitrat und Nitrit	33
3.2. Bestimmung von Distickstoffoxid	34
3.3. Bestimmung von Ammonium	34
3.4. Gaschromatographische Analyse von Kohlenwasserstoffen	35
3.4.1. Bestimmung von Hexan in der organischen Phase (HMN)	35
3.4.2. Bestimmung von Cyclohexan in der organischen Phase (HMN)	36
3.4.3. Bestimmung von kurzkettigen, aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Erdöl mittels Headspace-Analyse	37
3.5. Analyse von Zellfettsäuren	37
4. Proteinbiochemische Methoden	40
4.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese	40
4.1.1. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	40
4.1.1.1. Herstellung der Iso-Gele	40
4.1.1.2. Vorfokussierung	42
4.1.1.3. Isoelektrische Fokussierung der Proteinproben	42
4.1.2. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
4.1.2.1. Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gradientengele	44

4.1.2.2. SDS-PAGE	46
4.1.3. Coomassie Blue Färbung der SDS-Gele	48
4.2. Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Polyvinylidenfluorid-Membranen	48
4.2.1 Coomassie Blue Färbung der PVDF-Membranen	50
4.3. Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen	52
4.4. Nachweis von Enzymaktivitäten unter anoxischen Bedingungen	52
4.5. Proteinbestimmung nach Bradford	53
5. Molekularbiologische Methoden	54
5.1. Bestimmung der 16S rRNA-Gensequenzen	54
5.2. Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA	54
5.3. DNA-DNA-Hybridisierung	54
III. Experimente und Ergebnisse	55
Teil A:	
Anaerobe Oxidation von aliphatischen, gesättigten Kohlenwasserstoffen durch denitrifizierende Mikroorganismen	55
1. Anreicherung und Isolierung eines zur anaeroben Oxidation von Hexan befähigten Nitratreduzierers	55
1.1. Anreicherung	55
1.2. Isolierung	56
2. Phylogenetische Verwandtschaft des Neuisolates HxN1	58
2.1. Phylogenetische Einordnung des Stammes HxN1 aufgrund der 16S rRNA-Sequenzanalyse	58
2.2. DNA-DNA-Hybridisierung und G+C-Gehalt	58
3. Charakterisierung des Stammes HxN1	60
3.1. Morphologie	60
3.2. Temperatur- und pH-Optimum	61
3.3. Vitaminabhängigkeit	61
3.4. Optimierung des Wachstums durch schüttelnde Inkubation	62
3.5. Verträglichkeit des Substrates Hexan	62
3.6. Substrattest	64
3.7. Aerober Wachstumstest	67
3.8. Elektronenakzeptoren	67
4. Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation und Wachstumskurve von Stamm HxN1	68

5. Anaerobes Wachstum des Stammes HxN1 auf Erdöl	72	
6. Analyse der Zellfettsäuren in Abhängigkeit des Wachstumssubstrates	75	
7. Induktionsstudien mit Stamm HxN1	77	
7.1. Induktionsstudien zur Verwertung von Alkanen und Fettsäuren	77	
7.2. Untersuchung der Fähigkeit zur Oxidation von 1-Hexanol	80	
8. Analyse der Gesamtzellproteine von alkanverwertenden Denitrifizierern in der zweidimensionalen Gelelektrophorese	83	
8.1. Analyse der Gesamtzellproteine des Stammes HxN1	83	
8.2. Analyse der Gesamtzellproteine des Stammes OcN1	87	
8.3. Vergleichende Betrachtung der 2D-Elektrophorese-Analysen der Stämme HxN1 und OcN1	89	
9. N-terminale Aminosäuresequenzen einiger in Stamm HxN1 auf Hexan gebildeter Proteine	89	
10. Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm HxN1	90	
Teil B:		
Anaerobe Oxidation des alizyklischen, gesättigten Kohlenwasserstoffs Cyclohexan durch denitrifizierende Mikroorganismen		92
1.1. Anreicherungskultur mit Cyclohexan unter denitrifizierenden Bedingungen	92	
1.2. Bilanzierung des anaeroben Abbaus von Cyclohexan in der Anreicherungskultur	94	
IV. Diskussion	96	
1. Anaerobe Oxidation von gesättigten Kohlenwasserstoffen durch denitrifizierende Mikroorganismen	96	
1.1. Anaerobe Oxidation aliphatischer Kohlenwasserstoffe durch Stamm HxN1	96	
1.2. Anaerobe Oxidation von alizyklischen Kohlenwasserstoffen in einer Mischkultur	99	
2. Taxonomische Einordnung des alkanverwertenden Stammes HxN1	100	
3. Biochemische Überlegungen zum Mechanismus der anaeroben Oxidation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen	105	
3.1. Alkene als mögliche Intermediate der anaeroben Alkanoxidation	105	
3.2. Addition einer Kohlenstoffeinheit als initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation	108	

3.2.1. Carbonylierung als mögliche Aktivierungsreaktion von Alkanen	108
3.2.2. Addition von Fumarat als mögliche Aktivierung von Alkanen	113
3.2.3. Biochemische Betrachtungen zur homolytischen Spaltung der C-H-Bindung	120
V. Zusammenfassung	123
VI. Literatur	125
VII. Anhang	

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
(bi)dest.	(Bi)destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
CoA (CoA-SH)	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
2D	Zweidimensional
d	Tag(e)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	1,4-Dithiothreit
ΔG°	Änderung der freien (Gibbs'schen) Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen (pH = 7,0; [1 M])
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph(ie)
G+C	Guanin + Cytosin
h	Stunden
[H]	Reduktionsäquivalente
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HMW	High Molecular Weight
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
l	Liter
LMW	Low Molecular Weight

m	Meter
M	Molar [1 M = 1 mol/l]
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MPa	Megapascal
N	Normal
NP40	Nonidet P40 = Ethylphenolpoly(ethylenglykolether) _n
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Pa	Pascal [1 Pa]
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
psi	Pounds per Square Inch
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
s(p)p.	Spezies
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Zitronensäurezyklus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent, bezogen auf Volumen

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
D	Aspartat
N	Asparagin

C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutamat
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

I. Einleitung

Seit Beginn des 19. Jahrhunderts sind Mikroorganismen bekannt, die in Gegenwart von Sauerstoff mit gesättigten Kohlenwasserstoffen (Alkanen) wachsen. Die zahlreichen beschriebenen Mikroorganismen, sowohl Bakterien als auch Pilze, benötigen Sauerstoff nicht nur als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette, sondern nutzen ihn auch für den primären enzymatischen Angriff der Alkane.

Lange Zeit wurde daher bezweifelt, ob eine mikrobielle Umsetzung der als reaktionsträge bekannten Alkane in Abwesenheit von Sauerstoff überhaupt möglich ist. Erst Anfang der neunziger Jahre gelang mit der Isolierung eines sulfatreduzierenden Bakteriums aus einer Erdölförderanlage der eindeutige Nachweis, daß auch unter Ausschluß von Sauerstoff eine mikrobielle Alkanoxidation möglich ist. Seitdem folgten weitere Isolierungen von Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation langkettiger Alkane.

Die Frage, wie den Bakterien der primäre enzymatische Angriff auf die Alkanmoleküle gelingt, konnte jedoch bisher nicht beantwortet werden. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente mit einem zur anaeroben Oxidation von kurzkettigen Alkanen befähigten denitrifizierenden Bakterium sollen zur Beantwortung dieser Frage beitragen.

1. Gesättigte Kohlenwasserstoffe - ein Überblick

1.1. Struktur und Eigenschaften

Gesättigte Kohlenwasserstoffe, auch als Alkane und Paraffine bezeichnet, bestehen nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen. Als Strukturen sind Verbindungen mit unverzweigtem (*n*-Alkane) und verzweigtem Kohlenstoffgerüst (Isoalkane) mit der allgemeinen Molekularformel C_nH_{2n+2} sowie Verbindungen mit ringförmigem Kohlenstoffgerüst (Cycloalkane) mit der allgemeinen Molekularformel C_nH_{2n} bekannt.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Alkane sind durch die Molekülstruktur und die Anzahl der Kohlenstoffatome geprägt. Unter Normalbedingungen liegen die Alkane C_1 bis C_4 im gasförmigen, die Alkane C_5 bis C_{16} im flüssigen und die längerkettigen Alkane im festen Zustand vor. Eigenschaften, wie die Löslichkeit in Wasser sowie die Siede- und Schmelzpunkte, ändern sich mit zunehmender Kohlenstoffzahl. Während die Löslichkeit der Alkane in Wasser mit steigender Kohlenstoffatomzahl abnimmt, steigen die Siede- und Schmelzpunkte mit zunehmender Kettenlänge.

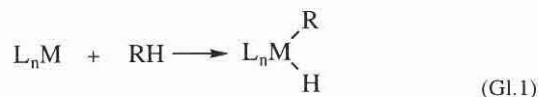
Die geringe Polarität der Bindungen (C-H, C-C) bedingt, daß das Dipolmoment aller gesättigten Kohlenwasserstoffe nahezu Null ist. Dieser unpolare Charakter erklärt die schlechte Löslichkeit von Alkanen in extrem polaren Lösungsmitteln, z. B. in Wasser, und

ebenso die gute Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln, z. B. in anderen Kohlenwasserstoffen (Christen 1985).

Hinsichtlich des chemischen Reaktionsverhaltens gelten Alkane als äußerst reaktionsträge. So sind sie gegenüber den meisten Reagenzien (konzentrierten Säuren, Alkalimetallen, Sauerstoff) bei Raumtemperatur praktisch völlig inert. Die ältere Bezeichnung Paraffin bringt diese Reaktionsträgheit bereits durch den Wortstamm zum Ausdruck (lat. parum = wenig; affinis = geneigt). Zurückführen läßt sich dieser reaktionsträge Charakter darauf, daß in den Kohlenwasserstoffgerüsten nur unpolarisierte σ -Bindungen enthalten sind und keine einsamen Elektronenpaare oder frei bindenden Orbitale zur Verfügung stehen.

Dennoch lassen sich sowohl in der Chemie als auch in der Biologie Reaktionen von Alkanen finden. Der erste Schritt der Alkanreaktion ist in jedem Fall die Aktivierung der unpolaren C-H-Bindung. Dies geschieht bei den meisten aus der Chemie bekannten Reaktionen durch den Angriff besonders aktiver Reagenzien (einige Radikale, Supersäuren, Fluor, Chlor, Carbene) und unter extremen Reaktionsbedingungen (hohe Temperaturen, Druck- und Lichteinfluß; Christen 1985). Die unter solchen Bedingungen ablaufenden Reaktionen erfolgen fast stets unter der homolytischen Spaltung der unpolaren C-H-Bindung und somit mit freien Radikalen als Zwischenstufen. Der Nachteil bei einer praktischen Anwendung dieser über radikalische Zwischenstufen verlaufenden Form der Alkanreaktion ist die nicht bestehende Selektivität der Reaktion, die bei Syntheseprozessen zu ungewünschten Nebenprodukten führt.

Seit Mitte der sechziger Jahre sind auch Alkanreaktionen bekannt, in denen die C-H-Bindung unter milden Bedingungen aktivierbar ist. Eine Aktivierung erfolgt in diesen Reaktionen durch die Beteiligung von Metallkomplexen. Im bekanntesten Mechanismus dieser Alkanaktivierung kommt es zur Addition des Alkans an ein koordinativ ungesättigtes Metallzentrum (Hill 1989). In dem neugebildeten Komplex sind ein Hydridion und ein Carbanion als weitere Liganden des Metalls gebunden (Gl. 1: L=Ligand, M=Metallzentrum, RH=Alkan).



Der an das Metall gebundene Alkylrest kann in weiteren Schritten zu definierten Produkten reagieren. Unter Beteiligung der Übergangsmetalle Rhenium, Rhodium und Iridium konnte durch einen solchen Aktivierungsmechanismus z. B. die Dehydrogenierung von Alkanen zu

Alkenen (Baudry et al. 1983) und die Carbonylierung von Alkanen zu Aldehyden (Sakakura und Tanaka 1987) erreicht werden.

Die bisher aus biologischen Systemen bekannten Reaktionen von Alkanen erfolgen ebenfalls unter Beteiligung von Übergangsmetallkomplexen. Sie sind Bestandteil der aktiven Zentren der Enzyme, die den ersten Schritt der biologischen Alkanoxidation katalysieren. Sie bewirken jedoch nicht im ersten Schritt der Reaktion die direkte Aktivierung der C-H-Bindung des Alkans. Das Metall lagert hier, anders als in den chemischen Reaktionen, zunächst molekularen Sauerstoff an. Das durch teilweise Reduktion aktivierte Sauerstoffatom spaltet dann in einem radikalischen Mechanismus die C-H-Bindung des Alkans homolytisch. Das dabei gebildete Alkylradikal vereinigt sich anschließend mit einem OH-Radikal zu einem Alkohol. Die Rolle im mikrobiologischen Stoffwechsel und das Vorkommen der nach solchem Reaktionsmechanismus funktionierenden Enzyme wird im weiteren näher erläutert.

1.2. Vorkommen

Alkane haben ihr größtes natürliches Vorkommen in Erdgas und in Erdöl. Erdgas besteht hauptsächlich aus kurzkettigen Alkanen, wobei das strukturell einfachste Alkan Methan mit 81-83 % den Hauptanteil einnimmt. Erdöl ist hingegen ein komplexeres Substanzgemisch aus gesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen, Harzen und Asphaltene, in dem die Alkane jedoch auch den Hauptanteil darstellen. Entsprechend ihrer Herkunft, ihres Ursprungs (Art des organischen Materials) und der Alterung unterscheiden sich die Erdöle im Gehalt der Alkane. Eine Untersuchung von 517 verschiedenen Erdölen ergab einen durchschnittlichen Anteil der Alkane von 57,2 % (Tissot und Welte 1984). Die Alkane liegen als *n*-Alkane, Isoalkane oder Cycloalkane vor und weisen verschiedenste Kettenlängen mit bis zu 40 Kohlenstoffatomen auf (Tissot und Welte 1984). Die Zusammensetzung der jeweiligen Alkane ist für jedes Erdöl charakteristisch.

In wesentlich kleineren Konzentrationen lassen sich Alkane als Bestandteile vieler lebender Organismen finden. Sie sind in Bakterien, Pflanzen und Tieren enthalten (Kolattukudy 1976). Bei Untersuchungen phototropher Bakterien und Bakterien der Gattung *Micrococcus* sowie in vielen marinen Algen und Süßwasserlgen wurden Alkane in unterschiedlicher Struktur und von unterschiedlichem Gehalt als Bestandteile der Zellipide nachgewiesen (Tornabene et al. 1970; Morrison et al. 1971; Ackman 1989). Eine Besonderheit bezüglich des Kohlenwasserstoffgehaltes stellt die Grünalge *Botryococcus braunii* dar, deren Trockenmasse mit bis zu 86 % aus Kohlenwasserstoffen bestehen kann (Dennis und Kolattukudy 1991). Die verschiedenen Unterarten der Alge unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer akkumulierten Kohlenwasserstoffe. Bei den in der

Unterart B enthaltenen Kohlenwasserstoffen handelt es sich um mehrfach ungesättigte, verzweigte Kohlenwasserstoffe (hier die sog. Botryococcene). In der Unterart A hingegen werden vorwiegend unverzweigte Alkane mit ungerader Zahl an Kohlenstoffatomen (C_{27} , C_{29} , C_{31}) akkumuliert. Eine ähnliche Produktivität und Zusammensetzung bezüglich der Kohlenwasserstoffe wurde in der Grünalge *Dunaliella salina* 1650 beobachtet, die im Rahmen der biotechnologischen Nutzung von Algen als alternative Brennstoffe untersucht wurde (Park et al. 1998).

In höheren Pflanzen, aber auch in Insekten sind Alkane wesentliche Komponenten der Wachs- und Lipidschichten der Kutikula (Walkil 1970). Die kutikulären Schichten stellen sowohl in den Pflanzen als auch in den Insekten einen Schutz gegen Wasserverluste dar. Darüber hinaus können die in der Kutikula enthaltenen Kohlenwasserstoffe den Insekten als Erkennungssystem zur Wiedererkennung bzw. Diskriminierung innerhalb der Art oder zwischen den Geschlechtern dienen (Singer 1998).

Außer in den Insekten ließen sich Alkane auch in anderen Tiergruppen wie Schwämmen, Mollusken, Krebsen, Fischen und Vögeln nachweisen (Ackman 1989; Cheesbrough und Kolattukudy 1988). Über ihre Funktion ist hier jedoch nichts bekannt.

Aufgrund der Tatsache, daß Alkane in vielen Organismen enthalten sind, lassen sich diese Kohlenwasserstoffe an vielen Umweltstandorten nachweisen. Aquatische Sedimente z. B. enthalten durch den indirekten und direkten Eintrag von Pflanzen und anderem organischem Material ein breites Spektrum an Alkanen (Brassel et al. 1978; Giger et al. 1980; Wakeham 1996). Das Alkanprofil ist oft charakteristisch ausgeprägt, so daß in vielen Fällen Rückschlüsse auf die Herkunft der Alkane möglich sind. Eine Dominanz der Alkane mit ungerader Anzahl an C-Atomen weist z. B. auf den biogenen Ursprung der Alkane hin. Wenn C_{15} - C_{17} Alkane überwiegen, stammen diese aus dem ursprünglich im Wasser lebenden Phytoplankton (Brassel et al. 1978). Längerkettige Alkane mit Kettenlängen zwischen C_{25} - C_{33} hingegen entstammen aus den höheren Landpflanzen, die im Uferbereich wuchsen bzw. durch Wind, Flüsse oder Eis ins Gewässer eingetragen wurden.

Die Dominanz der Alkane mit ungerader C-Atomzahl erklärt sich durch den Mechanismus der Alkansynthese. Untersuchungen zur Biosynthese an Pflanzen (Cheesbrough und Kolattukudy 1984), Algen (Dennis und Kolattukudy 1992), Vertebraten (Cheesbrough und Kolattukudy 1988) und Insekten (Yoder et al. 1992; Reed et al. 1994; Mpuru et al. 1996) ergaben, daß langkettige Fettsäuren, die in biologischen Systemen vorwiegend Kohlenstoffketten mit gerader Anzahl an C-Atomen besitzen, die Vorläufer für die Alkansynthese darstellen. Die Synthese verläuft nach einer Aktivierung der Fettsäure zum Acyl-CoA mit anschließender Reduktion zum Aldehyd. Für die anschließende Abspaltung einer C_1 -Einheit liegen unterschiedliche Hinweise über den Mechanismus vor. Während Kolattukudy und seine Mitarbeiter von einer Decarbonylierung des Aldehyds unter

Freisetzung von CO ausgehen (Cheesbrough und Kolattukudy 1984, 1988; Dennis und Kolattukudy 1991, 1992; Yoder et al. 1992), wird von Reed und seinen Mitarbeitern die Bildung des Alkans durch Freisetzung von CO₂ unter Beteiligung von NADPH und Sauerstoff postuliert (Reed et al. 1994, 1995; Mpuru et al. 1996). Unabhängig von dem Mechanismus des letzten Reaktionsschrittes bedingt die Abspaltung der C₁-Einheit die Produktion von Alkanen mit vorwiegend ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen.

Neben dem natürlichen Eintrag von Alkanen erfolgte seit Beginn des 19. Jahrhunderts ein vermehrter Eintrag von Alkanen in die Umwelt durch anthropogenen Einfluß. Die Nutzung von Alkanen als Brennstoffe, Kraftstoffe und Lösungsmittel sowie als Rohstoffe für die Petrochemie und der Umgang mit dem komplexen Gemisch Erdöl verursachen im Zeitalter der Industrie eine oft ungewollte Verbreitung von Kohlenwasserstoffen sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Systemen.

2. Mikrobieller Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen (*n*-Alkane) und alizyklischen Kohlenwasserstoffen (Cycloalkane)

Bei der weltweiten natürlichen Verbreitung der gesättigten Kohlenwasserstoffe (I.1.2.) ist es naheliegend, daß Mikroorganismen, die als Destruenten im Naturhaushalt für die Aufrechterhaltung des Kohlenstoffkreislaufes sorgen, über die Fähigkeit verfügen, Alkane zu mineralisieren.

Die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Alkane in Abhängigkeit von Struktur und Kettenlänge sind bei der Betrachtung ihrer mikrobiellen Umsetzung wichtig. So wird die Rate der mikrobiellen Umsetzung deutlich von diesen Eigenschaften beeinflusst. Alkane der Kettenlänge C₁₀-C₁₈ werden wesentlich einfacher und durch eine größere Anzahl von Mikroorganismen verwertet (van Beilen et al. 1994); längerkettige Alkane (> C₁₈) hingegen sind wesentlich schlechter wasserlöslich und somit deutlich schlechter für die Mikroorganismen verfügbar. Kurzkettige Alkane mit Kettenlängen zwischen C₅ und C₁₀ zeigen mit abnehmender Kettenlänge eine deutlich zunehmende Wasserlöslichkeit und somit eine bessere biologische Verfügbarkeit, aber auch gleichzeitig eine höhere Toxizität für viele Mikroorganismen (Britton 1984; van Beilen et al. 1994).

Während die Umsetzung von Alkanen durch Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff schon sehr früh bekannt war, galt die Mineralisierung in Abwesenheit von Sauerstoff bis zu Beginn der neunziger Jahre als sehr fraglich. So gibt es zahlreiche, detaillierte Untersuchungen an Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur aeroben Alkanoxidation, aber erst wenige deutliche Beweise für die anaerobe, mikrobielle Oxidation von Alkanen. Schwierigstes zu überwindendes Problem bei der Nutzung der Alkane ist die Aktivierung der reaktionsträgen Kohlenwasserstoffverbindungen. In den folgenden

Absätzen soll ein Überblick über den jeweiligen Kenntnisstand des Alkanabbaus in Anwesenheit bzw. in Abwesenheit von Sauerstoff gegeben werden.

2.1. Mikrobieller Abbau von *n*-Alkanen in Gegenwart von Sauerstoff

Die Fähigkeit zur Umsetzung von Alkanen in Gegenwart von Sauerstoff wurde für zahlreiche Bakterien und Pilze verschiedenster Gattungen beschrieben (Bühler und Schindler 1984; Britton 1984). Als die dabei am häufigsten vertretenen Gattungen seien *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia* und *Candida* genannt.

Die zur aeroben Alkanoxidation befähigten Mikroorganismen benötigen den Sauerstoff für den primären enzymatischen Angriff der Alkane (die initiale Aktivierung) sowie als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette.

Die bekannteste Form der aeroben Alkanoxidation beginnt mit einer Hydroxylierung des Substrates am terminalen Kohlenstoffatom (Abb. 1). Die Hydroxylierung des Alkans wird durch spezifische Monooxygenasen (Hydroxylase, auch: mixed-function oxygenases) katalysiert. Dabei erfolgt die enzymkatalysierte initiale Aktivierung, indem das O₂-Molekül reduktiv in ein reaktives Sauerstoffatom überführt wird, das die homolytische Spaltung einer C-H-Bindung im Alkan ermöglicht. Das dabei entstandene Alkylradikal vereinigt sich anschließend mit dem ebenfalls entstandenen OH-Radikal zu einem Alkoholmolekül. Der gebildete primäre Alkohol wird anschließend zum Aldehyd und weiter zur Monocarbonsäure oxidiert.

Die Monooxygenasen sind an mehrfach gekoppelte Elektronen-Carrier-Systeme angebunden. Gut bekannt und näher charakterisiert sind Carrier-Systeme unter Beteiligung von Rubredoxin, z. B. aus *Pseudomonas oleovorans* oder von Cytochrom P450, z. B. aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida* spp. (zur Übersicht s. Bühler und Schindler 1984; Britton 1984; Munro und Lindsay 1996; Shilov 1997).

Bei der eher seltenen diterminalen Alkanoxidation (hauptsächlich in Hefen) werden unter Bildung von α,ω -Dienen oder ω -Hydroxycarbonsäuren beide Substratenden oxidiert (Abb. 1). Die weitere Oxidation führt in diesem Fall zur Dicarbonsäure.

Bei der subterminalen Alkanoxidation erfolgt der Angriff durch die Monooxygenasen an einem nicht-endständigen C-Atom unter Bildung eines sekundären Alkohols, der anschließend zum Keton umgesetzt wird. Die weitere Umsetzung des Ketons verläuft über eine Oxygenierung zum Ester nach dem Prinzip der Baeyer-Villiger-Reaktion mit anschließender Hydrolyse zur Monocarbonsäure und zum Alkohol (Abb. 1).

Die anschließende Oxidation der jeweils gebildeten Carbonsäuren erfolgt über den bekannten Weg der β -Oxidation.

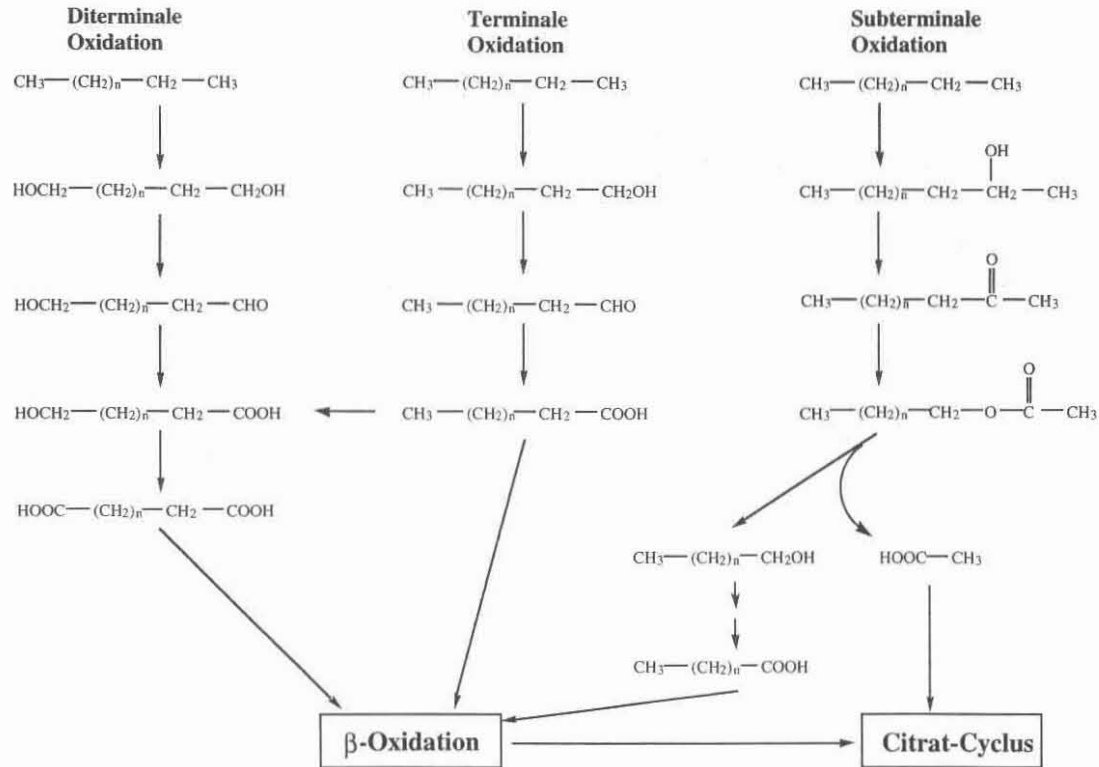
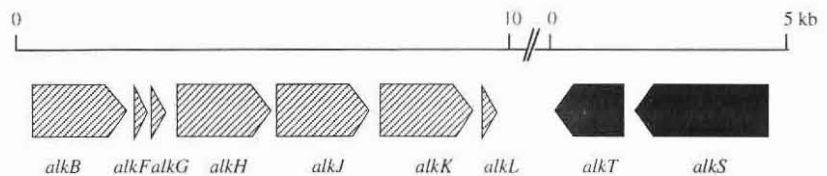


Abb. 1: Aus verschiedenen Organismen bekannte Stoffwechselwege der aeroben Oxidation von n -Alkanen.

Die aerobe Alkanoxidation ist in den meisten dazu fähigen Mikroorganismen eine induzierbare Eigenschaft. Nur in *Pseudomonas stutzeri*, *Cladosporium resinae* und einer *Micrococcus* Art wiesen Induktionsstudien auf ein konstitutives Enzymsystem zur Alkanoxidation hin (Britton 1984).

Die Genetik der aeroben Alkanoxidation wurde in verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen untersucht (zur Übersicht s. van Beilen et al. 1994; Britton 1984). Dabei zeigte sich, daß sich die genetische Information für den aeroben Alkanstoffwechsel auf extrachromosomaler DNA (Plasmiden) befindet. In *Pseudomonas oleovorans* wurde das sogenannte OCT-Plasmid (OCT für *n*-Oktan-Umsetzung) als Träger der Gene gefunden, welche für die an der Alkanoxidation beteiligten Enzyme codieren. Eine Analyse der Plasmid-DNA ergab, daß die sogenannten *alk*-Gene in zwei voneinander getrennten Clustern (*alkST* und *alkBFGHJKL*) organisiert sind (Abb. 2, van Beilen et al. 1994). Sie enthalten die Information für alle Proteine, die für die Umsetzung vom Alkan zum Acyl-CoA notwendig sind.



Genprodukt	Protein und Funktion
AlkB	Alkanhydroxylase (Alkanmonooxygenase)
AlkF	Rubredoxin 1 (inaktiv)
AlkG	Rubredoxin 2
AlkH	Aldehyd Dehydrogenase
AlkJ	Alkohol Dehydrogenase
AlkK	Acyl-CoA Synthase
AlkL	nicht bekannt
AlkS	Regulation der Transkription von <i>alkBFGHJKL</i>
AlkT	Rubredoxin Reduktase

Abb. 2: Organisation der für die aerobe Alkanoxidation verantwortlichen *alk*-Gene und Funktion der Genprodukte der *alkBFGHJKL*- und der *alkST*-Region in *Pseudomonas oleovorans*.

2.2. Mikrobieller Abbau von Cycloalkanen in Gegenwart von Sauerstoff

Der aeroben mikrobiellen Umsetzung von Cycloalkanen wurde im Gegensatz zu der von *n*-Alkanen weitaus weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Sehr frühe Berichte zwischen 1920 und 1940 über eine mikrobielle Verwertung von Cycloalkanen mußten angezweifelt werden, da das beobachtete Wachstum nicht reproduzierbar bzw. auf Verunreinigungen des eingesetzten Substrats zurückzuführen war (Trudgill 1984). In den darauf folgenden Jahren wurde zwar eine mikrobielle Umsetzung von Cycloalkanen in Sedimenten und Mischkulturen beobachtet, jedoch gelang es trotz zahlreicher Versuche nicht, eine Reinkultur mit der Fähigkeit zur vollständigen Mineralisierung von Cycloalkanen zu isolieren (Komagata et al. 1964; Ooyama und Foster 1965; Beam und Perry 1974; de Klerk und Van der Linden 1974).

Die Beobachtung der vollständigen Oxidation von Cyclohexan durch Konsortien von Mikroorganismen und in Substratgemischen führte zu der Annahme, daß ein Abbau von Cycloalkanen nur durch Commensalismus und Co-Oxidation ermöglicht wird (Beam und Perry 1974; de Klerk und van der Linden 1974; Trudgill 1984; Morgan und Watkinson 1994). Verdeutlicht wurde dies in Simulationsexperimenten mit Mischkulturen und Substratgemischen, in denen *n*-Alkan-verwertende Organismen zusammen mit gegen Kohlenwasserstoffe toleranten, Cyclohexanol-verwertenden Bakterien in Gegenwart von Cycloalkanen angezogen wurden. De Klerk und sein Mitarbeiter beobachteten die co-oxidative Mineralisierung von Cyclohexan in zwei *Pseudomonas* Stämmen. In Anwesenheit von *n*-Heptan wurde Cyclohexan durch den zur *n*-Alkan-Oxidation befähigten *Pseudomonas* Stamm in Cyclohexanol überführt, das dann durch den zweiten anwesenden *Pseudomonas* Stamm zu CO₂ umgesetzt wurde. Kontrollexperimente zeigten, daß weder der *n*-Alkan-oxidierende Stamm zur Umsetzung von Cyclohexanol noch der zweite *Pseudomonas* Stamm zur Oxidation von Cyclohexan befähigt waren.

Mit der Isolierung einer Reinkultur der Gattung *Nocardia* konnte jedoch gezeigt werden, daß es durchaus Mikroorganismen gibt, die über die Fähigkeit verfügen, Cycloalkane in Abwesenheit anderer Bakterien vollständig zu oxidieren (Stirling et al. 1977). Zwar deuteten die ersten Experimente mit einer *Nocardia* Art darauf hin, daß für eine Cyclohexanumsetzung die Gegenwart eines *Pseudomonas* Stammes notwendig war; dies wurde jedoch in darauf folgenden Experimenten als eine Auxotrophie der *Nocardia* Art für Biotin aufgeklärt. Danach wurden zwei weitere Reinkulturen der Gattungen *Pseudomonas* (Anderson et al. 1980) und *Xanthobacter* (Trower et al. 1985) isoliert, anhand derer eine erste Aufklärung des Stoffwechselweges der aeroben Cyclohexanoxidation gelang.

Durch Experimente mit ^{14}C -markiertem Cyclohexan sowie durch Respirations- und Enzymstudien wurde Cyclohexanol als das erste Intermediat der aeroben Cyclohexanoxidation und ein weiterer Abbau über Cyclohexanon, ϵ -Caprolacton, 6-Hydroxycaproat und Adipinsäure nachgewiesen (Abb. 3). Somit zeigte sich auch beim aeroben Cyclohexanabbau, daß der initiale Angriff wie bei der aeroben Oxidation von n -Alkanen über eine Monooxygenasereaktion erfolgt.

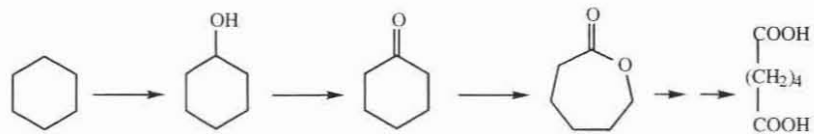


Abb. 3: Skizzierter Stoffwechselweg der aeroben Oxidation von Cyclohexan durch *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. und *Xanthobacter* spp..

2.3. Mikrobieller Abbau von Alkanen in Abwesenheit von Sauerstoff

Obwohl thermodynamisch eine Alkanoxidation mit den alternativen Elektronenakzeptoren Nitrat, Mangan(IV), Eisen(III) oder Sulfat durchaus möglich erscheint ($\Delta G^{\circ} < 0$), wurde lange Zeit bezweifelt, ob Alkane in Abwesenheit von Sauerstoff durch Mikroorganismen umgesetzt werden. Es war fraglich, ob eine initiale Aktivierung der Alkane überhaupt ohne Beteiligung von O_2 möglich ist.

Seit Mitte der vierziger Jahre erschienen erste Berichte zur anaeroben Oxidation von n -Alkanen durch denitrifizierende und sulfatreduzierende Organismen (Novelli und ZoBell 1944; Ward und Brock 1978; Davis und Yarbrough 1966; Traxler und Bernard 1969). Diese ersten Hinweise auf eine bakterielle Alkanumsetzung in Abwesenheit von O_2 wurden jedoch angezweifelt, da zum Teil Kulturen nicht erhalten blieben oder Bedenken bezüglich der Versuchsdurchführung geäußert wurden. So konnte in manchen Fällen nicht eindeutig ausgeschlossen werden, daß das beobachtete bakterielle Wachstum auf Spuren von Sauerstoff oder Verunreinigungen der Alkane zurückzuführen war (Novelli und ZoBell 1944; Davis und Yarbrough 1966; Delaune et al. 1980; Hambrick et al. 1980). Darüber hinaus konnten Untersuchungen an möglicherweise an der Alkanoxidation beteiligten Enzymen nicht reproduziert werden (Griffin und Traxler 1981).

Mit der Isolierung des sulfatreduzierenden Stammes Hxd3 aus einem Ölwasserseparator mit Hexadekan wurde erstmals der eindeutige Nachweis für die anaerobe Oxidation von n -Alkanen erbracht (Aeckersberg et al. 1991; Aeckersberg 1994). Unter

Gewährleistung strikt anoxischer Versuchsbedingungen und unter Verwendung hochreiner Chemikalien konnte gezeigt werden, daß Stamm Hxd3 90 % des eingesetzten Hexadekans unter anoxischen Bedingungen zu CO₂ oxidierte (Aeckersberg 1994).

Der ersten Reinkultur eines zur anaeroben Oxidation von *n*-Alkanen befähigten Bakteriums folgte sehr bald die Isolierung von zwei weiteren Sulfatreduzierern mit der Fähigkeit, unter Ausschluß von O₂ auf *n*-Alkanen zu wachsen. Der mesophile, sulfatreduzierende Stamm Pnd3 wurde aus marinem Sediment isoliert und war in der Lage, ebenfalls wie Stamm Hxd3, mit langkettigen *n*-Alkanen unter strikt anoxischen Bedingungen zu wachsen (Hxd3, C₁₂-C₂₀; Pnd3, C₁₄-C₁₇; Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998). Mit der Isolierung des thermophilen Sulfatreduzierers Stamm TD3 aus Sediment des Guaymas Becken (Golf von Kalifornien, Mexiko) wurde erstmals die anaerobe Oxidation relativ kurzkettiger *n*-Alkane (C₆-C₁₆) nachgewiesen (Rueter et al. 1994; Ehrenreich 1996).

Den Experimenten der anaeroben Alkanoxidation mit Sulfat folgten weitere Versuche zum Nachweis der anaeroben Alkanoxidation mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Nitrat versprach dabei aufgrund seines im Vergleich zum Sulfat positiveren Redoxpotentials eine höhere Energieausbeute und somit höhere Zellerträge als Sulfat. Es gelang, zwei Reinkulturen denitrifizierender Bakterien, Stamm OcN1 und Stamm HdN1, mit der Fähigkeit zur anaeroben Alkanoxidation zu isolieren (Ehrenreich 1996). Unter strikt anoxischen Bedingungen wuchs Stamm OcN1 mit *n*-Alkanen der Kettenlänge C₈-C₁₂, während Stamm HdN1 *n*-Alkane der Kettenlänge C₁₄-C₂₀ verwertete. Beide denitrifizierenden Stämme zeichneten sich durch deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeiten auf Alkanen als die sulfatreduzierenden alkanoxidierenden Stämme aus. Die Verdopplungszeiten der Denitrifizierer betragen 15-20 h, die der Sulfatreduzierer 48-120 h.

Auch in Untersuchungen von Sedimenten zeigte sich, daß in der Natur durchaus das biologische Potential zum Umsatz von *n*-Alkanen unter Ausschluß von Sauerstoff vorliegt. Bereits 1980 war bei der anoxischen Inkubation von Seesedimenten mit natürlich vorhandenem *n*-Hexadekan eine Abnahme von 90 % der ursprünglichen Alkanmenge beobachtet worden (Giger et al. 1980). Bei Untersuchungen von mit Mineralölkohlenwasserstoffen kontaminierten marinen Sedimenten zeigte sich nach der anoxischen Inkubation des Standortmaterials mit Dieselöl und Sulfat, daß Alkane mit der Kettenlänge C₁₁-C₂₄ deutlich abnahmen (Coates et al. 1997). Bestätigt wurde diese anaerobe Alkanoxidation mit ¹⁴C-markiertem Hexadekan. Dabei wurden nach 100 Tagen anoxischer Inkubation 75 % des dem Sediment zugesetzten Hexadekans als ¹⁴CO₂ wiedergefunden. Bei Zusatz des auf die Sulfatreduktion hemmend wirkenden Molybdat (MoO₄²⁻) in Parallelansätzen konnte hingegen selbst nach einem Jahr Inkubation keine weitere ¹⁴CO₂-Bildung beobachtet werden (Coates et al. 1997). In den Experimenten einer weiteren

Arbeitsgruppe wurde der anaerobe Abbau weiterer Alkane in Sedimenten beobachtet (Caldwell et al. 1998). Sie konnte in mit Kohlenwasserstoff kontaminierten marinen Sedimenten in Gegenwart von Sulfat eine Abnahme der Alkane mit einer Kettenlänge zwischen C_{15} und C_{34} nachweisen. Die anaerobe Mineralisierung wurde in diesem Fall durch Zusatz von ^{14}C -markiertem Oktacosan ($C_{28}H_{58}$) bestätigt, das zu 97 % als $^{14}CO_2$ wiedergefunden wurde.

Obwohl somit anhand der vorhandenen Reinkulturen und der Messungen im Sediment eindeutig nachgewiesen wurde, daß eine anaerobe, mikrobielle Oxidation von *n*-Alkanen möglich ist, ist die Frage, wie die initiale Aktivierung der Alkane ohne Beteiligung von O_2 erfolgt, bisher unbeantwortet.

Erste Versuche zur Aufklärung des Stoffwechselweges der anaeroben Alkanoxidation waren mit dem sulfatreduzierenden Stamm Hxd3 durchgeführt worden. Die ursprüngliche Annahme einer Dehydrogenierung des Alkans zum 1-Alken als möglichen ersten Reaktionsschritt der anaeroben Alkanoxidation (Senez und Azoulay 1961; Wagner et al. 1967; Iizuka et al. 1969; Parekh et al. 1977; Morikawa et al. 1996) wurde durch die Experimente mit dem Stamm Hxd3 nicht gestützt. Sowohl Zellfettsäureanalysen als auch Induktionsstudien in Zellsuspensionen zur Verwertung von Alkanen, Alkenen und Fettsäuren sprachen gegen eine Alkanoxidation mit einem 1-Alken als Intermediat (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998). Vielmehr deuteten die Zellfettsäureanalysen des Stammes Hxd3 darauf hin, daß eine Addition einer C_1 -Einheit an das Alkan die mögliche Eingangsreaktion darstellt (detaillierte Darstellung, IV.3.2.1.). Untersuchungen der Zellfettsäuren des sulfatreduzierenden Stammes Pnd3 und des nitratreduzierenden Stammes HdN1 konnten diesen hypothetischen Weg der anaeroben Alkanoxidation jedoch nicht stützen.

Beschreibungen über einen Abbau von Cycloalkanen unter Ausschluß von Sauerstoff liegen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vor.

3. Zielsetzungen

Zu Beginn der Arbeit waren zwei denitrifizierende Bakterien (Stamm OcN1 und Stamm HdN1) mit der Fähigkeit, längerkettige Alkane anaerob umzusetzen, bekannt. Stamm OcN1 wuchs mit Alkanen der Kettenlänge C_8 - C_{12} , Stamm HdN1 mit Alkanen der Kettenlänge C_{14} - C_{20} (Ehrenreich 1996). Ein Abbau von kürzerkettigen Alkanen als Oktan durch denitrifizierende Mikroorganismen war bis zum Beginn der Arbeit nicht bekannt.

Für weiterführende Experimente zur Aufklärung der anaeroben Alkanoxidation sollte daher versucht werden, Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Umsetzung von Alkanen mit Kettenlängen kleiner als C_8 anzureichern und zu isolieren. Für biochemische

Untersuchungen sollte ein Stoffwechsel von kurzkettigen Alkanen vorteilhafter sein als der von langkettigen, da im ersteren Fall z. B. Derivate, die als Substratanaloga die Aufklärung des Intermediärstoffwechsels der anaeroben Alkanoxidation erleichtern können, käuflich erhältlich sind. Darüber hinaus kann die Flüchtigkeit kurzkettiger Alkane in Experimenten genutzt werden, so daß z. B. in Markierungsexperimenten das Entfernen des Substrathintergrundes ermöglicht wird.

Im Fall einer erfolgreichen Anreicherung und Isolierung sollte das neuartige Bakterium taxonomisch und physiologisch charakterisiert werden. In Bilanzierungsmessungen sollte die vollständige Mineralisierung eines kurzkettigen *n*-Alkans in Gegenwart von Nitrat nachgewiesen werden.

Ferner sollten erste Experimente zum anaeroben Alkanstoffwechsel durchgeführt werden. Zellfettsäureanalysen, Induktionsstudien auf unterschiedlichen Substraten und enzymatische Untersuchungen sollten Hinweise auf einen möglichen Weg der anaeroben Alkanoxidation geben. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese sollten Proteine, die spezifisch beim Wachstum auf Alkanen gebildet werden, nachgewiesen und zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen isoliert werden.

Während der mikrobielle Abbau von *n*-Alkanen zu Beginn der vorliegenden Arbeit sowohl unter oxidischen als auch unter anoxischen Bedingungen bekannt war, war die Umsetzung von Cycloalkanen durch Mikroorganismen bisher nur in Gegenwart von Sauerstoff nachgewiesen worden. Mit neuen Anreicherungen sollte daher geprüft werden, ob eine anaerobe Umsetzung von Cyclohexan mit Nitrat möglich ist. Anhand einer Wachstumsbilanzierung in einer Anreicherungskultur sollte die vollständige Mineralisierung von Cyclohexan unter Ausschluß von Sauerstoff in Gegenwart von Nitrat gezeigt werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Gase

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „reinst“ bzw. „zur Analyse“ und wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Die verwendeten Gase (Stickstoff, Kohlendioxid, Wasserstoff, Helium) besaßen eine Reinheit von 4.5 (99,995 %) bis 5.0 (99,999 %) und wurden von der Firma Messer-Griesheim (Krefeld) geliefert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Gasgemische (N_2/CO_2 , 90/10 [v/v]; H_2/CO_2 , 80/20 [v/v]) wurden als fertige Gemische ebenfalls von der genannten Firma bezogen.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1. Probenmaterial und Mikroorganismen

Für die Anreicherungskultur mit Hexan unter nitratreduzierenden Bedingungen wurde als Inokulum ein homogenisiertes Gemisch aus Schlämmen verschiedener Bremer Gräben eingesetzt. Die nitratreduzierende Anreicherungskultur mit Cyclohexan wurde mit Sedimentschlamm des Bad Zwischenahner Meeres, Bad Zwischenahn (Kreis Ammerland), beimpft.

Als Reinkulturen standen Isolate aus dem eigenen Institut zur Verfügung. Die nitratreduzierenden, zum anaeroben Abbau von Alkanen befähigten Stämme OcN1 und HdN1 wurden von Dr. Petra Ehrenreich isoliert (Ehrenreich 1996). Die zur Oxidation von Aromaten befähigten Nitratreduzierer EbN1 und PbN1 wurden von Dr. Ralf Rabus isoliert (Rabus und Widdel 1995).

2.2. Kulturmedien

Zur Herstellung aller Medien, Lösungen und Puffer wurde demineralisiertes Wasser einer Reinstwasseranlage (Membra Pure, Lörzweiler) verwendet.

2.2.1. Zusammensetzung und Herstellung von Medium für die anaerobe Kultivierung

Für die anaerobe Anzucht denitrifizierender Bakterien in Flüssigmedium wurde ein Mineralmedium (Süßwassermedium) verwendet. Substrate wurden nachträglich entsprechend des durchzuführenden Experiments zugesetzt.

Zusammensetzung des Mineralmediums (Süßwassermedium)

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
H_2O	ad 1000 ml

Die Salze wurden nacheinander in demineralisiertem Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert (Widdel 1980). Dem unter einer N_2/CO_2 (90/10 v/v) Gasatmosphäre abgekühlten Medium wurden anschließend die nachfolgenden Komponenten (s. II.2.2.3.) steril zugegeben.

Spurenelement-Gemisch	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamin-Gemisch	1 ml/l
Thiamin-Lösung	1 ml/l
Riboflavin-Lösung	1 ml/l
Vitamin- B_{12} -Lösung	1 ml/l
Natriumbicarbonat-Lösung, 1 M	30 ml/l

In Experimenten mit Reinkulturen wurden zusätzlich als Reduktionsmittel je Liter Medium 4 ml einer Ascorbat-Lösung (1 M, s. II.2.2.3.2.) zugegeben. Mit steriler 2 M HCl wurde der pH-Wert des Mediums auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt.

Das Abfüllen des Mediums in autoklavierte Kulturflaschen (125 ml, 250 ml, 500 ml) und Vorratsflaschen (50 ml, 100 ml) erfolgte mittels leichten Überdrucks (10 kPa) mit Hilfe einer Abfüllglocke oder eines Abfüllröhrchens. Die Kulturflaschen wurden unmittelbar

nach Befüllung mit einer N_2/CO_2 (90/10 v/v) Gasatmosphäre überschichtet und nach der Hungate-Technik (Bryant 1972) mit Gummistopfen verschlossen. Der Anteil an CO_2 diente der Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Die Vorratsflaschen (50 ml) wurden randvoll mit Medium gefüllt und unter Ausschluß von Luftblasen anoxisch verschlossen. Erst unmittelbar vor der Verwendung des Mediums wurden das jeweilige organische Substrat und der Elektronenakzeptor zugesetzt.

2.2.2. Herstellung fester Nährböden

Für die Vereinzelung der denitrifizierenden Mikroorganismen wurden sowohl oxische Agarplatten als auch anoxische Agarverdünnungsröhrchen und Bottle Plates eingesetzt.

Agarplatten wurden mit Mineralmedium und mit Komplexmedium (AC-Broth) hergestellt. Dem jeweiligen Medium wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Für das Mineralmedium wurde der Agar getrennt in Wasser und doppelt konzentriert autoklaviert, dem Komplexmedium wurde der Agar direkt zugegeben.

Zur Herstellung der Agarverdünnungsreihen wurde ein ca. 3%iger Agar in H_2O angesetzt. Um mögliche lösliche Verunreinigungen aus dem Agar zu entfernen, wurde der Agar vor dem Schmelzen gewaschen. Dazu wurden 3,3 g Agar (Difco) in ca. 300 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen und 15 min stark gerührt. Nach der Sedimentation des Agars wurde das überständige Wasser abgenommen und verworfen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei im letzten Durchgang der sedimentierte Agar nur in 100 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen wurde. Der Agar wurde durch kurzes Erhitzen auf 100 °C geschmolzen und in 3 ml-Portionen auf Reagenzgläser verteilt. Die mit Alukappen verschlossenen Reagenzgläser wurden autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Bei ihrer Verwendung wurde der Agar erneut geschmolzen und mit Mineralmedium versetzt, so daß der Agar in der Agarverdünnungsreihe in einer Endkonzentration von ca. 1 % vorlag.

Zur Herstellung der Bottle Plates (Hermann et al. 1986) wurde in gleicher Weise verfahren wie bei der Herstellung der Agarverdünnungsröhrchen. In diesem Fall wurde jedoch der geschmolzene 3%ige Agar in spezielle flache Glasflaschen eingefüllt. Die Flaschen wurden mit Butylstopfen verschlossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.3. Medienzusätze**2.2.3.1. Vitamin- und Spurenelementlösungen****Spurenelement-Gemisch (komplexiert)**

Na ₂ -EDTA	5200 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2100 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	190 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	144 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	36 mg
H ₃ BO ₃	30 mg
NiCl ₂ · 6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	2 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Salze wurden nacheinander unter Erwärmung in Lösung gebracht. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,4 eingestellt. Die Lösung wurde in kleinen Schraubdeckelflaschen autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Selenit-Wolframat-Lösung

NaOH	400 mg
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	8 mg
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	6 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in kleinen Schraubdeckelflaschen autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Mögliche Ausfällungen durch die Reaktion der alkalischen Lösung mit dem Glas beeinträchtigen nicht den Gebrauch der Lösung.

Vitamingemisch für nitratreduzierende Bakterien

Pyridoxin-Hydrochlorid	15 mg
Nicotinsäure	10 mg
Calcium-D(+)-Pantothenat	5 mg
4-Aminobenzoesäure	4 mg
D(+)-Biotin	1 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Die Vitamine wurden in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,1, gelöst und sterilfiltriert in Schraubdeckelflaschen bei 4 °C gelagert.

Thiamin-Lösung

Thiaminchlorid-Hydrochlorid	10 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Das Vitamin wurden in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 3,7, gelöst und sterilfiltriert in Schraubdeckelflaschen bei 4 °C gelagert.

Riboflavin-Lösung

konz. Essigsäure	0,1 ml
Riboflavin	2,5 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert in Schraubdeckelflaschen bei 4 °C gelagert.

Vitamin-B₁₂-Lösung

Cyanocobalamin	5 mg
H ₂ O	ad 100 ml

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert in Schraubdeckelflaschen bei 4 °C gelagert.

Die Sterilfiltration der verschiedenen Vitaminlösungen erfolgte mit Membranfiltern aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel).

2.2.3.2. Ascorbat-Lösung (1 M) als Reduktionsmittel

17,6 g Ascorbinsäure wurden in 80 ml anoxischem Wasser gelöst und mit 2 M NaOH unter Rühren auf einem Eisbad neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wurde mit anoxischem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, in ein autoklaviertes, begasbares Spezialgefäß (Abb. 4) sterilfiltriert und unter einer Stickstoffatmosphäre bei 4 °C gelagert.

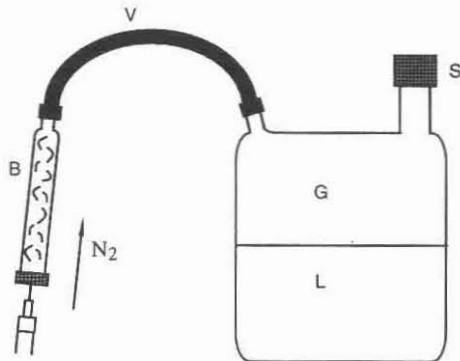


Abb. 4: Spezialgefäß zur sterilen Lagerung der Ascorbat-Lösung unter N_2 -Atmosphäre. Das Glasgefäß ist über einen Butylgummischlauch (V) mit einer Begasungsolive (B, gestopft mit Watte) verbunden. Durch die seitliche Begasungsvorrichtung kann das Gefäß über eine Nadel aseptisch mit Stickstoff versorgt werden. Die Entnahme der sterilen Lösung erfolgt unter stetigem N_2 -Strom aus der mit einem Schraubdeckel (S) mit Teflondichtung gesicherten Öffnung. Das Spezialgefäß wurde ebenfalls zur Lagerung von HMN und Rohöl verwendet. (G) Gasraum, (L) flüssige Substanz.

2.2.3.3. Eisen(II)sulfid-Suspension (0,5 M)

Die Herstellung der Eisen(II)sulfid-Suspension erfolgte nach der Vorschrift von Hanert (1981).

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	140 g
$Na_2S \cdot 9H_2O$	120 g
H_2O	ad 1000 ml

Unter Erwärmung auf $50\text{ }^\circ\text{C}$ wurden das Eisensulfat und das Natriumsulfid unter stetigem Rühren zusammengegeben. Das gebildete FeS -Präzipitat wurde anschließend intensiv bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes im Präzipitat mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Lösung wurde unter N_2 -Atmosphäre in einer Glasflasche gelagert.

2.2.3.4. Natriumbicarbonat-Lösung (1 M)

$NaHCO_3$	84,0 g
H_2O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in 30 ml-Portionen auf Serumflaschen verteilt. Die mit gasdichten Septen verschlossenen Flaschen wurden mit CO_2 begast, geschüttelt und evakuiert. Dieser Vorgang

wurde mehrmals wiederholt, um eine Sättigung mit CO_2 zu erreichen. Die Lagerung der Lösung erfolgte nach dem Autoklavieren unter CO_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur.

2.2.3.5. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen (Substrate)

Lösliche organische Substrate

Die löslichen organischen Substrate wurden den Kulturgefäßen direkt als sterile konzentrierte Stammlösungen unter Begasung mit N_2/CO_2 (90/10 [v/v]) nach der Hungate-Technik (Bryant 1972) zugesetzt. Aus der Tabelle 1 sind die verschiedenen Konzentrationen der Stammlösungen und ihre Endkonzentration im Kulturansatz ersichtlich.

Die Carbonsäuren wurden in Form ihrer Salze als Substrate eingesetzt. Zur Herstellung dieser Stammlösungen wurde die jeweilige Säure mit einer nahezu äquivalenten Menge an NaOH unter Rühren versetzt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7 bis 8 erfolgte dann durch vorsichtiges Zutropfen der NaOH-Lösung. Anschließend wurde die Lösung mit H_2O auf ihr Endvolumen aufgefüllt.

Die Stammlösungen hitzeempfindlicher Substanzen wurden über Membranfilter aus Cellulose (Porengröße $0,2 \mu\text{m}$, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert; hitzeunempfindliche Substanzen wurden autoklaviert. Die Lagerung unbeständiger Substrate erfolgte im Dunkeln bei 4°C .

Wasserunlösliche organische Substrate

Die wasserunlöslichen Substanzen wurden den Kulturmedien in einer inerten Trägerphase verdünnt zugesetzt (Tabelle 2). Als inerte Trägerphase diente 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (im folgenden als HMN abgekürzt). Leicht flüchtige Substrate wurden separat als Substrat-HMN-Gemisch in anoxisch verschlossenen Serumflaschen vorbereitet. Das Substrat-HMN-Gemisch wurde mit N_2 -gespülten Spritzen entnommen und den bereits verschlossenen Kulturgefäßen nachträglich zugesetzt. Die Zugabe der schwer flüchtigen Substrate erfolgte direkt vor dem Verschließen der Kulturgefäße in die HMN-Phase. Pentadekan, Hexadekan und Rohöl (aus Ölquellen der Nordsee, Beta-Raffinerie, Wilhelmshaven) wurden unverdünnt als Substrate eingesetzt.

Die Sterilisation der wasserunlöslichen Substrate erfolgte durch Filtration der Substanzen über lösungsmittelresistente Membranfilter (regenerierte Cellulose, Porengröße $0,1 \mu\text{m}$; Schleicher und Schuell, Dassel). Die Substanzen wurden in braunen Schraubdeckelgefäßen mit Teflondichtung gelagert.

Rohöl, HMN, Pentadekan und Hexadekan wurden dagegen in speziellen Gefäßen mit Begasungsvorrichtung unter N_2 -Atmosphäre gelagert (Abb. 4). Die Substanzen wurden zuvor mehrmals entgast, mit N_2 überschichtet und anschließend durch Autoklavieren sterilisiert. Alle wasserunlöslichen Substrate wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 1: Konzentration der Stammlösungen löslicher organischer Substrate und die Endkonzentration im Kulturansatz

Substanz	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration im Kulturansatz [mM]
Aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren, Na-Salze		
Formiat	1,0	10
Acetat	1,0	10
Propionat	1,0	5
Butyrat	1,0	5
Valerianat	0,5	3
2-Methylvalerianat	0,2	2
Capronat	1,0	2
2-Methylhexanoat	0,2	2
Oenanthat	0,2	2
Caprylat	0,2	2
Decanat	0,1	0,5-1
Palmitat	0,1	1
Stearat	0,1	1
Succinat	1,0	5-10
Fumarat	0,5	5-10
Malat	1,0	5
Pyruvat	1,0	5-10
Lactat	1,0	10
Aromatische Carbonsäuren		
Benzoat	1,0	1
Phenylacetat	1,0	1
Aminosäuren		
Alanin		10
Aspartat	0,5	10
Glutamat		5
Alkohole		
Methanol	1,0	6
Ethanol	1,0	10
1-Propanol	0,5	5-10
2-Propanol	0,5	5-10
1-Butanol	0,5	5
Monosaccharide		
Fructose	1,0	5
Glucose	1,0	5

Tabelle 2: Wasserunlösliche organische Substrate und ihre Endkonzentrationen in der Trägerphase (HMN)

Substanz	Endkonzentration in Heptamethylnonan (% v/v)
Alkane	
Pentan	2-4
Hexan	2-5
2-Methylhexan	1-2
3-Methylhexan	1-2
Heptan	5
2-Methylheptan	2-5
Oktan	5
2-Methyloktan	2-5
Nonan	10
Dekan	10
Undekan	5-20
Dodekan	5-20
Pentadekan	unverdünnt
Hexadekan	unverdünnt
Cyclohexan	1-2
Alkene	
1-Hexen	0,5-1
<i>cis</i> -2-Hexen	0,5-1
<i>trans</i> -2-Hexen	0,5-1
<i>cis</i> -3-Hexen	0,5-1
<i>trans</i> -3-Hexen	0,5-1
1-Hepten	0,5-1
1-Okten	0,5-1
1-Deken	0,5-1
Aldehyde	
Butanal	0,5-1
Hexanal	0,5-1
Heptanal	0,5-1
Oktanal	0,5-1
Dekanal	0,5-1
Alkohole	
1-Hexanol	0,5-1
2-Hexanol	0,5-1
3-Hexanol	0,5-1
1-Heptanol	0,5-1
1-Oktanol	0,5-1
Aromatische Verbindungen	
Toluol	2
Ethylbenzol	5
Propylbenzol	5
Hexylbenzol	5
Acetophenon	0,5-1
<i>m</i> -Xylol	2-5
<i>p</i> -Cymol	2-5
α -Terpinen	1-2
Rohöl	unverdünnt

Wasserstoff und Kohlendioxid

Wasserstoff als Elektronendonator wurde in Form eines H_2/CO_2 -Gasgemisches (80/20, [v/v]) nach der Hungate-Technik zugesetzt.

2.2.3.6. Elektronenakzeptoren

Tabelle 3: Konzentrationen der Stammlösungen der Elektronenakzeptoren und Endkonzentration im Kulturansatz

Elektronenakzeptor	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration im Kulturansatz [mM]
$NaNO_3$	1,0	5-10
$NaNO_2$	1,0	2-10
Na_2SO_4	1,0	15
Na_2SO_3	1,0	10
$Na_2S_2O_3$	1,0	5
Fumarat	0,5	10

Der überwiegend verwendete Elektronenakzeptor Nitrat wurde dem Medium in der Regel vor dem Abfüllen in die Kulturgefäße mit den übrigen Medienzusätzen (Vitamine und Spurenelemente) zugesetzt. Alle weiteren Elektronenakzeptoren wurden den Medien (ohne Nitrat) direkt mit dem jeweiligen Substrat zugefügt.

2.3. Isolierung und Anreicherung von nitratreduzierenden Mikroorganismen

2.3.1. Anreicherung

Grundlage der Anreicherung von nitratreduzierenden Mikroorganismen waren Sedimentschlämme aus Bremer Gräben und dem Bad Zwischenahner Meer. Die Schlämme wurden in flachen 250 ml Glasflaschen in Süßwassermedium aufgenommen. In den Anfangskulturen wurde der Elektronenakzeptor Nitrat nur in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt, um einen möglichen toxischen Effekt durch Nitrit, ein sich eventuell anhäufendes Intermediat der Nitratreduktion, auszuschließen. Auf den Zusatz des Reduktionsmittels Ascorbat im Medium wurde verzichtet, da dieses als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle die Anreicherung von unerwünschten Bakterien gefördert hätte. Das Anreicherungssubstrat wurde als verdünnte Lösung in HMN zugesetzt. Zur Gewährleistung einer möglichst gleichmäßigen Verteilung des Substrates wurden die nach der Hungate-Technik verschlossenen Glasflaschen leicht schrägliegend ruhig bzw. unter Schütteln inkubiert. Dabei wurden sie so gelagert, daß jeglicher Kontakt der organischen Phase mit dem Stopfen ausgeschlossen war.

2.3.2. Isolierung

Zur Isolierung alkanverwertender Nitratreduzierer war die Durchführung verschiedener in der Mikrobiologie verwendeter Isolierungstechniken notwendig. Neben der Vereinzelung von Bakterien durch ein Ausstreichen auf Agar mit Mineralmedium oder Komplexmedium nach der Dreistrichmethode wurden Agarverdünnungsreihen, Bottle Plates sowie flüssige Verdünnungsreihen mit selektivem Substrat angesetzt.

2.3.2.1. Agarverdünnungsreihen

Zur Herstellung einer Agarverdünnungsreihe wurden sieben der vorbereiteten Röhren (20 ml) mit Agar (3 ml, 3%ig, s. II.2.2.2.) zum Schmelzen in einem siedenden Wasserbad erhitzt. Der geschmolzene Agar wurde bis zum Zusatz des Mediums in einem Wasserbad bei 60 °C flüssig gehalten. Zusätzlich wurden 50 ml Süßwassermedium mit Ascorbat, dem Elektronenakzeptor und einem löslichen Substrat versetzt und in einem Wasserbad mit 41 °C vorgewärmt. Anschließend wurden jedem Agarröhrchen 6 ml des vorgewärmten Mediums zugefügt, wobei die Pipettenspitze stets etwas unterhalb der Oberfläche des sich mischenden Agars gehalten wurde; auf diese Weise wurde die Kontaktfläche zwischen Medium und Luft minimal gehalten. Unmittelbar nach der Zugabe des Mediums wurden die Röhren in das

auf 41 °C temperierte Wasserbad gestellt. Die Alukappen wurden durch schwarze Butylstopfen ersetzt und die Röhrrchen durchnummeriert.

Das erste Röhrrchen wurde dann mit einem Tropfen der Anreicherungskultur angeimpft, mit einem Stopfen verschlossen und einmal vorsichtig umgeschwenkt. Aus diesem Ansatz wurde nun dem zweiten Agarröhrrchen durch vorsichtiges Eingießen ein Tropfen zugesetzt. Das zweite Röhrrchen wurde verschlossen, vorsichtig umgeschwenkt und diente der Beimpfung des nächsten Röhrrchen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis letztendlich das siebte Röhrrchen mit einem Tropfen aus dem vorhergehenden Röhrrchen versetzt war. Die beimpften Agarröhrrchen wurden zur beschleunigten Erstarrung in ein Wasserbad gestellt, mit einer N_2/CO_2 -Atmosphäre überschichtet und nach der Hungate-Technik verschlossen. Die Inkubation der Agarverdünnungsreihen erfolgte stehend bei 28 °C.

2.3.2.2. Bottle Plates

Die wie unter II.2.2.2. beschriebenen vorbereiteten Bottle Plates (Hermann et al. 1986) wurden zum Schmelzen des Agars in einem siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend in ein 60 °C warmes Wasserbad gestellt. Zusätzlich wurde Süßwassermedium mit Ascorbat, dem Elektronenakzeptor und gegebenenfalls einem löslichen Substrat versetzt und in einem Wasserbad mit 41 °C erwärmt. Je Glasflasche (125 ml) wurden dann 6 ml des vorgewärmten Mediums zugegeben. Die Glasflaschen wurden anschließend sofort in das 41 °C warme Wasserbad gestellt und mit dem N_2/CO_2 -Gasgemisch begast. Nach zwei Minuten wurden die Flaschen verschlossen und zum Erstarren des Agars in eine waagerechte Position auf Eis gelegt.

Das Ausstreichen von Bakterien erfolgte, indem die Flasche erneut geöffnet und das Inokulum mit einer langen Kanüle auf den Nährboden aufgebracht wurde. Eine Vereinzlung wurde dabei durch eine leichte Zick-zack-Ausstrichlinie mit Hilfe einer am Ende tropfenförmig zugeschmolzenen Pasteurpipette erreicht. Anschließend wurden die Flaschen erneut mit dem N_2/CO_2 -Gemisch begast und verschlossen. Während die löslichen Substrate direkt dem Medium zugesetzt wurden, erfolgte die Zugabe der wasserunlöslichen Substrate im Gemisch mit HMN nachträglich nach dem Ausstreichen und Verschließen der Flasche. Die Flaschen wurden leicht schräg liegend bei 28 °C mit der Agarschicht nach oben inkubiert (Abb. 5). Eine Versorgung der Bakterien mit dem Kohlenwasserstoffsubstrat erfolgte auf diese Weise nur über die Gasphase, da kein direkter Kontakt zwischen Substrat-HMN-Gemisch und festem Nährboden bestand.

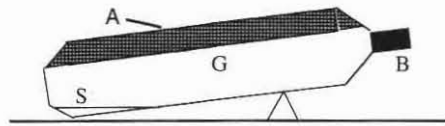


Abb. 5: Bottle Plates zur Isolierung von Mikroorganismen auf festem Nährboden unter anaeroben Bedingungen. Die mit einem Butylgummistopfen (B) verschlossene Glasflasche ist auf der einen Seite mit einem dünnen Agarnährboden (A) beschichtet und enthält ein Gemisch von N_2/CO_2 (90/10 [v/v]) als Gasatmosphäre (G). Die Bottle Plates wurden leicht schräg liegend mit der Agarschicht oben inkubiert. Das Substrat (S) wurde im Gemisch mit HMN ohne direkten Kontakt mit dem Agar zugesetzt.

2.3.2.3. Flüssige Verdünnungsreihen

Für flüssige Verdünnungsreihen wurde Medium mit Vitaminen und Spurenelementen in Kulturröhrchen gefüllt. In die ersten 6 Röhrchen wurden je 9 ml des Mediums gegeben, ab dem siebten Röhrchen wurde nur 1 ml Medium eingefüllt. Die Röhrchen wurden unter N_2/CO_2 Begasung nach der Hungate-Technik verschlossen. Das erste Röhrchen wurde mit 1 ml der Anreicherungskultur beimpft. Nach den 1:10-Verdünnungsschritten wurde nach dem sechsten Röhrchen im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Röhrchen mit den 1:2-Verdünnungen wurden anschließend mit Medium auf 10 ml Kulturvolumen aufgefüllt. Das Substrat-HMN-Gemisch wurde nach dem Verdünnen und Auffüllen den bereits verschlossenen Röhrchen zugesetzt. Die Röhrchen wurden flach liegend bei 28 °C inkubiert.

2.4. Kultivierungsmethoden in unterschiedlichen Experimenten

2.4.1. Stammhaltung

Zur Erhaltung des Neuisolates und der anderen zu Vergleichen herangezogenen nitratreduzierenden Bakterienstämme wurden die jeweiligen Stämme in 20-ml-Röhrchen kultiviert und alle vier Wochen überimpft. Das Ansetzen der Stammkulturen erfolgte wie in Absatz II.2.4.3. beschrieben. Die Stämme wurden parallel auf einer gut verwertbaren Fettsäure (Natriumsalz) und auf einem Kohlenwasserstoff (Alkan bzw. Aromat) angezogen. Die gewachsenen Stammkulturen wurden bei 4 °C gelagert.

2.4.2. Reinheitskontrollen

Zur Reinheitskontrolle wurden die Stammkulturen mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie auf ein einheitliches Erscheinungsbild der Zellen überprüft. Zusätzlich wurde die Einheitlichkeit der Kolonien des Isolates auf Platten aus Komplexmediumagar kontrolliert. Durch Inkubation des Isolates in Medium mit 0,5 g Hefeextrakt und 5 mM Fructose und anschließende Mikroskopie wurden andersartige Zelltypen ausgeschlossen.

2.4.3. Zellanzucht zur physiologischen Charakterisierung

Die Kultivierung der Bakterien zur Ermittlung der verwertbaren Substrate, des Temperatur- und pH-Optimums und der Vitaminabhängigkeit erfolgte in anoxisch verschlossenen 20-ml-Röhrchen. Das Medium wurde in die Röhrchen mittels einer Glaspipette eingefüllt, wobei die Pipettenspitze zur Vermeidung eines erhöhten Luftkontaktes beim Auslaufen des Mediums stets unter der Oberfläche des Mediumspiegels gehalten wurde. Die Röhrchen wurden mit etwa 15 ml Medium befüllt und unter N_2/CO_2 Begasung nach der Hungate-Technik verschlossen. Die Beimpfung erfolgte mit 3 bis 6 % des Kulturvolumens aus einer dichtgewachsenen Stammkultur. Das Inokulum wurde mittels einer N_2 -gespülten Spritze in die verschlossenen Kulturgefäße injiziert.

2.4.3.1. Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde eine Vielzahl identischer Röhrchenkulturen des Isolates angesetzt. Als Substrat wurde Hexan im Gemisch mit HMN zugesetzt. Die Röhrchen (Doppelinkubationen) wurden liegend ohne Schütteln in Brutschränken mit unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 660 nm kontinuierlich über einen Zeitraum von acht Wochen verfolgt.

2.4.3.2. Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden zu je 50 ml Medium unterschiedliche Mengen steriler 1 M HCl oder 1 M NaOH zugesetzt und für jeden vorgegebenen pH-Wert auf drei Kulturröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden unter N_2/CO_2 -Atmosphäre verschlossen, mit Hexan-HMN-Gemisch versetzt und beimpft. Eines der drei Röhrchen eines pH-Ansatzes wurde unmittelbar nach dem Beimpfen zur Messung des pH-Wertes geöffnet. Die anderen beiden Röhrchen dieses Ansatzes wurden bei 28 °C liegend unter Schütteln inkubiert. Das Kulturwachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 660 nm verfolgt.

2.4.3.3. Substrattest

Zur Ermittlung des Substratspektrums wurden dem Medium in Doppelansätzen die verschiedenen Substrate zugesetzt. Einige Substrate wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen angeboten. Die Kulturansätze mit wasserunlöslichen Substraten wurden liegend unter Schütteln inkubiert; alle anderen Kulturansätze wurden aufrecht stehend inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C. Das Kulturwachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 660 nm verfolgt.

2.4.3.4. Ermittlung des Vitaminbedarfs

Zur Ermittlung des Vitaminbedarfs wurde das Isolat über zehn Passagen auf vitaminfreiem Medium gezogen (Parallelansätze je Passage). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit allen Vitaminzusätzen. Alle Ansätze wurden liegend unter Schütteln bei 28 °C inkubiert. Die optische Dichte der jeweiligen Passage (bei 660 nm) wurde mit der Kontrollkultur verglichen.

2.4.3.5. Aerobe Wachstumstests

Die Prüfung auf aerobes Wachstum des Neuisolates erfolgte mit Mineralmedium in Schraubdeckelglasflaschen (50 ml). Die Flaschen wurden mit 10 ml oxischem Medium gefüllt. Die Zusammensetzung des Mediums war wie in II.2.2.1. angegeben, jedoch wurde kein Ascorbat zugegeben. Als Substrate wurden Kohlenwasserstoffe und Fettsäuren in je drei Parallelansätzen eingesetzt. Einem der drei Ansätze wurde zusätzlich 10 mM Nitrat zugegeben. Der Gasraum enthielt ein Luft/CO₂-Gasgemisch (90/10 [v/v]). Das steril zugesetzte CO₂ sollte die Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Bicarbonat enthaltenden Medium gewährleisten. In den Ansätzen mit Kohlenwasserstoffen wurden die Flaschendeckel mit teflonbeschichteten Gummidichtungen versehen, um ein Entweichen der Kohlenwasserstoffe auszuschließen. Die Inkubation der aeroben Kulturflaschen erfolgte bei 28 °C schüttelnd.

2.4.4. Zellanzucht zur Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation

Die Bilanzierung der anaeroben Hexanoxidation in der Reinkultur wurde in 100 ml Süßwassermedium in flachen Glasflaschen (125 ml) durchgeführt. Der Gasraum wurde mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch gespült. Anschließend wurden die Flaschen mit einem Butylseptum verschlossen und durch einen Schraubdeckelverschluß gesichert. Das Substrat wurde im definierten Gemisch mit HMN (s. II.2.2.3.5.) in die bereits verschlossenen Flaschen mit einer N₂-gespülter Spritze injiziert. Die vorbereiteten Kulturflaschen wurden

vor der Beimpfung zur vollständigen Reduktion möglicher Sauerstoffreste über Nacht vorinkubiert. Am folgenden Tag wurde eine auf demselben Substrat dichtgewachsene Vorkultur als Inokulum injiziert (3%ig). Der dabei entstehende Gasüberdruck wurde mit einer dünnen Kanüle abgelassen. Die Kulturen wurden flach liegend unter Schütteln bei 28 °C inkubiert, so daß die wasserunlösliche Phase nicht mit dem Stopfen in Kontakt kam.

Den Kulturansätzen, anhand derer eine Wachstumskurve aufgenommen wurde, wurden in bestimmten Intervallen während der Inkubationszeit Proben zur Bestimmung der optischen Dichte (bei 660 nm) und zur Bestimmung der Nitrat- und Nitritkonzentration entnommen.

Den Kulturansätzen für die stöchiometrische Analyse wurden erst nach Ablauf der Inkubationszeit zur Analyse die notwendigen Proben entnommen. Zunächst wurde der Gasüberdruck mit Hilfe einer leicht mit Wasser befeuchteten Glasspritze gemessen. Gleichzeitig wurde eine Probe für eine Gasanalyse entnommen. Für die Analyse des Substratverbrauchs wurden nach Ablassen des Überdrucks 10 ml reinsten Hexadekans zur Vergrößerung der Lösungsmittelphase zugesetzt. Nach intensivem Ausschütteln der Kultur wurden 2 ml der wasserunlöslichen Phase für die gaschromatographischen Analysen entnommen. Erst danach wurden wäßrige Proben zur Bestimmung der optischen Dichte, der Ammonium-, der Nitrat- und der Nitritkonzentration entnommen.

Die Bilanzierung der anaeroben Cyclohexanoxidation in der Anreicherungskultur erfolgte in gleicher Weise wie die Experimente zur Bilanzierung der Hexanoxidation in der Reinkultur. In den Experimenten mit der Anreicherungskultur wurde jedoch das Medium nicht mit Ascorbat vorreduziert, um eine Verwendung des Ascorbats als Kohlenstoff- und Energiequelle auszuschließen. Darüber hinaus wurde den Ansätzen für die gaschromatographische Analyse die organische Phase direkt ohne Zusatz von Hexadekan entnommen.

2.4.5. Massenzuchten für biochemische und genetische Untersuchungen

Für die Gewinnung von Zellmasse, der Grundlage weiterführender biochemischer und genetischer Untersuchungen, war eine Kultivierung der Bakterien in großen Mengen notwendig.

Massenzuchten mit Kohlenwasserstoffen als Substrat erfolgten in 400 ml Süßwassermedium in flachen Glasflaschen (500 ml), die mit Butylgummistopfen und Schraubdeckeln mit Bohrung verschlossen wurden. Dabei wurden je Anzucht mehrere Kulturen der beschriebenen Größe parallel angesetzt. Das Medium wurde direkt aus dem Abfüllkolben in mit N₂/CO₂-begaste Kulturflaschen über ein Abfüllröhrchen eingefüllt. Anschließend wurden die Flaschen unter N₂/CO₂-Begasung verschlossen. Das wasserunlösliche Substrat wurde nachträglich im Gemisch mit HMN durch den Stopfen

injiziert. Die eingesetzte Nitratkonzentration im Medium lag in den Massenanzuchten zwischen 8 und 9 mM. Höhere Nitratkonzentrationen führten zum verfrühten Abbruch des Kulturwachstums aufgrund zu hoher Konzentrationen intermediär gebildeten, toxischen Nitrits. Als Inokulum (3%ig) diente eine auf demselben Substrat dichtgewachsene Vorkultur, die ebenfalls nachträglich in die Kulturflaschen injiziert wurde. Die Inkubation der Flaschen erfolgte liegend bei 28 °C.

Massenanzuchten mit löslichen Substraten erfolgten in Süßwassermedium in 2 l Steilbrustflaschen, die ebenfalls mit einem Butylgummistopfen und Schraubdeckel, beide mit Bohrung, verschlossen wurden. Im Butylgummistopfen steckte ein Röhrchen mit einem Septum, das dem nachträglichen Zufügen von Mediumkomponenten diente. Das Medium wurde direkt in den Steilbrustflaschen angesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter N_2/CO_2 -Begasung abgekühlt und unter kontinuierlichem Gasstrom mit den weiteren Komponenten versetzt. Das Beimpfen erfolgte mit 3 % des Anzuchtolumens aus einer dichtgewachsenen Vorkultur. Die Flaschen wurden unter kontinuierlichem Rühren mit einem Magnetstäbchen bei 28 °C inkubiert.

2.4.6. Zellernte

Für die anaerobe Ernte der Massenanzuchten wurden die Kulturgefäße in eine Anaerobenkammer eingeschleust. Kulturen mit Kohlenwasserstoffphase wurden mit Hilfe eines Scheidetrichters von der wasserunlöslichen Phase getrennt. Die erhaltene Kulturflüssigkeit wurde dann auf bereits am Vortag in die Kammer eingeschleuste Zentrifugenbecher (450 ml) verteilt. Die umgefüllte Kultursuspension wurde in den gasdicht verschlossenen Zentrifugenbechern aus der Kammer geschleust und 40 min bei 8000 rpm (JA10 Rotor, J2-MC, Beckmann, Palo Alto, California, USA) bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die noch verschlossenen Zentrifugenbecher erneut in die Kammer eingebracht und die Kulturüberstände dekantiert. Die sedimentierten Zellen wurden je nach durchzuführender Untersuchung in Süßwassermedium bzw. Puffer aufgenommen, gewaschen, erneut zentrifugiert und wieder in Medium bzw. Puffer aufgenommen. Mit Ausnahme der Zentrifugation der geschlossenen Becher erfolgten alle Arbeitsgänge in der Anaerobenkammer.

2.5. Herstellung von Zellsuspensionen für Induktionsstudien

Die Durchführung von Induktionsstudien erfolgte mit Zellen, die zuvor über mindestens fünf Passagen auf dem jeweiligen Substrat der späteren Hauptkultur angezogen worden waren. Die Hauptkultur wurde in der exponentiellen Phase, wie unter II.2.4.6. beschrieben wurde,

geerntet und die sedimentierten Zellen nach einem Waschschrift in ascorbat- und nitrathaltigem (9 mM) Medium aufgenommen. Die optische Dichte (OD) der Zellsuspension wurde durch Zugabe von Medium auf einen Wert von 0,5 eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50-ml-Portionen auf Serumflaschen verteilt. Die Flaschen wurden noch in der Anaerobenkammer mit dicken Butylgummisepten und Aluminiumkappen verschlossen. Außerhalb der Anaerobenkammer wurde die Gasphase in den Serumflaschen mit dem N_2/CO_2 -Gemisch ausgetauscht. Die Inkubation der Flaschen erfolgte schräg liegend unter kontinuierlichem Schütteln über 60 h. Nach 1 h Inkubation wurde den Zellsuspensionen das jeweilige Substrat durch den Stopfen zugesetzt. In unterschiedlichen Zeitintervallen wurde aus den Ansätzen mit Hilfe einer mit N_2 -gespülten Spritze 0,5 ml wäßrige Probe für die Nitrat- und Nitrit-Bestimmungen entnommen.

2.6. Herstellung von Zellextrakten für gelelektrophoretische Analysen

Die Zellextrakte für die gelelektrophoretischen Untersuchungen wurde in gleicher Weise wie für die Zellsuspensionen und die enzymatischen Tests aus Massenanzuchten der Bakterienstämme gewonnen und unter anoxischen Bedingungen geerntet. Zum Waschen und Resuspendieren der Zellen wurde ein Tris-Puffer (100 mM), pH 7,5 mit 5 mM $MgCl_2$ verwendet. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die in mehreren Portionen sedimentierten Zellen in Abhängigkeit des weiteren Aufschlußverfahrens in verschiedenen Puffern bzw. Lösungen aufgenommen.

Aufschluß der Zellen in Harnstoff/NP40-Mix unter Einsatz des Glashomogenisators

Harnstoff/ NP40-Mix

Harnstoff	27,04 g
Nonidet P-40	2 ml
Ampholyt-Stammlösung (Servalyte 9-11, 20%ig)	5 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
H_2O	ad 50 ml

Der Harnstoff wurde unter schwacher Erwärmung in Lösung gebracht und der pH-Wert auf 9,5 eingestellt. Die Lagerung der Aufschlußlösung erfolgte in 1 ml Aliquots bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Die Aliquots wurden für ihre Verwendung langsam in der Hand aufgetaut.

Je 0,1 g Zellen (Naßgewicht) wurden 0,4 ml Harnstoff/NP40-Mix zugesetzt. Durch viermaliges Einfrieren bei -20 °C und Auftauen wurde das Aufbrechen der Zellen erleichtert. Der endgültige Aufschluß der Zellen wurde mit einem Glashomogenisator durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Glasstempels erreicht. Die aufgeschlossenen Zellen wurden abschließend 15 min bei 13.000 rpm, T = 20 °C in einer Mikrofuge (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Zellextraktüberstand wurde abgenommen und bis zur Elektrophorese bei -70 °C gelagert.

Aufschluß der Zellen durch Ultraschall

In einem zweiten Aufschlußverfahren wurden die sedimentierten Zellen zunächst in Tris-Puffer (100 mM, 5 mM MgCl₂, pH 7,5) resuspendiert. Je 0,1 g Zellen wurden 0,3 ml des Puffers zugesetzt. Die resuspendierten Zellen wurden dann mit Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß auf Eis gestellt und die Ultraschallsonde vorsichtig in die Zellsuspension eingetaucht. Bei einem Cycle von 20 % wurden die Zellen 6 - 8 mal für 1 min beschallt. Einer Beschallung folgte eine einminütige Pause. Dem beschallten Zellextrakt wurden anschließend 0,5 g reiner Harnstoff je µl Zellextrakt zugesetzt. Zusätzlich wurde dem Zellextrakt ein Volumen des Harnstoff/NP40-Mixes zugegeben. Die aufgeschlossenen Zellen wurden abschließend 15 min bei 13.000 rpm, T = 20 °C zentrifugiert und die Überstände bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.7. Herstellung von Zellextrakten für enzymatische Tests

Für die Herstellung von Zellextrakten zur Bestimmung von Enzymaktivitäten dienen Bakterien aus der Massenzucht (s. II.2.4.5.). Die Ernte der Zellen erfolgte wie unter II.2.4.6. beschrieben in der exponentiellen Phase unter anoxischen Bedingungen. Zellen aus 2 l Kulturvolumen wurden mit Aufschlußpuffer (50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 2,5 mM DTE, pH 7,2) gewaschen und nach der zweiten Zentrifugation in ca. 4,5 ml desselben Puffers aufgenommen. Ein Aliquot von 1,5 ml wurde abgenommen und in einem gasdicht verschlossenen Spezialgefäß unter N₂-Atmosphäre auf Eis gelagert (im weiteren als Zellsuspension bezeichnet). Die verbleibenden 3 ml wurden in der Anaerobenkammer in den Druckzylinder der French Presse (American Instruments Co. Inc., Silver Spring, USA) gefüllt. Der Zylinder wurde noch in der Kammer verschlossen. Der Zellaufschluß fand außerhalb der Kammer bei 900 psi (6,2 MPa) statt. Der aus dem Zylinderhahn fließende Zellextrakt wurde direkt über eine Kanüle in ein zweites Spezialgefäß (Abb. 6) gedrückt. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert. Gegebenenfalls wurde der

Aufschluß bis zu dreimal wiederholt. Das Befüllen des Druckzylinders wurde dabei immer in der Anaerobenkammer vorgenommen. Der nach dem letzten Aufschlußschritt erhaltene Zellextrakt wurde abschließend 12 min bei 12.000 rpm (JA21, J2-MC, Beckmann) bei 4 °C zentrifugiert. Der Zellextraktüberstand wurde abgenommen und in einem weiteren mit N₂-gespülten Spezialgefäß (Abb. 6) auf Eis aufbewahrt. Die Enzymaktivitäten wurden unmittelbar nach der Herstellung des Zellextraktes gemessen.

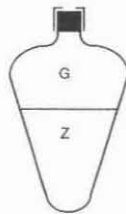


Abb. 6: Kleines Spezialgefäß, 4 ml Volumen, mit Butylgummiseptum und Schraubdeckel zur anaeroben Aufbewahrung von Zellextrakten. G, Gasraum; Z, Zellsuspension bzw. Zellaufschluß.

2.8. Bestimmung von Zelltrockenmasse

Für die Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation wurde die gebildete Zellmasse aus Kulturen von 100 ml Volumen ermittelt (s. II.2.4.4.). Die Zellen wurden zentrifugiert, mit Ammoniumacetat (20 mM) gewaschen und bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Die gebildete Zellmasse wurde auf das Kulturvolumen und die zuvor ermittelte optische Dichte bezogen, so daß ein Faktor zur Umrechnung von optischen Dichten (OD) in Zelldichten (mg/l) gewonnen wurde.

3. Analytische Methoden

3.1. Nachweis von Nitrat und Nitrit

Der qualitative Nachweis von Nitrat und Nitrit erfolgte mittels Teststäbchen der Firma Merck (Nitrat-Test, Merckoquant, Merck, Darmstadt).

Für die quantitative Bestimmung von Nitrat und Nitrit wurde eine Ionenchromatographie mit einer HPLC-Anlage der Firma Sykam (Gilchingen, München) durchgeführt. Die Trennung erfolgte über eine A09 Mikro-Anionenaustauschersäule (125 mm x 3 mm) mit einer 70 mM NaCl-Lösung als Laufmittel bei einer Flußrate von 1 ml/min und einer konstanten Säulentemperatur von 50 °C. Nitrit (Retentionszeit 1,4 min)

und Nitrat (Retentionszeit 2 min) wurden bei 220 nm mit einem Spektralphotometer (Modell S3200, Sykam, Gilchingen/München) gemessen. Proben aus Bakterienkulturen wurden vor der Analyse zentrifugiert (13.000 rpm, 4 min, $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), filtriert ($45\text{ }\mu\text{m}$, Nylon Arcodisc 4, Gelman Sciences Michigan, USA) und 1:10 bzw. 1:20 mit Wasser verdünnt. Die vorbereiteten Proben wurden über einen Autosampler (Modell 851-AS, Jasco, Tokyo, Japan) injiziert. Die Datenaufnahme und die Datenbearbeitung wurden mit Pyramid®-Software (Axxiom Chromatography, Moorpark, California, USA) durchgeführt. Für die Eichung wurden die Salze KNO_3 und KNO_2 in Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 mM eingesetzt.

3.2. Bestimmung von Distickstoffoxid

Der Nachweis von N_2O erfolgte gaschromatographisch unter Einsatz eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors (GC-8A-Gaschromatograph, Shimadzu Europa, Duisburg). Die Trennung erfolgte isotherm auf einer Poraplot Q Säule ($3\text{ mm} \times 2\text{ m}$) bei einer Temperatur von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Injektor- und Detektortemperatur betrug $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Flußrate von 16 ml/min verwendet.

Das in der wäßrigen Phase gelöste Distickstoffoxid wurde unter Verwendung des Löslichkeitskoeffizienten ($0,279\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, berechnet nach Dean 1992) anhand des Partialdrucks in der Gasphase ermittelt.

3.3. Bestimmung von Ammonium

Die quantitative Bestimmung von Ammonium erfolgte photometrisch nach Boltz und Taras (1978). Das Ammonium wurde in Gegenwart von Hypochlorit mit Phenol in alkalischer Lösung zu Indophenol umgesetzt und photometrisch bei 635 nm nachgewiesen.

Lösung A:

Phenol	3 g
Na-Nitroprussid	3 mg
H_2O	ad 100 ml

Lösung B:

NaOH	2 g
NaClO (13%ig)	2 ml
H_2O	ad 100 ml

Für die Lösung B wurde das Natriumhydroxid zunächst in 80 ml Wasser gelöst, bevor die Hypochlorid-Lösung zugesetzt und letztendlich auf 100 ml aufgefüllt wurde. Beide Lösungen wurden in dunklen Flaschen aufbewahrt und vor jeder Bestimmung neu angesetzt.

Für den Nachweis wurden 10 ml einer Probe bzw. 10 ml H₂O (Kontrolle) nacheinander mit jeweils 1 ml der Lösung A und B versetzt. Sowohl vor als auch nach der Zugabe von Lösung B wurde das Gemisch gründlich gemischt. Nach Zugabe beider Lösungen wurden die Ansätze für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 635 nm im Photometer bestimmt. Der Meßbereich des Tests lag zwischen 1 µM und 100 µM Ammonium, so daß die Proben gegebenenfalls entsprechend vor ihrer Analyse mit Wasser verdünnt werden mußten. Eine Eichkurve wurde mit NH₄Cl im angegebenen Konzentrationsbereich erstellt.

3.4. Gaschromatographische Analyse von Kohlenwasserstoffen

3.4.1. Bestimmung von Hexan in der organischen Phase (HMN)

Zur Bestimmung des Hexanverbrauchs in den Kulturansätzen (s. II.2.4.4.) wurde den Ansätzen nach der Inkubation 10 ml Hexadekan und 25 µl Dekan als interner Standard zugesetzt. Die Ansätze wurden anschließend gründlich geschüttelt. Dann wurden 2 ml der organischen Phase für die gaschromatographische Analyse entnommen. Die Proben wurden in dunklen, mit PTFE-Septen verschlossenen Gefäßen (Zinsser-Analytik, Frankfurt) bei -18 °C gelagert und vor der Analyse 1:10 mit Oktan verdünnt. Von den verdünnten Proben wurde je 1 µl mit einer Glasspritze injiziert. Die Spritze wurde für die einzelnen Läufe mit Oktan gespült.

Die Trennung erfolgte gaschromatographisch auf einer PVMS/54 Permaphase-Kapillarsäule (50 m x 0,32 mm ID; 0,3 µm Filmdicke) mit Hilfe des Perkin Elmer Autosystems (Perkin Elmer, Überlingen); zum Nachweis diente ein Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flußrate von 2,9 ml/min. Die Analysen wurden mit einem Split von 1:10 durchgeführt. Die für den FID verwendeten Gase waren Wasserstoff mit 40 ml/min und synthetische Luft mit 420 ml/min. Zur optimalen Trennung diente das nachstehende Temperaturprogramm. Die hohe Temperatur am Ende des Temperaturprogrammes diente der Regeneration der Säule. Bei dem verwendeten Temperaturprogramm eluierte Hexan nach 2,2 min, Oktan nach 5,8 min, Dekan nach 8,8 min und Hexadekan nach 12,1 min. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Turbochrom Navigator 4.1 (Perkin Elmer, Überlingen).

Injektortemperatur	$T_i = 250\text{ °C}$
Detektortemperatur	$T_d = 350\text{ °C}$
Ofentemperatur 1	$T_1 = 50\text{ °C}, 5\text{ min}$
Heizrate 1	20 °C/min
Ofentemperatur 2	$T_2 = 170\text{ °C}, 0,1\text{ min}$
Heizrate 2	40 °C/min
Ofentemperatur 3	$T_3 = 300\text{ °C}, 10\text{ min}$

3.4.2. Bestimmung von Cyclohexan in der organischen Phase (HMN)

Zur Bestimmung des Cyclohexanverbrauchs in den Anreicherungsansätzen wurde den Ansätzen nach der Inkubation mit Hilfe einer langen Kanüle die organische Phase für die gaschromatographische Analyse entnommen. Die Proben wurden in dunklen, mit PTFE-Septen verschlossenen Gefäßen (Zinsser Analytik, Frankfurt) aufgenommen und bei -18 °C gelagert. Für die Analyse wurden die Proben zuvor mit Oktan verdünnt (1:5; 1:10); dann wurde je $1\text{ }\mu\text{l}$ der verdünnten Lösung mit Hilfe einer Glasspritze injiziert. Vor den einzelnen Läufen wurde die Spritze mit Oktan gespült.

Die Analyse erfolgte mittels Dual-Kapillarsäulen-Gaschromatographie (GC-14A Gaschromatograph, Shimadzu Europa, Duisburg) mit einer unpolaren SE 54-Säule (50 m x 0,32 mm, 0,5 μm Filmdicke, Macherey & Nagel, Düren) und einer polaren CW 20M Säule (50 m x 0,32 mm, 0,5 μm Filmdicke, Macherey & Nagel, Düren). Die Detektion erfolgte durch zwei Flammenionisationsdetektoren. Als Trägergas wurde Wasserstoff mit einer Flußrate von 2 ml/min verwendet. Die Analysen wurden mit einem Split von 1:20 unter folgenden Trennbedingungen durchgeführt:

Injektortemperatur	$T_i = 250\text{ °C}$
Detektortemperatur	$T_d = 280\text{ °C}$
Ofentemperatur 1	$T_1 = 50\text{ °C}, 7\text{ min}$
Heizrate	20 °C/min
Ofentemperatur 2	$T_2 = 220\text{ °C}, 5\text{ min}$

Bei dem verwendeten Temperaturprogramm eluierte Cyclohexan nach 3,5 min und Oktan nach 6,9 min. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Turbochrom Navigator 4.1 (Perkin Elmer, Überlingen).

3.4.3. Bestimmung von kurzkettigen, aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Erdöl mittels Headspace-Analyse

Zur Bestimmung kurzkettiger, aliphatischer Kohlenwasserstoffe in Bakterienkulturen mit Erdöl als Substrat wurde eine Headspace-Analyse durchgeführt. Dazu wurden den Kulturansätzen bei Raumtemperatur mit Hilfe einer gasdichten Glasspritze Proben 0,5 ml aus dem Gasraum entnommen und gaschromatographisch analysiert. Die Analyse erfolgte gaschromatographisch über eine PVMS/54 Permaphase-Kapillarsäule (50 m x 0,32 mm ID; 0,3 µm Filmdicke) mit Hilfe des Perkin Elmer Autosystems (Perkin Elmer, Überlingen); zum Nachweis diente wiederum ein Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flußrate von 2,9 ml/min bei einem Split von 1:10. Die für den FID verwendeten Gase waren Wasserstoff mit 40 ml/min und synthetische Luft mit 420 ml/min. Die Trennung erfolgte mit dem nachstehenden Temperaturprogramm:

Injektortemperatur	$T_i = 130\text{ °C}$
Detektortemperatur	$T_d = 250\text{ °C}$
Ofentemperatur 1	$T_1 = 30\text{ °C}, 25\text{ min}$
Heizrate	30 °C/min
Ofentemperatur 2	$T_2 = 240\text{ °C}, 5\text{ min}$

Zur Identifizierung der aliphatischen Kohlenwasserstoffkomponenten im Erdöl wurde ein Standard-Gemisch aus kurzkettigen, aliphatischen Kohlenwasserstoffen hergestellt und analysiert.

3.5. Analyse von Zellfettsäuren

Für die Analyse der Zellfettsäuren wurden die Bakterien in einer Massenanzucht auf ausgewählten Substraten kultiviert. Der jeweiligen Hauptkultur (1,6 l Gesamtvolumen) ging eine Kultivierung des Stammes auf dem gleichen Substrat über 5 Passagen voraus. Die Ernte der Hauptkultur erfolgte unter oxidischen Bedingungen entsprechend Abschnitt II.2.4.6. Die Zellen wurden mit 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,9 gewaschen, in 5 ml derselben Lösung aufgenommen und in der Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode im Harz) bei -20 °C und 0,04 mbar getrocknet. Die gefriergetrockneten Zellen wurden bei -20 °C gelagert. Für die Analyse der Zellfettsäuren wurden die Fettsäuren zu Methylestern umgesetzt und als solche gaschromatographisch analysiert.

Herstellung von Fettsäuremethylestern

Die Umsetzung der Zellfettsäuren zu Methylestern und ihre Extraktion erfolgten nach Sasser (1997). Für die einzelnen Schritte wurden folgende Reagenzien benötigt:

Reagenz 1 (Verseifung):	NaOH	45 g
	Methanol	150 ml
	H ₂ O	150 ml
Reagenz 2 (Methylierung):	Methanol	275 ml
	HCl	325 ml
Reagenz 3 (Extraktion):	Hexan	200 ml
	Methyl-tert-Butylether	200 ml
Reagenz 4 (Waschen):	NaOH	10,8 g
	H ₂ O	900 ml

Etwa 40 mg gefriergetrocknete Zellen wurden in ein mit einem Teflondeckel verschließbares 10 ml-Glasröhrchen eingewogen.

Verseifung:

Den gefriergetrockneten Zellen wurden 1 ml von Reagenz 1 zugesetzt. Das verschlossene Röhrchen wurde für 5 min in einem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach gründlichem Durchmischen auf einem Vortex Mixer wurde der Ansatz für weitere 30 min in dem siedenden Wasserbad inkubiert. Nach der Erhitzung wurde der Ansatz in einem Eisbad abgekühlt.

Methylierung:

Dem gekühlten Ansatz wurde 2 ml von Reagenz 2 zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 80 °C. Die Zeit und die Temperatur dieses Schrittes waren genau einzuhalten.

Extraktion:

Für die Extraktion der Methylester wurden dem abgekühlten Ansatz 1,25 ml von Reagenz 3 zugesetzt. Der Ansatz wurde für 10 min permanent gut durchmischt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde nach 10 min die wäßrige Phase entfernt und verworfen.

Waschen:

Die verbliebene organische Phase wurde gewaschen. Dazu wurden 3 ml von Reagenz 4 zugesetzt. Nach erneutem Durchmischen (mind. 5 min) wurde eine Phasentrennung

beobachtet, die durch Zusatz einer Spatelspitze NaCl verstärkt wurde. Ungefähr 2/3 der organischen Phase wurden mit einer Glaspipette abgenommen und für die gaschromatographische Analyse in dunklen Probengefäßen bei -20 °C gelagert.

Nachweis von Fettsäuremethylestern mittels Gaschromatographie

Die Analyse erfolgte gaschromatographisch auf einer PVMS/54 Permaphase-Kapillarsäule (50 m x 0,32 mm ID; 0,3 µm Filmdicke) mit Hilfe des Perkin Elmer Autosystems (Perkin Elmer, Überlingen); zum Nachweis diente ein Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer Flußrate von 2,9 ml/min. Die Analyse wurde bei einem Split von 1:10 durchgeführt. Die für den FID verwendeten Gase waren Wasserstoff mit 40 ml/min und synthetische Luft mit 420 ml/min. Für die Analyse wurde je 1 µl der Fettsäuremethylester-Probe injiziert. Die Spritze wurde vor jedem Lauf mit Hexan gespült. Die Trennung erfolgte mit dem nachstehenden Temperaturprogramm:

Injektortemperatur	$T_i = 300\text{ °C}$
Detektortemperatur	$T_d = 350\text{ °C}$
Ofentemperatur 1	$T_1 = 140\text{ °C}, 2\text{ min}$
Heizrate 1	4 °C/min
Ofentemperatur 2	$T_2 = 270\text{ °C}, 0,1\text{ min}$
Heizrate 2	10 °C/min
Ofentemperatur 3	$T_3 = 300\text{ °C}, 5\text{ min}$

Zur Identifizierung der Fettsäuremethylester wurden zwei käufliche Standard-Gemische bekannter Fettsäuremethylester (Sulpelco 37component FAME Mix, Sulpelco BAME, Sulpelco, Deisenhofen) verwendet.

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D) Auftrennung von Zellproteinen wurde nach der Beschreibung von Anderson (1991) mit dem ISO-DALT System® (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) durchgeführt.

Die erste Dimension stellt eine isoelektische Fokussierung dar. Proteine werden entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, in dem sie in einem elektrischen Feld in einem pH-Gradienten wandern. In einer zweiten Dimension werden die bereits isoelektrisch fokussierten Proteine in einem SDS-Gel mit einem Polyacrylamidgradienten (9-18 %) entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Das Ergebnis der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist ein komplexes Proteinpunktmuster, welches für die jeweiligen Anzuchtbedingungen charakteristisch ist.

Als Proben für die 2D-Elektrophorese dienten Geamtzellproteine von Bakterienzellen, die auf ausgewählten Substraten angezogen worden waren. Die Bakterien wurden über mindestens fünf Passagen auf dem gleichen Substrat angezogen, bevor die Kultivierung in einer Massenanzucht erfolgte. Die Herstellung der Zellextrakte erfolgte wie unter Abschnitt II.2.6. beschrieben.

4.1.1. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

4.1.1.1. Herstellung der Iso-Gele

Acrylamid-Lösung (31,8 %)

Acrylamid	15,0 g
Bisacrylamid	0,9 g
H ₂ O	ad 50 ml

Die Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert und in einer dunklen Flasche bei 4 °C gelagert. Die Lösung wurde innerhalb von 14 Tagen verwendet.

Ampholyt-Stammlösung

Biolyte 5-7	5,0 ml
Servalyte 3-10	2,5 ml
Biolyte 3-10	2,5 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C in einer dunklen Flasche gelagert.

Puffer II

Tris	11,35 g
SDS	0,75 g
H ₂ O	ad 375 ml

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 6 N HCl auf 6,8 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C.

Isoequilibrierungspuffer

Glycerin	7,5 ml
Puffer II	37,5 ml
SDS	1,5 g
DTT	0,1 g
H ₂ O	30 ml

Dem Puffer wurde zur Färbung eine Spatelspitze Bromphenolblau zugesetzt. Der Isoequilibrierungspuffer wurde zur Aufnahme der Gele jeweils frisch angesetzt.

Vorbereitung der Apparatur zur Herstellung der Iso-Gele

Die für die Iso-Gele verwendeten dünnen Glaskapillaren (28 cm x 0,15 cm) wurden vor jedem Lauf gründlich mit Reinigungskonzentrat (Bio-Rad, München) gereinigt und mit Druckluft getrocknet. Die gereinigten Kapillare wurden in der oberen Pufferkammer der ISO-DALT-Kammer fixiert, so daß sie 1,5 cm in die obere Pufferkammer hineinragten. Am entgegengesetzten Ende der Kapillare wurde die Gießkassette fixiert. Die Hauptgelkammer wurde mit 3 l Wasser befüllt. Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurde die Gellösung wie folgt zusammengestellt.

Iso-Gellösung

Harnstoff	8,25 g
Ampholyt-Stammlösung	0,8 ml
Acrylamid-Lösung (31,8 %)	2,0 ml
H ₂ O	6,0 ml

Zunächst wurden die Acrylamid-Lösung und das Wasser zusammengegeben und der Harnstoff darin durch leichtes Erwärmen gelöst. Erst nach vollständiger Auflösung der Harnstoff-Kristalle wurde die Ampholyt-Lösung zugesetzt. Anschließend wurde die Gellösung vorsichtig entgast. Die Polymerisation der Gellösung wurde durch die Zugabe der folgenden Reagenzien gestartet.

Nonidet P 40	300 μ l
APS-Lösung (10 %ig)	50 μ l
TEMED	5 μ l

Die gut durchmischte und zur Polymerisation gestartete Gellösung wurde unter Vermeidung von Luftblasen mit einer Glaspipette in die Gießkassette gefüllt. Die obere Pufferkammer einschließlich der Glaskapillaren und der anhängenden Gießkassette wurde unmittelbar nach dem Einfüllen der Gellösung in die mit 3 l Wasser gefüllte Hauptgelkammer eingehängt. Durch das vorsichtige Eintauchen konnte die schwere Gellösung in den Glaskapillaren auf eine einheitliche Meniskushöhe ansteigen. Nach 1 h waren die Gele vollständig polymerisiert. Nachdem die Gießkassette entfernt worden war, wurden die überstehenden Gelen an den Glaskapillaren abgeschnitten.

4.1.1.2. Vorfokussierung

Für die eigentliche isoelektrische Fokussierung war zunächst die Erstellung des pH-Gradienten innerhalb der Iso-Gele erforderlich. Das Wasser vom Gießvorgang in der Hauptkammer wurde verworfen und durch 3,2 l frisches Wasser ersetzt. Dem Wasser wurden zusätzlich 3,2 ml 85%ige H_3PO_4 zugesetzt. Die obere Pufferkammer wurde nun mit den mit Gel gefüllten Glaskapillaren in die saure Lösung eingetaucht. In die obere Pufferkammer wurden 200 ml Wasser mit 0,4 ml 10 N NaOH eingefüllt (Abb. 7). Mit Hilfe einer Glasspritze wurden die in die basische Lösung hineinragenden Kapillaren von Luftblasen befreit. Verbliebene unpolymerisierte Acrylamidreste wurden vorsichtig herausgespült. Zur späteren Erkennung des Gelendes wurden je Iso-Gel 2 μ l 10%ige SDS-Lösung aufgetragen. Diese Markierung war nach der Elektrophorese als milchige Zone am Gelende erkennbar und kennzeichnete das „saure“ Ende. Die Vorfokussierung erfolgte bei 200 V für 1 h.

4.1.1.3. Isoelektrische Fokussierung der Proteinproben

Nach der Vorfokussierung wurden die Proteinproben mit Hilfe einer Glasspritze aufgetragen. Die maximale Menge an Protein je Gel betrug 100 μ g. Als Standard wurden 2 μ l der carbamylierten Carboanhydrase des Calibration Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zusätzlich mit der Probe aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte zunächst für 1 h bei 1000 V, für die weiteren 22 h bei 1300 V.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Iso-Gele vorsichtig mit einer wassergefüllten Plastikspritze aus den Glaskapillaren gedrückt (Abb. 7), in Isoequilibrationspuffer aufgenommen und unmittelbar bis zu ihrer Verwendung bei $-80^\circ C$ eingefroren.

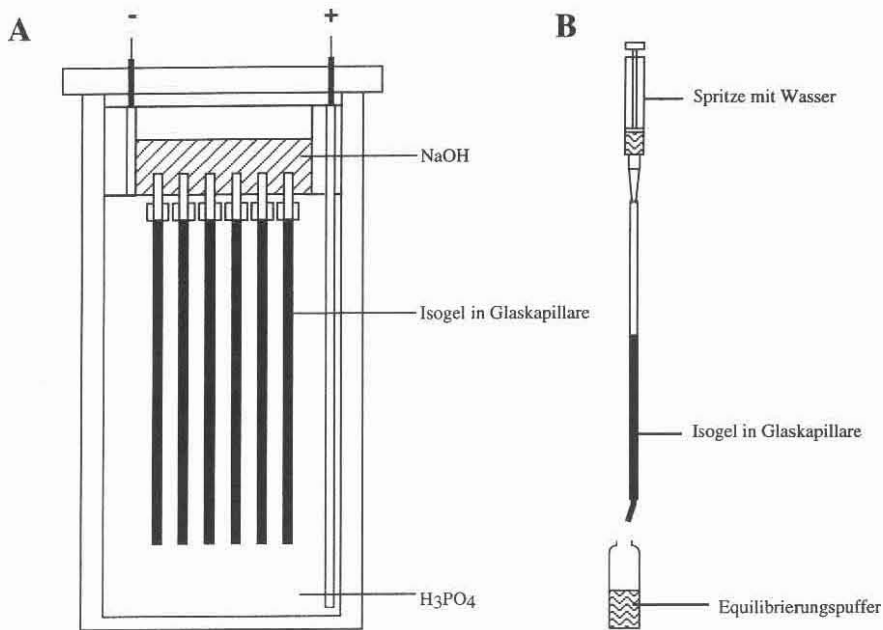


Abb. 7: A, Apparatur zur Durchführung der isoelektrischen Fokussierung. Die Glaskapillare mit den Iso-Gelen sind in der Apparatur so fixiert, so daß sie jeweils in eine Pufferkammer mit NaOH und in eine Pufferkammer mit H₃PO₄ ragen. B, nach Ablauf der isoelektrischen Fokussierung werden die Isogele mit Hilfe einer wassergefüllten Spritze aus den Glaskapillaren in ein Gefäß mit Equilibrierungspuffer gedrückt.

4.1.2. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

4.1.2.1. Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gradientengele

Acrylamid-Lösung (30,8 %)

Acrylamid	300 g
Bisacrylamid	8 g
H ₂ O	1000 ml

Die Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert und in einer dunklen Flasche bei 4 °C gelagert. Die Lösung wurde innerhalb von 14 Tagen verwendet.

Puffer D

Tris	182 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 6 N HCl auf 8,6 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

SDS-Lösung (10%ig)

SDS	10,0 g
H ₂ O	100 ml

APS-Lösung (10%ig)

Ammoniumpersulfat	2,0 g
H ₂ O	ad 20 ml

Die APS-Lösung wurde jeweils kurz vor ihrer Verwendung frisch angesetzt.

Elektrophorese-Laufpuffer

Tris	58,0 g
Glycin	299,6 g
SDS	19,9 g
H ₂ O	18,5 l

Gleitlösung

SDS	1,0 g
Puffer II	50 ml
H ₂ O	50 ml

Agarose-Lösung

Tris	2,9 g
Glycin	15,0 g
SDS	1,0 g
Agarose	5,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Für die SDS-PAGE wurden Glasplatten der Größe 20 cm x 25 cm verwendet. Aufgeklebte Spacer garantierten einen Abstand von 1,5 mm zwischen den Glasplatten. Die Gelkassetten wurden vor jedem Lauf gründlich von Gelresten befreit, mit Wasser gespült und abschließend mit Ethanol gereinigt.

Für den Gießvorgang der Gele wurden 22 Gelkassetten in einen Gelkontainer geladen. In jede Gelkassette wurde ein kleiner Beschriftungsabschnitt (0,5 cm x 1 cm) gelegt.

Für das SDS-Gel mit Polyacrylamidgradienten wurden kurz vor Beginn des Gießvorganges folgende leichte (9 %) und schwere (18 %) Gellösungen angesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der leichten und der schweren Gellösung für die Herstellung der SDS-Gele

Reagenzien	Leichte Gellösung (9 %) (ml)	Schwere Gellösung (18 %) (ml)
Acrylamid-Lösung (30,8 %)	321,4	642,9
Puffer D	275,0	275,0
SDS-Lösung (10%ig)	11,0	11,0
Glycerol	-	88,0
APS (10%ig)	10,0	5,0
TEMED	0,2	0,03
H ₂ O	479,5	77,3

Kurz vor dem Befüllen des Gradientenmischers wurde die Polymerisation der Gellösung durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Die leichte und die schwere Gellösung wurden nacheinander luftblasenfrei in die Kammern des Gradientenmischers eingefüllt. Mit Hilfe einer Schlauchpumpe wurde das Gemisch aus leichter und schwerer Gellösung in den Gelcontainer gedrückt. Die Pumpe wurde auf eine Flußrate von 460 ml/min eingestellt. Unmittelbar nachdem die Lösungen in dem Gradientenmischer zur Neige gegangen waren, wurde die Verbindung zwischen Pumpe und Gelcontainer gelöst. Mit Hilfe einer 35%igen Saccharose Lösung (mit Bromphenol leicht gefärbt) wurden die Zuflußverbindungen des Gelcontainers gefüllt. Für den Erhalt gerader Geloberflächen wurden die frisch gegossenen Gele mit einer gesättigten Lösung von Butanol in Puffer II besprüht. Die Gele waren nach 4 h vollständig auspolymerisiert.

Für den Elektrophoreselauf wurden die Gelkassetten dem Gelcontainer entnommen und gründlich mit Wasser von Gelresten befreit. Die Gele konnten bis zu einer Woche in Frischhalteboxen mit feuchten Tüchern geschichtet bei 4 °C gelagert werden.

4.1.2.2. SDS-PAGE

Mit dem ISO-DALT-System war ein Elektrophoreselauf von 10 Gelen gleichzeitig im Elektrophoresetank möglich. Vor dem Auftragen der Iso-Gele der ersten Dimension auf die SDS-Gele wurde der Tank mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt und auf 10 °C gekühlt.

Die aufzutragenden Iso-Gele wurden mit lauwarmem Wasser zügig aufgetaut, über ein Sieb mit Gleitlösung gespült und mit Hilfe eines Spezialständers luftblasenfrei auf die SDS-Gele aufgelegt (Abb. 8). Bei der Auftragung war auf die Orientierung der Iso-Gele zu achten. Mögliche Luftblasen zwischen Iso-Gel und dem SDS-Gel wurden mit Hilfe eines Spatels beseitigt. Die überschüssige Gleitlösung wurde abgegossen und das Iso-Gel mit 2 ml einer geschmolzenen Agarose-Lösung auf dem SDS-Gel fixiert (Abb. 8).

Zur Bestimmung von Molekularmassen wurden der High Molecular Weight (HMW) und der Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Der HMW und der LMW Standard wurde jeweils in 50 µl Wasser aufgenommen. Die beiden Standards wurden vereinigt und 20 µl des Gemisches auf kleine Filterstreifen pipettiert. Die Filterstreifen wurden mit einem Iso-Gel zusammen auf ein SDS-Gel aufgetragen und durch die Agarose fixiert.

Nachdem alle zehn SDS-Gele mit Iso-Gelen beladen worden waren, wurden die Gelkassetten für den Lauf in den Elektrophoresetank gestellt (Abb. 8). Die Elektrophorese erfolgte über 17 h bei einer Spannung von 120-130 V. Während der Elektrophorese wurde der Elektrophoresetank kontinuierlich auf 10 °C temperiert. Nach 17 h wurden die Gelkassetten dem Tank entnommen, die einzelnen Gelkassetten vorsichtig mit einem Spatel

aufgehoben und die SDS-Gele von der Agarose und dem Iso-Gel befreit. Die SDS-Gele wurden anschließend gefärbt oder für einen Transfer auf PVDF-Membranen vorbereitet.

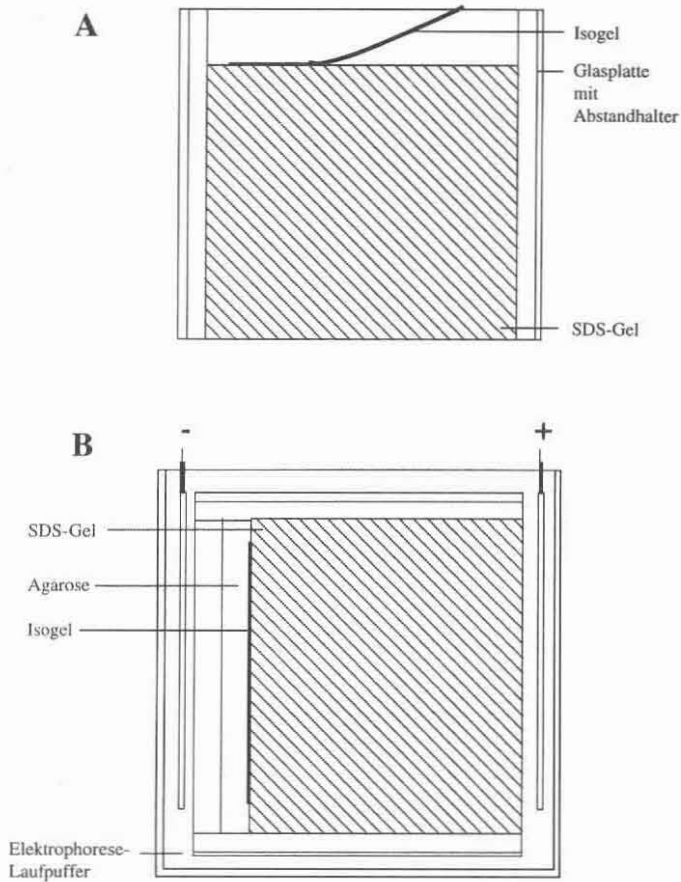


Abb. 8: A, Transfer des Iso-Gels auf das SDS-Gradientengel. B, Vor dem eigentlichen Elektrophoreselauf wurde das Iso-Gel mit Agarose auf dem SDS-Gel fixiert. Anschließend wurden die Gelkassetten in den Elektrophoretetank gestellt, so daß sich der Elektrophoreseverlauf von links nach rechts vollzog.

4.1.3. Coomassie Blue Färbung der SDS-Gele

Um die in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden diese unspezifisch mit Coomassie Blue gefärbt.

Fixierungslösung

Ethanol	500 ml
H ₃ PO ₄	20 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Färbelösung

Ethanol	500 ml
H ₃ PO ₄ , 85 % v/v	20 ml
Coomassie Blue R250	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Entfärbungslösung

Ethanol	200 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Die SDS-Gele wurden zunächst 30 min in der Fixierungslösung und anschließend über mindestens 6 h in der Färbelösung unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Wippe inkubiert. Zur Entfärbung wurden die Gele in 20%igem Ethanol inkubiert. Für eine gründliche Entfärbung des Gelhintergrunds war ein mindestens viermaliger Wechsel des Ethanolbades notwendig. Die Lagerung der Gele über einen längeren Zeitraum erfolgte ebenfalls in 20%igem Ethanol bei 4 °C.

4.2. Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF-Membranen)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membranen wurde nach der Methode von Matsudaira (1987) durchgeführt. Die Übertragung der Proteine auf die Membranen diente als Vorbereitung der Isolierung von einzelnen Proteinspots zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz. Der Transfer der in der zweidimensionalen Elektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte auf ProBlott PVDF-Membranen (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit Hilfe einer Semi-Dry Transfer Einheit (SemiPhor™, Pharmacia

Biotech, Freiburg). Das SDS-Gel wurde zwischen Filterpapier (Pharmacia Biotech, Freiburg) auf eine PVDF-Membran geschichtet und in der Transfer-Einheit einem elektrischen Feld ausgesetzt.

Die Gele wurden unmittelbar nach Ablauf der Gelelektrophorese den Gelkassetten entnommen und 5-10 min in CAPS-Transfer-Lösung inkubiert. Die PVDF-Membranen (zugeschnitten in der Größe 15,9 cm x 14,0 cm) wurden kurz mit 100%igem Methanol benetzt und anschließend in CAPS-Transfer-Lösung getränkt. Eine ausreichende Anzahl an Filterpapieren wurde ebenfalls in CAPS-Transfer-Lösung getränkt. Die zu blottenden Gele wurden jeweils einzeln in der Größe der Membranen ausgeschnitten, zur Orientierung durch Einschnitt markiert und anschließend erneut in CAPS-Transfer-Lösung zur Entfernung von Gelresten gewaschen. Die in CAPS-Transfer-Lösung inkubierten Filterpapiere, PVDF-Membranen und zugeschnittenen Gele wurden anschließend zu einem sogenannten Blotting-Sandwich wie folgt geschichtet und auf der mit Wasser befeuchteten Polplatte (Anode) der Transfer-Einheit plaziert (Abb. 9).

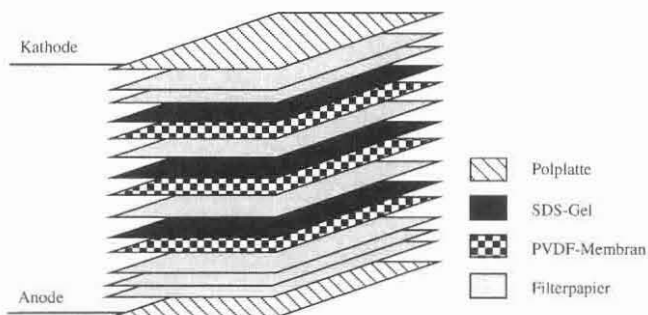


Abb. 9: Blotting-Sandwich für den Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membranen

Bei der Zusammenstellung des Sandwiches war darauf zu achten, daß das Gel nach Auflage auf die Membran nicht nachträglich verschoben wurde, da sonst die Gefahr der Verwischung der getrennten Proteine bestand. Vor dem Auflegen der zweiten Polplatte (Kathode) wurden mögliche Luftbläschen im Sandwich durch Überrollen mit einem Reagenzglas entfernt. Zur Beschwerung wurde auf die obere Polplatte der Transfer-Einheit ein 1 kg-Gewicht gestellt. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromversorgung von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Während des Transfers wurde die Stromstärke so angepaßt, daß eine Spannung von 15 V nicht überschritten wurde.

CAPS-Transfer-Lösung

3-Cyclohexylamino-1-propan-	
sulfonsäure	11,05 g
Methanol	500 ml
H ₂ O	ad 5000 ml

Der pH-Wert der Lösung wurde vor der vollständigen Auffüllung mit Wasser mit 6 N NaOH auf 11,0 eingestellt.

4.2.1. Coomassie Blue Färbung der PVDF-Membranen

Um die geblotteten Proteinspots für eine N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung gezielt aus den Membranen ausschneiden zu können, wurden die Membranen mit Coomassie Blue gefärbt.

Färbungslösung

Methanol	200 ml
Eisessig	4,0 ml
Coomassie Blue R250	0,4 g
H ₂ O	ad 400 ml

Entfärbungslösung

Methanol	500 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Nach Ablauf der Transferzeit wurden die PVDF-Membranen kurz mit Wasser gewaschen, mit 100%igem Methanol benetzt und zur Färbung der Proteinspots für 1-4 min in der Färbungslösung geschwenkt. Die Membranen wurden jeweils einzeln gefärbt. Der Membranhintergrund wurde durch mehrmaliges Waschen mit 50%igem Methanol entfärbt. Abschließend wurden die Membranen gründlich mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Bis zur Analyse einzelner Proteinspots wurden die Membranen in Tüten eingeschweißt bei -20 °C gelagert.

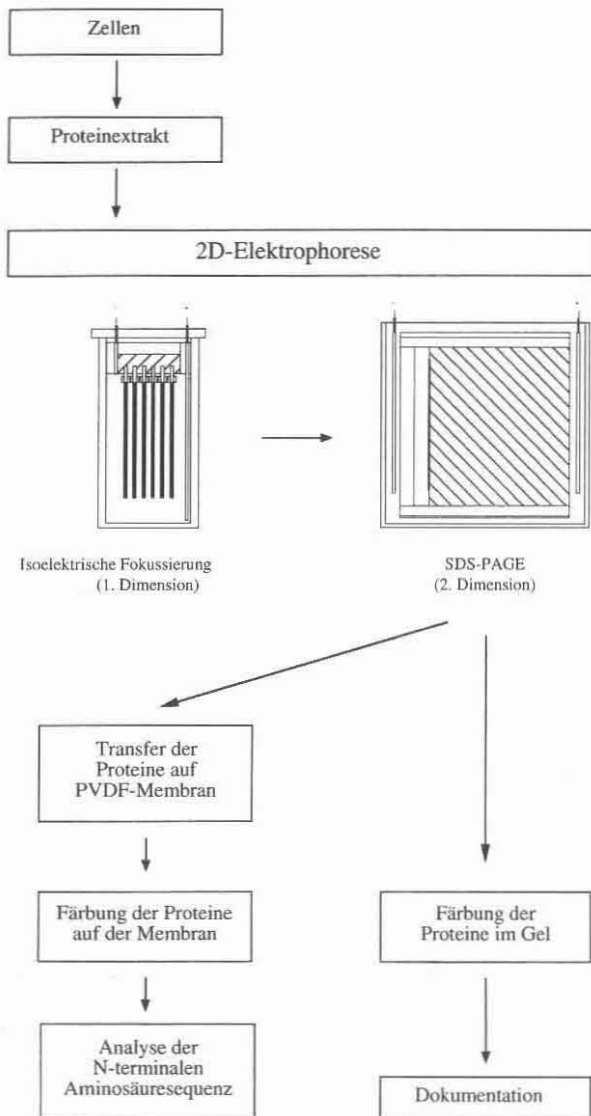


Abb. 10: Fließschema des experimentellen Ablaufs zur Untersuchung der gebildeten Zellproteine in Abhängigkeit des Wachstumssubstrates. Der gewonnene Proteinextrakt wurde in der 2D-Elektrophorese eingesetzt. Die zweidimensional aufgetrennten Proteine wurden anschließend zur Dokumentation direkt angefärbt oder auf PVDF-Membranen zur folgenden Ermittlung der N-terminalen Aminosäuresequenzen übertragen.

4.3. Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen

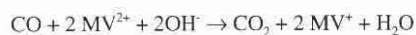
Für die Ermittlung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine nach der Anfärbung mit Coomassie selektiv aus der Membran ausgeschnitten und für die Sequenzanalyse verwendet. Die Aminosäuresequenzanalyse erfolgte nach dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaus mit einer Modifikation nach Hunkapiller (1983). Die Analyse wurde von Toplab, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Martinsried, durchgeführt.

4.4. Nachweis von Enzymaktivitäten unter anoxischen Bedingungen

Für den Nachweis von Enzymaktivitäten wurden, wie unter II.2.7. beschrieben, frisch hergestellte Zellextrakte verwendet. Die Zellextrakte wurden in mit N₂ gespülten Spezialgefäßen auf Eis gelagert.

Die verwendeten Puffer und die Zusätze wurden durch mehrmaliges Evakuieren unter Schütteln und Begasen mit N₂ anaerobisiert und in mit dicken Butylgummisepten verschlossenen Serumflaschen aufbewahrt. Die Entnahme der Lösungen erfolgte durch mit N₂ gespülte Spritzen. Als Reaktionsgefäße wurden 1,5 ml Glasküvetten mit runder, verschließbarer Öffnung (mit Schliff) verwendet. Die Küvetten wurden mit einem Stopfen verschlossen und mindestens 2 min mit N₂ durchspült, bevor die Lösungen für den Enzymtest injiziert wurden. Die Enzymtests wurden in einem Spektralphotometer (Shimadzu UV-1202, Duisburg) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 578 nm.

Testprinzip zum Nachweis von CO-Dehydrogenase:



Das zunächst leicht hellblau mit Natriumdithionit vorreduzierte Methylviologen wird bei vorhandener CO-Dehydrogenase-Aktivität vollständig reduziert (dunkelblau). Die Extinktionszunahme ist bei einer Wellenlänge von 578 nm meßbar.

Testansatz:

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , 50 mM, pH = 7,2	1,0 ml
Methylviologen, 500 mM	10 µl
Na-Dithionit, 29 mM (unter N ₂)	1-2 Tropfen
Zellextrakt	5-100 µl
CO	gesamter Gasraum

Nachdem der Puffer und das Methylviologen in die Küvette injiziert worden waren, wurde der Gasraum 1 min mit CO-Gas durchspült. Die Küvette wurde gründlich geschüttelt und erneut 1 min mit CO begast. Durch 1-2 Tropfen injizierte Natriumdithionit-Lösung wurde das Methylviologen im Reaktionsansatz bis zur leichten Hellblaufärbung vorreduziert. Der Reaktionsstart des Tests erfolgte durch Zugabe des Zellextraktes. Die Extinktionsänderung wurde mit einem Analogschreiber aufgezeichnet. Im Kontrollansatz wurde der Gasraum anstelle des CO-Gases mit N₂ durchspült.

In einem variierten Testansatz wurde statt des Zellextraktes eine Zellsuspension eingesetzt. Zusätzlich wurden dann 10 µl einer Cetyltrimethylammoniumbromid-Lösung (CTAB, 0,5 %, w/v) als Aufschlußreagenz dem Testansatz zugegeben. Das CTAB diente der Permeabilisierung der Zellen.

4.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in Zellextrakten wurde Coomassie-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Der Assay bedient sich der Methode von Bradford (1976). Das Reagenz wurde vor seiner Verwendung durch einen Papierfilter filtriert und in einer dunklen Flasche bei 4 °C gelagert. Als Testansatz wurden 200 µl des Reagenz mit 800 µl Probe bzw. Eichlösung zusammengegeben. Der gründlich gemischte Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (Spektralphotometer, Shimadzu UV-1202, Duisburg). Als Eichlösung wurde eine Rinderserumalbumin-Lösung (0,14 mg/ml) im Konzentrationsbereich von 1,4 bis 9,8 µg/ml eingesetzt. Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt, so daß die Werte im Bereich der Eichkurve lagen.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Bestimmung der 16S rRNA-Gensequenzen

Für die phylogenetische Einordnung des Neuisolates wurde die 16S rRNA-Gensequenz ermittelt. Sowohl die Experimente zur Ermittlung der 16S rRNA-Gensequenz als auch der Vergleich der erhaltenen Sequenz mit publizierten Sequenzdaten wurden von Dr. F. Rainey (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Die genomische DNA wurde extrahiert, und 16S rRNA-Genabschnitte wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Rainey et al. 1996). Das gereinigte PCR-Produkt wurde unter Verwendung des Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Germany) entsprechend den Herstellerangaben sequenziert. Ein Sequenzabgleich der erhaltenen Sequenz mit bereits publizierten Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des ae2 Editors (Maidak et al. 1994). Die Berechnung der phylogenetischen Distanzen und die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes erfolgten nach Jukes und Cantor (1969) und DeSoete (1983).

5.2. Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA

Der G+C-Gehalt der DNA wurde von der DSMZ in Braunschweig bestimmt. Die DNA wurde nach der Methode von Visuvanathan et al. (1989) isoliert und der G+C-Gehalt mittels HPLC nach Mesbah et al. (1989) und Tamaoka und Komagata (1984) ermittelt.

5.3. DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA Hybridisierung wurde von der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Die DNA wurde mittels Chromatographie über Hydroxyapatit nach der Methode von Cashion et al. (1977) isoliert. Die DNA/DNA Hybridisierung erfolgte nach der Methode von De Ley et al. (1970), wobei eine Modifizierung entsprechend Huss et al. (1983) und Escara und Hutton (1980) vorgenommen wurde. Zur Messung wurde ein Spektrometer (Gilford System Modell 2600) mit einem Thermoprogrammer (Gilford Modell 2527-R) und einem Plotter eingesetzt. Die Renaturierungsraten wurden mit dem PC-Programm TRANSFER.BAS von Jahnke (1992) ermittelt.

III. Experimente und Ergebnisse

Teil A:

Anaerobe Oxidation von aliphatischen, gesättigten Kohlenwasserstoffen durch denitrifizierende Mikroorganismen

1. Anreicherung und Isolierung eines zur anaeroben Oxidation von Hexan befähigten Nitratreduzierers

1.1. Anreicherung

Das Alkan mit der kürzesten Kette, dessen anaerobe Verwertbarkeit durch Reinkulturen denitrifizierender Bakterien nachgewiesen wurde, ist *n*-Oktan (C_8H_{18}). Das wichtigste Bestreben der vorliegenden Experimente war daher die Suche nach Denitrifizierern, die die Fähigkeit besitzen, noch kürzerkettige Alkane anaerob zu verwerten.

Als Impfmateriale für die mögliche Anreicherung solcher denitrifizierenden Bakterien diente eine Anreicherungskultur in Süßwassermedium mit Erdöl als Substrat und 5 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. In dieser Anreicherung wurde neben anderen Kohlenwasserstoffen auch *n*-Hexan und zu einem geringen Teil sogar *n*-Pentan aus dem Erdöl anaerob verwertet (Rabus et al. 1999).

Daher wurden für die nun folgenden Anreicherungsexperimente *n*-Pentan und *n*-Hexan einzeln als definierte Kohlenwasserstoffe verwendet. Das Inokulum dieser Anreicherungskulturen bestand aus einem Gemisch von Grabenschlämmen aus Bremen. Dazu wurde Süßwassermedium mit 5 mM Nitrat in 100 ml flachen Glasflaschen angesetzt. Sowohl Pentan als auch Hexan wurden 2%ig in einer Trägerphase (Heptamethylnonan, HMN) eingesetzt. Dem Medium wurde kein Ascorbat als Reduktionsmittel zugesetzt, um die Anreicherung zusätzlicher Bakterien mit dieser Verbindung auszuschließen. Die Inkubation der Kulturflaschen erfolgte flach liegend sowohl ruhig als auch unter kontinuierlichem Schütteln. Ein bakterielles Wachstum wurde durch Messung der Gasbildung und mikroskopische Kontrollen verfolgt und mit einer Kontrolle ohne Substrat verglichen.

Der Ansatz mit Pentan zeigte weder unter kontinuierlich schüttelnder Inkubation noch in ruhiger Lage ein bakterielles Wachstum. So blieben die Kulturen selbst nach sechsmonatiger Inkubation klar und ohne Gasbildung.

Dagegen wurde in Gegenwart von Hexan ein deutliches bakterielles Wachstum beobachtet. Neben einer zunehmenden Trübung der Kultur waren ein Nitratverbrauch (nachgewiesen mit Nitratteststäbchen) und eine Gasbildung in den Kulturen zu beobachten. Die unter kontinuierlichem Schütteln inkubierten Kulturen verbrauchten das Nitrat schneller

als die ruhig liegend inkubierten Kulturen. So mußte den geschüttelten Kulturen bereits nach einer Woche erneut Nitrat zugesetzt werden, während dies in den ruhig inkubierten Kulturen erst nach 3-5 Wochen notwendig war.

Die Kulturen zeichneten sich durch ein homogenes Wachstum der Zellen in der wäßrigen Phase aus. So zeigte sich eine einheitliche Trübung in parallelen Kulturansätzen, ohne Flockenbildung und ohne Emulgierung der organischen Phase. Die Bakterien wuchsen ohne Anheftung an die Trägerphase. Eine mikroskopische Kontrolle der Anreicherungskultur zeigte neben wenigen stäbchenförmigen Zelltypen einen deutlich vorherrschenden ovalen Zelltyp.

Die schüttelnd inkubierte Anreicherungskultur mit Hexan wurde als Inokulum für weitere Folgekulturen verwendet. Nach mehreren Passagen in Süßwassermedium mit Hexan als Substrat wurden aus einem gut gewachsenen Kulturansatz Aliquots für die Isolierungsschritte entnommen.

1.2. Isolierung

Die Isolierung eines Denitrifizierers, der zur anaeroben Oxidation kurzkettiger Alkane befähigt ist, wurde zunächst in anoxischen Agarverdünnungsreihen mit Acetat, Butyrat, Valerianat und Capronat versucht (s. II.2.3.2.1.). Nach ein bis zwei Wochen waren bis in die vierte Verdünnungsstufe Einzelkolonien erkennbar. Es handelte sich um zwei verschiedene Kolonietypen, nämlich größere, orange erscheinende Kolonien mit ausgefranstem Rand und kleinere, durchsichtige Kolonien mit glattem Rand. Mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette wurden die einzelnen Kolonietypen gezielt aus dem Agar gesogen und in Flüssigmedium übertragen. Als mögliches Substrat wurde dem Medium Hexan in HMN als Trägerphase zugesetzt. Keine der übertragenen Kolonien war jedoch zum Wachstum mit Hexan als Kohlenstoff- und Elektronenquelle befähigt. Die Kulturansätze blieben klar, und das Nitrat blieb unverbraucht. Eine mikroskopische Kontrolle der ausgesuchten Kolonien deutete bereits darauf hin, daß es sich bei den isolierten Bakterienzellen nicht um den vorherrschenden Zelltyp der Anreicherung (s. III.A.1.1.) handelte. Während der vorherrschende Zelltyp der Anreicherungskultur oval war, handelte es sich bei den isolierten Zellen um länglichere und deutlich kleinere Zellen. In wiederholten Verdünnungsreihen ließen sich die Beobachtungen der ersten Verdünnungsreihe erneut feststellen.

Eine gründliche Untersuchung von Agarstückchen aus den niedrigen Verdünnungsstufen der Agarreihen sollte eine Erklärung liefern. Schmale Agarstückchen wurden aus den Agarröhrchen herausgestanzt, zwischen einem Objektträger und Deckglas zerdrückt und anschließend mikroskopiert. Es waren Haufen aus nur wenigen Zellen sichtbar, die

offensichtlich nur sehr wenige Teilungen vollzogen hatten. Diese Zellen entsprachen dem vorherrschenden ovalen Zelltyp der Anreicherungskultur (s. III.A.1.1.). Das Agarmedium schien somit keine optimale Wachstums Umgebung für die alkanverwertenden Bakterien darzustellen.

Auch weitere Versuchsansätze mit festen Nährböden (Agarplatten und Bottle Plates, s. II.2.3.2.) ermöglichten nicht die Isolierung eines Hexan verwertenden Bakteriums. Ein Ausstrich auf anoxisch inkubierten Mineralmediumplatten mit Acetat und langkettigen Fettsäuren zeigte neben einem dicken Startimpfstrich nur selten Einzelkolonien. Die wenigen deutlich erkennbaren Kolonien waren nach einem Transfer in Medium mit Hexan nicht in der Lage, zu wachsen. Ein Ausstrich auf Agar in Bottle Plates mit Hexanatmosphäre zeigte ebenfalls nur ein sehr schwaches bakterielles Wachstum. Es waren nur sehr winzige Kolonien am Anfang des Impfstriches erkennbar, deren Isolierung mit ausgezogenen Pasteurpipetten nicht gelang.

Als letztendlich erfolgreiche Methode erwies sich eine flüssige Verdünnungsreihe in Süßwassermedium mit Hexan (2 % verdünnt in Trägerphase) als Substrat (s. II.2.3.2.3.). Die Verdünnung des Aliquots aus der Anreicherungskultur erfolgte in den ersten sechs Stufen im Verhältnis 1:10, in allen weiteren Stufen im Verhältnis 1:2. Hexan wurde nachträglich allen Verdünnungsstufen in HMN als Trägerphase zugesetzt. Ein Wachstum, erkennbar durch Trübung des Mediums, zeigte sich bis hin zur 14. Verdünnungsstufe. Eine mikroskopische Kontrolle der höchsten noch gewachsenen Verdünnungsstufe zeigte den aus der Anreicherungskultur bekannten vorherrschenden Zelltyp. Nach einer zweiten flüssigen Verdünnungsreihe, für deren Beimpfung die höchste noch gewachsene Verdünnungsstufe der ersten Verdünnungsreihe diente, wurde die letzte gewachsene Verdünnungsstufe als mögliche Reinkultur eines zur Verwertung von Hexan befähigten Denitrifizierers weiter untersucht.

Zur Prüfung der Reinheit wurde die Kultur auf festen Nährböden ausgestrichen. Es zeigte sich wiederum nur eine sehr schwache Koloniebildung auf den Platten. Die größten, am deutlichsten ausgeprägten Einzelkolonien wurden nach einem Ausstrich auf oxisch inkubierten Komplexmediumplatten mit AC-Broth beobachtet. Doch auch hier war die Koloniebildung nur am beginnenden Impfstrich zu beobachten. Isolierte Kolonien des Impfstriches zeigten deutlich den aus der Anreicherungskultur bekannten ovalen Zelltyp ohne morphologisch erkennbare Kontaminanten. Alle von der Platte isolierten Kolonien waren in der Lage, nach Übertragung in Flüssigmedium mit Hexan zu wachsen. Eine der erhaltenen Flüssigkulturen wurde als Reinkultur mit der Stammbezeichnung HxN1 ausgewählt und im weiteren Verlauf der Arbeit charakterisiert.

2. Phylogenetische Verwandtschaft des Neuisolates HxN1

2.1. Phylogenetische Einordnung des Stammes HxN1 aufgrund der 16S rRNA-Sequenzanalyse

Eine Einordnung des Neuisolates HxN1 aufgrund einer 16S rRNA-Sequenzanalyse ergab eine Zugehörigkeit zum *Azoarcus-Thauera*-Cluster innerhalb der β -Gruppe der Proteobakterien (Abb. 11). Innerhalb der *Azoarcus-Thauera*-Gruppierung zeigte sich nach einem 16S rRNA Sequenzvergleich ein sehr hoher Verwandtschaftsgrad zu den zur Verwertung von Aromaten befähigten Denitrifizierern Stamm PbN1 und Stamm EbN1 (Rabus und Widdel 1995). Die Sequenzähnlichkeit zu Stamm PbN1 betrug 99,4 % und zu Stamm EbN1 98,6 %.

2.2. DNA-DNA-Hybridisierung und G+C-Gehalt

Wegen der sehr hohen 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit des Neuisolats zu den Stämmen PbN1 und EbN1 wurde zwecks feinerer Erkennung der Verwandtschaftsverhältnisse eine DNA-DNA-Hybridisierung durchgeführt. Die DNA-DNA-Hybridisierung zeigte eine DNA-Ähnlichkeit des Stammes HxN1 zu PbN1 von 63,1 % und zu EbN1 von 62,7 %.

Der G+C-Gehalt der DNA des Stammes HxN1 betrug 66,3 mol % und lag damit in der Größenordnung der G+C-Gehalte anderer Stämme der *Azoarcus-Thauera* Gruppe, deren Werte wie folgt sind: Stamm PbN1 66,8 mol %, Stamm EbN1 65,0 mol % (Rabus und Widdel 1995), *Azoarcus evansii* 67,5 mol % (Anders et al. 1995), *Azoarcus indigenus* 66,6 mol % (Reinhold-Hurek et al. 1993), *Azoarcus anaerobius* 66,5 mol % (Springer et al. 1998), *Thauera aromatica* 67,0 mol % (Anders et al. 1995) und *Thauera selenatis* 66,0 mol % (Macy et al. 1993).

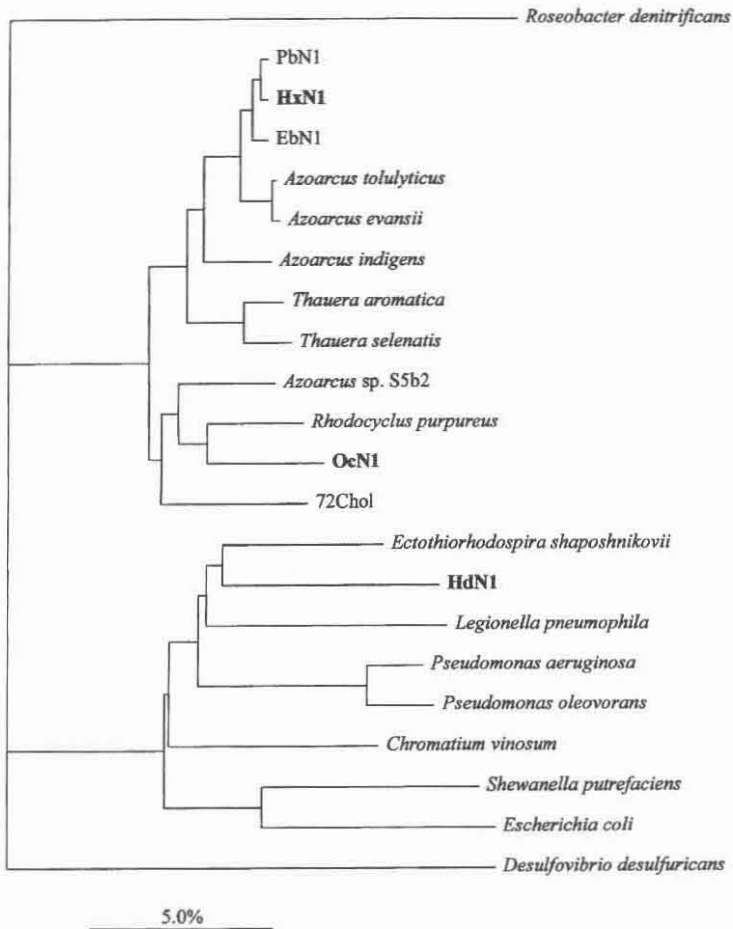


Abb. 11: Phylogenetisches Dendrogramm basierend auf 16S rRNA Sequenzen zur Einordnung des auf Hexan und Nitrat isolierten Stammes HxN1 sowie der beiden zuvor bekannten alkanverwertenden Denitrifizierer Stamm OeN1 und HdN1 (Ehrenreich 1996). Stamm HxN1 und OeN1 erwiesen sich als Angehörige der β -Gruppe der Proteobakterien, während Stamm HdN1 der γ -Gruppe der Proteobakterien angehörte. *Roseobacter denitrificans* wurde als Vertreter der α -Gruppe und *Desulfovibrio desulfuricans* als Vertreter δ -Gruppe in die Darstellung einbezogen. Der Maßstab entspricht fünf ausgetauschten Nukleotiden pro 100 Nukleotiden.

3. Charakterisierung des Stammes HxN1

3.1. Morphologie

Die Zellen des Stammes HxN1 waren unbeweglich und oval. Die Größe betrug $1,0 - 1,5 \mu\text{m} \times 1,8 - 2 \mu\text{m}$ (Abb. 12). Kulturen des Stammes zeichneten sich auf allen Substraten einschließlich Alkanen durch ein homogenes Wachstum in der wässrigen Phase aus. Im Gegensatz zu den bereits bekannten, ebenfalls zur Verwertung von Alkanen befähigten Denitrifizierern Stamm OcN1 und HdN1 (Ehrenreich 1996), hefteten Zellen des Neuisolats HxN1 während des Wachstums auf wasserunlöslichen Substraten (Alkane, Aldehyde, langkettige Alkohole) nicht an die Substratphase (Abb. 13). So zeigte sich in den Kulturen von Stamm HxN1 auch keine Emulgierung der wasserunlöslichen Substratphase. Das homogene Wachstumsverhalten des Stammes ermöglichte daher eine kontinuierliche Verfolgung des Wachstums durch Messung der optischen Dichte und begünstigte eine hohe Zellausbeute bei der Kulturernte.

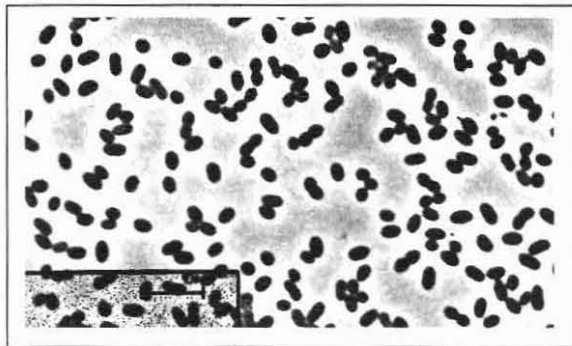


Abb. 12: Phasenkontrastaufnahme der Reinkultur von Stamm HxN1. Die Kultur war in Süßwassermedium mit 10 mM Nitrat und 5 % Hexan in HMN gewachsen. Der eingezeichnete Maßstab entspricht $6 \mu\text{m}$.

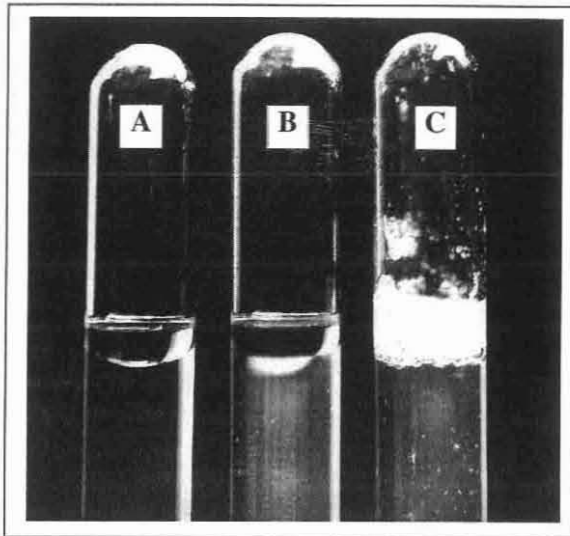


Abb. 13: Vergleich des Wachstumsverhalten zweier alkanverwertender Denitrifizierer. (A) Unbeimpfter Ansatz mit Medium und einer Hexan-HMN-Phase. (B) Stamm HxN1 gewachsen in Süßwassermedium mit Hexan-HMN-Phase. (C) Stamm OcN1 gewachsen in Süßwassermedium mit einer Oktan-HMN-Phase. Die Zellen von Stamm HxN1 weisen ein homogenes Wachstumsverhalten in der wäßrigen Phase auf und heften nicht wie die Zellen von Stamm OcN1 an der organischen Phase.

3.2. Temperatur- und pH-Optimum

Zur Ermittlung des Temperatur- und des pH-Optimums wurde der Stamm HxN1 mit Hexan (2 % in der Trägerphase) und 10 mM Nitrat in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 60 °C kultiviert. Es zeigte sich Wachstum in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 35 °C, mit einem Optimum zwischen 25 °C und 28 °C.

In Kulturansätzen verschiedener pH-Werte zeigte sich ein Wachstum im pH-Bereich von 7,0 bis 8,5. Das pH-Optimum lag zwischen 7,2 und 8,0.

3.3. Vitaminabhängigkeit

Zur Prüfung einer möglichen Vitaminabhängigkeit von Stamm HxN1 wurde dieser wiederholt mit Hexan (2 % in Trägerphase) und 10 mM Nitrat in Süßwassermedium ohne jegliche Vitaminzusätze kultiviert. Im Vergleich zu Kontrollansätzen mit vitaminhaltigem Medium zeigte sich, daß auch nach zehn Folgepassagen auf vitaminfreiem Medium das

Wachstum nicht beeinträchtigt war. Stamm HxN1 wies somit kein spezielles Vitaminbedürfnis auf.

3.4. Optimierung des Wachstums durch schüttelnde Inkubation

In der Anreicherungskultur wurde beobachtet, daß eine Inkubation unter kontinuierlichem Schütteln das Wachstum beschleunigte. Dies wurde auch für die Reinkultur bestätigt. Eine geschüttelt inkubierte Kultur des Stammes HxN1 mit wasserunlöslichem Substrat wuchs schneller als eine ruhig liegend inkubierte Kultur. Während in der geschüttelten Kultur mit 3 % (v/v) Inokulum innerhalb einer Woche die optische Dichte deutlich zunahm und 10 mM Nitrat vollständig verbraucht wurden, begann in der ruhig inkubierten Kultur erst in der zweiten Woche die Zunahme der OD und die Abnahme des Nitrats (Abb. 14 A).

3.5. Verträglichkeit des Substrates Hexan

Untersuchungen zur Verträglichkeit des Substrates Hexan wurden zur Optimierung des Wachstums des Stammes HxN1 und somit zur Optimierung der Zellausbeute für nachfolgende Untersuchungen zur Alkanverwertung durchgeführt.

Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt, daß kurzkettige Alkane, wenn sie unverdünnt den Kulturansätzen zugesetzt wurden, wachstumshemmend wirkten (Aeckersberg 1994; Ehrenreich 1996). Wurden die kurzkettigen Alkane jedoch verdünnt in einer hydrophoben inerten Trägerphase, z. B. Paraffin oder HMN, angeboten, so nahm mit zunehmender Verdünnung des Substrates dessen Verträglichkeit zu und die Beeinträchtigung des Wachstums ab.

Für den Stamm HxN1 zeigte sich, daß eine Konzentration von 5 % Hexan in HMN eine optimale Substratkonzentration darstellte. Höhere Substratkonzentrationen führten zur Beeinträchtigung des Wachstums. Ab einer Konzentration von 75 % war das Wachstum vollständig gehemmt (Abb. 14 B).

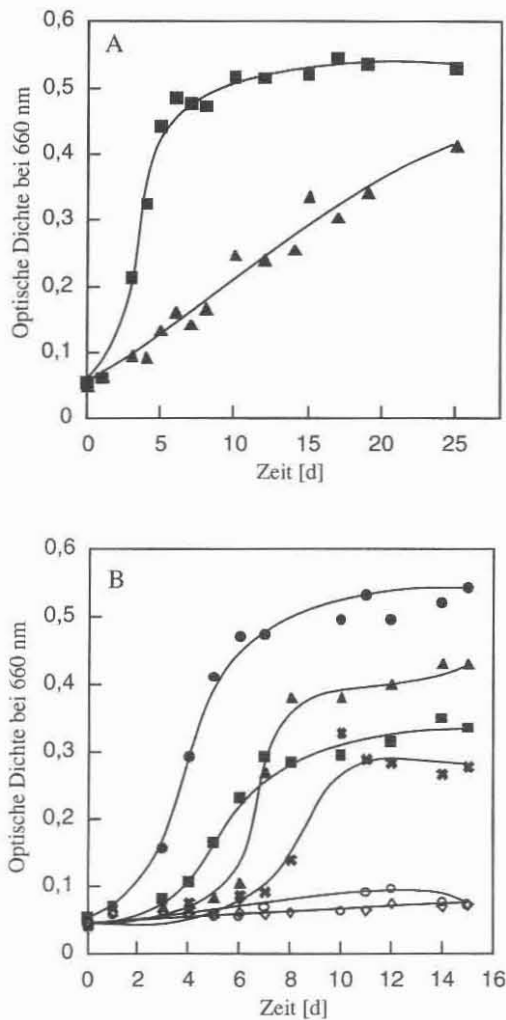


Abb. 14: Optimierung des Wachstums von Stamm HxN1. (A) Wachstum bei ruhig liegender (▲) und schüttelnder Inkubation (■). (B) Wachstum in Abhängigkeit der angebotenen Hexanmenge in HMN (■, 2 %; ●, 5 %; ▲, 10 %; ✖, 50 %; ○, 75 %; ◇, reines Hexan). Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte verfolgt.

3.6. Substrattest

Zur Untersuchung der physiologischen Fähigkeiten und zum eventuellen Erhalt von Hinweisen auf Stoffwechselwege des Stammes HxN1 wurde die Verwertung verschiedener Verbindungen als alleinige Kohlenstoff- und Elektronenquellen geprüft (Tabelle 5). Ein Wachstum von Stamm HxN1 und damit die Verwertung des Substrates wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte festgestellt.

Stamm HxN1 zeigte, wie die bereits bekannten, zur Verwertung von Alkanen befähigten Anaerobier (Sulfatreduzierer und Denitrifizierer; IV.1.1., Tabelle 14), in der Alkanverwertung eine Spezialisierung auf einen bestimmten Kettenlängenbereich; das Isolat bevorzugte die kurzkettigen Alkane mit der Kettenlänge C_6 - C_8 . Alkane längerer Kettenlängen ($\geq C_9$) wurden von dem Stamm nicht verwertet. Hinsichtlich des Alkanspektrums grenzte der Stamm HxN1 sich somit klar von den bevorzugten Kettenlängen der beiden bekannten alkanverwertenden Denitrifizierern OcN1 (C_8 - C_{12}) und HdN1 (C_{14} - C_{20}) ab. Neben den kurzkettigen Alkanen war Stamm HxN1 in der Lage, kurzkettige Alkohole, Aldehyde und verschiedene Mono- und Dicarbonsäuren zu verwerten. Von den geprüften Monosacchariden wurde lediglich Fructose verwertet.

Bemerkenswert war das beobachtete Wachstum mit Benzoat. Außer dieser aromatischen Carbonsäure diente keine andere getestete aromatische Verbindung als Wachstumssubstrat. Mit der Unfähigkeit zur Verwertung von aromatischen Kohlenwasserstoffen grenzte sich Stamm HxN1 physiologisch von den bekannten Denitrifizierern PbN1 und EbN1 ab, die aufgrund der 16S rRNA Analysen dem Stamm HxN1 sehr nahe stehen (Abb. 11). Die Stämme PbN1 und EbN1 besitzen die Fähigkeit zum Abbau von Alkylbenzolen, sind aber nicht in der Lage, Alkane jeglicher Kettenlänge zu verwerten (Rabus 1995; Rabus und Widdel 1995).

Tabelle 5: Substrattests mit Stamm HxN1. Jede Verbindung wurde in einem Doppelsatz geprüft und den Kulturröhrchen (15 ml) in den in Klammern angegebenen Konzentrationen (in mM) zugesetzt. Angaben in % beziehen sich auf die Trägerphase HMN (0,5 ml HMN je 15 ml Kulturvolumen). +, Wachstum; -, kein Wachstum.

<i>n</i>-Alkane		Aldehyde	
Pentan (2 + 4 %)	-	Butanal (0,5 + 1 %)	+
Hexan (2 + 5 %)	+	Hexanal (0,5 + 1 %)	+
Heptan (5 %)	+	Heptanal (0,5 + 1 %)	+
Oktan (5 %)	+	Oktanal (0,5 + 1 %)	-
Nonan (10 %)	-	Dekanal (0,5 + 1 %)	+
Dekan (10 %)	-		
Undekan (5 + 20 %)	-	Aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren	
Dodekan (5 + 20 %)	-	Formiat (10)	-
Pentadekan	-	Acetat (10)	+
Hexadekan	-	Propionat (5)	+
		Butyrat (5)	+
2-Methylhexan (1 + 2 %)	-	Valerianat (3)	+
3-Methylhexan (1 + 2 %)	-	2-Methylvalerianat (2)	+
2-Methylheptan (1 + 2 %)	-	Capronat (2)	+
2-Methyloktan (2 + 5 %)	-	2-Methylhexanoat (2)	+
		Oenanthat (2)	+
Cyclohexan (1 + 2 %)	-	Caprylat (2)	+
		Palmitat (1)	+
<i>n</i>-Alkene		Succinat (5 + 10)	+
1-Hexen (0,5 + 1 %)	-	Fumarat (5 + 10)	+
<i>cis</i> -2-Hexen (0,5 + 1 %)	-	Malat (5)	+
<i>trans</i> -2-Hexen (0,5 + 1 %)	-	Pyruvat (5 + 10)	+
<i>cis</i> -3-Hexen (0,5 + 1 %)	-	Lactat (10)	+
<i>trans</i> -3-Hexen (0,5 + 1 %)	-		
1-Hepten (0,5 + 1 %)	-	Aromatische Verbindungen	
1-Okten (0,5 + 1 %)	-	Benzoat (1)	+
1-Deken (0,5 + 1 %)	-	Toluol (2 %)	-
		Ethylbenzol (2 + 5 %)	-
Terpene		<i>n</i> -Propylbenzol (2 + 5 %)	-
α -Terpinen (1 + 2 %)	-	<i>n</i> -Hexylbenzol (5 %)	-
		<i>m</i> -Xylol (2 + 5 %)	-
Alkohole		<i>p</i> -Cymol (2 + 5 %)	-
Methanol (6)	-	Acetophenon (0,5 + 1 %)	-
Ethanol (10)	-	Phenylacetat (1)	-
1-Propanol (5 + 10)	+		
2-Propanol (5 + 10)	+	Zucker	
1-Butanol (5)	+	Fructose (5)	+
1-Hexanol (0,5 + 1 %)	+	Glucose (5)	-
2-Hexanol (0,5 + 1 %)	-		
3-Hexanol (0,5 + 1 %)	-	Aminosäuren	
1-Heptanol (0,5 + 1 %)	-	Alanin (10)	+
1-Oktanol (0,5 + 1 %)	-	Aspartat (10)	+
		Glutamat (5)	+

Zu den wichtigen getesteten, aber von Stamm HxN1 nicht verwerteten Verbindungen zählten die verschiedenen Strukturisomere der *n*-Alkene, die aufgrund von Spekulationen in der Literatur (Iizuka et al. 1969; Wagner et al. 1967; Chouteau et al. 1962; Senez und Azoulay 1961; Parekh et al. 1977) als mögliche Intermediate der anaeroben Alkanoxidation in Erwägung gezogen wurden. Um auszuschließen, daß toxische Effekte für das ausbleibende Wachstum auf den Alkenen verantwortlich waren, wurden diese im Gemisch mit verwertbaren Verbindungen geprüft. Neben Hexan wurde 1-Hexanol als wasserunlösliche und Acetat als wasserlösliche Substanz verwendet (Tabelle 6). Durch den Einsatz der wasserunlöslichen Substanz sollte ausgeschlossen werden, daß 1-Hexen immer nur dann toxisch wirkte, wenn die Zellen ihr Substrat ebenfalls aus der wasserunlöslichen Phase bezogen.

Tabelle 6: Substrattest zur Untersuchung der Verwertung von Hexen und dessen mögliche toxische Wirkung auf den Stamm HxN1. Hexen wurde einzeln oder in Kombination mit einem zweiten Wachstumssubstrat den Kulturröhrchen zugesetzt. Angaben in % beziehen sich auf die Trägerphase HMN (0,5 ml HMN je 15 ml Kulturvolumen).

Substratangebot	Wachstum von Stamm HxN1
1-Hexen (0,5 %)	-
1-Hexen (0,5 %) + Hexan (5 %)	-
1-Hexen (0,5 %) + 1-Hexanol (0,5 %)	+
1-Hexen (0,5 %) + Acetat (10 mM)	+
Kontrollen:	
Hexan (5 %)	+
1-Hexanol (0,5 %)	+
Acetat (10 mM)	+

Der Substrattest zeigte, daß Stamm HxN1 sowohl auf Hexen in Kombination mit Acetat als auch mit Hexanol wuchs. Somit ließ sich die Unfähigkeit, Hexen zu verwerten, nicht auf einen allgemeinen toxischen Effekt des Alkens auf die Zellen zurückführen. Selbst wenn die Notwendigkeit bestand, das Substrat 1-Hexanol aus der hydrophoben Phase zu verwerten, zeigte sich keine Beeinträchtigung des Wachstums durch das darin ebenfalls gelöste 1-Hexen. Allerdings war der Stamm HxN1 nicht in der Lage, in Gegenwart von 1-Hexen auf Hexan zu wachsen. In diesem Fall schien eine spezifische Hemmung der Hexanoxidation durch das Alken vorzuliegen.

3.7. Aerober Wachstumstest

Aerobe Wachstumstests zeigten, daß Stamm HxN1 auch in der Lage ist, unter oxischen Bedingungen Alkane und verschiedene Monocarbonsäuren zu verwerten. Wie auch unter anoxischen Bedingungen bevorzugte der Stamm in Gegenwart von Sauerstoff die kurzkettigen Alkane. Das anhand der optischen Dichte beobachtete Wachstum setzte unter oxischen Bedingungen aber deutlich später ein. Erst nach ca. 10-14 Tagen nahm die optische Dichte der beimpften Kulturansätze zu. Eine mikroskopische Kontrolle der gewachsenen Kulturen zeigte Bakterienzellen mit der bekannten ovalen Zellform von Stamm HxN1, die allerdings Unregelmäßigkeiten und lichtbrechende Einschlüsse zeigten. Die Zellen schienen unter oxischen Bedingungen nicht optimal zu wachsen.

3.8. Elektronenakzeptoren

Sowohl für die Anreicherung und die Isolierung als auch für die weitere Kultivierung des Stammes HxN1 wurde Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor eingesetzt. In der Anreicherung wurde Nitrat zunächst nur in niedrigen Konzentrationen (5 mM) zugesetzt, um mögliche toxische Effekte von intermediär gebildetem Nitrit auszuschließen. Spätere Wachstumsversuche mit Stamm HxN1 zeigten ein optimales Wachstum bei Nitratkonzentrationen zwischen 8 und 10 mM. Bei höheren Nitratkonzentrationen beeinträchtigte das intermediär gebildete Nitrit das Wachstum.

Ferner wurde die Alkanoxidation mit anderen möglichen Elektronenakzeptoren als Nitrat und Sauerstoff geprüft. Stamm HxN1 nutzte neben Nitrat und Sauerstoff lediglich Nitrit als externen Elektronenakzeptor bei der Alkanoxidation. Schwefelverbindungen (Sulfat 15 mM, Sulfit 10 mM, Thiosulfat 5 mM) und Fumarat (10 mM) dienten nicht als terminale Elektronenakzeptoren.

4. Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation und Wachstumskurve von Stamm HxN1

Zum eindeutigen Nachweis der Alkanverwertung durch Stamm HxN1 unter anoxischen Bedingungen wurde in Kulturansätzen die Oxidation von Hexan unter denitrifizierenden Bedingungen quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte in flachen Glasflaschen (125 ml) mit 100 ml Süßwassermedium, das 10 mM Nitrat und 4 mM Ascorbat enthielt. Die Flaschen wurden nach gründlicher Begasung mit einem N_2/CO_2 -Gasgemisch mit Butylgummisepten verschlossen. Das Hexan wurde in anoxischem HMN verdünnt (s. II.2.2.3.5.) und als definiertes Hexan-HMN-Gemisch in die bereits verschlossenen Flaschen nachträglich injiziert. Dabei wurde Hexan im Verhältnis zum verfügbaren Elektronenakzeptor sowohl wachstumslimitierend (0,10 mmol) als auch im Überschuß (0,27 mmol) zugesetzt. Zur Kontrolle dienten jeweils ein Kulturansatz ohne Hexan, ohne Nitrat und ohne Inokulum. Die Beimpfung der Versuchsansätze erfolgte einen Tag nach der vollständigen Zusammenstellung der Ansätze, um sicherzustellen, daß eventuell noch vorhandener Sauerstoff während der Vorinkubation durch das Reduktionsmittel Ascorbat entfernt wurde. Als Inokulum (3 ml je Versuchsansatz) dienten Aliquots allein aus der wäßrigen Phase einer Vorkultur von Stamm HxN1 auf Hexan. Die Versuchsansätze wurden 8 Tage unter Schütteln bei 28 °C inkubiert, wobei auf die Vermeidung jeglichen Kontaktes der organischen Phase mit dem Stopfen geachtet wurde. Nach Ablauf der Inkubation wurden den einzelnen Ansätzen für die verschiedenen Analysen Proben entnommen. Zunächst wurden der Gasüberdruck ermittelt und eine Probe (1 ml) aus der Gasphase für die N_2O -Analyse entnommen. Dann wurde die Hexankonzentration in der Trägerphase bestimmt. Anschließend wurden der wäßrigen Kulturphase Proben zur Bestimmung der optischen Dichte und zur Analyse der Protein-, Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentration entnommen.

In der Tabelle 7 sind die Meßergebnisse zusammengefaßt. Im Ansatz mit einer begrenzten Menge an Hexan war dieses nahezu vollständig verbraucht worden; Nitrat und Nitrit waren in diesem Ansatz noch in signifikanten Mengen nachweisbar. Im Ansatz mit Hexan im Überschuß ließen sich 33 % der eingesetzten Substratmenge wiederfinden. Nitrat war in diesem Ansatz vollständig verbraucht, und intermediär gebildetes Nitrit ließ sich ebenfalls nicht mehr nachweisen. In keinem der Wachstumsansätze ließ sich N_2O oder zusätzlich Ammonium nachweisen. Die als Kontrolle mitgeführten Ansätze ohne Nitrat und ohne Inokulum wiesen beide einen Hexanverlust von nur jeweils 7 % während der Inkubationszeit auf.

Unter Berücksichtigung der optischen Dichte und der experimentell ermittelten Zelltrockenmasse wurde der Zellertrag ermittelt. Dazu wurde die experimentell ermittelte

Zelltrockenmasse in Bezug zur dissimilierten Hexanmenge gesetzt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Wachstumsertrag von 64,9 g Zelltrockenmasse pro mol oxidierten Hexans.

Für die Aufnahme einer Wachstumskurve mit Hexan als Substrat wurde Stamm HxN1 in einem weiteren, wie bei der Quantifizierung beschriebenen Kulturansatz (s. II.2.4.4.) angezogen. Die eingesetzte Nitratkonzentration betrug in diesem Ansatz 9 mM. Diesem Ansatz wurden kontinuierlich während der Inkubation Proben für die Nitrat- und Nitrit-Analyse und die Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Abbildung 15 zeigt den typischen Verlauf einer Wachstumskurve von Stamm HxN1. Das Wachstum konnte anhand der Zunahme der optischen Dichte und der Abnahme der Nitratkonzentration nachgewiesen werden. Während des Wachstums kam es zur vorübergehenden Anhäufung von Nitrit. Erst mit dem vollständigen Verbrauch des Nitrats setzte erkennbar die Nitritreduktion ein (Abb. 15). Die Zunahme der optischen Dichte folgte nur am Anfang und dort auch nur näherungsweise einer exponentiellen Kurve. Mit zunehmender Nitritkonzentration nahm die Wachstumsrate merklich ab. Der Verlauf der Kurve erlaubt daher nur eine Schätzung der Verdopplungszeit anhand des ersten Kurvenabschnittes. Die aus diesem Wachstumsabschnitt ermittelte Verdopplungszeit betrug etwa 11 h.

Tabelle 7: Quantitative Bestimmung des anaeroben Hexanverbrauchs und der Nitratreduktion von Stamm HxN1. Das Wachstumsexperiment wurde in einer flachen Glasflasche (125 ml), die mit einem Butylstopfen verschlossen war, durchgeführt. Die Kulturflasche enthielt 100 ml Süßwassermedium (Nitratkonzentration 10 mM), das mit einem Substrat-HMN-Gemisch überschichtet wurde. Die Flasche wurde flach liegend auf einem Schüttler inkubiert, wobei ein Kontakt zwischen der wasserunlöslichen Schicht und dem Stopfen vermieden wurde.

	Zellen mit über-schüssiger Menge an Hexan	Zellen mit begrenzter Menge an Hexan	Zellen ohne Hexan	Zellen ohne Nitrat	Medium ohne Zellen
Hexan eingesetzt [mmol]	0,27	0,10	0	0,27	0,27
Hexan verbraucht ^a [mmol]	0,18	0,09	0	0,02	0,02
Nitrat am Versuchsende [mmol]	0	0,44	0,98	0	1,00
Nitrit am Versuchsende [mmol]	0	0,07	0,01	0	0
Zelltrockenmasse [mg]	9,85	4,16	0	0	
Hexan dissimiliert ^b [mmol]	0,14	0,07			
Elektronen aus dissimiliertem Hexan ^c [mmol]	5,32	2,70			
Elektronen verbraucht durch Nitratreduktion ^d [mmol]	5,00	2,59	0,07		0

^aAngegeben ist die Differenz zwischen der zu Beginn des Versuchs eingesetzten Menge an Hexan und der zum Ende des Versuchs wiedergefundenen Menge an Hexan.

^bAngegeben ist die Differenz zwischen der im Versuch verbrauchten Menge an Hexan und der zur Assimilation verwendeten Menge an Hexan.

Die Menge an assimiliertem Hexan wurde unter Annahme der folgenden Gleichung berechnet: $17 \text{ C}_6\text{H}_{14} + 14 \text{ H}_2\text{O} + 50 \text{ CO}_2 \rightarrow 38 \text{ C}_4\text{H}_7\text{O}_3$.

Entsprechend der Gleichung ergibt 1 mmol assimiliertes Hexan 230 mg Biomasse.

^cBei vollständiger Oxidation zu CO_2 werden aus 1 mol Hexan 38 mol Elektronen erhalten.

^dElektronen verbraucht = $5 \cdot [\text{Nitrat}_{\text{eingesetzt}} - \text{Nitrat}_{\text{gemessen}} - \text{Nitrit}_{\text{gemessen}}] + 2 \cdot [\text{Nitrit}_{\text{gemessen}}]$

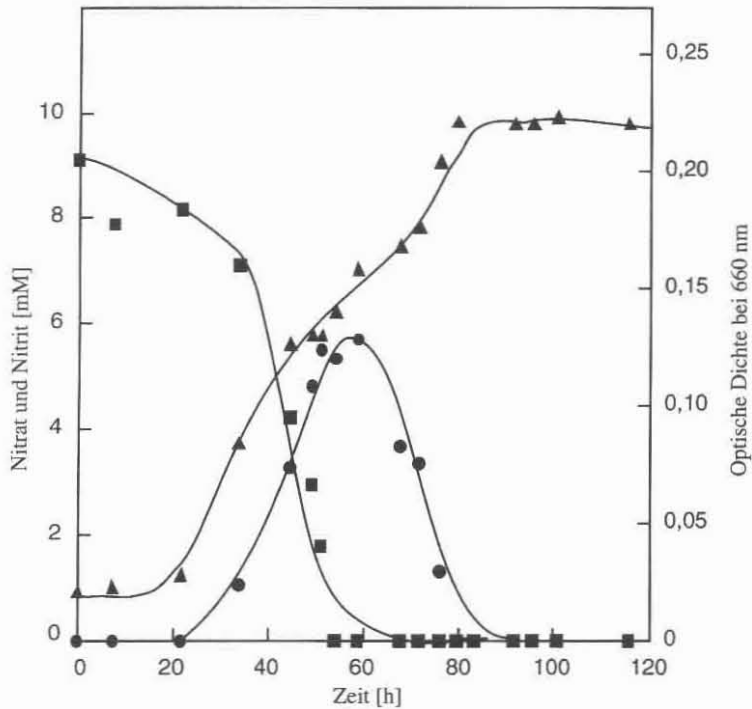


Abb. 15: Anaerobes Wachstum von Stamm HxN1 auf Hexan und Nitrat (9 mM). Das Wachstumsexperiment wurde in einer flachen Glasflasche (125 ml), die mit einem Butylstopfen verschlossen war, durchgeführt. Die Kulturflasche enthielt 100 ml Süßwassermedium, das mit Ascorbat reduziert worden war und mit 1,5 ml eines Substrat-HMN-Gemisches überschichtet wurde (5 % Hexan in HMN als Trägerphase). Die Flasche wurde flach liegend auf einem Schüttler inkubiert, wobei ein Kontakt zwischen der wasserunlöslichen Schicht und dem Stopfen vermieden wurde. Während des Wachstums wurde die optische Dichte (▲) und die Konzentration von Nitrat (■) und Nitrit (●) verfolgt.

5. Anaerobes Wachstum des Stammes HxN1 auf Erdöl

Das ursprüngliche Anreicherungssubstrat für Stamm HxN1 war Erdöl. Daher war anzunehmen, daß das Neuisolat ebenfalls die Fähigkeit besaß, Rohöl als einziges organisches Substrat mit Nitrat als Elektronenakzeptor zum Wachstum zu nutzen. In Vorversuchen mit unterschiedlichen Mengen an Rohöl im Kulturansatz (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 ml Rohöl auf 15 ml Medium) sollte das Wachstum von Stamm HxN1 geprüft werden. Dabei zeigte sich jedoch in keinem der Versuchsansätze eine Zunahme der Trübung. Daher wurden weitere Kulturansätze vorbereitet, in denen das Rohöl im Verhältnis zum Medium in deutlich kleinerem Volumen eingesetzt wurde (0,2 ml Rohöl in 90 ml). Nitrat wurde in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Als Inokulum diente eine Kultur von Stamm HxN1 auf Hexan.

Im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Nitrat oder ohne Inokulum war nun eine leichte Trübungszunahme in den Kulturansätzen zu beobachten. Eine Nitrat- und Nitritanalyse während der Inkubationszeit bestätigte, daß Stamm HxN1 in den Ansätzen mit Nitrat und Rohöl wuchs. Nitrat nahm in den Wachstumsansätzen ab und Nitrit wurde als Intermediat der Reduktion nachgewiesen (Abb. 16).

Eine gaschromatographische Headspaceanalyse der verschiedenen Versuchsansätze machte die Nutzung des Rohöls als Substrat durch Stamm HxN1 deutlich. Für die Analyse wurde sowohl den gewachsenen Versuchsansätzen als auch den Kontrollansätzen ohne Bakterien bei Raumtemperatur 0,5 ml Gasprobe aus dem Gasraum entnommen. Der Vergleich der Chromatogramme der Wachstumsansätze mit den Kontrollansätzen zeigte, daß nach Wachstum von Stamm HxN1 in dem umfangreichen Peakmuster die Flächen bestimmter Peaks abnahmen. Mit Hilfe eines synthetisch zusammengestellten Kohlenwasserstoffgemisches aus kurzkettigen, aliphatischen Kohlenwasserstoffen in HMN konnten die abnehmenden Peaks identifiziert werden (Abb. 17 C). Die Identifizierung ergab, daß Stamm HxN1 aus dem komplexen Substanzgemisch Rohöl gezielt die kurzkettigen aliphatischen Kohlenwasserstoffe Hexan, Heptan und Oktan als Substrate verwendete (Abb. 17 B). Andere Substanzpeaks blieben während des Wachstums von Stamm HxN1 unverändert.

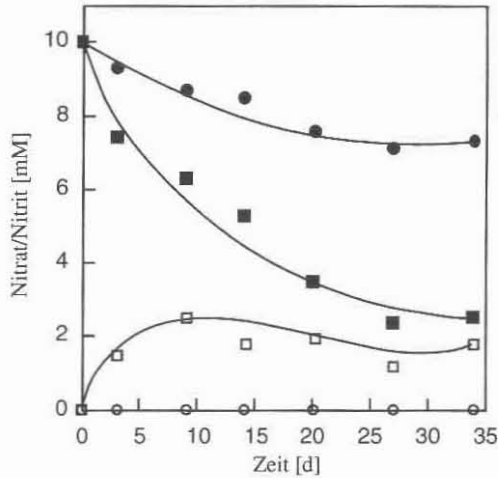


Abb. 16: Anaerobes Wachstum von Stamm HxN1 auf Erdöl und Nitrat (10 mM). Das Wachstumsexperiment wurde in einer flachen Glasflasche, die mit einem Butylstopfen verschlossen war, durchgeführt. Die Flasche enthielt 90 ml Süßwassermedium, das mit Ascorbat reduziert worden war und mit 0,2 ml Erdöl überschichtet wurde. Als Inokulum diente eine Kultur von Stamm HxN1 auf Hexan. Die Flasche wurde flach liegend auf einem Schüttler inkubiert, wobei ein Kontakt zwischen der wasserunlöslichen Schicht und dem Stopfen vermieden wurde. Während des Wachstums wurde die Konzentration von Nitrat (■) und Nitrit (□) verfolgt. In einem Kontrollansatz ohne Inokulum wurde ebenfalls Nitrat (●) und Nitrit (○) bestimmt.

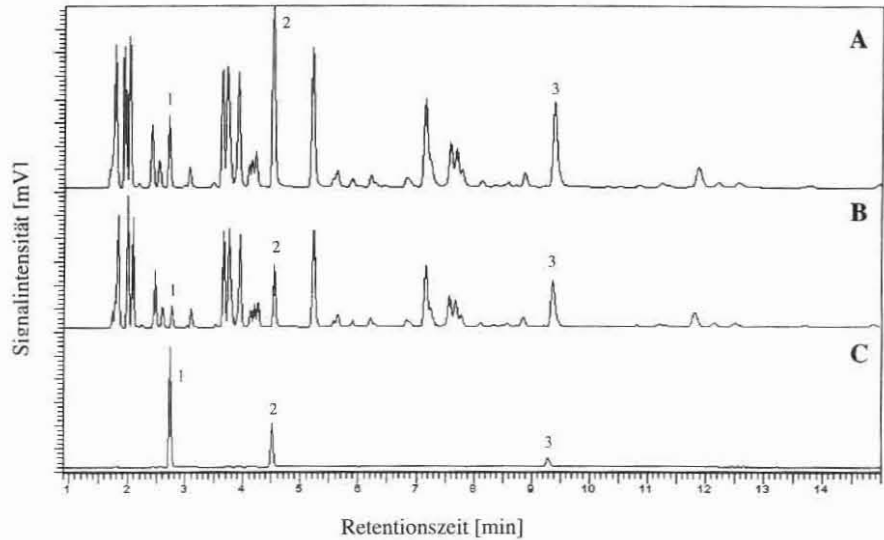


Abb. 17: Gaschromatographische Headspaceanalyse zur Untersuchung der Verwertung von Alkanen aus Rohöl durch den Stamm HxN1. Den Kulturansätzen (90 ml Medium + 0,2 ml Rohöl in einer 100 ml Glasflasche) wurden nach siebenwöchiger Inkubation zur Analyse eine Gasprobe entnommen. (A) Ansatz ohne Inokulum, (B) Kulturansatz mit Inokulum des Stammes HxN1. Die Identifizierung der Alkane erfolgte mit einem synthetischen Versuchsansatz (90 ml Medium + 1 ml synthetisches Kohlenwasserstoffgemisch in einer 100 ml Glasflasche; C). Das synthetische Kohlenwasserstoffgemisch besteht aus 1 ml HMN mit je 0,1 % Hexan (1), Heptan (2), Octan (3), Nonan und Dekan.

6. Analyse der Zellfettsäuren in Abhängigkeit des Wachstumssubstrates

Es ist anzunehmen, daß der Stoffwechselweg der anaeroben Oxidation langkettiger Kohlenwasserstoffe in den Fettsäurestoffwechsel der Bakterienzelle einmündet. In vorangegangenen Untersuchungen von alkanverwertenden Sulfatreduzierern (Stamm Hxd3, Stamm Pnd3; Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998) und dem Denitrifizierer HdN1 (Ehrenreich 1996) bestand daher die Annahme, daß Alkane und, sofern diese auch verwertet wurden, Alkene ebenso wie zugegebene langkettige Monocarbonsäuren die Zusammensetzung der Zellfettsäuren beeinflussen. Die Fettsäuren würden demnach direkt aus frühen Intermediärprodukten der als Wachstumssubstrate genutzten Alkane gebildet und nicht *de novo* aus Acetyl-CoA synthetisiert.

Tatsächlich bestätigten Experimente mit den Stämmen Hxd3, Pnd3 und HdN1 diese Annahme. Es bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Zahl an C-Atomen (gerade oder ungerade) in den Molekülen der Wachstumssubstrate und in den später nachgewiesenen Zellfettsäuren (Tabelle 9). Im Fall des sulfatreduzierenden Stammes Hxd3 wurde aufgrund der Beeinflussung der Zellfettsäuren durch den Kohlenwasserstoff sogar eine Hypothese zum Mechanismus der Alkanaktivierung aufgestellt (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998).

Durch die Analyse der Zellfettsäuren von Stamm HxN1 auf verschiedenen Wachstumssubstraten sollte nun ebenfalls überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Art des verwerteten Substrates und dem Fettsäureprofil bestand.

Stamm HxN1 wurde in jeweils 400-ml-Kulturen (Gesamtvolumen 1,6 l) mit den Substraten Capronat (C₆), Oenanthat (C₇), Hexan (C₆) und Heptan (C₇) angezogen. Die Kulturen wurden jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase unter oxidischen Bedingungen geerntet und wie unter II.3.5. beschrieben aufbereitet.

Bei der gaschromatographischen Analyse von Stamm HxN1 nach dem Wachstum auf den verschiedenen Substraten zeigte sich kein erkennbarer Einfluß des jeweiligen Substrates auf die Zusammensetzung der Zellfettsäuren. Unabhängig davon, ob die Zellen auf Alkanen bzw. Fettsäuren mit gerader oder ungerader Anzahl von C-Atomen gewachsen waren, waren die Fettsäureprofile nahezu identisch und wiesen hauptsächlich Fettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen auf (Tabelle 8). Die Analysegaschromatogramme zeigten nur wenige Peaks auf, deren eindeutige Zuordnung zu einer Substanz anhand der verwendeten Standards nicht möglich war.

Somit zeigte sich, daß Stamm HxN1 nicht wie die Stämme Hxd3, Pnd3 und HdN1 (Aeckersberg 1994; Ehrenreich 1996) durch die geprüften Substrate in seinem

Fettsäureprofil beeinflusst wurde. In Tabelle 9 sind die Fettsäureprofile nochmals vergleichend zusammengestellt.

Tabelle 8: Fettsäureprofil des Stammes HxN1 auf unterschiedlichen Wachstumssubstraten. Der prozentuale Anteil anhand von Standards nicht identifizierter Fettsäuren war gering und bleibt in der Tabelle unberücksichtigt.

Zellfettsäure*	Wachstumssubstrat			
	Hexan	Heptan	Capronat	Oenanthat
3-OH-10:0	1,7	1,6	1,6	2,0
12:0	4,6	4,1	4,6	6,0
16:1	53,8	49,1	46,3	42,3
16:0	22,0	21,9	20,6	38,9
18:1	8,5	8,1	7,4	1,9

* Die Zellfettsäuren sind mit der Anzahl der C-Atome, der Doppelbindungen und der Position der Hydroxylgruppe bezeichnet

Tabelle 9: Vergleich des Einflusses des Wachstumssubstrats auf die Fettsäureprofile der sulfatreduzierenden Stämme Hxd3 und Pnd3 sowie der denitrifizierenden Stämme HxN1 und HdN1.

Stamm	Wachstums- substrat	Zahl der C-Atome	Zahl der C-Atome in den nachgewiesenen Zellfettsäuren	Referenz
Hxd3	Alkane	gerade	ungerade	Aeckersberg 1994, Aeckersberg et al. 1998
	Fettsäuren	gerade	gerade	
		ungerade	ungerade	
Pnd3	Alkane	gerade	gerade	
	Fettsäuren	gerade	gerade	
		ungerade	ungerade	
HxN1	Alkane	gerade	gerade	Ehrenreich 1996
	Fettsäuren	gerade	gerade	
		ungerade	gerade	
HdN1	Alkane	gerade	gerade	
	Fettsäuren	gerade	gerade	
		ungerade	ungerade	

7. Induktionsstudien mit Stamm HxN1

7.1. Induktionsstudien zur Verwertung von Alkanen und Fettsäuren

Die Durchführung von Substrattests hatte gezeigt, daß Stamm HxN1 sowohl kurzkettige Alkane als auch verschiedene Fettsäuren als Wachstumssubstrate nutzt. Dabei zeigte sich, daß das Wachstum auf anderen als in der Vorkultur verwendeten Substraten häufig erst nach einer Anlaufphase begann. Die aus dieser Beobachtung entstandene Vermutung, daß die Synthese bestimmter Enzyme oder Enzymsysteme nicht konstitutiv erfolgt, sondern substratabhängig induziert wird, wurde anhand der Verwertung von Alkanen und Fettsäuren in Induktionsstudien untersucht. Solche Studien können in Verbindung mit einer 2D-Elektrophorese von Zellextrakten zum Auffinden spezifisch für den Substratabbau benötigter Proteine führen.

Detaillierte Induktionsstudien wurden mit Hilfe von dichten Zellsuspensionen von Stamm HxN1 durchgeführt. Konzentrierte Zellsuspensionen weisen einen deutlich höheren Substratumsatz auf als reguläre Wachstumsansätze. Sie erleichtern somit die Beobachtung von Stoffwechselfähigkeiten und damit die Erkennung einer konstitutiven gegenüber einer induzierten Stoffwechseleigenschaft. In der Induktionsstudie mit Stamm HxN1 wurde die Verwertung von Alkanen nach einer über mehrere Passagen verlaufenden Voranzucht auf einer Fettsäure gleicher Kettenlänge näher untersucht.

Stamm HxN1 wurde auf Capronat und zum Vergleich auch auf Hexan angezogen. Die Zellen wurden geerntet, in frischem Medium aufkonzentriert (OD = 0,5) und als Zellsuspensionen in anoxisch verschlossene Serumflaschen portioniert. Den Zellsuspensionen wurde anschließend Hexan (5 % in HMN) und Capronat (3 mM) als Substrat zugesetzt. Nach Zugabe der Substrate wurde durch kontinuierliche Probennahme anhand der Nitrat- und Nitritreduktion die Substratumsetzung in den Zellsuspensionen verfolgt. Als Kontrolle dienten Zellsuspensionen ohne Substrat.

Nach der Zugabe von Hexan zu Suspensionen von Zellen aus einer Capronat-Kultur zeigte sich erst nach längerer Anlaufphase (15 h) eine Nitratreduktion. Eine vollständige Reduktion des Elektronenakzeptors war in diesen Zellsuspensionen 33 h nach der Hexanzugabe erreicht (Abb. 18). In der Positivkontrolle mit Capronat begann die Nitratreduktion sofort nach der Zugabe des Elektronendonators. Dieser Versuch zeigte, daß die verwendeten Zellen in einem stoffwechselaktiven Zustand waren. Die Fähigkeit zur Alkanoxidation wurde demnach induziert.

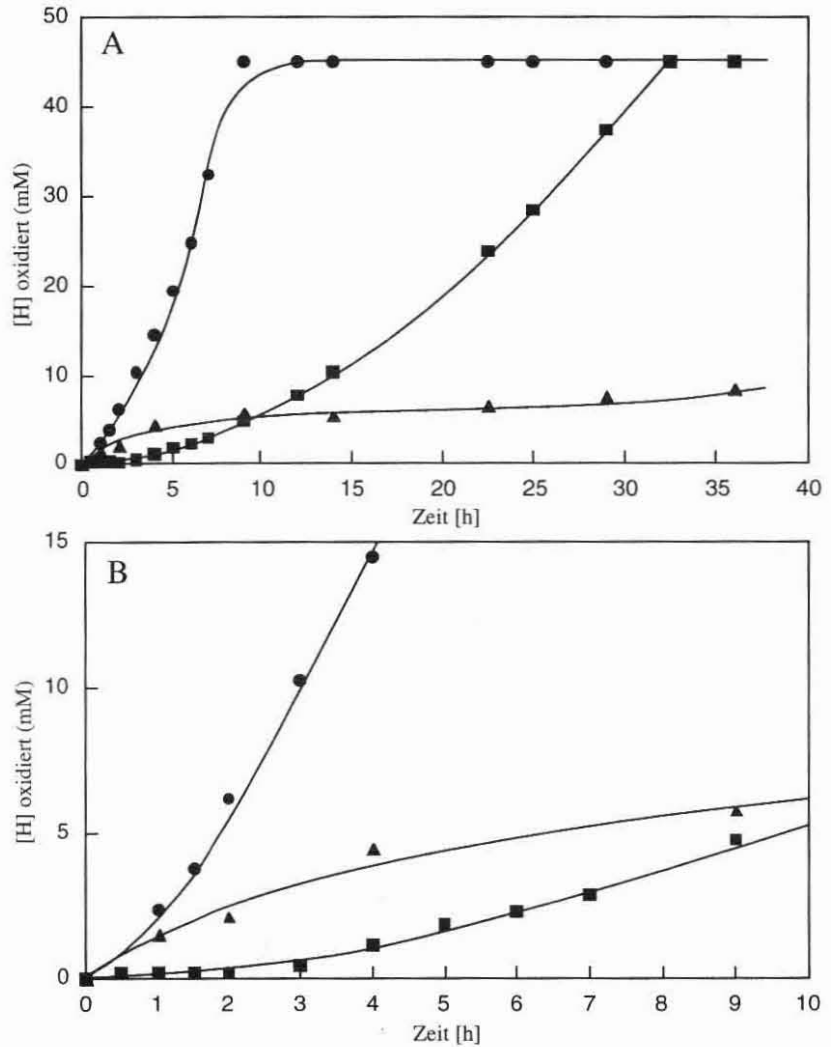


Abb. 18: Untersuchungen der Fähigkeiten zur Oxidation von Capronat (●, 3 mM) und Hexan (■, 5 % in HMN) in anaeroben Zellsuspensionen (50 ml) von Stamm HxN1; (▲), Kontrolle ohne Substrat; (A, Gesamtdarstellung des Experiments; B, Ausschnittsvergrößerung). Zur Herstellung der Zellsuspension war Stamm HxN1 über mehrere Passagen auf Capronat angezogen worden. Die Oxidation der Substrate wurde anhand der Reduktion von Nitrat und des intermediär gebildeten Nitrits verfolgt. Die oxidierten Reduktionsäquivalente wurden entsprechend der folgenden Gleichung errechnet:

$$[H]_{\text{oxidiert}} = 5 \cdot [\text{Nitrat}_{\text{zugeseht}} - (\text{Nitrat}_{\text{bestimmt}} + \text{Nitrit}_{\text{bestimmt}})] + 2 \cdot [\text{Nitrit}_{\text{bestimmt}}].$$

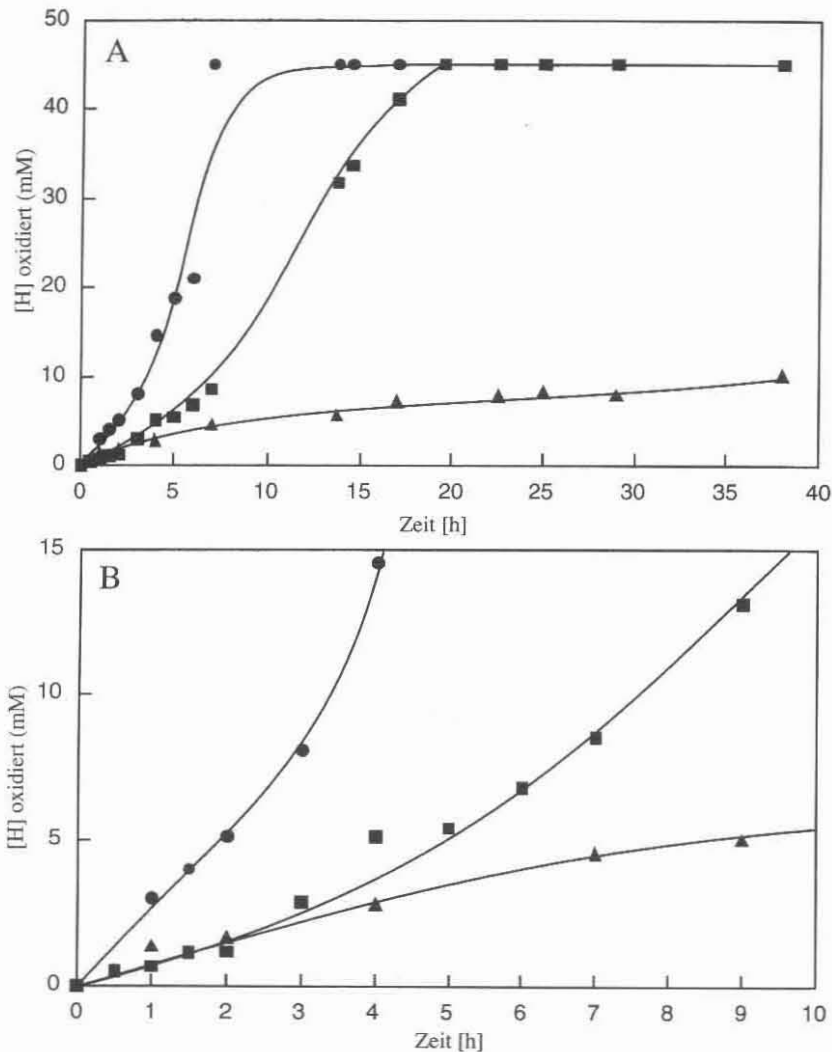


Abb. 19: Untersuchungen der Fähigkeiten zur Oxidation von Capronat (●, 3 mM) und Hexan (■, 5 % in HMN) in anaeroben Zellsuspensionen (50 ml) von Stamm HxN1; (▲), Kontrolle ohne Substrat; (A, Gesamtdarstellung des Experiments; B, Ausschnittsvergrößerung). Zur Herstellung der Zellsuspension war Stamm HxN1 über mehrere Passagen auf Hexan angezogen worden. Die Oxidation der Substrate wurde anhand der Reduktion von Nitrat und des intermediär gebildeten Nitrits verfolgt. Die oxidierten Reduktionsäquivalente wurden entsprechend der folgenden Gleichung errechnet:

$$[H]_{\text{oxidiert}} = 5 \cdot [\text{Nitrat}_{\text{ausgesetzt}} - (\text{Nitrat}_{\text{bestimmt}} + \text{Nitrit}_{\text{bestimmt}})] + 2 \cdot [\text{Nitrit}_{\text{bestimmt}}].$$

In den Suspensionen von Zellen, die auf Hexan angezogen worden waren, begann die Umsetzung von zugesetztem Capronat sofort und bei zugesetztem Hexan nur wenig verzögert nach der jeweiligen Substratzugabe. Eine vollständige Reduktion des Elektronenakzeptors Nitrat war mit Capronat nach 7 h und mit Hexan nach 10 h erreicht (Abb. 19).

Die leicht verzögerte Hexanverwertung in den Zellsuspensionen mit Hexan gewachsener Zellen muß auf eine anfänglich unzureichende Verteilung des schwerlöslichen Substrates zurückgeführt werden.

7.2. Untersuchung der Fähigkeit zur Oxidation von 1-Hexanol

Bei Versuchen, den Stoffwechselweg der anaeroben Hexanoxidation aufzuklären, muß auch eine mögliche Rolle des primären Alkohols 1-Hexanol als Intermediat überprüft werden. In einem weiteren Suspensionsversuch mit Zellen von Stamm HxN1, die auf Hexan angezogen worden waren, sollte deshalb die Fähigkeit zur Umsetzung von 1-Hexanol näher untersucht werden. Wie in den Induktionsstudien zur Verwertung von Hexan und Capronat wurde auch die 1-Hexanolumsetzung in den Zellsuspensionen anhand der Nitrat- und Nitritreduktion verfolgt.

Wäre der primäre Alkohol ein Intermediat auf dem Stoffwechselweg der anaeroben Alkanoxidation, so sollte die Induktion der Fähigkeit zur Hexanverwertung die zur Hexanolverwertung mit einschließen. In diesem Fall würde man in den Zellsuspensionen sofort nach dem Zusatz von Hexanol eine einsetzende Substratverwertung in den mit Hexan gewachsenen Zellen erwarten. Die Untersuchung in den Zellsuspensionen zeigte jedoch, daß die Umsetzung von 1-Hexanol in den mit Hexan gewachsenen Zellen verzögert einsetzte (Abb. 20). Vergleicht man dies mit der sofortigen Umsetzung von Hexan und Capronat durch Zellen aus derselben Anzucht, so ergibt sich die Schlußfolgerung, daß zur Verwertung des primären Alkohols die Synthese eines weiteren Enzymsystems induziert wird, und daß der Alkohol kein Intermediärprodukt der Alkanoxidation ist.

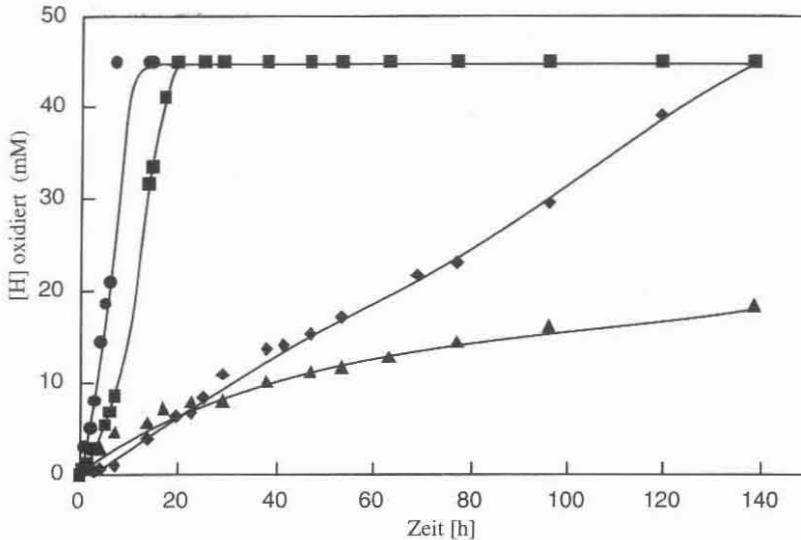


Abb. 20: Untersuchungen der Fähigkeiten zur Oxidation von Capronat (●, 3 mM), Hexan (■, 5 % in HMN) und Hexanol (◆, 0,5 % in HMN) in anaeroben Zellsuspensionen von Stamm HxN1. (▲), Kontrolle ohne Substrat. Zur Herstellung der Zellsuspension war Stamm HxN1 über mehrere Passagen auf Hexan angezogen worden. Die Oxidation der Substrate wurde anhand der Reduktion von Nitrat und des intermediär gebildeten Nitrits verfolgt. Die oxidierten Reduktionsäquivalente wurden entsprechend der folgenden Gleichung errechnet: $[H]_{\text{oxidiert}} = 5 \cdot [\text{Nitrat}_{\text{zugewetzt}} - (\text{Nitrat}_{\text{bestimmt}} + \text{Nitrit}_{\text{bestimmt}})] + 2 \cdot [\text{Nitrit}_{\text{bestimmt}}]$.

Ein einfacher Wachstumsversuch bestätigte diese Beobachtungen. Stamm HxN1 wurde nach mehrmaliger Passage auf Hexan und Hexanol beim erneuten Wachstum auf den beiden Substraten beobachtet. Das Wachstum wurde diesmal anhand der optischen Dichte verfolgt. Es zeigte sich im Vergleich, daß das Wachstum nach der Übertragung auf das jeweils gleiche Substrat immer ohne merkliche Verzögerung erfolgte (Abb. 21). Die unterschiedlichen Zelldichten auf Hexan und 1-Hexanol lassen sich durch die unterschiedlichen Mengen der eingesetzten Substrate erklären. Fand jedoch mit der Übertragung ein Wechsel des Substrates statt, so setzte das Wachstum im Vergleich zur substratadaptierten Kultur verzögert ein (Abb. 22 und Abb. 23).

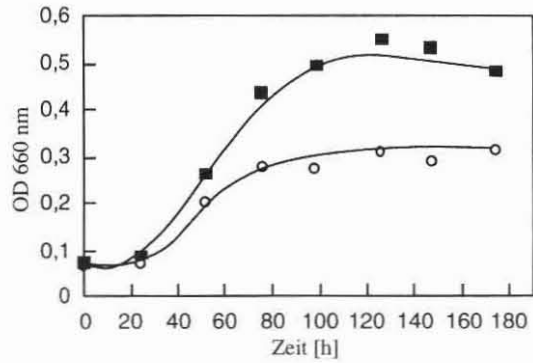


Abb. 21: Wachstum von Stamm HxN1 auf Hexan (■, 5 % in HMN) und 1-Hexanol (○, 0,5 % in HMN). Als Inokulum dienten Vorkulturen auf jeweils demselben Substrat.

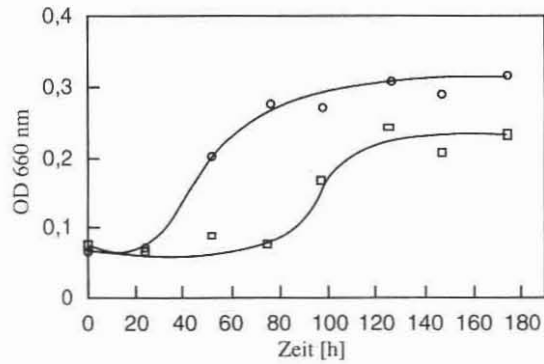


Abb. 22: Wachstum von Stamm HxN1 auf 1-Hexanol (0,5 % in HMN; offene Symbole). Als Inokulum dienten eine Vorkultur auf Hexan (□) und eine Vorkultur auf 1-Hexanol (○).

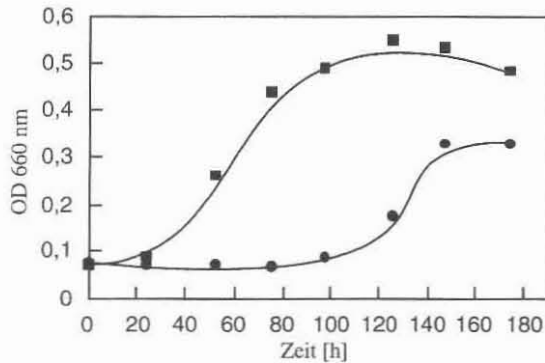


Abb. 23: Wachstum von Stamm HxN1 auf Hexan (5 % in HMN; geschlossene Symbole). Als Inokulum dienten eine Vorkultur auf Hexan (■) und eine Vorkultur auf 1-Hexanol (●).

8. Analyse der Gesamtzellproteine von alkanverwertenden Denitrifizierern in der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist die Analyse komplexer Proteingemische möglich. Im ersten Schritt der 2D-Elektrophorese, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt. Im nachfolgenden zweiten Schritt, der SDS-PAGE, werden die Proteine zusätzlich entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Ein komplexes Proteingemisch läßt sich somit als ein zweidimensionales Proteinmuster darstellen. Die Methode ermöglicht die Darstellung charakteristischer Proteinmuster unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und gibt somit Aufschluß über die Expression von Proteinen (Van Bogelen et al. 1996).

8.1. Analyse der Gesamtzellproteine des Stammes HxN1

Die Induktionsstudien mit Stamm HxN1 hatten darauf hingewiesen, daß die Fähigkeit zur Verwertung von Alkanen in Stamm HxN1 nicht konstitutiv vorliegt. Vielmehr schien das benötigte Enzymsystem zur Umsetzung von Alkanen zunächst induziert werden zu müssen. Zur Unterstützung dieser Beobachtung wurden die Gesamtzellproteine von Stamm HxN1

nach Wachstum auf Hexan und Capronat in der 2D-Elektrophorese getrennt und miteinander verglichen.

Für die Herstellung der Zellextrakte wurde Stamm HxN1 zunächst sowohl auf Hexan als auch auf Capronat über mehrere Passagen kultiviert, bevor eine Massenanzucht des Stammes auf dem jeweiligen Substrat erfolgte. Die Zellen des jeweiligen Substrates wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet und entsprechend II.2.6. aufgeschlossen. Die erhaltenen Zellproteinextrakte wurden im ersten Schritt der 2D-Elektrophorese, der IEF, mit 100 µg eingesetzt. Nach der IEF und der anschließenden SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue angefärbt.

Zellen aus beiden Kulturen zeigten ein komplexes Proteinmuster. Ein Vergleich der Proteinmuster der auf den unterschiedlichen Substraten angezogenen Zellen zeigte einen hohen Grad an Übereinstimmung in der Verteilung der Proteinspots. Dennoch wiesen die Proteinmuster der Capronat-Zellen und der Hexan-Zellen Unterschiede auf. In dem Proteinmuster der auf Hexan gewachsenen Zellen ließen sich vier zusätzliche Proteinspots (A_{HxN1} - D_{HxN1}) nachweisen (Abb. 24 und Abb. 25). Auch wiederholte Zellaufschlüsse unter denselben Bedingungen führten wiederum zu den bereits beobachteten Proteinmustern, die stets die vier zusätzlichen Spots bei den mit Hexan gewachsenen Zellen zeigten.

Mit Hilfe eines Standards für die isoelektrische Fokussierung (CA, Pharmacia, Uppsala, Schweden) und eines Größenstandards (LMW und HMW, Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden der isoelektrische Punkt und die Molekularmasse der zusätzlich auftretenden Proteine bestimmt (Tabelle 10).

Der Vergleich der Zellproteine von Stamm HxN1 durch 2D-Gelelektrophorese nach dem Wachstum auf Hexan und auf Capronat stützt die Beobachtung der Induktionsstudien. Bei einem Wachstum auf Hexan wurde in Stamm HxN1 die Synthese zusätzlicher Proteine induziert.

Tabelle 10: Isoelektrische Punkte und Molekularmassen der in den Zellen von Stamm HxN1 vorhandenen Proteine A_{HxN1} - D_{HxN1} beim Wachstum auf Hexan.

Proteinspot	pI	Molekularmasse [Da]
A_{HxN1}	6,5	47.500
B_{HxN1}	6,5	13.400
C_{HxN1}	6,2	11.000
D_{HxN1}	> 6,9	11.000

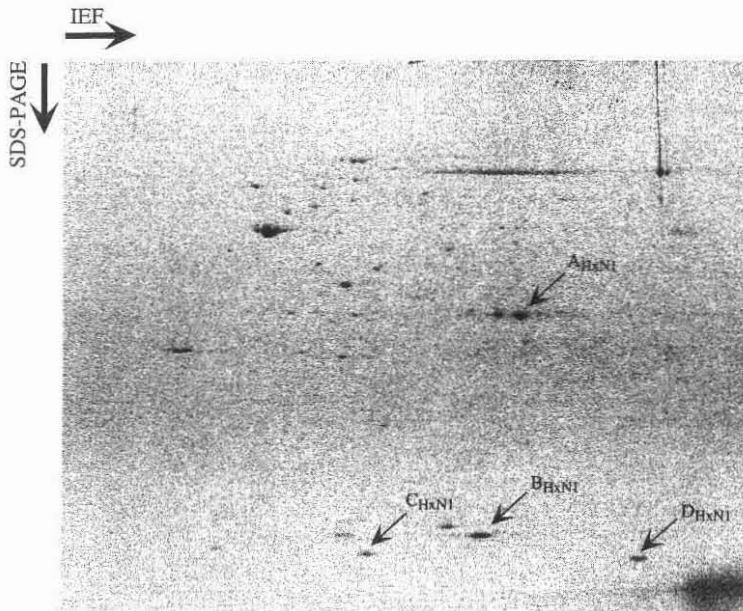


Abb. 24: Zweidimensionales gelelektrophoretisches Proteinmuster von auf Hexan gewachsenen Zellen des Stammes HxN1. Die Zellproteine werden bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese in der ersten Dimension (IEF) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (Trennung von links nach rechts) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekularmasse (Trennung von oben nach unten) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen die Proteine, die in Stamm HxN1 nur beim Wachstum auf Hexan zusätzlich vorhanden waren. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 100 μg .

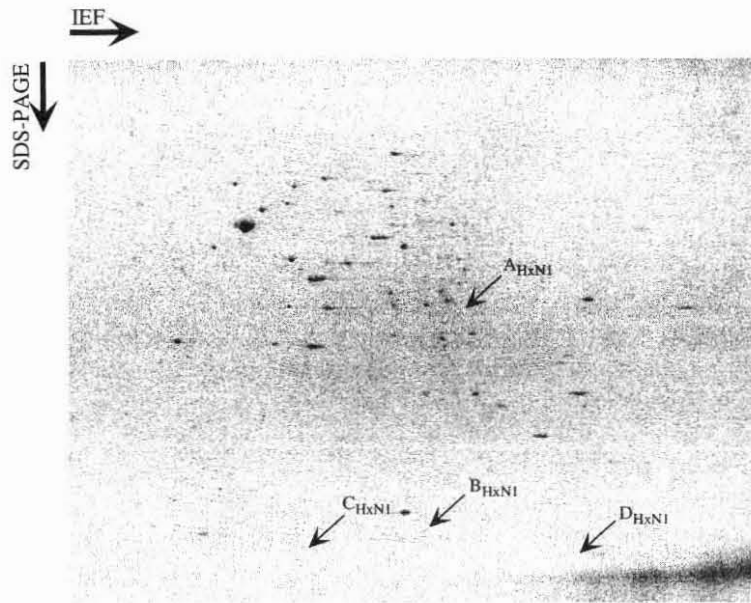


Abb. 25: Zweidimensionales gelelektrophoretisches Proteinmuster von auf Capronat gewachsenen Zellen des Stammes HxN1. Die Zellproteine werden bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese in der ersten Dimension (IEF) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (Trennung von links nach rechts) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekularmasse (Trennung von oben nach unten) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Die Pfeile deuten auf die Stellen, an denen sich die zusätzlichen Proteine der mit Hexan gewachsenen Zellen des Stammes HxN1 befinden (siehe Abb. 24). Die aufgetragene Proteinmenge betrug 100 µg.

8.2. Analyse der Gesamtzellproteine des Stammes OcN1

Bereits in einer vorangegangenen Arbeit waren Untersuchungen zur Alkanverwertung in einem denitrifizierenden, alkanverwertenden Stamm OcN1 durchgeführt worden (Ehrenreich 1996). In Induktionsstudien mit Stamm OcN1 war gezeigt worden, daß die Fähigkeit zur anaeroben Oktanverwertung nicht konstitutiv vorlag, sondern beim Wachstum auf dem Alkan induziert wurde. In einer vergleichenden Analyse der Gesamtzellproteine durch 2D-Elektrophorese nach dem Wachstum von Stamm OcN1 auf Oktan und Caprylat sollte im Rahmen dieser Arbeit diese Beobachtung geprüft werden.

Stamm OcN1 wurde über mehrere Passagen auf Oktan und Caprylat kultiviert, bevor die Massenzucht zur Herstellung der Zellproteinextrakte erfolgte. Da die Zellen des Stammes OcN1 während des Wachstums auf Oktan an die organische Phase hefteten, wurden die Kulturen vor der Ernte heftig geschüttelt. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet und zu Extrakten, wie unter II.2.6. beschrieben, verarbeitet.

Stamm OcN1 wies ein aus vielen Proteinspots bestehendes komplexes Proteinmuster auf. Es zeigte sich beim Vergleich der Zellen, die auf Caprylat gewachsen waren, mit den auf Oktan gewachsenen Zellen ein nahezu identisches Proteinmuster. Unterschiedlich waren lediglich die drei zusätzlichen Proteinspots im Proteinmuster der mit Oktan gewachsenen Zellen (Abb. 26). Mit Hilfe der Standards konnten den zusätzlich auftretenden Proteinen in den auf Oktan gewachsenen Zellen (A_{OcN1} - C_{OcN1}) isoelektrische Punkte und Molekularmassen zugeordnet werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Isoelektrische Punkte und Molekularmassen der in den Zellen von Stamm OcN1 vorhandenen Proteine A_{OcN1} - C_{OcN1} beim Wachstum auf Oktan.

Proteinspot	pI	Molekularmasse [Da]
A_{OcN1}	6,1	64.400
B_{OcN1}	6,4	47.000
C_{OcN1}	5,8	13.800

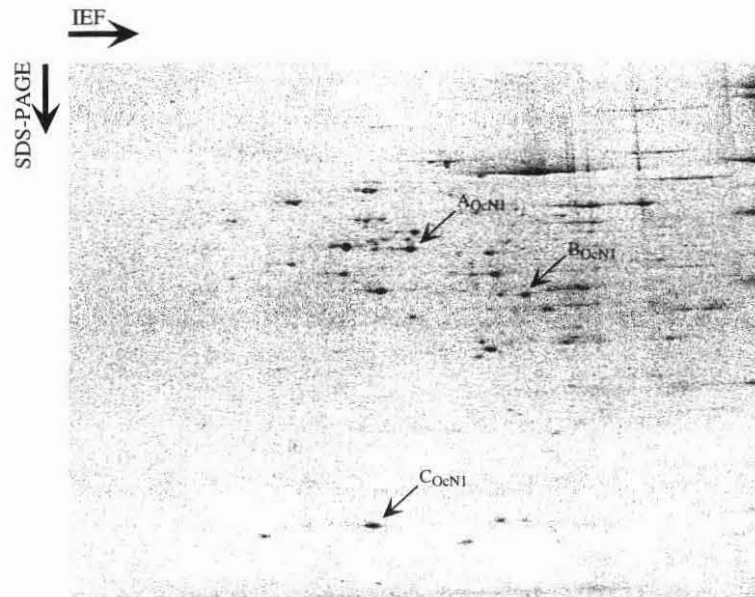


Abb. 26: Zweidimensionales geelektrophoretisches Proteinmuster von auf Oktan gewachsenen Zellen des Stammes OcN1. Die Zellproteine werden bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese in der ersten Dimension (IEF) entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (Trennung von links nach rechts) und in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Molekularmasse (Trennung von oben nach unten) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht. Die Pfeile kennzeichnen die Proteine, die in Stamm OcN1 nur beim Wachstum auf Oktan zusätzlich vorhanden waren. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 100 μ g.

8.3. Vergleichende Betrachtung der 2D-Elektrophorese-Analysen der Stämme HxN1 und OcN1

Die Analysen der Gesamtzellproteine der Stämme HxN1 und OcN1 in Abhängigkeit des Wachstumssubstrates in der 2D-Elektrophorese zeigten, daß jeder Stamm durch ein für ihn charakteristisches Proteinmuster gekennzeichnet ist. Darüber hinaus wird dieses stammspezifische Proteinmuster aber auch durch Wachstumsbedingungen, so z. B. das Wachstumssubstrat, geprägt. So führte in beiden Stämmen das Wachstum auf Alkanen im Vergleich zum Wachstum auf den korrespondierenden Säuren zu einer Expression zusätzlicher Proteine. In den auf Alkan gewachsenen Zellen beider Stämme zeigte sich die Bildung eines Proteins mit nahezu identischer Molekularmasse und nahezu identischem isoelektrischen Punkt. Das Protein (A_{HxN1} bzw. B_{OcN1}) in Stamm HxN1 und in Stamm OcN1 hatte eine Molekularmasse von ungefähr 47.000 Da und einen isoelektrischen Punkt von 6,5 bzw. 6,4.

9. N-terminale Aminosäuresequenzen einiger in Stamm HxN1 auf Hexan gebildeter Proteine

Die 2D-Elektrophorese zeigt die Bildung von Proteinen in Abhängigkeit des Substrates, gibt aber keine Auskunft über Funktionen der Proteine und ihre Rolle im Stoffwechsel. Die Ermittlung der Aminosäuresequenzen der auf Substraten spezifisch gebildeten Proteine ist jedoch ein erster Schritt, durch Vergleiche mit Sequenzen bekannter Proteine mögliche Informationen über die mögliche Rolle der unbekannt Proteine zu erhalten.

Für die N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung einiger in Stamm HxN1 zusätzlich gebildeter Proteine wurden diese nach der 2D-Elektrophorese auf PVDF-Membranen transferiert und mit Coomassie Blue gefärbt. Die nur in den Hexan-Zellen gefundenen Proteine A_{HxN1} , B_{HxN1} , C_{HxN1} und D_{HxN1} wurden aus der Membran ausgeschnitten und die Aminosäuresequenzen durch Edman-Abbau bestimmt (Tabelle 12).

Tabelle 12: N-terminale Aminosäuresequenzen der in mit Hexan gewachsenen Zellen von Stamm HxN1 zusätzlich gebildeten Proteine.

Protein	Aminosäuresequenz																						
	NH ₂ → COOH																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A _{HxN1}	M	N	R	A	H	F	E	H	E	H	N	I	F	R	Q	S	V	R	G	F			
B _{HxN1}	S	R	R	D	E	W	K	K	L	Q	E	E	M	T	R	D	G	G	E	I	K	S	L
C _{HxN1}	M	K	C	T	E	C	S	S	N	F	Q	E	Q	K									
	L	G	F	L	Q	R	Q	H	E	A	E	V	M										
D _{HxN1}	S	T	C	K	E	C	R	N	Y	F	P	I	N	E	E	A							

Während für die Proteine A_{HxN1}, B_{HxN1} und D_{HxN1} jeweils eine eindeutige Aminosäuresequenz ermittelt werden konnte, ergab die Analyse des Proteins C_{HxN1} zwei Sequenzen. Es scheint sich bei diesem Proteinspot um zwei Proteine zu handeln, die nicht voneinander isoliert werden konnten. Die Untersuchung läßt nicht die Bestimmung einer Hauptsequenz von diesen beiden ermittelten Sequenzen zu. Außerdem waren die Sequenzabfolgen in diesem Fall nicht eindeutig, da die Methode des Edman-Abbaus bei Doppelsequenzen zu einer Mißinterpretation bei der Erkennung der jeweilig abgespaltenen Aminosäure führen kann (Lottspeich et al. 1994).

10. Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm HxN1

Während Mikroorganismen bei der aeroben Alkanoxidation Sauerstoff als reaktives, stark oxidierendes Molekül für die Aktivierung des Alkans nutzen, müssen die unter anoxischen Bedingungen zur Umsetzung von Alkanen befähigten Organismen andere Aktivierungsmechanismen verwenden. Als eine mögliche Eingangsreaktion der anaeroben Alkanoxidation wurde die Knüpfung einer C-C-Bindung, z. B. durch Carbonylierung in Betracht gezogen (Aeckersberg 1994). Die Reaktion der Carbonylierung ist bereits aus einem anderen Stoffwechselweg vieler anaerober Bakterien bekannt, dem sog. Acetyl-CoA-Weg. Hier katalysiert das Enzym Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-Dehydrogenase) die Reduktion von CO₂ zu Acetyl-CoA ($2\text{CO}_2 + \text{CoASH} + [8\text{H}] \rightarrow \text{CH}_3\text{CO-SCoA} + 3\text{H}_2\text{O}$). Die CO-Dehydrogenase ist ein reversibel arbeitendes Enzym, das die Knüpfung bzw. die Lösung einer C-C-Bindung ermöglicht (Ferry 1995).

Bei der Annahme einer Aktivierung des Alkans durch eine Carbonylierungsreaktion wäre ein Katalysemechanismus entsprechend der CO-Dehydrogenase-Reaktion denkbar.

Basierend auf diesen Überlegungen sollte versucht werden, im Rohextrakt von Stamm HxN1 die CO-Dehydrogenase-Aktivität nachzuweisen.

Zur Herstellung des Rohextraktes wurde Stamm HxN1 in einer Massenzucht mit Hexan angezogen, unter anaeroben Bedingungen geerntet und wie unter II.2.7. beschrieben aufbereitet. Ein Aliquot der Zellen wurde nicht aufgeschlossen (Zellsuspension).

Beim Einsatz des Rohextraktes von Stamm HxN1 im Testansatz zum Nachweis der CO-Dehydrogenase zeigte sich zunächst eine Extinktionszunahme. Die Zunahme war sehr gering, war aber im Vergleich zu einer Kontrolle ohne CO und ohne Zellextrakt eindeutig erkennbar. Bezogen auf die Proteinkonzentration ergab sich eine spezifische Aktivität von $2,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Daraufhin wurde versucht, die beobachtete Aktivität durch Modifikationen des Testansatzes zu steigern. Zusätze von MgCl_2 (10 mM) oder ATP (5 mM) und die Wahl verschiedener Puffersysteme (MOPS, HEPES, Tris; 50-100 mM) ermöglichten jedoch keine Steigerung der Enzymaktivitäten. Auch der Versuch, durch Einsatz von Titan(III)-Citrat (Zehnder und Wuhrmann 1976) stark reduzierende und die Aktivität eventuell steigernde Bedingungen einzustellen, blieb ohne Erfolg. In einem zweiten Experiment mit frischen Zellextrakten von Stamm HxN1 wurde keine Extinktionszunahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden im Testansatz ganze Zellen von Stamm HxN1 eingesetzt. Durch Zugabe des Reagenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen und damit der Zellaufschluß im Testansatz. Jedoch war auch mit dieser Versuchsdurchführung die Messung von CO-Dehydrogenase-Aktivität in den Zellen von Stamm HxN1 nicht reproduzierbar.

Das Testprinzip zum Nachweis der CO-Dehydrogenase wurde mit Zellen des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfobacterium cetonicum*, für den eine CO-Dehydrogenase-Aktivität beschrieben worden war (Janssen und Schink 1995c), überprüft. Die gemessenen Aktivitäten lagen in der Größenordnung der in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten.

Teil B:**Anaerobe Oxidation des alizyklischen, gesättigten Kohlenwasserstoffs Cyclohexan durch denitrifizierende Mikroorganismen****1.1. Anreicherungskultur mit Cyclohexan unter denitrifizierenden Bedingungen**

Neben dem Anreicherungsversuch zum Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen (Pentan, Hexan) wurden weitere Anreicherungsversuche mit Cyclohexan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle unter denitrifizierenden Bedingungen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde ein Schlammgemisch aus dem Bad Zwischenahner Meer (Niedersachsen) aus dem Bereich eines Fähranlegers verwendet. Der Schlamm wurde mit Süßwassermedium mit 5 mM Nitrat vermischt. Als Substrat wurde Cyclohexan in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,9%ig und 2%ig) in HMN angeboten. Dabei wurden Doppelansätze verwendet, wobei ein Ansatz ruhig liegend und der andere unter kontinuierlichem Schütteln bei 28 °C inkubiert wurde. Zur Beobachtung mikrobiellen Wachstums wurde in den Anreicherungsansätzen in regelmäßigen Abständen die Gasbildung überprüft und mit der in einer mitlaufenden Kontrolle ohne Substrat verglichen.

Während im Kontrollansatz die Gasbildung nach zwei Wochen nachließ, wiesen die Anreicherungskulturen, in denen Cyclohexan 0,9%ig in HMN vorhanden war, eine stetige Gasentwicklung auf. Die gleichzeitige Analyse der Nitrat- und Nitritkonzentration zeigte in diesen Ansätzen einen Verbrauch des Elektronenakzeptors. Nach ca. neun Wochen waren erstmals 5 mM Nitrat im geschüttelten Anreicherungsansatz vollständig verbraucht. Im ruhig liegend inkubierten Ansatz war die Nitratreduktion langsamer; hier waren 5 mM Nitrat erst nach ca. 13 Wochen vollständig reduziert. Sobald der Elektronenakzeptor komplett verbraucht war, wurde er in einer Konzentration von 5 mM erneut zugesetzt. Nachdem dem geschüttelten Ansatz zweimal Nitrat erneut zugesetzt worden war, wurden Folgekulturen beimpft. Nach der dritten Passage war der Anreicherungsansatz schlammfrei. Es zeigte sich nun neben einer Gasentwicklung und dem Verbrauch von Nitrat auch eine deutliche Trübung des Mediums durch bakterielles Wachstum. Eine mikroskopische Kontrolle der Anreicherungskultur zeigte verschiedenartige Zelltypen, wobei ein kleiner stäbchenförmiger Zelltyp vorherrschend war (Abb. 27). Die ohne Schütteln inkubierten Ansätze wuchsen nach der Übertragung im Vergleich zu den geschüttelten Ansätzen deutlich langsamer und wurden daher nicht weitergeführt.

Die Anreicherungsansätze mit der höheren Cyclohexankonzentration (2 % in HMN) verhielten sich wie die Kontrolle. Nach einer anfänglichen schwachen Gasbildung kam die mikrobielle Aktivität zum Erliegen; es fand keine weitere Gasbildung statt, und Nitrat und Nitrit nahmen in ihren Konzentrationen nicht weiter ab. Während der weiteren sechsmonatigen Inkubation zeigte sich keine Änderung. Die höhere Cyclohexankonzentration schien für ein mikrobielles Wachstum hemmend zu sein.

Im weiteren wurden nun erste Isolierungsexperimente mit einer der letzten Passagen der geschüttelten Anreicherungskultur (mit 0,9 % Cyclohexan in HMN) als Inokulum durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, eine Reinkultur mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von Cyclohexan zu erhalten.

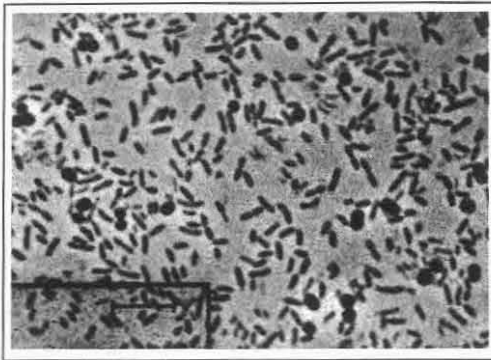


Abb. 27: Phasenkontrastaufnahme der Anreicherungskultur mit Cyclohexan (0,9 % in HMN) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle und mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 6 μm .

1.2. Bilanzierung des anaeroben Abbaus von Cyclohexan in der Anreicherungskultur

In einem Wachstumsversuch mit der Anreicherungskultur wurde die Oxidation des Cyclohexans durch Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen quantifiziert. Für die Quantifizierung wurden Kulturen in Glasflaschen in 200 ml Süßwassermedium mit 10 mM Nitrat angesetzt. Anders als bei der Quantifizierung des anaeroben Hexanabbaus durch die Reinkultur von Stamm HxN1 wurde der Anreicherungskultur kein Ascorbat als Reduktionsmittel zugesetzt. So wurde eine Verwendung des Ascorbats als mögliche Kohlenstoff- und Energiequelle durch unbekannte Bakterien ausgeschlossen. Das Substrat wurde als steriles Cyclohexan-HMN-Gemisch (0,9 % Cyclohexan) anoxisch und steril hergestellt und nach dem Verschluss der Kulturflaschen mit einer Spritze zugesetzt. Nach Beimpfung der Kulturansätze wurde ein Druckausgleich vorgenommen. Nach 12 Wochen Inkubation unter kontinuierlichem Schütteln wurden die optische Dichte, der entstandene Gasdruck, die Nitrat-, Nitrit- und die Distickstoffoxid-Konzentration sowie der Cyclohexanverbrauch bestimmt.

In Tabelle 13 sind die Meßergebnisse zusammengefaßt. In den beiden Wachstumsansätzen mit Zellen zeigte sich ein Cyclohexanverbrauch von über 60 % und ein vollständiger Nitratverbrauch. Nitrit war in keinem der beiden Ansätze am Ende der Inkubation nachweisbar. Beide Ansätze wiesen eine deutliche Gasproduktion auf. Die Gasmengen betragen 29 ml und 32 ml. Die Gasanalyse ergab, daß es sich dabei um N_2 , CO_2 und im Ansatz 2 zusätzlich um N_2O handelte.

Zusätzlich zum Verbrauch des Cyclohexans und des Nitrats ließ sich auch eine Zunahme der Trübung des Mediums erkennen. So wurde in den Wachstumsansätzen eine OD von 0,14 und 0,15 erreicht. In den als Kontrolle mitgeführten Ansätzen ohne Nitrat und Cyclohexan wurde keine Trübungszunahme beobachtet. Auch zeigte sich in diesen Ansätzen keine Cyclohexanabnahme und keine nennenswerte Nitratreduktion und Gasproduktion.

Eine Gegenüberstellung der aus der verbrauchten Cyclohexanmenge stammenden Elektronen und der durch die Nitratreduktion verbrauchten Elektronen zeigte, daß ein nahezu ausgeglichenes Elektronenverhältnis von 1:1 bestand. Bei dieser Gegenüberstellung muß in Betracht gezogen werden, daß nicht die gesamte Cyclohexanmenge der Energiegewinnung diente, sondern ein Teil davon assimiliert wurde.

Tabelle 13: Quantitative Bestimmung des anaeroben Cyclohexanverbrauchs und der Nitratreduktion in einer Anreicherungskultur. Das Wachstumsexperiment wurde in einer flachen Glasflasche (250 ml), die mit einem Butylstopfen verschlossen war, durchgeführt. Die Kulturflasche enthielt 200 ml Süßwassermedium (Nitratkonzentration 10 mM), das mit 5 ml eines Substrat-HMN-Gemisches überschichtet wurde (0,9 % Cyclohexan in HMN als Trägerphase). Die Flasche wurde flach liegend auf einem Schüttler inkubiert, wobei ein Kontakt zwischen der wasserunlöslichen Schicht und dem Stopfen vermieden wurde.

	Zellen mit Cyclohexan		Zellen ohne Cyclohexan	Zellen ohne Nitrat	Medium ohne Zellen
	Ansatz 1	Ansatz 2			
Cyclohexan eingesetzt [mmol]	0,42	0,42	0	0,42	0,42
Cyclohexan verbraucht ^a [mmol]	0,29	0,27	0	0	0
Cyclohexanverbrauch in [%]	69,0	64,3	0	0	0
Nitrat am Versuchsende [mmol]	0	0	1,7	0	2,0
Nitrit am Versuchsende [mmol]	0	0	0	0	0
Distickstoffoxid am Versuchsende ^b [mmol]	0	0,15	0	0	0
OD bei 660 nm	0,14	0,15	0,01	0,02	0,01
Gasproduktion [ml]	29,0	32,0	0	0	0
Elektronen aus vollständiger Cyclohexanoxidation ^c [mmol]	10,4	9,7			
Elektronen verbraucht durch Nitratreduktion ^d [mmol]	10,0	9,7	1,5		0

^a Angegeben ist die Differenz zwischen der zu Beginn des Versuchs eingesetzten Menge an Cyclohexan und der zum Ende des Versuchs wiedergefundenen Menge an Cyclohexan.

^b Angegeben ist die N₂O-Menge unter Berücksichtigung der Löslichkeit im Medium (II.3.2.).

^c Bei vollständiger Oxidation zu CO₂ werden aus 1 mol Cyclohexan 36 mol Elektronen erhalten.

^d Elektronen verbraucht = 5 · [Nitrat_{eingesetzt} - Nitrat_{gemessen} - Nitrit_{gemessen} - 2 · Distickstoffoxid_{gemessen}] + 2 · [Nitrit_{gemessen}] + 8 · [Distickstoffoxid_{gemessen}]

IV. Diskussion

1. Anaerobe Oxidation von gesättigten Kohlenwasserstoffen durch denitrifizierende Mikroorganismen

1.1. Anaerobe Oxidation aliphatischer Kohlenwasserstoffe durch Stamm HxN1

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, ein denitrifizierendes Bakterium, Stamm HxN1, zu isolieren, das kurzkettenige Alkane (C_6 - C_8) anaerob oxidiert. Beim Wachstum auf Hexan zeichnete sich der Stamm HxN1 im Vergleich zu den bekannten, zur Alkanoxidation befähigten Bakterien durch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit aus (Tabelle 14). Die Verdopplungszeit mit Hexan als alleinigem Substrat betrug 11 h. Die vergleichsweise hohe Wachstumsgeschwindigkeit von Stamm HxN1 ist für die Zellernte für biochemische Untersuchungen besonders vorteilhaft.

Bei der Gegenüberstellung aller bislang isolierten Mikroorganismen, die zur anaeroben Alkanoxidation befähigt sind, fällt eine hohe Substratspezifität bezüglich der verwertbaren Kohlenwasserstoffe auf (Tabelle 14). Ferner ist allen bisher isolierten, zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Stämmen gemeinsam, daß sie keine aromatischen Kohlenwasserstoffe umsetzen.

Die Verwertung von Alkanen und die Unfähigkeit zur Verwertung von aromatischen Kohlenwasserstoffen zeigte sich auch beim Wachstum einiger Reinkulturen auf Erdöl als komplexem Kohlenwasserstoffgemisch. So verbrauchte Stamm HxN1 während des Wachstums auf Erdöl selektiv Alkane der Kettenlänge C_6 - C_8 . Die Fähigkeit der selektiven Nutzung von Alkanen der jeweils bevorzugten Kettenlänge war bereits in dem denitrifizierenden Stamm OcN1 und in dem sulfatreduzierenden Stamm TD3 beobachtet worden (Rueter et al. 1994; Ehrenreich 1996). Bei der Untersuchung zum anaeroben Abbau von Erdölkomponenten in marinen Sedimenten durch Sulfatreduzierer war darüber hinaus eine selektive Verwertung von langkettigen Alkanen mit Kettenlängen von C_{15} - C_{34} beobachtet worden (Caldwell et al. 1998).

Das Spektrum der unter anaeroben Bedingungen oxidierbaren Alkane umfaßt somit Kohlenstoffketten mit einer Länge von C_6 - C_{34} . Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine anaerobe, mikrobielle Oxidation von Alkanen mit weniger als sechs Kohlenstoffatomen bekannt.

Tabelle 14: Vergleich der zur anaeroben Alkanoxidation befähigten bekannten Reinkulturen sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien (Aeckersberg 1994, Ehrenreich 1996, Aeckersberg et al. 1998).

Stamm	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$			$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$		
	TD3	Hxd3	Pnd3	HxN1	OcN1	HdN1
Isolierungsstandort	Guayamas Basin	Öltank	Mariner Schlamm	Grabenschlamm	Grabenschlamm	Kläranlage
Phylogenetische Einordnung: Gruppe der Proteobakterien	δ	δ	δ	β	β	γ
Verwertete Alkane	$\text{C}_6 - \text{C}_{16}$	$\text{C}_{12} - \text{C}_{20}$	$\text{C}_{14} - \text{C}_{17}$	$\text{C}_6 - \text{C}_8$	$\text{C}_8 - \text{C}_{12}$	$\text{C}_{14} - \text{C}_{20}$
Verdopplungszeit beim Wachstum auf Alkanen	2 - 3 d	4 - 5 d	≤ 4 d	11 h	15 - 20 h	15 - 20 h

Beim Wachstum auf Alkanen ist besonders das Wachstumsverhalten von Stamm HxN1 hervorzuheben. Dessen Wachstum erfolgte gleichmäßig in der wäßrigen Phase, ohne Anheftung der Zellen an die organische Phase (Abb. 13). Hingegen hefteten sich die Zellen der sulfatreduzierenden Stämme Hxd3, Pnd3 und TD3 und der denitrifizierenden Stämme OcN1 und HdN1 während des Wachstums mit Alkanen an die organische Phase, so daß gewachsene Kulturen nahezu keine Trübung des Mediums zeigten. Dies ließ, anders als beim Stamm HxN1, nicht die Verfolgung des Wachstums anhand der optischen Dichte zu (Ehrenreich 1996; Aeckersberg 1994).

Gründe für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der alkanverwertenden Stämme lassen sich vielleicht in der Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe in Wasser finden. Die Löslichkeit von Alkanen in Wasser nimmt mit zunehmender Kettenlänge stark ab. Dabei läßt sich die Löslichkeit (C_L^S in $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) nicht-gasförmiger Alkane bei 25 °C mit guter Näherung als Funktion der Anzahl an C-Atomen (N) durch die Gleichung $C_L^S = 282 \cdot 10^{-0.57N}$ beschreiben (Eastcott et al. 1988). Somit ergibt sich bei einer Verlängerung eines Alkans um ein C-Atom eine Abnahme der Löslichkeit in Wasser um den Faktor 3,72. Das bedeutet beispielsweise für *n*-Hexan eine Löslichkeit von $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ und für *n*-Dekan eine Löslichkeit von $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$. Demnach scheint die Löslichkeit der von den Stämmen Hxd3, Pnd3, HdN1 und OcN1 umgesetzten, länger-kettigen Alkane zu niedrig zu sein, um ein Wachstum in der wäßrigen Phase zu ermöglichen. Für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Substrat scheint daher ein direkter Kontakt der Zellen dieser Stämme mit dem Alkan notwendig zu sein. Im Gegensatz dazu erlauben die kürzerkettigen, von Stamm HxN1 bevorzugten Alkane mit ihrer besseren Löslichkeit in Wasser das Wachstum in der wäßrigen Phase. Daß dennoch eine Limitierung des Wachstums von Stamm HxN1 aufgrund der Diffusion von Hexan im Medium besteht, zeigte sich an den unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten in ruhig liegend und unter stetigem Schütteln inkubierten Kulturen (s. III.3.4.).

Denitrifizierende Stämme (PbN1, pCyN1, pCyN2) mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von *n*-Propylbenzol und *p*-Cymol zeigten ebenfalls wie Stamm HxN1 ein homogenes Wachstum im Kulturmedium ohne eine Anheftung der Zellen an die organische Phase (Harms 1998; Rabus und Widdel 1995). Tatsächlich liegt die Löslichkeit dieser aromatischen Kohlenwasserstoffe in Wasser ungefähr in der Größenordnung der Löslichkeit von Hexan. Die Löslichkeiten von *n*-Propylbenzol beträgt $0,43 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$, die von *p*-Cymol $0,25 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ (Eastcott et al. 1988). Auch das Wachstum dieser Stämme wurde durch eine stetige schüttelnde Inkubation beschleunigt.

Bei der Aufnahme einer Wachstumskurve von Stamm HxN1 mit Hexan und Nitrat zeigte sich, daß dieser Stamm im Gegensatz zu den bereits beschriebenen, zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Denitrifizierern HdN1 und OcN1 zunächst Nitrit ausschied, bevor

die vollständige Reduktion zu Stickstoff erfolgte (Abb. 15). Die Konzentration des zum Beginn des Wachstums eingesetzten Nitrats durfte 10 mM nicht überschreiten, da sonst das ausgeschiedene Nitrit das Wachstum hemmte. Der nicht-exponentielle Verlauf der anhand der optischen Dichte aufgenommenen Wachstumskurve läßt diesen hemmenden Effekt deutlich erkennen.

In Versuchen zur Bilanzierung der anaeroben Oxidation von Hexan durch den Stamm HxN1 wurde neben dem Nitratverbrauch und der intermediären Nitritbildung der Verbrauch von Hexan und die gebildete Zelltrockenmasse ermittelt. Um sicherzustellen, daß nicht Spuren von Sauerstoff im Medium enthalten waren, war das Medium mit Ascorbat als Reduktionsmittel versetzt worden. Eine signifikante Abnahme des Hexans unter diesen strikt anoxischen Bedingungen wurde nur in Gegenwart des Elektronenakzeptors Nitrat beobachtet. Die in den Kontrollexperimenten beobachtete leichte Hexanabnahme läßt sich vermutlich durch Verlust bei der Hexananalyse erklären. Ebenso wurde Nitrat nur dann verbraucht, wenn Hexan als Elektronendonator vorlag.

Unter Berücksichtigung der Bildung von Biomasse ergab die Bilanzierung ein ausgewogenes Verhältnis der Elektronen, die bei der Dissimilation des Hexans freigesetzt wurden, und der Elektronen, die für die Reduktion des Nitrats über Nitrit zu Stickstoff verbraucht wurden (s. III.A.4.). Diese Wachstumsbilanzierung sowie die Fähigkeit von Stamm HxN1, Acetat als Elektronendonator zu verwerten, sprechen für eine vollständige Oxidation des Hexans entsprechend folgender Gleichung:



$$\Delta G^\circ = -3724,2 \text{ kJ/mol Hexan}$$

1.2. Anaerobe Oxidation von alizyklischen Kohlenwasserstoffen in einer Mischkultur

Bisher wurde nicht beschrieben, daß Cycloalkane unter Ausschluß von Sauerstoff von Bakterien in Rein- oder Anreicherungskulturen verwertet werden. Selbst in Gegenwart von Sauerstoff wurde eine Oxidation von Cycloalkanen nur bei wenigen Mikroorganismen nachgewiesen (Morgan und Watkinson 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von Cyclohexan angereichert. Die Wachstumsbilanzierung in der Anreicherungskultur zeigte deutlich eine vollständige Oxidation des Cyclohexans bei gleichzeitigem Verbrauch von Nitrat. Eine Reinkultur mit der Fähigkeit zur anaeroben Cyclohexanoxidation konnte jedoch bisher nicht isoliert werden.

Die zur anaeroben Oxidation von Cyclohexan befähigten, angereicherten Bakterien wuchsen, wie Stamm HxN1, gleichmäßig in der wäßrigen Phase. Wie beim Wachstum von Stamm HxN1 auf Hexan, kann auch das homogene Wachstum der Anreicherungskultur durch die verhältnismäßig gute Wasserlöslichkeit des Cyclohexans erklärt werden. Mit $6,8 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ liegt die Löslichkeit von Cyclohexan noch über der Löslichkeit des Hexans (Eastcott et al. 1988).

Ziel zukünftiger Experimente sollte es sein, aus der Anreicherungskultur eine Reinkultur zu isolieren. Da Cyclohexan nur gleichwertige Methylengruppen enthält, wäre die Isolierung einer Reinkultur für die Untersuchung des Mechanismus der anaeroben Alkanoxidation besonders interessant.

2. Taxonomische Einordnung des alkanverwertenden Stammes HxN1

Basierend auf den 16S rRNA Sequenzdaten ist Stamm HxN1 dem Cluster der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* innerhalb der β -Gruppe der Proteobakterien zuzuordnen (s. III.A.2., Abb. 11).

Die Gattung *Thauera* wurde erstmals 1993 mit der Beschreibung des Bakteriums *Thauera selenatis*, einem Bakterium, das Selenat als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen vermag, etabliert (Macy et al. 1993). Weitere Angehörige dieser Gattung sind *Thauera aromatica* (Anders et al. 1995; Gallus et al. 1998), *Thauera* sp. Stamm mXyN1 (Rabus und Widdel 1995), *Thauera linaloolentis* und *Thauera terpenica* (Foß und Harder 1998). Während die beiden erstgenannten Bakterienstämme aromatische Kohlenwasserstoffe unter denitrifizierenden Bedingungen verwerten, bauen die letztgenannten Denitrifizierer sauerstoffhaltige Monoterpene ab.

Die Gattung *Azoarcus* wurde ebenfalls 1993 etabliert (Reinhold-Hurek et al. 1993). Sie wurde ursprünglich zur Beschreibung von mit Kallar-Gras assoziierten Bakterienstämmen mit der Fähigkeit zur Fixierung von Stickstoff definiert. Als erste Arten dieser Gattung wurden *Azoarcus indigens* und *Azoarcus communis* beschrieben, bei denen zunächst ein strikt aerober Stoffwechsel vermutet wurde (Reinhold-Hurek et al. 1993). Die Fähigkeit zur Denitrifikation wurde in den Stämmen dieser Gattung zunächst nicht nachgewiesen. Bereits in dieser ersten Beschreibung von Arten der Gattung *Azoarcus* wurde auf deren Vorkommen an geographisch unterschiedlichen Standorten und unter diversen Umweltbedingungen hingewiesen. Als Isolierungsstandorte für *Azoarcus* Stämme wurden sowohl Wurzelsysteme des Kallar-Grases (*Leptochloa fusca* [L.] Kunth) in Pakistan, Schlämme einer Ölraffinerie in Frankreich als auch humane Quellen (Blut, Körperwunden) bei Untersuchungen in Schweden genannt (Reinhold-Hurek et al. 1993).

Nur kurze Zeit nach der Erstbeschreibung der Gattung *Azoarcus* wurde dieser als weitere, neue Art *Azoarcus toluolyticus* zugeordnet (Zhou et al. 1995). *A. toluolyticus* stammte aus einem erdölkontaminierten Grundwasserleiter in den USA und unterschied sich von den vorher beschriebenen *Azoarcus* Stämmen durch die Fähigkeit zum anaeroben Abbau von Toluol mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor (Zhou et al. 1995). Mittlerweile sind weitere denitrifizierende Stämme mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation aromatischer Kohlenwasserstoffe bekannt geworden, die phylogenetisch der Gattung *Azoarcus* zuzuordnen sind (Tabelle 15).

Darüber hinaus wurden *Azoarcus* Arten beschrieben, die zum Abbau diverser aromatischer Verbindungen mit funktionellen Gruppen (z. B. Phenol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, Benzoat, Hydroxybenzoat und *p*-Cresol) befähigt sind (Tabelle 15). Weiterhin wurden *Azoarcus* Arten mit der Fähigkeit zum Abbau von Cyclohexan-1,2-diol (Stamm 22Lin, Harder 1997) und zum Abbau der N-heterozyklischen Verbindung Pyridin (Stamm pF6, Rhee et al. 1997) beschrieben. Mit dem denitrifizierenden Stamm HxN1 ist innerhalb der Gattung *Azoarcus* nun auch ein Organismus mit der Fähigkeit zum Abbau aliphatischer, gesättigter Kohlenwasserstoffe vertreten.

Die als *Thauera* und *Azoarcus* benannten Arten sind aufgrund der 16S rRNA Analyse sehr nahe miteinander verwandt. Dennoch bilden Arten dieser Gattungen abgrenzbare Cluster innerhalb der β -Gruppe (s. III.A.2., Abb. 11). Ausnahmen stellen der *Azoarcus* Stamm S5b2 (Reinhold-Hurek et al. 1993) und der als *Azoarcus petrolei* vorgeschlagene Stamm OcN1 (Ehrenreich 1996) dar. Beide Stämme wurden zwar ursprünglich als Arten der Gattung *Azoarcus* benannt, erwiesen sich aber nach weiteren 16S rRNA Analysen als außerhalb des Clusters der sonstigen bekannten *Azoarcus* Arten stehend (s. III.A.2., Abb. 11). Daher wäre eine Neubenennung dieser beiden Stämme vorzuschlagen. Stamm HxN1 hingegen ist eindeutig der Gattung *Azoarcus* zuzurechnen.

Tabelle 15: Isolierungsstandorte und Wachstumssubstrate von bekannten, Aromaten-verwertenden Stämmen, die als Arten der Gattung *Azoarcus* beschrieben wurden oder dieser Gattung zuzuordnen sind.

Bakterienart oder Bakterienstamm	Isolierungs- standort	Aromatische Wachstumssubstrate		Autoren
		Kohlen- wasserstoffe	Sonstige	
<i>Azoarcus toluolyticus</i>	Mineralöl-kontaminierter Aquifer	Toluol	nicht bestimmt	Zhou et al. 1995
<i>Azoarcus evansii</i>	Grabenschlämme, USA	keine bekannt	Benzylalkohol, Benzaldehyd, Benzoat, Hydroxybenzoat, Phenylacetat, Phenylglyoxylat, <i>p</i> -Cresol	Anders et al. 1995
EbN1	Grabenschlämme, Bremen	Toluol, Ethylbenzol	Benzylalkohol, Phenylethanol, Benzaldehyd, Acetophenon	Rabus und Widdel 1995
PbN1	Grabenschlämme, Bremen	Ethylbenzol, <i>n</i> -Propylbenzol	Phenol, Benzylalkohol, Phenylethanol, Benzaldehyd, Acetophenon, Propiophenon	Rabus und Widdel 1995
T3	Dieselöl-kontaminierter Aquifer, Schweiz	Toluol	nicht bestimmt	Hess et al. 1997
M3	Dieselöl-kontaminierter Aquifer, Schweiz	Toluol, <i>m</i> -Xylol	nicht bestimmt	Hess et al. 1997
<i>Azoarcus anaerobius</i>	Klärschlamm, Tübingen	keine bekannt	Phenol, Resorcinol, Benzoat, Hydroxybenzoat, Phenylacetat, <i>p</i> -Cresol	Springer et al. 1998
FL05	Entwässerungsgraben, Orangenhai, Florida, USA	keine bekannt	Phenol, 4-Hydroxybenzylalkohol, 4-Hydroxybenzaldehyd, Benzoat, 4-Hydroxybenzoat, Phenylacetat, <i>p</i> -Cresol	Van Schie und Young 1998
PH002	Eastriver, New York, USA	keine bekannt	wie Stamm FL05 + Benzylalkohol, Benzaldehyd	Van Schie und Young 1998
CR23	Graben, Costa Rica	keine bekannt	wie Stamm FL05 + Benzylalkohol, Benzaldehyd	Van Schie und Young 1998
pCyN1	Grabenschlämme, Bremen	Toluol, <i>p</i> -Cymol, <i>p</i> -Ethyltoluol,	Benzylalkohol, Benzoat, <i>p</i> -Ethylbenzoat, <i>p</i> -Isopropylbenzoat, <i>p</i> -Cresol	Harms 1998

Aus den generell sehr nahen Verwandtschaften auf der Ebene von 16S rRNA Sequenzen innerhalb der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* kann nicht notwendigerweise auf gleiche oder ähnliche Stoffwechseleigenschaften geschlossen werden. Ein markantes Beispiel hierfür sind die Stämme HxN1 und PbN1. Die 16S rRNA Analyse ergab eine Ähnlichkeit der beiden Stämme von 99,4 % (s. III.A.2.). Bezüglich der Substratverwertung unterschieden sich die beiden Stämme jedoch deutlich. Während Stamm HxN1 aliphatische, gesättigte, aber keine aromatischen Kohlenwasserstoffe umsetzte, war Stamm PbN1 befähigt, aromatische Kohlenwasserstoffe zu nutzen, jedoch keine aliphatischen Kohlenwasserstoffe. Das Beispiel verdeutlicht, daß die taxonomische Abgrenzung zwischen Bakterienstämmen nicht nur aufgrund der 16S rRNA Sequenzanalysen vorgenommen werden kann. Tatsächlich sprechen sich viele Taxonomen für die Beschreibung einer Art sowohl unter Berücksichtigung genotypischer als auch phenotypischer Merkmale und somit für die Anwendung der polyphasischen Taxonomie aus (Vandamme et al. 1996; Goodfellow et al. 1997).

Bei Ähnlichkeiten zwischen 16S rRNA Sequenzen von >97 %, wie auch im Falle der Stämme HxN1 und PbN1, stellt die DNA-DNA-Hybridisierung eine zusätzliche, zuverlässigere Methode zur genauen Klassifizierung der Bakterien dar (Stackebrandt und Goebel 1994; Goodfellow et al. 1997). Zwei Bakterienstämme werden als Angehörige derselben Art betrachtet, wenn die DNA-DNA-Hybridisierung eine Ähnlichkeit von ≥ 70 % beträgt (Wayne et al. 1987). Der angegebene Wert von 70 % stellt allerdings nur eine Empfehlung aufgrund einer Konvention dar und sollte nicht als ein von der Natur gegebener, absoluter Grenzwert betrachtet werden. Die DNA-DNA-Hybridisierung der Stämme HxN1 und PbN1 ergab eine Ähnlichkeit von 63,1 %. Nach der Konvention bedeutet dies, daß Stamm HxN1 als eine von Stamm PbN1 unterschiedliche Art angesehen werden sollte.

Daß eine Einordnung von Stamm HxN1 in den Cluster der Gattungen *Azoarcus* und *Thauera* durchaus sinnvoll ist und nicht die Etablierung einer eigenen, neuen Gattung zu erwägen ist, ergab sich aus weiteren chemotaxonomische Analysen. Sowohl der G+C-Gehalt der DNA als auch das Fettsäureprofil sprechen dafür, den Stamm hier einzuordnen. Der G+C-Gehalt von 66,3 mol % in Stamm HxN1 lag in der Größenordnung der Werte anderer bekannter Stämme der *Azoarcus-Thauera*-Gruppe. Deren Werte waren wie folgt: Stamm PbN1, 66,8 mol %; Stamm EbN1, 65,0 mol % (Rabus und Widdel 1995); *Azoarcus evansii*, 67,5 mol % (Anders et al. 1995); *Azoarcus indigenus*, 66,6 mol % (Reinhold-Hurek et al. 1993), *Azoarcus anaerobius*, 66,5 mol % (Springer et al. 1998); *Thauera aromatica*, 67,0 mol % (Anders et al. 1995) und *Thauera selenatis*, 66,0 mol % (Macy et al. 1993).

Ebenso zeigte das Fettsäureprofil von Stamm HxN1 eine hohe Ähnlichkeit mit den Fettsäureprofilen bekannter *Azoarcus-Thauera*-Arten. So wurden in Stamm HxN1, ebenso

wie in *Azoarcus toluityticus* (Zhou et al. 1995), *Azoarcus evansii*, *Azoarcus indigenus*, *Thauera aromatica* (Anders et al. 1995), in kürzlich beschriebenen, ebenfalls der *Azoarcus*-Gattung zuzuordnenden Phenol-abbauenden Denitrifizierern (van Schie und Young 1998) und in Monoterpen-abbauenden Denitrifizierern (Foss und Harder 1998) die Fettsäuren 3-Hydroxydekanoat (3OH-10:0) Dodekanoat (12:0), *cis*-9 Hexadekanoat (16:1), Hexadekanoat (16:0) und Oktadekanoat (18:1) als die häufigsten Zellfettsäuren nachgewiesen.

Zusammenfassend betrachtet wird Stamm HxN1 als neue Art der Gattung *Azoarcus* mit der Bezeichnung *Azoarcus hydrocarbonis* vorgeschlagen (s. Anhang).

3. Biochemische Überlegungen zum Mechanismus der anaeroben Oxidation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen

Da es sich bei aliphatischen Kohlenwasserstoffen um chemisch reaktionsträge Verbindungen handelt, setzt eine mikrobielle Umsetzung zu CO_2 zunächst eine initiale Aktivierung der Alkane voraus. Der bisher einzige in der Biologie eindeutig nachgewiesene Mechanismus zur Aktivierung von Alkanen ist die bei aeroben Mikroorganismen beobachtete Hydroxylierung durch Monooxygenasen (Bühler und Schindler 1984; Britton 1984). Dabei wird ein Sauerstoffatom des O_2 direkt in das Alkan eingefügt.

Die Möglichkeit, reaktive Formen von Sauerstoff unter anoxischen Bedingungen aus reduzierten Sauerstoffverbindungen zu bilden, besteht für die zur anaeroben Oxidation von Alkanen befähigten Mikroorganismen gemäß unseres heutigen Kenntnisstandes nicht. Unter Ausschluß von O_2 sind diese Mikroorganismen daher auf alternative Mechanismen der Alkanaktivierung angewiesen. In der Literatur werden zwei Möglichkeiten der anaeroben Alkanaktivierung diskutiert. Zum einen wurde die Bildung eines Alkens durch eine initiale Dehydrogenierung des Alkans postuliert (Bühler und Schindler 1984; Morikawa et al. 1996); zum anderen wird eine Aktivierung des Alkans durch die Addition einer Kohlenstoffeinheit, also die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung, vorgeschlagen (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998). In den folgenden Absätzen sollen diese beiden Möglichkeiten der Aktivierung unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse mit Stamm HxN1 erörtert werden.

3.1. Alkene als mögliche Intermediate der anaeroben Alkanoxidation

Bereits in frühen Arbeiten zum Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe wurden Alkene als mögliche Intermediate nicht nur bei einem angenommenen anaeroben, sondern auch bei dem bereits gut bekannten aeroben Abbau von Alkanen diskutiert. Experimente mit wachsenden Zellen und Zellextrakten gaben Hinweise auf die Umsetzung von Alkanen zu Alkenen (Iizuka et al. 1969; Wagner et al. 1967; Chouteau et al. 1962; Senez und Azoulay 1961; Parekh et al. 1977; Morikawa et al. 1996).

Erstmals Anfang der sechziger Jahre wurde in Experimenten mit *Pseudomonas aeruginosa* unter Ausschluß von Sauerstoff die Umsetzung von Heptan zu 1-Hepten in Anwesenheit eines künstlichen Elektronenakzeptors beobachtet (Chouteau et al. 1962; Senez und Azoulay 1961). Darüber hinaus wurden Experimente mit einem weiteren *Pseudomonas* Stamm zur Reinigung von Proteinen beschrieben, die unter anoxischen Bedingungen eine

Umsetzung eines Alkans über das 1-Alken zum Alkohol katalysierten (Parekh et al. 1977). Die Autoren berichten in dieser Arbeit von einem Enzymtest, in dem Dekan zu Deken mit NAD^+ als Elektronenakzeptor reagiert.

In einer Arbeit jüngeren Datums wurde ebenfalls die Oxidation eines Alkans zu einem Alken unter anoxischen Bedingungen aufgezeigt (Morikawa et al. 1996). Die Autoren führten den Nachweis von 1-Dodeken in einer Zellsuspension von *Pseudomonas anaerooleophila* HD1, die in Gegenwart von Tetradekan unter anoxischen Bedingungen inkubiert wurde, als Beweis für einen alternativen Stoffwechselweg der Alkanoxidation mit einem Alken als Intermediat an.

Bei einer genaueren Betrachtung der beschriebenen Experimente kommen jedoch Zweifel an einer Dehydrogenierung des Alkans zum Alken als initiale Reaktion auf. So stellte sich in einer späteren Arbeit heraus, daß der von Parekh verwendete *Pseudomonas* Stamm nicht in der Lage ist, anaerob mit Alkanen zu wachsen (Griffin und Traxler 1981). Darüber hinaus ist die von Parekh et al. (1977) beschriebene enzymkatalysierte Reaktion vom Alkan zum Alken im System mit aufgereinigten Proteinen energetisch schwer verständlich. Aufgrund der thermodynamischen Daten handelt es sich bei der Dehydrogenierung des Alkans mit NAD^+ als Elektronenakzeptor um eine endergone Reaktion (Aeckersberg 1994; McKenna und Kallis 1965), für deren Ablauf die Kopplung an eine energieliefernde Reaktion notwendig wäre. In dem Enzymtest mit gereinigten Proteinen wird diese notwendig erscheinende energieliefernde Kopplungsreaktion jedoch nicht erkennbar.

Auch die Beobachtungen in den Zellsuspensionen mit *Pseudomonas anaerooleophila* HD1 bedürfen einer kritischen Betrachtung. So wurde zum einen das anaerobe Wachstum des Stammes auf Alkanen nicht eindeutig bewiesen. Aus den Experimenten wird nicht ersichtlich, welche Substanz beim Wachstum mit Alkanen als terminaler Elektronenakzeptor fungiert. Das für das Zellwachstum von Stamm HD1 notwendige CO_2 diente nicht als Elektronenakzeptor, da in den Kulturen weder Methan noch Acetat nachgewiesen werden konnte (Morikawa und Imanaka 1993; Morikawa et al. 1996). Somit ist fraglich, inwieweit Stamm HD1 überhaupt zum anaeroben Wachstum auf Alkanen befähigt ist. Darüber hinaus erscheint der Nachweis des 1-Dodekens in anaeroben Zellsuspensionen von Stamm HD1 mit Tetradekan als Beweis für eine Alkanoxidation über ein Alken als Intermediat nicht verständlich. Eine Erklärung, warum es mit der Einführung einer terminalen Doppelbindung gleichzeitig zur Verkürzung des Alkans um zwei C-Atome kommt, wird nicht angeführt. Der Reaktionsmechanismus, der diese direkte Umsetzung des Tetradekans zu 1-Dodeken erklärt, wird nicht erkennbar.

Die Fähigkeit der kürzlich isolierten, zur anaeroben Oxidation von Alkanen befähigten Sulfatreduzierer Hxd3 und Pnd3 sowie des Denitrifizierers HdN1, mit 1-Alkenen zu wachsen, schien der Annahme eines Alkens als Intermediat der anaeroben Alkanoxidation

nicht zu widersprechen. Induktionsstudien in Zellsuspensionen von Stamm Hxd3 zeigten jedoch, daß zwei unterschiedliche Enzymsysteme zur Aktivierung eines Alkans bzw. eines Alkens vorliegen (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998). So erfolgte die Umsetzung des Alkens 1-Hexadeken in Suspensionen von mit Hexadekan gewachsenen Zellen mit deutlicher Verzögerung. In Suspensionen von auf Alkanen gewachsenen Zellen in Gegenwart eines Antibiotikums, das die Proteinsynthese hemmt, wurde das Alken überhaupt nicht umgesetzt. Auch Untersuchungen der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3 sprachen nicht für eine Dehydrogenierung als initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation. So wiesen Zellen von Stamm Hxd3 nach dem Wachstum auf Alkanen bzw. auf 1-Alkenen gleicher Kettenlänge unterschiedliche Zellfettsäuremuster auf (s. III.A.6., Tabelle 9).

Für den nitratreduzierenden Stamm OcN1 wurde bereits in Wachstumstests das 1-Alken als Intermediat der anaeroben Alkanoxidation ausgeschlossen (Ehrenreich 1996). Dieser Stamm wuchs nicht auf 1-Alkenen. Um sicherzustellen, daß das Wachstum nicht aufgrund einer toxischen Wirkung der Alkene auf die Zellen ausblieb, wurden die Alkene in Kombination mit von den Zellen verwertbarem Substrat zugesetzt. Dabei wurden gleichzeitig mit dem Alken sowohl wasserlösliche Substrate (Monocarbonsäuren) als auch schwer wasserlösliche Substrate (1-Decanol, Decanal) zugesetzt. Letztere waren wie das Alken in der Trägerphase (HMN) gelöst. Somit wurde berücksichtigt, daß sich ein möglicher toxischer Effekt des Alkens nur bei der Anheftung der Zellen an die Trägerphase oder in unmittelbarer Nähe zur Trägerphase bemerkbar machen könnte. Die Wachstumstests zeigten dann, daß in Gegenwart des Alkens ein Wachstum durch Nutzung des in der Trägerphase gelösten Alkohols oder Aldehyds möglich war. Hingegen wurde in den Ansätzen, in denen das Alken zusammen mit dem Alkan vorhanden war, kein Wachstum beobachtet. Damit wurde gezeigt, daß das Alken nicht grundsätzlich toxisch für den Stoffwechsel der Bakterien war, sondern spezifisch nur die anaerobe Alkanoxidation hemmte.

Ebenso wie Stamm OcN1 verhielt sich auch der Stamm HxN1 in Wachstumstests mit Alkenen. Stamm HxN1 war weder in der Lage, mit 1-Hexen noch mit den Isomeren dieses Alkens zu wachsen (s. III.A.3.6.). Wiederum konnte eine grundsätzliche Giftigkeit der Alkene für die Zellen ausgeschlossen werden und wiederum zeigte sich, daß 1-Hexen spezifisch die Hexanoxidation hemmte. Es läßt sich vermuten, daß 1-Hexen die Bindungsstelle des Alkan umsetzenden Enzyms blockiert, so daß die anaerobe Alkanoxidation spezifisch gehemmt ist.

Betrachtet man zusammenfassend die Unstimmigkeiten der genannten Veröffentlichungen und die Experimente mit den kürzlich isolierten, zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Stämmen, so läßt sich ein Alken als Intermediat der anaeroben Alkanoxidation nach derzeitigem Kenntnisstand ausschließen.

3.2. Addition einer Kohlenstoffeinheit als initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation

3.2.1. Carbonylierung als mögliche Aktivierungsreaktion von Alkanen

In frühen Arbeiten über aerobe alkanverwertende Mikroorganismen hatte das Auffinden von langkettigen Alkoholen und Fettsäuren in Zellen zur Aufklärung des Stoffwechselweges von Alkanen geführt. Bei den Analysen zeigte sich oft, daß die Art des verwerteten Alkans das Zellfettsäuremuster entscheidend beeinflusst (Souw et al. 1976, 1977; Rehm und Reiff 1981).

Mit einer Art der Hefe *Candida* wurde gezeigt, daß beim Wachstum mit langkettigen Alkanen die *de novo* Fettsäuresynthese gehemmt war und daß stattdessen die Kohlenwasserstoffe direkt als Vorläufer für die Zellfettsäuren dienten. Ein langkettiges Alkan wurde zur entsprechenden Fettsäure oxidiert und entweder direkt oder nach Verlängerung oder Verkürzung um C_2 -Einheiten in die Lipide eingebaut. Das Zellfettsäuremuster war somit beim Wachstum auf Kohlenwasserstoffen mit gerader Anzahl an C-Atomen vorwiegend durch geradkettige Fettsäuren und bei Wachstum auf Kohlenwasserstoffen mit ungerader Zahl an C-Atomen vorwiegend durch ungeradkettige Fettsäuren geprägt (Souw et al. 1976, 1977).

Basierend auf diesen Experimenten mit aeroben Organismen und mit der Erwartung, Hinweise auf den Mechanismus der anaeroben Alkanoxidation zu gewinnen, wurde eine Analyse der Zellfettsäuren des anaeroben sulfatreduzierenden Stammes Hxd3 nach dem Wachstum auf Alkanen, Alkenen und Monocarbonsäuren durchgeführt (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998). Ebenso wie bei den aeroben alkanverwertenden Organismen zeigte sich auch bei dem anaeroben, sulfatreduzierenden Stamm Hxd3 ein Einfluß des Wachstumssubstrats auf die Zusammensetzung der Zellfettsäuren (s. III.A.6., Tabelle 9), jedoch in einer anderen Weise als bei den aeroben Mikroorganismen. So wies Stamm Hxd3 nach dem Wachstum auf einem Alkan mit gerader C-Atomanzahl überwiegend Zellfettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen auf, während nach dem Wachstum auf einem Alkan mit ungerader C-Atomanzahl das Fettsäuremuster vorwiegend durch Fettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen geprägt war. Mit Fettsäuren oder 1-Alkenen als Substrat ließ sich keine Änderung der Art der Kettenlänge der Zellfettsäuren gegenüber dem Substrat beobachten. Weil auch Stamm Hxd3 Alkane wahrscheinlich als Vorläufer für die Zellfettsäuren nutzt, wurde angenommen, daß die Alkane im Stoffwechsel um eine C_1 -Einheit verändert wurden. Reaktionsmechanistisch ließe sich diese Veränderung der Kohlenstoffkette um eine C_1 -Einheit durch eine Carboxylierung oder eine Carbonylierung des Alkans erklären.

Eine Carboxylierung des Substrates, wie sie für den anaeroben Abbau von Phenol, *o*-Cresol, Ethylbenzol, Catechol, Anilin, Acetophenon und Aceton beschrieben ist (Tschech und Fuchs 1987; Roberts et al. 1990; Platen und Schink 1989; Platen et al. 1990; Schnell und Schink 1991; Rudolphi et al. 1991; Bisailon et al. 1991; Gallert et al. 1991; Gorny und Schink 1994; Janssen und Schink 1995a,b,c; Zengler 1996; Ball et al. 1996; Ensign et al. 1998; Champion et al. in Vorbereitung), ist jedoch als Aktivierungsreaktion im anaeroben Abbau der Alkane eher unwahrscheinlich. Während in den zuvor genannten Verbindungen die Bildung eines Carbanions aufgrund einer Mesomeriestabilisierung im aromatischen Ringsystem bzw. über die Keto-Enol-Tautomerie begünstigt wird, könnte ein aus einem Alkan gebildetes Carbanion nicht mesomeriestabilisiert werden. Ein nukleophiler Angriff des CO₂ ist daher schwer vorstellbar.

Die Annahme einer Aktivierung eines Alkans durch eine Carbonylierung (Aeckersberg 1994; Aeckersberg et al. 1998) wurde durch Veröffentlichungen zur Biosynthese von Alkanen angeregt. Kolattukudy und Mitarbeiter, die die Biosynthese von Alkanen in Pflanzen (Cheesbrough und Kolattukudy 1984; Dennis und Kolattukudy 1991, 1992), in Wirbeltieren (Cheesbrough und Kolattukudy 1988) und Insekten (Yoder et al. 1992) untersucht haben, postulierten einen Syntheseweg, in dem ein langkettiges Acyl-CoA zum Aldehyd reduziert und dieser anschließend zum Alkan unter Freisetzung von Kohlenmonoxid decarboxyliert wird. In der Alge *Botryococcus braunii* konnte sogar ein für die Decarboxylierung verantwortliches Enzym nachgewiesen werden (Dennis und Kolattukudy 1992). Die gereinigte Aldehyddecarboxylase enthielt ein an der Reaktion beteiligtes Kobalt-Porphyrin. Die Beteiligung weiterer Cofaktoren schien für die Umsetzung des Aldehyds zum Alkan nicht notwendig zu sein. In einer Arbeit jüngerer Datums wurde darüber hinaus in dem Kreuzblüter *Arabidopsis* anhand von Mutanten, die einen Defekt in der Biosynthese von Alkanen aufwiesen, ein an der Umsetzung langkettiger Aldehyde zu Alkanen beteiligtes Genprodukt CER1 und das dafür codierende Gen beschrieben (Aarts et al. 1995).

Hinweise, daß die Reaktion der Biosynthese vom Aldehyd zum Alkan möglicherweise reversibel ist, ergaben sich aus den Experimenten mit einer Aldehyddecarboxylase aus der Uropygialdrüse eines Schwarzhalstauchers (*Podiceps nigricollis*). So wurde hier eine Austauschreaktion zwischen ¹⁴CO und der Carbonylgruppe von Octadecanal beobachtet (Cheesbrough und Kolattukudy 1988).

Für eine Nettoumsetzung des Alkans zum Aldehyd durch eine Carbonylierung wäre jedoch die Zufuhr von Energie notwendig (Aeckersberg 1994).



Die Carbonylierung eines Alkans ist bereits als rein chemischer Prozeß unter milden Bedingungen bekannt. Sakakura und Tanaka (1987) beschrieben die Bildung von Hexanal durch Carbonylierung von Pentan in Gegenwart eines Rhodiumkomplexes mit freien Ligandenstellen unter Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe. Für diese Reaktion wird ein zyklischer Mechanismus angenommen, in dem zunächst durch die Addition von Pentan an den Metallkomplex ein Alkyl-Metallkomplex mit einem zusätzlich koordinierten Wasserstoffatom gebildet wird. Als nächster Schritt wird die Bindung eines CO-Moleküls an das Metallzentrum und die anschließende Übertragung der Alkylgruppe auf die CO-Gruppe unter Bildung einer Hexanoylgruppe angenommen. Die Hexanoylgruppe kann dann durch Verbindung mit dem Wasserstoffatom als *n*-Hexanal freigesetzt werden.

In Anlehnung an diesen chemischen Prozeß wäre auch für die initiale Aktivierung des Alkans in Mikroorganismen eine Carbonylierung an einem Metallzentrum vorstellbar. Eine solche Bildung einer Acylgruppe aus einem Alkan und Kohlenmonoxid ähnelt der Synthese der Acetylgruppe aus einer Methylgruppe und Kohlenmonoxid durch die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-Dehydrogenase). Die CO-Dehydrogenase ist in strikt anaeroben Bakterien (homoacetogene, methanogene und sulfatreduzierende Bakterien) das Schlüsselenzym der Synthese von Acetyl-CoA (Ragsdale 1991; Ferry 1995). Als Reaktionsmechanismus wird zunächst die Reduktion von CO₂ zu CO angenommen, wobei das CO an ein Metallatom gebunden ist. Eine von einem weiteren Protein (Methyltransferase) übertragene Methylgruppe wird ebenfalls an das Metallzentrum der CO-Dehydrogenase gebunden. In einer nachfolgenden Reaktion wird die Methylgruppe mit der CO-Gruppe unter Bildung der Acetylgruppe verknüpft. Diese wird anschließend von dem Metallzentrum der CO-Dehydrogenase als Acetyl-CoA abgespalten (Abb. 28).

Um weitere Hinweise auf eine Carbonylierung als mögliche initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation zu erhalten, wurde auch mit anderen zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Stämmen eine Analyse der Zellfettsäuren durchgeführt (Ehrenreich 1996). Sowohl bei dem denitrifizierenden Stamm HdN1 als auch bei dem sulfatreduzierenden Stamm Pnd3 wurde ein Einfluß des Wachstumssubstrates auf die Zellfettsäurezusammensetzung beobachtet. Jedoch bestätigten die Ergebnisse der Experimente mit diesen Stämmen nicht die mit Stamm Hxd3 erhaltenen. Beim Wachstum der Zellen sowohl auf Alkanen als auch auf Monocarbonsäuren war die Art der Kohlenstoffkette (geradzahlig bzw. ungeradzahlig) der Zellfettsäuren immer entsprechend derjenigen des Wachstumssubstrats (s. III.A.6., Tabelle 9). Die Ergebnisse sprachen nicht wie bei Stamm Hxd3 für eine terminale Änderung der Kohlenstoffkette um eine C₁-Einheit. Die Ergebnisse warfen somit die Frage auf, ob in diesen Stämmen vielleicht ein anderer Aktivierungsmechanismus als die für Stamm Hxd3 postulierte terminale Carbonylierung als initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation vorliegt. Da es sich aber bei den beiden

sulfatreduzierenden Stämmen Hxd3 und Pnd3 um phylogenetisch nahe verwandte Stämme handelt, ist es unwahrscheinlich, daß für die reaktionsmechanistisch anspruchsvolle anaerobe Alkanoxidation in nahe verwandten Stämmen zwei grundsätzlich verschiedene Aktivierungsmechanismen vorliegen. Daher wurde als Alternative eine mögliche Carbonylierung des subterminalen Kohlenstoffatoms des Alkans diskutiert (Aeckersberg 1994; Ehrenreich 1996; Aeckersberg et al. 1998). Die Addition der C_1 -Einheit an das C_2 -Atom des Alkans würde zu einer 2-Methylfettsäure im Fettsäurestoffwechsel führen (Abb. 29). Dabei würde infolge der Abspaltung von Propionyl-CoA bei der β -Oxidation die Art der Kohlenstoffkette (geradzahlig bzw. ungeradzahlig) der verkürzten Fettsäure entsprechend des Wachstumsstrahls erhalten bleiben (Abb. 29). Die Fettsäureanalyse der Stämme HdN1 und Pnd3 würde somit nicht grundsätzlich der postulierten Carbonylierung als initiale Aktivierungsreaktion widersprechen.

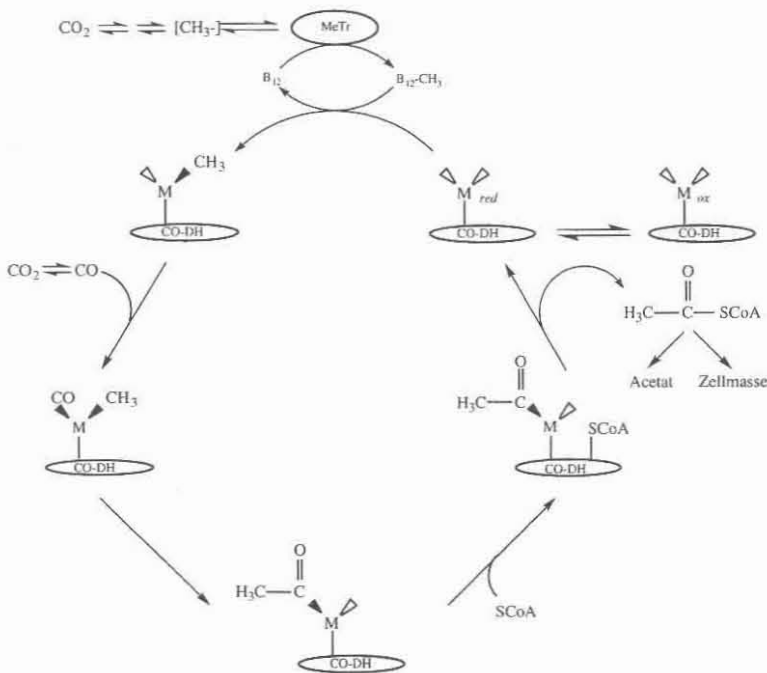


Abb. 28: Reaktionszyklus der CO-Dehydrogenase (CO-DH), (nach Ferry 1995). Der Zyklus ist auch umkehrbar. B_{12} , Coenzym B_{12} ; M, Metallzentrum; MeTr, Methyltransferase.

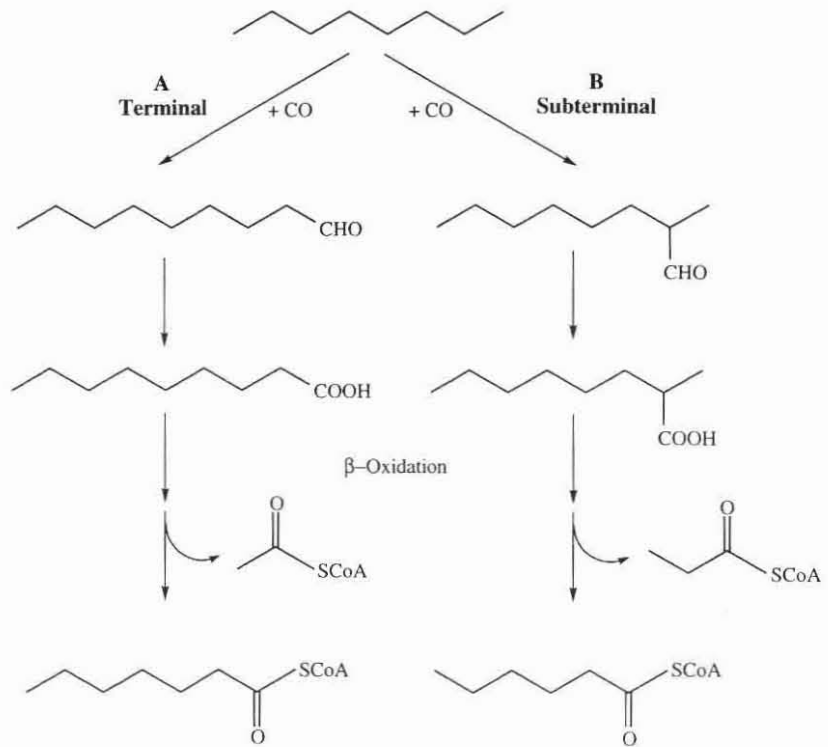


Abb. 29: Hypothetischer Weg der anaeroben Alkanoxidation mit einer Carbonylierung als initialer Aktivierungsreaktion. (A) Addition der C₁-Einheit an das terminale Kohlenstoffatom, (B) Addition der C₁-Einheit an das subterminale Kohlenstoffatom.

Die Analyse der Zellfettsäuren von Stamm HxN1 ergab keine neuen Hinweise auf die initiale Aktivierungsreaktion. Anders als bei den bislang untersuchten zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Stämmen, ließ sich beim Stamm HxN1 nach dem Wachstum der Zellen auf Alkanen und Monocarbonsäuren kein Einfluß des Wachstumssubstrats auf die Zellfettsäurezusammensetzung feststellen. Unabhängig von der Art der Kettenlänge des Wachstumssubstrats ergaben die Analysen mit diesem Stamm immer ein einheitliches Fettsäuremuster (s. III.A.6., Tabelle 8). Daher ist anzunehmen, daß Stamm HxN1, der lediglich zur Umsetzung kurzkettiger Alkane befähigt ist, die benötigten Zellfettsäuren *de novo* aus Acetyl-CoA synthetisiert und nicht die kurzkettigen Alkane als Vorläufer nutzt. Untersuchungen an der Hefe *Candida lipolytica*, die zur Umsetzung sowohl kurzkettiger als

auch langkettiger Alkane befähigt ist, unterstützen diese Annahme. Es wurde beobachtet, daß beim Wachstum der Hefe auf kürzerkettigen Alkanen wie Undekan oder Dodekan die Fettsäuren *de novo* synthetisiert wurden, hingegen beim Wachstum auf längerkettigen Alkanen (C₁₄-C₁₈) die Alkane als Vorläufer der Zellfettsäuren genutzt wurden (Britton 1984).

Während die Fettsäureanalyse von Stamm HxN1 somit ohne Aussagekraft für den Stoffwechselweg der anaeroben Alkanoxidation blieb, könnte ein Substrattest (s. III.A.3.6.) durchaus als positiver Hinweis auf die postulierte Carbonylierung eines subterminalen C-Atoms und die daraus folgende β -Oxidation einer 2-Methylsäure betrachtet werden. Der Substrattest zeigte nämlich, daß Zellen von Stamm HxN1, die zuvor auf Alkanen angezogen worden waren, sehr gut auf 2-Methylvalerat und 2-Methylhexanoat anwuchsen.

Ausgehend von den Überlegungen zu einer Carbonylierung von Alkanen wurde mit Zellextrakten von Stamm HxN1 ein Enzymtest zum Nachweis der CO-Dehydrogenase durchgeführt (s. III.A.10).

Anders als die Stämme Hxd3 und TD3, welche, wie viele andere sulfatreduzierende Bakterien, CO-Dehydrogenasen für die Oxidation von Acetyl-CoA benötigen, oxidiert Stamm HxN1 als denitrifizierender, fakultativ aerober Organismus Acetyl-CoA sehr wahrscheinlich über den Zitronensäurezyklus und sollte somit normalerweise keine CO-Dehydrogenase besitzen. Wäre eine Enzymaktivität zur Bereitstellung von CO zur Carbonylierung eines Alkanes vorhanden, so sollte diese nur in auf Alkanen gewachsenen Zellen nachweisbar sein. In Extrakten auf Hexan gewachsener Zellen von Stamm HxN1 war jedoch mit Methylviologen keine CO-Dehydrogenase nachweisbar (s. III.A.10.). Das negative Ergebnis läßt zwei Deutungen zu. Zum einen könnte ein Enzym, das eine Carbonylierung eines Alkans katalysiert mit dem üblichen Enzymtest zum Nachweis der CO-Dehydrogenase gar nicht nachweisbar sein. Zum anderen könnte eine andere Kohlenstoffverbindung als CO während der initialen Reaktion an das Alkan addiert werden.

3.2.2. Addition von Fumarat als mögliche Aktivierung von Alkanen

Ein alternativer anaerober Mechanismus der Aktivierung unpolare Substrate, der ebenfalls als möglicher Aktivierungsmechanismus für Alkane diskutiert werden muß, findet sich im anaeroben mikrobiellen Abbauweg des aromatischen Kohlenwasserstoffs Toluol. Der in den denitrifizierenden Bakterien *Thauera aromatica*, *Azoarcus* Stamm T, Stamm EbN1 sowie in dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfobacula toluolica* nachgewiesene Abbauweg des Toluols beginnt mit der Addition eines Moleküls Fumarat an das Substrat unter Bildung von Benzylsuccinat (Biegert et al. 1996; Beller und Spormann 1997a,b; Rabus und Heider 1998; Heider et al. 1999). Die Reaktion wird durch das Enzym Benzylsuccinat-Synthase (BSS) ohne Beteiligung von Co-Substraten katalysiert. Das gebildete Benzylsuccinat wird dann im

Verlauf einer modifizierten β -Oxidation zum zentralen Intermediat des anaeroben Aromaten-Stoffwechsels, Benzoyl-CoA, umgesetzt (Heider und Fuchs 1997; Heider et al. 1999).

Die biochemische und genetische Charakterisierung der Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* ergab, daß das Enzym aus drei verschiedenen Untereinheiten, α (98 kDa), β (8,5 kDa) und γ (6,4 kDa) besteht, wobei aufgrund des nativen Molekulargewichts des Enzyms (220 kDa) eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Zusammensetzung angenommen wird. Die für diese Untereinheiten codierenden Gene (*bssA*, *bssB*, *bssC*) befinden sich gemeinsam mit einem weiteren, nicht für eine Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase codierenden Gen (*bssD*) in einem Operon (Abb. 30) (Leuthner et al. 1998).

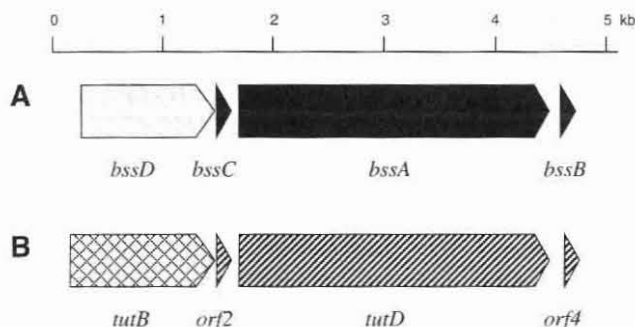


Abb. 30: Organisation der für die Benzylsuccinat-Synthase codierenden Gene aus *Thauera aromatica* (A) und der Gene aus einer *Thauera* Art, Stamm T1, die am anaeroben Toluolabbau beteiligt sind (B).

Eine Datenbanksuche der von den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte, daß die Untereinheit α aus der BSS aus *Thauera aromatica* eine starke Homologie zu bekannten Glycinradikal-Enzymen wie der Pyruvat-Formiat-Lyase und der anaeroben Ribonukleotidreduktase aufweist, insbesondere im Bereich der für den Enzymmechanismus wichtigen Aminosäuren Glycin und Cystein (Leuthner et al. 1998). Daher wurde auch für die Addition des Fumarats an Toluol ein radikalischer Reaktionsmechanismus angenommen (Abb. 31). Im hypothetischen Reaktionsmodell ermöglicht die radikalische, aktive Form des Enzyms die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Substrat. Das Substratradikal kann dann im weiteren die Doppelbindung des Fumarats unter Bildung des Produkttradikals angreifen. Im letzten Schritt der Reaktion erhält das Produkttradikal das zuvor an das Enzym gebundene Wasserstoffatom unter Bildung von Benzylsuccinat zurück (Abb. 31).

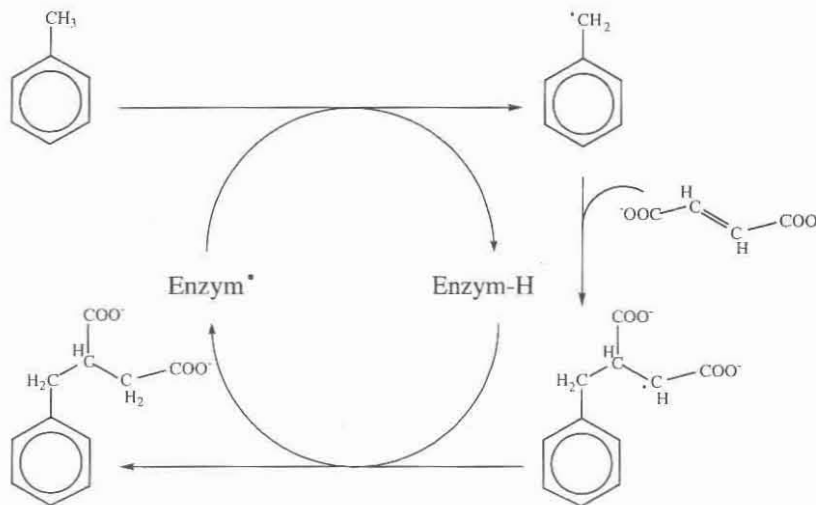


Abb. 31: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Benzylsuccinat-Synthase (nach Heider et al. 1999).

Ein erster Hinweis darauf, daß eine Fumarataddition als mögliche initiale Aktivierungsreaktion der anaeroben Alkanoxidation in Frage kommt, ergibt sich aufgrund der in mit Hexan gewachsenen Zellen von Stamm HxN1 zusätzlich gebildeten Proteine (A_{HxN1} - D_{HxN1} , III.A.8.1.). Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen dieser Proteine ermöglichte einen Vergleich mit Sequenzen in der Datenbank (BLAST). Die Datenbanksuche mit den Aminosäuresequenzen der Proteine A_{HxN1} - C_{HxN1} ergab gar keine bzw. keine nützlichen Hinweise. Hingegen zeigte sich beim N-Terminus des Proteins D_{HxN1} eine Homologie zur γ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* (Leuthner et al. 1998, Abb. 32) und zu einer Aminosäuresequenz, die von einem offenen Leserahmen (orf2) aus *Thauera* Stamm T1 abgeleitet wurde (Coschigano et al. 1998, Abb. 32).

Die Aminosäuresequenzen aus *Thauera aromatica* und *Thauera* Stamm T1 werden durch Gene codiert (*bssC* bzw. *orf2*), die sich jeweils zusammen mit drei weiteren Genen in einem Operon befinden (Abb. 30), dessen Genprodukte am ersten Schritt des Toluolabbaus beteiligt sind. Während die Aminosäuresequenz von *BssC* (57 Aminosäuren) vom Stamm *Thauera aromatica* eindeutig die γ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase darstellt, ist über die Funktion des Genprodukts von *orf2* aus *Thauera* Stamm T1 (60 Aminosäuren) nichts bekannt. Es ist jedoch nachgewiesen, daß dieses Protein ebenfalls im Toluolabbau involviert ist, für den auch in *Thauera* Stamm T1 aufgrund der Sequenz des Genproduktes

TutD ein radikalischer Mechanismus angenommen wird (Coschigano et al. 1998). Die Addition von Fumarat an Toluol durch die Benzylsuccinat-Synthase wurde bisher nur für *Thauera aromatica*, *Azoarcus* Stamm T, Stamm EbN1 und *Desulfobacula toluolica* eindeutig gezeigt (Biegert et al. 1996; Beller und Spormann 1997; Rabus und Heider 1998; Heider et al. 1999).

Protein D _{HxN1}	1	S	T	C	K	E	C	R	N	Y	F	P	I	N	E	E	A	16
		:				:				·				:				
γ -Untereinheit (BssC) der Benzylsuccinat-Synthase aus <i>Thauera aromatica</i>	2	T	T	C	K	D	C	A	F	F	F	S	I	P	E	D	A	17
Protein D _{HxN1}	1	S	T	C	K	E	C	R	N	Y	F	P	I	N	E	E	A	16
		:				·					·			:			:	
Aminosäuresequenz gemäß orf2 aus <i>Thauera</i> Stamm T1	4	T	T	C	K	Q	C	A	N	F	F	P	V	P	K	D	A	19

Abb. 32: Sequenzhomologien zwischen der N-terminalen Aminosäuresequenz des Proteins D_{HxN1} und Sequenzen der Datenbank BLAST. Zahlen geben die erste bzw. letzte der aufgeführten Aminosäurepositionen an. Zwischen den Aminosäuren sind Identitäten (|), hohe Ähnlichkeiten (:), geringe Ähnlichkeiten (·) und fehlende Ähnlichkeiten (Freiraum) angedeutet.

Auch die aus der SDS-PAGE abgeleiteten ähnlichen Molekularmassen des Proteins D_{HxN1} aus Stamm HxN1 (11 kDa) und der γ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* (10 kDa) sprechen neben den N-terminalen Homologien dafür, daß es sich um ähnliche Proteine handelt. Für das Protein aus *Thauera* Stamm T1 liegt keine durch SDS-PAGE ermittelte Molekularmasse vor; es läßt sich aber vermuten, daß die Molekularmasse des vom Gen abgeleiteten, aus 60 Aminosäuren bestehenden Proteins in derselben Größenordnung liegt.

Anhand dieser Befunde läßt sich die noch vage Vermutung aufstellen, daß das Protein D_{HxN1} in Stamm HxN1 einen Teil eines Enzymkomplexes darstellt, der ähnlich wie die Benzylsuccinat-Synthase im Toluolabbau die Addition von Fumarat an das Alkan katalysiert. Entsprechend dem Mechanismus eines Glycinradikalenzym könnte ein ähnlich arbeitendes Enzym die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom reaktionsträgen Alkan am terminalen C-Atom ermöglichen. In einem weiteren Schritt wäre dann ein Angriff des gebildeten Alkylradikals an ein Fumaratmolekül denkbar. Auf einem modifizierten Weg der β -Oxidation

könnte das gebildete Additionsprodukt Acylsuccinat zu einem Acyl-CoA und Succinyl-CoA umgesetzt werden und damit den Eintritt in den Fettsäurestoffwechsel finden (Abb. 33). In der Hypothese ist allerdings zu berücksichtigen, daß ein intermediäres Alkylradikal nicht wie aromatische Moleküle durch Elektronendelokalisierung stabilisiert werden kann.

Bei der Annahme einer Addition von Fumarat an das Alkan müssen jedoch auch die bisherigen Ergebnisse der Fettsäureanalysen der zur anaeroben Alkanoxidation befähigten Bakterien Berücksichtigung finden. Während die Fettsäureanalyse mit Stamm HxN1 keine Hinweise auf den anaeroben Alkanstoffwechsel lieferte, zeigte sich in Stamm Hxd3, daß sich die Kohlenstoffketten im Alkan und in den Zellfettsäuren (geradzahlig gegenüber ungeradzahlig) voneinander unterscheiden (s. III.A.6., Tabelle 9). Möchte man diese Befunde mit einer Aktivierung eines Alkans durch Addition von Fumarat in Einklang bringen, so wäre eine Addition an das subterminale Kohlenstoffatom der Alkankette anzunehmen (Abb. 34). Die Addition von Fumarat an das subterminale Kohlenstoffatom würde dieses C-Atom zu einem tertiären C-Atom werden lassen. Der Weg der β -Oxidation über einen Alkohol mit anschließender thiolytischer Spaltung, wie bei der Addition von Fumarat an das terminale C-Atom, wäre dann nicht möglich. In diesem Fall müßte bereits die gebildete Hydroxyverbindung zu einem Keton und Succinat gespalten werden, ähnlich wie in einer Aldolspaltung. Im weiteren müßte die Carboxylierung des Ketons zu einer β -Ketosäure postuliert werden.

Die Ergebnisse der Fettsäureanalysen mit den Stämmen Pnd3 und HdN1 würden hingegen die Annahme einer Addition des Fumarats an das terminale C-Atom unterstützen (Abb. 33). Bei diesen Stämmen zeigte sich eine Abhängigkeit des Fettsäuremusters vom Wachstumssubstrat, jedoch unter Erhalt der Art der Kettenlänge im Vergleich zum Substrat (s. III.A.6., Tabelle 9).

Um die Vermutungen einer Fumarataddition als initiale Aktivierungsreaktion der anaeroben Alkanoxidation zu stützen, sind in der Zukunft sowohl biochemische als auch molekularbiologische Experimente notwendig.

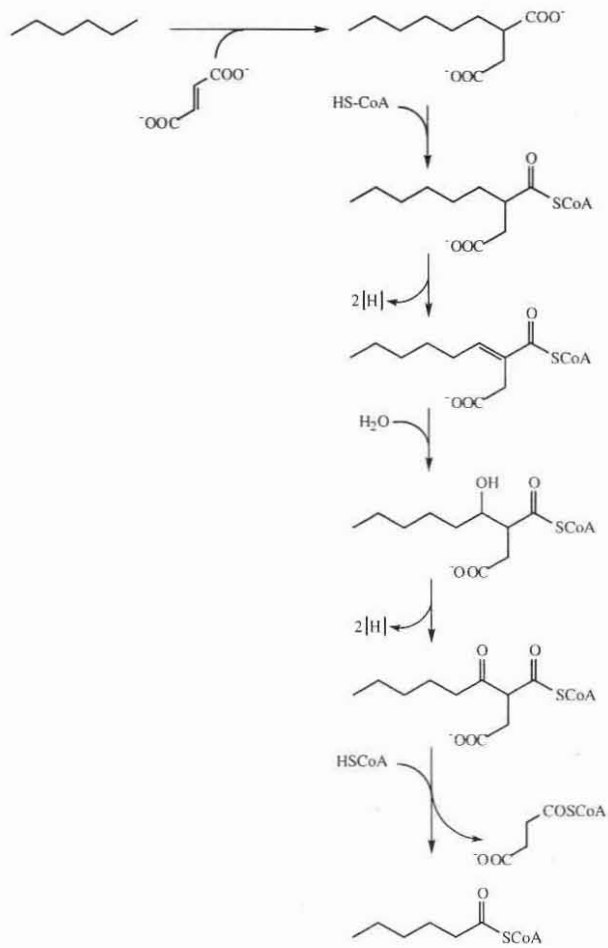


Abb. 33: Hypothetischer Weg einer anaeroben Alkanaktivierung durch Addition von Fumarat an das terminale Kohlenstoffatom, in Analogie zur Aktivierung von Toluol (Biegert et al. 1996; Heider et al. 1999, s. Abb. 31)

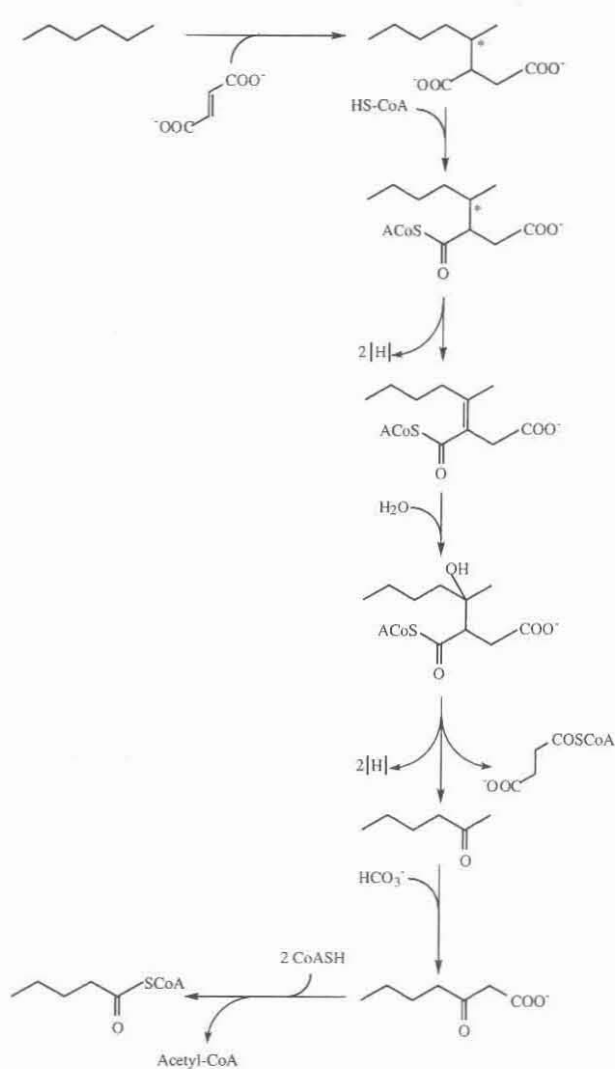


Abb. 34: Hypothetischer Weg einer anaeroben Alkanaktivierung durch Addition von Fumarat an das subterminale Kohlenstoffatom, in Analogie zur Aktivierung von Toluol (Biegert et al. 1996; Heider et al. 1999, s. Abb. 31). * Tertiäres C-Atom.

3.2.3. Biochemische Betrachtungen zur homolytischen Spaltung der C-H-Bindung

Für den hypothetischen Weg der Knüpfung einer neuen C-C-Bindung als initiale Reaktion der anaeroben Alkanoxidation, entweder durch eine Carbonylierungsreaktion oder eine Additionsreaktion von Fumarat an das Alkan, ist als erster Schritt die Spaltung einer unpolaren, nicht aktivierten C-H-Bindung erforderlich.

Im aeroben Alkanabbau erfolgt eine homolytische Spaltung der C-H-Bindung in der Monoxygenasereaktion mittels eines Sauerstoffatoms an einem Protein-Metall-Komplex (Bühler und Schindler 1984; Shilov 1997).

In Abwesenheit von Sauerstoff werden homolytische Spaltungen von C-H-Bindungen durch Enzyme häufig unter Beteiligung von Coenzym B₁₂ oder S-Adenosylmethionin ermöglicht. Die Cofaktoren bewirken die zielgerichtete, durch das Protein gesteuerte Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom umzusetzenden Substrat oder von radikalisch wirksamen Enzymen selbst (Roth et al. 1996; Kräutler 1998; Frey et al. 1998).

Die Enzymaktivierung in der Familie der Glycinradikal-Enzyme (Pyruvat-Formiat-Lyase, anaerobe Ribonukleotidreduktase), der auch die Benzylsuccinat-Synthase zugeordnet wird, erfolgt nach heutigen Kenntnissen unter Beteiligung von S-Adenosylmethionin. Spezifische Aktivasen bewirken unter Beteiligung des Cofaktors die Abspaltung eines Wasserstoffatoms von einem Glycinrest des Enzyms und überführen dieses damit in seine aktivierte Form. Dieses erzeugt dann ein Radikal am Substrat, worauf dieses dann zum Produkt reagiert (Frey et al. 1994; Knappe und Sawers 1990; Leuthner et al. 1998).

Enzyme, die ein Wasserstoffatom unter Beteiligung von Coenzym B₁₂ oder S-Adenosylmethionin abstrahieren, wurden bisher nur in solchen Reaktionen eingehend untersucht, bei denen nach der Abspaltung des Wasserstoffatoms vom Substrat eine Mesomeriestabilisierung möglich ist (Frey et al. 1990; Dowd 1990). Bei Alkanen wäre jedoch die Mesomeriestabilisierung eines Radikals nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms nicht möglich.

Dennoch lassen sich in Mikroorganismen Beispiele dafür finden, daß nicht aktivierte C-H-Bindungen anaerob gespalten werden können. Untersuchungen der Lipidsynthese im Archaeobakterium (Archaeon) *Methanobacterium thermoautotrophicum* ergaben, daß bei der Synthese des charakteristischen Tetraetherlipids Caldechol zwei Archaeoleinheiten an einem Kohlenstoffatom der gesättigten Isoprenoid-Kette fusionieren. Der Fusion muß die Abstraktion eines H-Atoms an jeder Kette vorausgehen (Galliker et al. 1998). Ein vergleichbarer Mechanismus der Dimerisierung unpolarer Kohlenstoffketten wird bei der Lipidsynthese in dem anaeroben Eubakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* angenommen. In dem Organismus wurde die Synthese von Diabolinsäure, einer Komponente vieler komplexer Lipide, durch die Kopplung zweier Palmitinsäureeinheiten beobachtet

(Hazlewood et al. 1980). In Markierungsexperimenten mit Deuterium an der endständigen Methylgruppe bzw. den davor liegenden Methylengruppen der Palmitinsäure konnte gezeigt werden, daß sich die Aktivierungs- und Kopplungsreaktion nur an der (ω -1)-Position vollzieht (Fitz und Arigoni 1992; Galliker et al. 1998).

Galliker und Mitarbeiter (1998) schlagen für diese Kopplungsreaktionen nicht-aktivierter Methylengruppen einen radikalischen Mechanismus unter Beteiligung von Coenzym B₁₂ vor (Abb. 35). Wie bei den bekannten Umlagerungsreaktionen unter Beteiligung von Coenzym B₁₂ (Roth et al. 1996) werden eine Homolyse der Co-C-Bindung im Coenzym und eine dadurch bewirkte Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Substrat angenommen. Die Autoren postulieren im weiteren Reaktionsverlauf eine Stabilisierung des Substratradikals durch die Bindung an das Kobaltzentrum des Cobalamin. Ein zweites Palmitinsäuremolekül mit einem Radikal in der (ω -1)-Position könnte dann das Alkylcobalamin angreifen und so zu der ungewöhnlichen C-C-Kopplung führen.

Unterstützt wird dieser hypothetische Reaktionsweg durch die von Kräutler und Mitarbeitern durchgeführten chemischen Syntheseexperimente von Cyclopentan (Kräutler et al. 1995). Durch die Thermolyse und Photolyse eines Biscobalaminderivates, in dem die zwei Metallzentren durch fünf Methylengruppen miteinander verbunden sind, gelingt die Ringschließung und damit die Synthese von Cyclopentan.

Der hohe Gehalt an Corrinoiden sowohl in *Methanobacterium thermoautotrophicum* als auch in *Butyrivibrio fibrisolvens* steht ebenfalls in Einklang mit dem postulierten Reaktionsmodell (Galliker et al. 1998).

Ein derzeit ungeklärter Punkt bei der Annahme des von Galliker und Mitarbeitern beschriebenen Reaktionsmechanismus in der Lipidsynthese wäre das Schicksal des Cobalamins nach der Reaktion, denn es findet, anders als in den Umlagerungsreaktionen, im vorgeschlagenen Reaktionsablauf keine Wiederherstellung der nicht-radikalischen Form des Cofaktors statt.

Es ist durchaus denkbar, daß die initiale Aktivierungsreaktion der anaeroben Oxidation von Alkanen ähnlich wie bei dem von Galliker und Mitarbeitern vorgeschlagenen radikalischen Mechanismus abläuft. Bei der Beteiligung von Coenzym B₁₂ könnte nach der Homolyse von dessen Co-C-Bindung ein Wasserstoffatom vom Alkan abgespalten und das Alkylradikal durch Bindung an das Kobaltzentrum stabilisiert werden. Der stabilisierte Alkylrest müßte für einen Reaktionspartner (CO, Fumarat oder andere Verbindungen) angreifbar bleiben, so daß die angenommene Knüpfung der neuen C-C-Bindung zustande kommt.

Der hypothetische Reaktionsmechanismus mit Beteiligung von Coenzym B₁₂ erfordert in den Zellen beim Wachstum auf Alkanen möglicherweise höhere Konzentrationen dieses Cofaktors als beim Wachstum auf polaren Substraten. Untersuchungen der zur anaeroben

Alkanoxidation befähigten Mikroorganismen auf ihren Corrinoidgehalt wären daher zur ersten Stützung der Theorie sinnvoll.

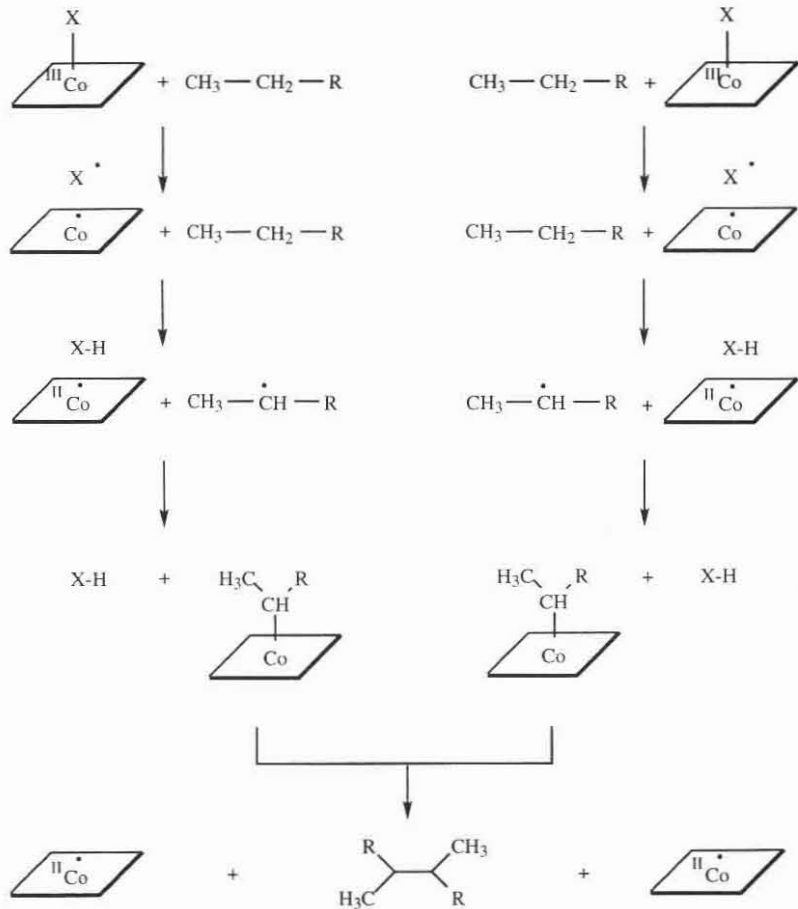


Abb. 35: Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur anaeroben Kopplung von Alkylketten unter Beteiligung von Coenzym B₁₂ (nach Galliker et al. 1998).

V. Zusammenfassung

1. Mit Hexan als einzigem organischem Substrat wurde unter anoxischen Bedingungen aus Süßwasserschlamm eine stabile Anreicherung nitratreduzierender Mikroorganismen erhalten. Aus dieser Anreicherungskultur wurde der mesophile, nitratreduzierende Stamm HxN1 isoliert. Stamm HxN1 wuchs unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff in Gegenwart von Nitrat als Elektronenakzeptor mit kurzkettigen Alkanen der Kettenlänge C₆-C₈. Eine Bilanzierung der Hexanverwertung unter strikt anoxischen Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor zeigte eine vollständige Oxidation von Hexan zu CO₂. Während des Wachstums mit Hexan und Nitrat wurde Nitrit als Intermediat der Nitratreduktion im Medium nachgewiesen.
2. Die 16S rRNA-Sequenzanalyse ergab eine Zugehörigkeit des Stammes HxN1 zum *Azoarcus-Thauera*-Cluster innerhalb der β -Gruppe der Proteobakterien. Diese Einordnung wurde durch eine Analyse des G+C-Gehaltes (66,3 mol %) und der Zellfettsäuren unterstützt. Mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierung konnte Stamm HxN1 deutlich von dem phylogenetisch sehr nahe verwandten Alkylbenzol-abbauenden, denitrifizierenden Stamm PbN1 unterschieden werden; letzterer verwertete keine Alkane. Für Stamm HxN1 wird die neue Art *Azoarcus hydrocarbonis* vorgeschlagen.
3. Stamm HxN1 verwertete unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von Nitrat neben *n*-Alkanen der Kettenlänge C₆-C₈ kurzkettige Alkohole, Aldehyde, Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Fructose. Als einziges aromatisches Substrat wurde Benzoesäure genutzt. Andere aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen sowie Alkene dienten nicht als Substrate. 1-Alkene verursachten darüber hinaus eine spezifische Hemmung der anaeroben Alkanumsetzung.
4. Stamm HxN1 war in der Lage, auch unter oxischen Bedingungen kurzkettige Alkane und Monocarbonsäuren zu verwerten. Das beobachtete Wachstum erfolgte jedoch deutlich verzögert und langsamer als anaerob mit Nitrat.
5. Im Gegensatz zu den bisher bekannten, zur anaeroben Alkanverwertung befähigten Stämmen OcN1 und HdN1 hefteten sich Zellen von Stamm HxN1 während des Wachstums auf wasserunlöslichen Substraten wie Alkanen nicht an die organische Phase. Vielmehr zeichnete sich der Stamm HxN1 auf allen Substraten einschließlich der Alkane durch ein homogenes Wachstum im Medium aus. Dies ermöglichte eine Messung des Wachstums anhand der optischen Dichte und eine Gewinnung von Zellen ohne anheftende Alkantröpfchen.

6. Stamm HxN1 war in der Lage, *n*-Alkane aus Erdöl unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von Nitrat zu oxidieren. Eine gaschromatographische Analyse nach dem Wachstum ergab, daß Stamm HxN1 die kurzkettigen *n*-Alkane (C₆-C₈) verwendete.
7. Eine Analyse der Zellfettsäuren von Stamm HxN1 ergab, daß das Fettsäureprofil unabhängig vom Substrat (Alkane bzw. Monocarbonsäuren mit gerader oder ungerader C-Atomzahl) in jedem Fall durch Fettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen geprägt war; diese wurden somit wahrscheinlich *de novo* aus Acetyl-CoA und nicht direkt aus länger-kettigen Intermediärprodukten des Alkanstoffwechsels gebildet.
8. Induktionsstudien mit Zellsuspensionen des Stammes HxN1 ließen darauf schließen, daß die Fähigkeit zur anaeroben Verwertung von *n*-Alkanen nicht konstitutiv vorliegt. Vielmehr muß das für eine anaerobe Alkanoxidation benötigte Enzymsystem zunächst induziert werden. Darüber hinaus war für die Verwertung von primären Alkoholen die Bildung eines weiteren, nicht konstitutiven Enzymsystems in Induktionsstudien erkennbar. Der primäre Alkohol stellt somit kein Intermediat der anaeroben Alkanoxidation dar.
9. Bei einem Vergleich der Gesamtzellproteine von Stamm HxN1 mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese nach dem Wachstum auf Hexan und auf Capronat wurden in den mit dem Alkan gewachsenen Zellen vier zusätzliche Proteine (A_{HxN1}-D_{HxN1}) nachgewiesen. Ähnliches zeigte die Analyse der Gesamtzellproteine des denitrifizierenden Stammes OcN1 nach dem Wachstum auf Oktan und auf Caprylat. In Stamm OcN1 wurden drei zusätzliche Proteine in den mit dem Alkan gewachsenen Zellen nachgewiesen (A_{OcN1}-C_{OcN1}).
10. Von den Proteinen (A_{HxN1}-D_{HxN1}), die in Stamm HxN1 nur beim Wachstum auf Hexan nachgewiesen wurden, wurden die N-terminalen Aminosäuresequenzen ermittelt. Eine Suche in der Datenbank ergab für die Proteine A_{HxN1}-C_{HxN1} keine Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen. Für das Protein D_{HxN1} zeigte sich eine N-terminale Homologie zu zwei Aminosäuresequenzen von Proteinen, die am anaeroben Abbau von Toluol beteiligt sind.
11. Unter strikt anoxischen Bedingungen wurde mit Cyclohexan als einzigem organischen Substrat aus Süßwasserschlamm eine Anreicherungskultur nitratreduzierender Mikroorganismen erhalten. Eine Bilanzierung des Cyclohexanabbaus mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor zeigte eine vollständige mikrobielle Oxidation des Cyclohexans zu CO₂ bei gleichzeitiger Nitratreduktion zu N₂. Dies ist der erste Nachweis für eine anaerobe Cycloalkanoxidation durch Mikroorganismen.

VI. Literatur

- Aarts M. G. M., C. J. Keijzer, W. J. Stiekema und A. Pereira** (1995) Molecular characterization of the *cer1* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell* 7: 2115-2127
- Ackman R. G.** (1989) Marine biogenic lipids, fats, and oils. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 4-78
- Aeckersberg F.** (1994) Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen
- Aeckersberg F., F. Bak und F. Widdel** (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 5-14
- Aeckersberg F., F. A. Rainey und F. Widdel** (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
- Anders H. J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig und G. Fuchs** (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 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 L.** (1991) Two-dimensional electrophoresis. 2. Edition, Large Scale Biology Press, Rockville
- Anderson M. S., R. A. Hall und M. Griffin** (1980) Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: cyclohexane catabolism by a pure strain of *Pseudomonas* sp. *J. Gen. Microbiol.* 120: 89-94
- Ball H. A., Johnson H. A., Reinhard M. und A. M. Spormann** (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* 178: 5755-5761
- Baudry D., M. Ephritikhine, H. Felkin und R. Holmes-Smith** (1983) The selective catalytic conversion of cycloalkanes into cycloalkenes using a soluble rhenium polyhydride system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pp. 788-789
- Beam H. W. und J. J. Perry** (1974) Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commensalism. *J. Gen. Microbiol.* 82: 163-169

- Beller H. R. und A. M. Spormann** (1997a) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. J. Bacteriol. 179: 670-676
- Beller H. R. und A. M. Spormann** (1997b) Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3729-3731
- Biegert T., G. Fuchs und J. Heider** (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
- Bissailon J.-G., F. Lepine, R. Beaudet und M. Sylvestre** (1991) Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2131-2134
- Brassel S. C., G. Eglinton, J. R. Maxwell und R. P. Philip** (1978) Natural background of alkanes in the aquatic environment. In: O. Hutzinger (ed.) Aquatic pollutants: Transformation and biological effects, Pergamon Press, Frankfurt, pp. 69-86
- Boltz D. F. und M. J. Taras** (1978) Nitrogen. In: Boltz D. F. und J. A. Howell (ed.), Colorimetric Determination of Nonmetals, 2nd ed, Wiley, New York, pp. 197-251
- Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
- Britton L. N.** (1984) Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: T. D. Gibson (ed.), Microbial degradation of organic compounds, Marcel Dekker, New York, pp. 98-129
- Bryant M. P.** (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1324-1328
- Bühler M. und J. Schindler** (1984) Aliphatic hydrocarbons. In: K. Kieslich (ed.), Biotechnology, Band 6a, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 329-385
- Caldwell M. E., R. M. Garrett, R. C. Prince und J. M. Suflita** (1998) Anaerobic biodegradation of long-chain *n*-alkanes und sulfate-reducing conditions. Environ. Sci. Techn. 32: 2191-2195
- Cashion P., M. A. Holder-Franklin, J. McCully und M. Franklin** (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. Anal. Biochem. 81: 461-466

- Champion K. M., K. Zengler und R. Rabus** (1999) Anaerobic degradation of ethylbenzene and toluene in denitrifying strain EbN1 proceeds via independent substrate-induced pathways, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (eingereicht)
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy** (1984) Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehyds catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6613-6617
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy** (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
- Chouteau J., E. Azoulay und J. C. Senez** (1962) Anaerobic formation of *n*-hept-1-ene from *n*-heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature* 194: 576-578
- Christen H. R.** (1985) Grundlagen der organischen Chemie. Salle und Sauerländer, Frankfurt
- Coates J. D., J. Woodward, J. Allen, P. Philp und D. R. Lovley** (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3589-3593
- Coschigano P. W., T. S. Wehrman und L.Y. Young** (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1650-1656
- Davis J. B. und H. F. Yarbrough** (1966) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Chem. Geol.* 1: 137-144
- Dean J. A.** (1992) Lange's handbook of chemistry, 14 ed McGraw-Hill, Inc., New York
- Delaune R. D. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott und K. M. Jones** (1980) Degradation of hydrocarbons in oxidized and reduced sediments. *Mar. poll. Bull.* 11: 103-106
- DeLey J., H. Cattoir und A. Reynaerts** (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 133-142
- Dennis M. W. und P. E. Kolattukudy** (1991) Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehyde catalyzed by a microsomal preparation from *Botryococcus braunii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 287: 268-275
- Dennis M. und P. E. Kolattukudy** (1992) A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5306-5310

- DeSoete G.** (1983) At least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data. *Psychometrika* 48: 621-626
- Dowd P.** (1990) On the mechanism of action of vitamin B₁₂. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebman (ed.), *Selective hydrocarbon activation: principles and progress*, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 15-36
- Eastcott L., W. Y. Shiu und D. Mackay** (1988) Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: a review of data and development of simple correlations. *Oil Chem. Pollut.* 4: 191-216
- Ehrenreich** (1996) Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf *n*-Alkanen und Erdöl. Dissertation. Universität Bremen.
- Ensign S. A., Small F. J. und J. R. Allen** (1998) New roles for CO₂ in the microbial metabolism of aliphatic epoxides and ketones. *Arch. Microbiol.* 169: 179-187
- Escara J. F. und J. R. Hutton** (1980) Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: acceleration of renaturation rate. *Biopolymers* 19: 1315-1327
- Ferry G. F.** (1995) CO Dehydrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 305-333
- Fitz W. und D. Arigoni** (1992) Biosynthesis of 15,16-Dimethyltriacontanedioic acid (diabolic acid) from [16-²H₃] and [14-²H₃]-palmitic acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1533-1534
- Foß S. und J. Harder** (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol, and eucalyptol) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* 21: 365-373
- Fox G. E., J. D. Wisotzkey and P. Jurtshuk** (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166-170
- Frey M., M. Rothe, A. F. V. Wagner und J. Knappe** (1994) Adenosylmethionine-dependent synthesis of glycyl radical in pyruvate formate lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. *J. Biol. Chem.* 269: 12432-12437
- Frey P. A.** (1990) Importance of organic radicals in enzymatic cleavage of unactivated C-H bonds. *Chem. Rev.* 90: 1343-1357
- Frey P. A., G. H. Reed, M. D. Ballinger, K. W. Lieder, W. Wu, C. H. Chang, V. Bandarian, F. J. Ruzicka, R. LoBrutto und H. Beinert** (1998) The role of S-adenosylmethionine as a poor man's adenosylcobalamin in the reaction of

- lysine 2,3-aminomutase. In: B. Kräutler, D. Arigoni und B. T. Golding (ed.), Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 435-446
- Gallert C., G. Knoll und J. Winter** (1991) Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 124-129
- Galliker P., O. Gräther, M. Rümmler, W. Fitz und D. Arigoni** (1998) New structural and biosynthetic aspects of the unusual core lipids from Archaeobacteria. In: B. Kräutler, D. Arigoni und B. T. Golding (ed.), Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 447-458
- Gallus C., N. Gorny, W. Ludwig und B. Schink** (1997) Anaerobic degradation of α -resorcyolate by a nitrate-reducing bacterium, *Thauera aromatica* strain AR-I. *System. Appl. Microbiol.* 20: 540-544
- Giger W., C. Schaffner und S. G. Wakeham** (1980) Aliphatic and olefinic hydrocarbons in recent sediments of Greifensee, Switzerland. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44: 119-129
- Gilewicz P., G. Monpert, A. Acquaviva, G. Mille und J.-C. Bertrand** (1991) Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 252-256
- Golding B. T., R. J. Anderson, S. Ashwell, C. H. Edwards, I. Garnett, F. Kroll und W. Buckel** (1998) A mechanistic overview of B₁₂ dependent processes. In: B. Kräutler, D. Arigoni und B. T. Golding (ed.), Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 201-216
- Goodfellow M., G. P. Manfio und J. Chun** (1997) Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: M. F. Claridge, H. A. Dawah and M. R. Wilson (ed.), *Species: The units of biodiversity*. Chapman & Hall, pp. 25-59
- Gorny N. und B. Schink** (1994) Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3396-3400
- Griffin W. M. und R. W. Traxler** (1981) Some aspects of hydrocarbon metabolism by *Pseudomonas*. *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 425-434
- Hambrick G. A., R. D. Delaune und W. H. Patrick** (1980) Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 365-369

- Hanert H. H.** (1981) The genus *Gallionella*. In: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. Springer Verlag, Berlin, pp. 509-515
- Harder J.** (1997) Anaerobic degradation of cyclohexane-1,2-diol by a new *Azoarcus* species. Arch. Microbiol. 168: 199-204
- Harms G., R. Rabus und F. Widdel** (1998) Anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon, *p*-isopropyltoluene (*p*-cymene) by two new types of denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. (zum Druck eingereicht)
- Hazlewood G. P., N. G. Clarke und R. M. C. Dawson** (1980) Complex lipids of a lipolytic and general-fatty-acid-requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen. Biochem. J. 191: 555-560
- Heider J. und G. Fuchs** (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. Eur. J. Biochem. 243: 577-596
- Heider J., A. M. Spormann, H. R. Beller und F. Widdel** (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 22: 459-473
- Hermann M., K. M. Noll und R. S. Wolfe** (1986) Improved agar bottle plate for isolation of methanogens or other anaerobes in a defined gas atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1124-1126
- Hess A., P. Höhner, D. Hunkeler und J. Zeyer** (1996) Bioremediation of diesel fuel contaminated aquifer: Simulation studies in laboratory aquifer column. J. contam. Hydrol. 23: 329-345
- Hess A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stax, P. Höhener und J. Zeyer** (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
- Hill C. L.** (1989) Activation and functionalization of alkanes. John Wiley & Sons, New York
- Hunkapiller M. W., R. M. Hewiek, W. J. Dreyer und L. E. Hood** (1983) High sensitivity sequencing with a gas phase sequenator. Meth. Enzymol. 91: 399-413
- Huss V. A. R., H. Festl und K. H. Schleifer** (1983) Studies on the spectrometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. J. Syst. Appl. Microbiol. 4: 184-192
- Iizuka H., M. Iida und S. Fujita** (1969) Formation of *n*-decene-1 from *n*-decane by resting cells of *Candida rugosa*. Z. Allg. Mikrobiol. 8: 145-149

- Jahnke K.-D.** (1992) Basic computer program for evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD System 2600 spectrometer on a PC/XT/AT type personal computer. *J. Microbiol. Methods* 15: 61-73
- Janssen P. H. und B. Schink** (1995a) $^{14}\text{CO}_2$ exchange with acetoacetate catalyzed by dialyzed cell-free extracts of the bacterial strain BunN grown with acetone and nitrate. *Eur. J. Biochem.* 228: 677-682
- Janssen P. H. und B. Schink** (1995b) Catabolic and anabolic enzyme activities and energetics of acetone metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus biacutus*. *J. Bacteriol.* 177: 277-282
- Janssen P. H. und B. Schink** (1995c) Metabolic pathways and energetics of the acetone-oxidizing, sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium cetonicum*. *Arch. Microbiol.* 163: 188-194
- Jones J. G. und M. A. Edington** (1968) An ecological survey of hydrocarbon oxidising microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 52: 381-390
- Jukes T. H. und C. R. Cantor** (1969) Evolution of protein molecules. In: H. N. Munru (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, pp. 21-132
- de Klerk H. und A. C. van der Linden** (1974) Bacterial degradation of cyclohexane. Participation of co-oxidation reaction. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 40: 7-15
- Knappe J. und G. Sawers** (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 383-398
- Kolattukudy P. E.** (1976) *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam
- Komagata K., T. Nakase und N. Katsuya** (1964) Assimilation of hydrocarbons by yeast. I. Preliminary screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10: 313-319
- Kräutler B., T. Dérer, P. Liu, W. Mühlecker, M. Puchberger, K. Gruber und C. Kratky** (1995) Oligomethylene-bridged vitamin B₁₂ dimers. *Angew. Chem.* 34: 84-84
- Kräutler B.** (1998) B₁₂ coenzymes, the central theme. In: B. Kräutler, D. Arigoni und B. T. Golding (ed.), *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 3-43
- Leuthner B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Hörth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schrägger und J. Heider** (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

Lottspeich F., T. Houthhaeve und R. Kellner (1994) The Edman Degradation. In : R. Kellner, F. Lottspeich und H. E. Meyer (ed.), *Microcharacterization of proteins*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 117-130

Macy J. M., S. Rech, G. Auling, M. Dorsch und E. Stackebrandt (1993) *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *Int. Syst. Microbiol.* 43: 135-142

Maidak B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy und C. R. Woese (1994) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22: 3485-3487

Matsudaira P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038

McKenna E. J. und R. E. Kallio (1965) The biology of hydrocarbons. *Ann. Rev. Microbiol.* 19: 183-208

Mesbah M., U. Premachandran und W. Whitman (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 159-167

Monpert G. (1996) Relation between denitrification and biodegradation of *n*-heptadecane in a marine bacterium. *Life sci.* 319: 805-809

Morgan P. und R. J. Watkinson (1994) Biodegradation of components of petroleum. In: C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Niederlande, pp. 1-31

Morikawa M. und T. Imanaka (1993) Isolation of a new mixotrophic bacterium which can fix CO₂ and assimilate aliphatic and aromatic hydrocarbons anaerobically. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 280-283

Morikawa M., M. Kanemoto und T. Imanaka (1996) Biological oxidation of alkane to alkene under anaerobic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 309-311

Morrison S. J., T. G. Tornabene und W. E. Kloos (1971) Neutral lipids in the study of relationship of members of the family *Micrococcaceae*. *J. Bacteriol.* 108: 353-358

Mpuru S., J. R. Reed, R. C. Reitz und G. J. Blomquist (1996) Mechanism of hydrocarbon biosynthesis from aldehyd in selected insect species: requirement for O₂ and NADPH and Carbonyl group released as CO₂. *Insect Biochem.* 26: 203-208

- Munro A. W. und J. G. Lindsay** (1996) Bacterial cytochromes P-450. *Mol. Microbiol.* 20: 1115-1125
- Novelli G. D. und C. E. ZoBell** (1944) Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 47: 447-448
- Ooyama J. und J. W. Foster** (1965) Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 31: 45-65
- Parekh V. R., R. W. Traxler und J. M. Sobeck** (1977) *n*-Alkane oxidation enzymes of *Pseudomonad*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 881-884
- Park D.-H., H.-W. Ruy, K.-Y. Lee, C. H. Kang, T.-H. Kim und H.-Y. Lee** (1998) The production of hydrocarbons from photoautotrophic growth of *Dunaliella salina* 1650. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72: 739-746
- Platen H. und B. Schink** (1989) Anaerobic degradation of acetone and higher ketones by newly isolated denitrifying bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 135: 883-892
- Platen H., A. Temmes und B. Schink** (1990) Anaerobic degradation of acetone by *Desulfococcus biacutus* spec. nov.. *Arch. Microbiol.* 154: 355-361
- Rabus R.** (1995) Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation, Universität Bremen
- Rabus R. und F. Widdel** (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 96-103
- Rabus R. und J. Heider** (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 170: 377-384
- Rabus R., H. Wilkes, A. Schramm, G. Harms, A. Behrends, R. Amann und F. Widdel** (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliated with *Azoarcus/Thauera* cluster within the β -subclass of Proteobacteria. *Environ. Microbiol.* 1: im Druck
- Ragsdale S. W.** (1991) Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 261-300
- Rainey F. A., M. Dorsch, H. W. Morgan und E. Stackebrandt** (1992) 16S rDNA analysis of *Spirochaeta termophila*: position and implications for the systematics of the order Spirochaetales. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 224-226
- Rainey F. A. und E. Stackebrandt** (1993) 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 125-128

- Rainey F. A., N. Ward-Rainey, R. M. Kroppenstedt und E. Stackebrandt** (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiopsaceae fam. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 1088-1092
- Reed J. R., D. Vanderwel, S. Choi, J. G. Pomonis, R. C. Reitz und G. J. Blomquist** (1994) Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the house fly: Cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO₂. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 10000-10004
- Reed J. R., D. R. Quilici, G. J. Blomquist und R. C. Reitz** (1995) Proposed mechanism for the cytochrome P450-catalyzed conversion of aldehydes to hydrocarbons in the house fly, *Musca domestica*. Biochem. 34: 16221-16227
- Rehm H.-J. und I. Reiff** (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. Adv. Biochem. Eng. 19: 175-215
- Reinhold-Hurek B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, K. Vancanneyt, K. Kerstens und J. DeLey** (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen fixing *Proteobacteria* associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov.. Int. J. Bacteriol. 43: 574-584
- Rhee S.-K., G. M. Lee, J.-H. Yoon, Y.-H. Park, H.-S. Bae und S.-T. Lee** (1997) Anaerobic and aerobic degradation of pyridin by a newly isolated denitrifying bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2578-2585
- Roberts D. J., P. M. Fedorak und S. E. Hruday** (1990) CO₂ incorporation and 4-hydrox-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of *m*-cresol by a methanogenic consortium. Appl. Environ. Microbiol. 56: 472-478
- Roth J. R., J. G. Lawrence und T. A. Bobik** (1996) Cobalamin (coenzyme B₁₂): Synthesis and biological significance. Annu. Rev. Microbiol. 50: 137-181
- Rudolphi A., A. Tschsch und G. Fuchs** (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 155: 238-248
- Rueter P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch und F. Widdel** (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. Nature 372: 455-458
- Sakakura T. und M. Tanaka** (1987) Efficient catalytic C-H activation of alkanes: regioselective carbonylation of the terminal methyl group of *n*-pentane by RhCl(CO)(PMe₃)₂. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 758-759

- Sasser M.** (1997) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI, Newark
- Schnell S. und B. Schink** (1991) Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch. Microbiol. 155: 183-190
- Schweizer E.** (1989) Biosynthesis of fatty acids and related compounds. In: Microbial Lipids, Band 2, Academic press, pp. 3-50
- Senez J. C. und E. Azoulay** (1961) Deshydrogenation d'hydrocarbures paraffiniques par les suspensions non-proliférantes et les extraits des *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta 47: 307-316
- Shilov A. E.** (1997) Metal complexes in biomimetic chemical reactions. N₂-fixation in solution, activation and oxidation of alkanes, chemical models of photosynthesis. CRC Press, New York
- Singer T. L.** (1998) Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. Amer. Zool. 38: 394-405
- Souw P., H. Luftmann und H. J. Rehm** (1976) Oxidation of *n*-alkanes by citric acid producing *Candida* spp. I. Oxidation and assimilation of *n*-tetradecane. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 43-54
- Souw P. und H. J. Rehm** (1977) Oxidation of *n*-alkanes by citric acid producing *Candida* spp. II. Oxidation and assimilation of *n*-pentadecane. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 289-301
- Spalding R. F. und M. E. Exnter** (1993) Occurrence of nitrate in groundwater - a review. J. Environ. Qual. 22: 392-402
- Springer N., W. Ludwig, B. Philipp und B. Schink** (1998) *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strict anaerobic, denitrifying bacterium. Int. Syst. Bacteriol. 48: 953-956
- Stackebrandt E. und B. M. Goebel** (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
- Stirling L. A., R. J. Watkinson und I. J. Higgins** (1977) Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: Isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium. J. Gen. Microbiol. 99: 119-125

- Tamaoka J. und K. Komagata** (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 125-128
- Thauer R. K.** (1989) Carbonylierungs-Chemie in anaeroben Bakterien. In: P. Präve, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer und F. Wagner (ed.), *Jahrbuch Biotechnologie*, Band 2, Carl Hanser Verlag, München, Wien, pp. 49-64
- Tissot B. P. und D. H. Welte** (1984) *Petroleum formation and occurrence*. Springer Verlag, New York
- Tornabene T. G., S. J. Morrison und W. E. Kloos** (1970) Aliphatic hydrocarbon contents of various members of the family *Micrococcaceae*. *Lipids* 5: 929-937
- Traxler R. W. und J. M. Bernard** (1969) The utilization of *n*-alkanes by *pseudomonas aeruginosa* under conditions of anaerobiosis. I. Preliminary observation. *Int. Biodet. Bull.* 5: 21-25
- Trower M. K., R. M. Buckland, R. Higgins und M. Griffin** (1985) Isolation and characterization of cyclohexane-metabolizing *Xanthobacter* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1282-1289
- Truggill P. W.** (1984) Microbial degradation of the alicyclic ring. Structural relationships and metabolic pathways. In: D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York, pp. 132-180
- Tscheck A. und G. Fuchs** (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 148: 213-217
- Van Beilen J. B., M. G. Wubbolts und B. Witholt** (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5: 161-174
- VanBogelen R. A., K. Z. Abshire, A. Pertselmidis, R. L. Clark und F. C. Neidhardt** (1996) Gene-protein databases of *Escherichia coli* K-12, Edition 6. In F. C. Neidhardt (Editor in chief) *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press, Washington D.C., pp. 2067-2127
- Vandamme P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters und J. Swings** (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microb. Rev.* 60: 407-438
- Van Schie P. M. und L. Y. Young** (1998) Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2432-2438

- Visuvanathan S., M. T. Moss, J. J. Stanford, J. Hermon Taylor und J.J. Mcfadden** (1989) Simple method for isolation of DNA from diverse bacteria. *J. Microbiol. Methods* 10: 59-64
- Wagner F., W. Zahn und U. Buhring** (1967) 1-Hexadecene, an intermediate in the microbial oxidation of *n*-hexadecane *in vivo* and *in vitro*. *Angew. Chem. Internat. Edit.* 6: 359-360
- Wakeham S. G.** (1996) Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in Black sea sediments. *Marin. Chem.* 53: 187-205
- Walkil S. J.** (1970) Lipid metabolism. Academic Press, New York, pp. 102-104
- Ward D. M. und T. D. Brock** (1978) Anaerobic metabolism of hexadecane in sediments. *Geomicrobio. J.* 1: 1-9
- Wayne L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, P. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr und H. G. Trüper** (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464
- Widdel F.** (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen
- Yoder J. A., D. L. Denlinger, M. W. Dennis und P. E. Kolattukudy** (1992) Enhancement of diapausing flesh fly puparia with additional hydrocarbons and evidence for alkane biosynthesis by a decarbonylation mechanism. *Biochem. Molec. Biol.* 22: 237-243
- Zehnder A. J. B. und K. Wuhrmann** (1976) Titanium(III)-citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* 1976: 1165-1166
- Zengler K.** (1996) Anaerobe Oxidation von Xylolen, anderer Alkylbenzolen und Erdöl. Diplomarbeit. Georg-August-Universität Göttingen
- Zhou J., M. R. Fries, J. C. Chee-Sanford und J. M. Tiedje** (1995) Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov.. *Int. Syst. Bacteriol.* 45: 500-506

VII. Anhang: Vorschlag zur Beschreibung des Neuisolats

Description of *Azoarcus hydrocarbonis* sp. nov. (suggested)

hy.dro.car.bo'nis Gr. neut. n. *hydor* water; L. masc. n. *carbo* coal, carbon;
L. masc. comb. *hydrocarbo* hydrocarbon; *hydrocarbonis* pertaining to hydrocarbons.

Cells are gram-negative, non-motile, short oval rods (1,0 μm -1,5 μm x 1,8 μm -2 μm).
Cells grow homogeneously in aqueous media, even with water-insoluble substrates such as alkanes. Growth on media solidified by agar is poor.

The metabolism is chemoorganotrophic and facultatively anaerobic. Oxygen, nitrate and nitrite are used as electron acceptors. With nitrate as terminal electron acceptor, nitrite is usually excreted; accumulation of N_2O has not been detected. In the presence of nitrate, alkanes from C_6 - C_8 , 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-hexanol, butyraldehyde, caproaldehyde, capric aldehyde, acetate, propionate, valerate, 2-methylvalerate, caproate, 2-methylcaproate, oenanthate, caprylate, palmitate, succinate, fumarate, malate, pyruvate, lactate, benzoate, fructose, alanine, aspartate and glutamate are used anaerobically as sole carbon sources and electron donors. Methylalkanes, 1-alkenes, cyclohexane, toluene, ethylbenzene, *n*-propylbenzene, *n*-hexylbenzene, *m*-Xylene, *p*-Cymene, acetophenone, phenylacetate, ethanol, 1-heptanol, 1-octanol, formate and glucose are not used as growth substrates. No vitamins are required for growth. Optimum pH, 7,2 - 8,0. Optimum growth temperature, 25 - 28 °C. G + C ratio of the DNA, 66,8 mol%. The major fatty acids are 3-OH 10:0, 12:0, *cis*-9 16:1, 16:0 and 18:1. The microorganism belongs to the β -subclass of the Proteobacteria, as determined by 16S rRNA gene sequence analysis.

Habitat: Type strain was isolated from ditch mud collected in Bremen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Widdel danke ich für die Überlassung des Themas, die stete Bereitschaft, aufkommende Fragen auch zwischendurch zu beantworten und die Möglichkeit zum sehr selbständigen Arbeiten.

Herrn Dr. F. Rainey danke ich für die Sequenzierung der 16S rRNA und die Anfertigung des phylogenetischen Stammbaumes.

Frau Dr. K. Champion danke ich für die Einführung in die Technik der 2D-Elektrophorese.

Bei Herrn Dr. J. Harder möchte ich mich für die oft gewährte Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei chemisch-analytischen Fragestellungen bedanken. Christina Probian danke ich für die geduldige Beantwortung der Frage „Wo finde ich...?“ und die sonstige Unterstützung im Laboralltag.

Mein Dank gilt weiterhin allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danken möchte ich vor allem für freundschaftliche Gesten und lustige Labormomente, aber auch für die teils bühnenreifen Selbstdarstellungen, die mich um einige Erfahrungen bereicherten.

Bernd Stickfort möchte ich sehr für die stets prompte Erledigung aller Literaturanfragen und die sonstigen nützlichen Tips danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Wolfgang Schwaer und Kristin Stuertz, die mich mit höchstem Aufwand an Geduld und großer Toleranz unablässig unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Astrid Behrends
Geboren am 28. März 1968
in Varel

Schulbesuch

1974 – 1978 Grundschule Petersfehn, nach Wohnsitzwechsel Grundschule Wiefelstede
1978 – 1987 Jade-Gymnasium in Jaderberg; Abitur

Studium

1987 - 1988 Studium generale am Leibniz Kolleg in Tübingen
1988 – 1994 Studium der Biologie an der Universität Göttingen
Studienschwerpunkt: Mikrobiologie
Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie und Organische Chemie
Diplomarbeit am Mikrobiologischen Institut Göttingen zum Thema „Untersuchungen zur Glykoproteinnatur von Polyhydroxyalkanoat-Depolymerasen aus *Pseudomonas lemoignei*“
Studienabschluß als Diplom-Biologin
1/1995 – 6/1995 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Mikrobiologischen Institut Göttingen
seit 7/1995 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen, Abteilung Mikrobiologie (Prof. Dr. F. Widdel)

