

**Der anaerobe Abbau von Monoterpenen durch
das β -Proteobakterium *Alcaligenes defragrans***

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaft

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Bremen

vorgelegt von

Udo Heyen

aus Aurich

Oktober 1999

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von November 1996 bis Mai 1999 am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Jens Harder

Tag des Promotionskolloquiums: 13.12.1999

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

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

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

1. Terpene und Terpenoide	4
1.1 Biosynthese und Strukturen	5
2. Monoterpene	7
2.1 Vorkommen, Strukturen und chemische Eigenschaften	7
2.2 Biosynthese	9
2.3 Physiologische und ökologische Bedeutung	9
3. Abbau biogener Monoterpene durch aerobe Mikroorganismen	12
3.1 Azyklische Monoterpene	12
3.2 Monozyklische Monoterpene	14
3.3 Bizyklische Monoterpene	15
4. Mikrobieller Abbau isoprenoider Naturstoffe unter anoxischen Bedingungen	17
5. Zielsetzung	19

B Ergebnisse und Diskussion

1. Beschreibung der vier monoterpenerwertenden, nitratreduzierenden Bakterien	21
2. Wachstumsversuche mit <i>Alcaligenes defragrans</i>	23
2.1 Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus	23
2.2 Versuche zur Erweiterung des Substratspektrums	24

2.3	Konkurrenzversuche mit verschiedenen Monoterpenen	25
2.4	Resistenz von <i>Alcaligenes defragrans</i> gegenüber Monoterpenen	28
2.5	Massenanzucht von <i>Alcaligenes defragrans</i> im Fermenter	29
3.	Metabolite des anaeroben Monoterpenstoffwechsels	30
3.1	Biotransformation von Isolimonen zu Isoterpinolen	30
3.2	Neutrale Metabolite des Abbaus bityklischer Monoterpene	31
3.3	Isolierung und Identifizierung saurer Metabolite	34
4.	Zellsuspensionsversuche mit <i>Alcaligenes defragrans</i>	35
5.	Anaerobe Umsetzung von Monoterpenen <i>in vitro</i>	37
6.	Ökologische Aspekte	38
6.1	Ätherische Öle als Wachstumssubstrat für <i>Alcaligenes defragrans</i>	39
6.2	Ätherische Öle als Wachstumssubstrat für Anreicherungen	40
C	Literaturverzeichnis	42

Teil II: **Publikationen**

A	Publikationsliste mit Erläuterungen	61
B	Publikationen	
1	<i>Alcaligenes defragrans</i> sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene, and α -phellandrene) and nitrate	63
2	Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by denitrifying <i>Alcaligenes defragrans</i>	83

3	Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in <i>Alcaligenes defragrans</i>	95
4	Monoterpene tolerance of denitrifying <i>Alcaligenes defragrans</i>	110
5	Denitrification on essential oils	118

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ade441	Oligonukleotidsonde, spezifisch für <i>Alcaligenes defragrans</i>
AT1458	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Genera <i>Azoarcus</i> und <i>Thauera</i> sowie für <i>Alcaligenes defragrans</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BET42a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Beta-Untergruppe der Proteobakterien
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CoA	Coenzym A
d	Tag
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	Equivalent chain length
Eco440, 1455, 1464	Oligonukleotidsonden, spezifisch für <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenionisierung
et al.	et alteri (und andere)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EUB338	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Eubakterien
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavinadenindinukleotid
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor

FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G+C	Guanin und Cytosin
GAM42a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Gamma- Untergruppe der Proteobakterien
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GDP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
(RP)-HPLC	(Reversed-Phase)-High Performance Liquid Chromatography
IDP	Isopentenylidiphosphat
k	Kilo
l	Liter
log P	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten im Zweiphasensystem <i>n</i> -Octanol/Wasser
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar oder Mega
min	Minute
mol	Mol
MPN	Most probable number
n	Nano
NAD(P)H	Reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat)
OD	Optische Dichte
p	Piko
Pa	Pascal
%	Prozent

%o	Promille
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PVMS	Polyvinylmethylsilikon
RI	Retentionsindex
rDNS, rDNA	DNS-Bereiche, die für die ribosomale Ribonucleinsäure kodieren
rRNS, rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
s(p)p.	Spezies
Tab.	Tabelle
TMPB	1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzol
UV	Ultraviolett
vol (v)	Volumen
wt (w)	Gewicht

Zusammenfassung

1 Die zuvor unter nitratreduzierenden Bedingungen mit den zyklischen, ungesättigten Monoterpenkohlenwasserstoffen *p*-Menth-1-en, α -Pinen, 2-Caren und α -Phellandren isolierten Bakterienstämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen waren einander physiologisch und phylogenetisch sehr ähnlich. Alle Isolate waren bewegliche, mesophile, Gram-negative Stäbchen mit einem strikt respiratorischen Metabolismus. Neben Nitrat dienten auch reduziertere Stickstoffverbindungen (Nitrit, Distickstoffoxid) sowie Sauerstoff als Elektronenakzeptoren. In quantitativen Wachstumsansätzen wurde eine vollständige Oxidation der Monoterpene zu CO₂ nachgewiesen. Alle Stämme metabolisierten neben den Monoterpenen auch einige Amino- und Fettsäuren. Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen und Alkane wurden nicht verwertet. Auf der Grundlage der Bakterienzellfettsäuren und den Unterschieden in den 16S rDNS-Sequenzen wurden die vier monoterpenverwertenden Bakterienstämme als eine neue Spezies, *Alcaligenes defragrans*, innerhalb der Gattung *Alcaligenes* mit Stamm 54Pin als Typstamm beschrieben.

2 Alle vier Stämme waren in der Lage, unter anoxischen Bedingungen mit verschiedenen aliphatischen, mono- und bicyklischen Monoterpenen als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Aufgrund der übereinstimmenden Substratmuster scheint ein gemeinsamer Abbauweg für die Monoterpenkohlenwasserstoffe wahrscheinlich. Die beobachtete Bildung von monozyklischen *p*-Menthadienen während des Wachstum mit bicyklischen Monoterpenen deutet auf eine anfängliche Umwandlung der bicyklischen Strukturen zu monozyklischen Verbindungen hin. Diese Hypothese wird unterstützt durch den gleichzeitigen Abbau von mono- und bicyklischen Strukturen innerhalb definierter Terpengemische, wobei monozyklische Diene leicht bevorzugt wurden. In kometabolischen Studien konnte eine Isomerisierung von Isolimonen zu Isoterpinolen nachgewiesen werden. Beide Verbindungen dienten nicht als Wachstumssubstrate. Diese Beobachtung belegt, daß *A. defragrans* zu Umlagerungen innerhalb des Kohlenstoffgerüsts der Monoterpene befähigt ist. In Wachstumsuntersuchungen mit unterschiedlichen Strukturisomeren einer Verbindung wurden selektiv die Isomere mit einem sp²-hybridisierten, methylsubstituierten C1-Kohlenstoffatom

abgebaut. Die entsprechenden C1-sp³-hybridisierten Isomere wurden nicht verwertet. Für den vollständigen Abbau der Monoterpene durch *A. defragrans* ist somit das sp²-hybridisierte C1-Kohlenstoffatom eine essentielle Voraussetzung. Eine Hydratisierung der Alkene zu den entsprechenden Alkoholen als initialer Schritt des anaeroben Monoterpenabbaus erscheint anhand von früheren Untersuchungen als unwahrscheinlich.

3 Die azyklische Geraniumsäure wurde als erstes potentiell Aktivierungsprodukt aus Zellen vom Stamm 65Phen nach anaerobem Wachstum mit α -Phellandren isoliert. In anaeroben Studien mit dichten Zellsuspensionen konnte eine eindeutige Umsetzung von α -Phellandren, α -Pinen, Limonen und β -Myrcen zu Geraniumsäure nachgewiesen werden. Dabei wurde mit der azyklischen Verbindung β -Myrcen die höchste Transformationsrate in den Suspensionen erreicht. Unter C-limitierten Bedingungen und in Gegenwart von Nitrat erfolgte ein Abbau der gebildeten Geraniumsäure innerhalb der Zellsuspensionen. Mit der Umsetzung von β -Myrcen zu Geraniumsäure in zellfreien Extrakten konnte der erste *in vitro* Enzymtest für die anaerobe Alkentransformation entwickelt und etabliert werden. Dieser Enzymtest ermöglicht eine weitere Aufklärung der Bedeutung der Reaktion für den anaeroben Monoterpenabbau.

4 Ätherische Öle als natürlich vorkommende Monoterpengemische wurden sowohl von *A. defragrans* als auch von denitrifizierenden Anreicherungskulturen als Kohlenstoffquellen verwertet. In Gegenwart des reinen Öls führten nur die beiden hauptsächlich aus Monoterpenkohlenwasserstoffen bestehenden Öle, Zitronen- und Kiefernadelöl, zu Wachstum und vollständiger Nitratreduktion, wohingegen Petersiliensamen-, Campher-, Salbei-, Fenchel- und Minzöl nur verwertet wurden, wenn sie in einer HMN-Phase verdünnt vorlagen. Thymianöl führte zu keiner Nitratreduktion. Verbindungen, die in den verschiedenen Ölen durch die angereicherten Mikroorganismen metabolisiert wurden, waren Wachstumssubstrate der bisher auf Monoterpenen isolierten Bakterienstämmen (*Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica* und *Thauera linaloolentis*) sowie Bornylacetat, α -, β -Thujon, Campher, Borneol und aromatische Methoxypropenylbenzole. Eine molekularökologische Analyse der Bakterienpopulationen in den Anreicherungskulturen ergab, daß sie nicht von den bisher auf

Monoterpenen isolierten Bakterienstämmen dominiert wurden, was ein Anzeichen für die weite Verbreitung der Fähigkeit zur anaeroben Monoterpenoxidation in der Natur ist.

5 Die *Alcaligenes defragrans* Stämme wuchsen in Anwesenheit einer reinen Monoterpenphase, z.B. 30 % (vol/vol) Limonen. Diese beobachtete Toleranz ist das erste Beispiel für ein anaerobes Bakterium mit der Fähigkeit, in Gegenwart von hohen Konzentrationen an wasserlöslichen Kohlenwasserstoffen zu wachsen. Molekularökologische Populationsanalysen von denitrifizierenden Anreicherungskulturen, die mit verschiedenen Monoterpenen und ohne Zusatz einer HMN-Trägerphase gewonnen wurden, zeigten eine selektive Anreicherung von *Alcaligenes defragrans*-verwandten Bakterien.

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

1. Terpene und Terpenoide

Schon die Alchimisten des Mittelalters widmeten ihre besondere Aufmerksamkeit den flüchtigen Inhaltsstoffen von Kräutern und Gewürzen. Sie suchten nach dem fünften Element (quinta essentia oder äther), aus welchem nach ihrer Ansicht die himmlischen Körper zusammengesetzt seien. Die Öle, die sie durch Extraktion mit Alkohol aus Pflanzengewebe erhielten, werden auch heute noch unter dem Sammelbegriff 'ätherische Öle' oder englisch: 'essential oils' zusammengefaßt (Loomis und Croteau 1980). Terpentinöl, ursprünglich isoliert aus dem Harz von *Pistacia terebinthus* (Terpentin-Pistazie), war eines der ersten ätherischen Öle, von dessen Verwendung schon im alten Ägypten berichtet wurde (Erman 1985). Im 19. Jahrhundert gelang die Isolierung der wesentlichen Inhaltsstoffe des Terpentinöls. Es waren natürliche Kohlenwasserstoffe der Zusammensetzung $C_{10}H_{16}$, die aufgrund ihrer Herkunft als Terpene bezeichnet wurden. In den folgenden Jahrzehnten wurden in mühevoller Arbeit über 700 verschiedene Terpene isoliert und charakterisiert (Erman 1985; Gershenzon und Croteau 1991). Otto Wallach beobachtete, daß einige Terpene periodisch aufgebaut sind und schlug 1887 die 'Isopren-Regel' vor, nach der viele aus ätherischen Ölen isolierte Naturstoffe als Oligomer des C_5 -Kohlenwasserstoffs Isopren aufgefaßt werden können. Später erkannte Ruzicka (1953) die Ursache dieser strukturellen Ähnlichkeit: - das 'aktive Isopren' - als eine gemeinsame Zwischenstufe bei der Biosynthese aller Terpene (Loomis und Croteau 1980). Entsprechend wird heute der Begriff 'Terpen' für eine Gruppe von Naturstoffen benutzt, deren Struktur sich durch die Vervielfachung von Isopren-Einheiten ergibt. Unter dem erweiterten Begriff Terpenoide oder Isoprenoide werden auch die abgeleiteten Alkohole, Ketone, Aldehyde und Ester erfaßt (Hoffmann et al. 1982). Die Verbindungen werden üblicherweise mit Trivialnamen belegt, da die systematische Nomenklatur bei den komplizierten Strukturen wenig praktikabel ist.

Zur leichteren Differenzierung werden in dieser Arbeit die Begriffe 'Terpen' als Synonym für reine Kohlenwasserstoffe und 'Terpenoid' als Synonym für sauerstoffhaltige Derivate der Terpene verwendet.

1.1 Biosynthese und Strukturen

Terpene und Terpenoide werden in großer struktureller Vielfalt hauptsächlich von Pflanzen gebildet, werden aber in allen Organismen gefunden. Sie sind die größte Gruppe natürlich vorkommender Verbindungen; mehr als 23 000 individueller Isoprenoidverbindungen sind bereits beschrieben (Sacchetti und Poulter 1997). Einige besitzen essentielle Funktionen im Grundstoffwechsel, z.B. Gibberelline und Abscisinsäure (Pflanzenhormone), Sterole und Hopane (Strukturelemente der Biomembranen), Carotinoide und Phytol-Seitenketten des Chlorophylls (photosynthetische Pigmente), wie auch die Polyprenylgruppen der Elektronenübertragenden Chinone (McGarvey und Croteau 1995). Die Mehrzahl der produzierten Verbindungen sind nicht am Primärstoffwechsel beteiligt und werden daher als sekundäre Stoffwechselprodukte klassifiziert.

Lange Zeit ging man davon aus, daß alle Organismen Isoprenoide über einen einheitlichen Weg synthetisieren. Dieser 'klassische' Biosyntheseweg verläuft über die Mevalonsäure, eine C₆-Säure, wobei zuerst 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA durch Kondensation von drei Molekülen Acetyl-Coenzym A gebildet wird (Acetat-Mevalonat-Weg). Unter Verbrauch von ATP und anschließender Decarboxylierung wird die Mevalonsäure zu Isopentenylidiphosphat (IDP) umgesetzt, der universalen C₅-Vorstufe für die Isoprenoidbiosynthese in allen lebenden Organismen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß Eubakterien (Rohmer 1993), Grünalgen (Schwender et al. 1996) und auch höhere Pflanzen (Lichtenthaler et al. 1997a; Zeidler et al. 1997) einen zweiten Isopentenylidiphosphat-Syntheseweg besitzen. Dieser alternative Weg verläuft über die Thiaminpyrophosphat-abhängige Kondensation einer C₂-Einheit aus Pyruvat an die Aldehydgruppe von Glyceraldehyd-3-phosphat (Rohmer et al. 1996). Als erstes C₅-Intermediat wurde 1-Desoxyxylulose-5-phosphat identifiziert (Arigoni et al. 1997; Schwender et al. 1997).

Über das hypothetische Zwischenprodukt 2-Methylerythrose-4-phosphat entsteht 2-Methylerythritol-4-phosphat, das anschließend weiter zu IDP umgesetzt wird (Takahashi et al. 1998). Weitere Studien zeigten, daß höhere Pflanzen über beide Möglichkeiten verfügen - in den Plastiden erfolgt die Biosynthese isoprenoider Verbindungen über den Desoxyxylulose-Weg, im Cytosol über den Mevalonat-Weg (Lichtenthaler et al. 1997a,b). *Streptomyces aerioovifer*, ein Gram-positives Bodenbakterium, ist der erste Vertreter der Prokaryoten, in dem die Existenz beider Synthesewege nachgewiesen wurde (Seto et al. 1996).

Im Verlauf der weiteren Biosynthese wird Isopentenylidiphosphat zunächst zu Dimethylallyldiphosphat (DMADP) isomerisiert. Beide Verbindungen bilden das biologisch aktive Isopren, wobei DMADP als 'Starter'-Molekül dient. Durch Kopf-Schwanz-Kondensation von IDP und DMADP entsteht Geranylidiphosphat (GDP). Höhere Terpene werden durch Prenyltransferasen gebildet, die weitere IDP-Einheiten an das Molekül anfügen. Terpene mit 30 oder mehr Kohlenstoffatomen entstehen durch Schwanz-Schwanz-Kondensation aus zwei Molekülen Farnesylidiphosphat (C_{15}) bzw. zwei Molekülen Geranylgeranylidiphosphat (C_{20}). Variationen des Kohlenstoffgerüsts bei der weiteren Biosynthese zu zyklischen Verbindungen ergeben sich aus den räumlichen Anordnungen und intramolekularen Reaktionen der entsprechenden Diphosphat-Vorstufen (McCaskill und Croteau 1997). Katalysiert werden diese Umlagerungen durch spezifische Synthasen und Cyclasen, wobei die Röntgenstruktur einiger Terpenoidsynthasen inzwischen aufgeklärt ist (Sacchetti und Poulter 1997). Entsprechend der Anzahl der Isopren-Einheiten werden Hemiterpene (C_5), Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Sesterterpene (C_{25}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene ($>C_{40}$) unterschieden. Die ausgesprochene Mannigfaltigkeit der gesamten Stoffgruppe erklärt sich durch weitere, nachfolgende Transformationen, z.B. durch Hydroxylierung mit Cytochrom-P450-Enzymen und molekularem Sauerstoff als Cosubstrat (Karp und Croteau 1988).

2. Monoterpene

2.1 Vorkommen, Strukturen und chemische Eigenschaften

Monoterpene und Monoterpenoide werden von Pflanzen als sekundäre Stoffwechselprodukte, oft in hochspezialisierten Sekretionsgeweben, synthetisiert. Sie bilden die größte Gruppe natürlich vorkommender Alkene und sind die geruchsintensiven Hauptkomponenten der ätherischen Öle, die durch Wasserdampfdestillation oder Extraktion aus pflanzlichen Materialien gewonnen werden. Eine Vielzahl dieser Öle und deren Terpen-Komponenten werden wirtschaftlich genutzt als Duftstoffe und Aromen sowie als pharmazeutische Produkte, letzteres bedingt durch die antibakteriellen und fungiziden Eigenschaften einiger Öle (Janssen et al. 1987; Billing und Sherman 1988; Hulin et al. 1998).

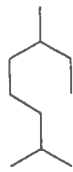
Die Kohlenstoffskelette der Monoterpene besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen, die azyklisch, monozyklisch oder bicyklisch aufgebaut sein können. Bei den bicyklischen Verbindungen können C₆-C₃-, C₆-C₄- und C₆-C₅-Ringsysteme unterschieden werden. Innerhalb der drei Gruppen der Monoterpene kommen weitere Strukturisomere vor, die sich durch die Position von Doppelbindungen unterscheiden (Abb. 1). Die Mehrzahl der natürlich vorkommenden Verbindungen sind ungesättigte Kohlenwasserstoffe, aber auch die oxygenierten Verbindungen sind in der Natur zu finden (Erman 1985).

Die Monoterpene besitzen eine geringe Wasserlöslichkeit, wobei eine deutliche Zunahme von den Terpenkohlenwasserstoffen (ca. 50 µM) zu den oxyfunktionalisierten Terpenen (bis zu 20 mM) festzustellen ist (Weidenhamer et al. 1993). Neben der geringen Wasserlöslichkeit ist die Flüchtigkeit eine weitere charakteristische Eigenschaft. Terpenkohlenwasserstoffe weisen Dampfdrücke von 0,2-0,5 kPa (25° C) auf, während die Dampfdrücke der Monoterpenalkohole nur 1-5 % der Dampfdrücke der Kohlenwasserstoffe betragen (Fichan et al. 1999).

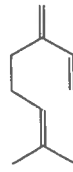
Grundgerüste

Monoterpene

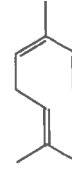
azyklisch



2,6-Dimethyloctan

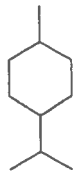


Myrcen

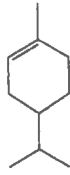


Ocimen

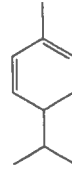
monozyklisch



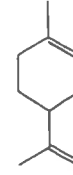
p-Menthan



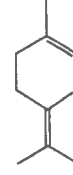
p-Menth-1-en



α -Phellandren



Limonen



Terpinolen

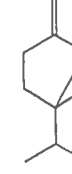
bizyklisch



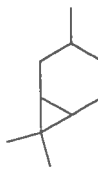
Thujan



α -Thujan



Sabinen



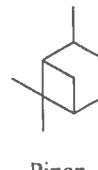
Caran



2-Caren



3-Caren



Pinan



α -Pinen



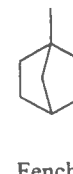
β -Pinen



Bornan



2-Bornen



Fenchan



δ -Fenchen

Abb. 1. Strukturen und Trivialnamen einiger wichtiger Monoterpene.

2.2 Biosynthese

Die Biosynthese der azyklischen und zyklischen Kohlenstoffgerüste der Monoterpene findet von Geranyldiphosphat (GDP) ausgehend statt. Die beteiligten Enzyme sind membran-gebundene Synthasen bzw. Cyclasen, die zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) als Cofaktoren benötigen (Croteau 1987). GDP wird zunächst zu einem allylischen Kation ionisiert und anschließend zu dem enzymgebundenen Linalyldiphosphat isomerisiert. Diese Reaktion ist notwendig, da die räumliche Struktur von GDP eine direkte Zyklisierung nicht ermöglicht. Eine weitere Aktivierung über eine zweite kationische Zwischenstufe führt zur Bildung des enzymgebundenen, zyklischen α -Terpinyl-Kations, das universale Intermediat der Ringbildungsreaktionen. Durch intramolekulare Additionen, Wasserstoff-Verschiebungen und Umlagerungen leiten sich von diesem hochreaktiven Zwischenprodukt die weiteren Grundgerüste der zyklischen Monoterpene ab. Offenkettige Monoterpene, wie z.B. β -Myrcen, entstehen durch Deprotonierung der azyklischen Carbokationen (Bohlmann et al. 1997). Viele Synthasen katalysieren die gleichzeitige Bildung von Monoterpengemischen, z.B. bildet die Limonen-Synthase neben Limonen auch geringe Mengen an β -Myrcen, α - und β -Pinen (Bohlmann et al. 1998). Die Primärprodukte der pflanzlichen Biosynthese sind die ungesättigten Kohlenwasserstoffe, aus denen nachfolgend die oxygenierten Derivate gebildet werden.

2.3 Physiologische und ökologische Bedeutung

Die Bedeutung der Monoterpene in der Natur ist vielschichtig und im Detail noch nicht vollkommen verstanden. Die biogenen Kohlenwasserstoffe werden nicht nur in den Pflanzen am Bildungsort gespeichert, sondern diffundieren auch in beträchtlichem Umfang in die Atmosphäre. Zimmerman et al. (1978) schätzten die weltweite Emission biogener Monoterpene auf ca. 4.8×10^{14} g C pro Jahr. Monoterpene und Isopren bilden zusammen den wesentlichen Anteil (>75%) der biogen emittierten, sogenannten Nicht-Methan-Kohlenwasserstoffe. Nach neueren Modellrechnungen beträgt die Emissionsrate der

Monoterpene ca. 1.3×10^{14} g C pro Jahr (Guenther et al. 1995). Dies entspricht mehr als ein Prozent des pflanzlich fixierten Kohlenstoffs (Bolin 1983).

Es wird vermutet, daß die Freisetzung der flüchtigen Kohlenwasserstoffe zu einer Erhöhung der Wärmetoleranz der Pflanzen beiträgt (Sharkey und Singsaas 1995; Zimmer et al. 1997). Alternativ können die flüchtigen Monoterpene in der Umgebung der Pflanzen auch zu wichtigen Faktoren ökologischer Beziehungen werden. Da viele Pflanzen von tierischen Bestäubern abhängig sind, ist beispielsweise das Anlocken von Insekten lebenswichtig für die pflanzliche Vermehrung. So werden bei einigen Orchideen-Arten durch die Freisetzung von Monoterpenen die männlichen Vertreter bestimmter Bienen oder Grabwespen sehr effizient angelockt, da das Duftmuster der Pflanzen den Sexualduftstoffen der weiblichen Insekten ähnelt (Gershenzon und Croteau 1991). Eine weitere Erklärung für das verbreitete Vorkommen von Monoterpenen in Pflanzen liefert ihre Funktion als chemische Verteidigungsmechanismen. In den Nadeln der Kiefer *Pinus monophylla* wurden Monoterpengehalte von ca. 5 mg/g Trockenmasse (Wilt et al. 1993) und in den Blättern von *Umbellularia californica* (kalifornischer Laurel) von bis zu 20 mg/g Trockenmasse (Wood et al. 1995) nachgewiesen. Diese permante Speicherung von Monoterpenen in den Pflanzengewebe dient als vorsorgender Fraßschutz gegenüber Herbivoren. Bei einer induzierten Biosynthese nach Befall mit Schädlingen basiert der Schutzmechanismus nicht allein auf der toxischen oder insektiziden Wirkung dieser Substanzen, sondern teilweise auf einem komplexen Wechselspiel zwischen Wirtspflanze, Parasit und dessen Jäger. Nach Besiedlung mit pflanzenfressenden Insekten beginnen einige Pflanzenarten bestimmte Monoterpene an die Umgebung abzugeben. Diese induzierte Emission bewirkt z.B. die Anlockung von Freßfeinden der entsprechenden Insekten (Paré und Tumlinson 1997). Flüchtige Terpene spielen auch bei der gegenseitigen Beeinflussung von Pflanzen eine Rolle. So werden von einigen Pflanzenarten Verbindungen wie α -, β -Pinen, Camphen, Campher oder 1,8-Cineol ausgeschieden, die im Boden vor allem als nachhaltige Keimungsinhibitoren gegenüber andere Pflanzen wirken, um so den Platz- und Nahrungsbedarf der eigenen Art sicherzustellen (Loomis und Croteau 1980). Eine weitere Funktion sehen einige Autoren in der intraspezifischen Kommunikation zwischen Pflanzen, indem nach Insekten- oder Virenbefall Isoprenoide freigesetzt werden, die die Produktion von

Abwehrstoffen bei nicht befallenen Pflanzen der eigenen Art induzieren (Baldwin und Schultz 1983; Shulaev et al. 1997).

Neben der erwähnten insektiziden Wirkung wurde für verschiedene Monoterpene auch eine artspezifische Toxizität für Mikroorganismen nachgewiesen (Andrews et al. 1980; Uribe et al. 1985; Knobloch et al. 1986; 1988). Die Toxizität wird generell durch die Akkumulation der lipophilen Monoterpene in den Zellmembranen verursacht. Die damit verbundene Aufhebung der Membranintegrität bewirkt eine Hemmung des respiratorischen Elektronentransports, der Protonentranslokation und letztlich der oxidativen Phosphorylierung, so daß der Energiestoffwechsel zum Erliegen kommt (Knobloch et al. 1986; 1988; Sikkema et al. 1995). Untersuchungen mit aeroben Bakterien zeigten, daß Monoterpenoide im Vergleich zu den Monoterpenkohlenwasserstoffen einen stärkeren toxischen Effekt besitzen (Knobloch et al. 1986; 1988). Dies ist möglicherweise auf die höhere Bioverfügbarkeit, aufgrund der höheren Wasserlöslichkeit (Weidenhamer et al. 1993), und auf die Anwesenheit von Ketogruppen, die mit Proteinen reagieren können, zurückzuführen.

Umfangreiche ökologische Studien zeigten einen bedeutenden Einfluß von Monoterpenen auf die Nährstoffkreisläufe in Waldböden. So stellte White (1986) in Laborexperimenten bei Anwesenheit von Monoterpenen (α -, β -Pinen, β -Myrcen, Limonen, β -Phellandren) in der Gasphase eine 68%ige Reduktion der Nettostickstoffmineralisierung (Summe der Ammonium- und Nitrat-Bildungsraten) im Waldboden fest. Mit den flüchtigen Verbindungen, die aus einem *Pinus ponderosa*-Waldboden emittierten, wurde eine Reduktion um 74 % erreicht. Diese Beobachtungen werden erklärt durch die spezifische Hemmung der mikrobiellen Ammonium-Monooxygenase in Gegenwart bereits niedriger Konzentrationen, vor allem an ungesättigten Terpenkohlenwasserstoffen (White 1988; 1994; Ward et al. 1997). Eine spezifische Hemmung der Methan-Monooxygenase durch die Monoterpenkohlenwasserstoffe wurde auch für einige methanotrophe Bakterien beschrieben (Amaral et al. 1998).

3. Abbau biogener Monoterpene durch aerobe Mikroorganismen

Nur wenige Bakterien, hauptsächlich *Pseudomonas*-ähnliche Gram-negative Spezies oder Gram-positive *Actinomyceten*, wurden in den letzten vierzig Jahren mit Monoterpenen als alleiniger Kohlenstoffquelle isoliert. Untersuchungen zum aeroben Katabolismus sind bislang nur für einzelne Verbindungen erfolgt. Die Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit der Aufklärung der initialen Aktivierungsprozesse dieser azyklischen und zyklischen Kohlenwasserstoffe. Stoffwechselprodukte, die während des Wachstums im Kulturmedium gefunden und identifiziert wurden, begründen postulierte Abbauwege. Insgesamt gesehen, sind die gewonnenen Einsichten angesichts der Strukturvielfalt der Monoterpene begrenzt. Nur wenige der beteiligten Enzyme sind gereinigt und charakterisiert worden (Übersicht in: Kieslich 1976; Trudgill 1984; Kieslich et al. 1986; Trudgill 1986; Mikami 1988; Trudgill 1990; 1994; van der Werf et al. 1997). Im folgenden sind die Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau einzelner Monoterpene zusammengefaßt.

3.1 Azyklische Monoterpene

Bereits vor mehr als dreißig Jahren gelang es Seubert und seinen Mitarbeitern, den aeroben Abbau der verzweigten Kohlenstoffgerüste von Geraniol (3,7-Dimethyl-2,6-octadienol) und Farnesol (3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol) in *Pseudomonas citronellolis* aufzuklären (Seubert 1960; Seubert und Remberger 1963; Seubert et al. 1963; Seubert und Fass 1964a,b). Untersuchungen mit gereinigten Enzymen zeigten eine neue Variante zur Aktivierung von β -methylverzweigten Kohlenwasserstoffen, die einen vollständigen Abbau dieser Verbindungen ermöglichen: Nach Oxidation der primären Alkohole zu den entsprechenden β -Methyl- α,β -ungesättigten Säuren und Aktivierung durch Coenzym A-Thioesterbildung wird die β -ständige Methylgruppe in einer Biotin-abhängigen Reaktion carboxyliert (Geranyl-CoA-Carboxylase). Im Anschluß an die Hydratisierung der α,β -Doppelbindung erfolgt in einer Lyase-Reaktion die Eliminierung der durch Carboxylierung aktivierten β -Methylgruppe in Form von Essigsäure. Das entstehende β -Ketoacyl-CoA-Derivat wird anschließend über die

Reaktionen der β -Oxidation weiter verkürzt. Diese Variante wird nur bis zum Dimethylacryl-CoA eingeschlagen. Der weitere Abbau erfolgt über die Reaktionen des Leucinabbaus (Seubert und Fass 1964b).

Neben den erwähnten Verbindungen verwertet *P. citronellolis* weitere funktionalisierte Isoprenoide wie das Isolationssubstrat Citronellol, Citronellal, Citronellsäure, 3,7-Dimethyl-1-octanol und Nerol als einzige Kohlenstoffquelle (Seubert 1960; Cantwell et al. 1978). Der aerobe Abbau dieser Terpenoide unter Beteiligung einer Geranyl-CoA-Carboxylase wurde auch für die Organismen *P. aeruginosa* und *P. mendocina* gezeigt (Cantwell et al. 1978). Die Verwertung von 2,6-Dimethyl-2-octen, einem verzweigten Alken, durch die Kombination einer Monooxygenase-Reaktion und anschließender Carboxylierung durch die Geranyl-CoA-Carboxylase wurde von Fall et al. (1979) durch *n*-Alkan verwertende Mutanten (Dec⁺) von *P. citronellolis* nachgewiesen. Von den genannten Monoterpenen metabolisiert *P. citronellolis* unter anaeroben Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Nitrat nur Dimethyl-1-octanol und Citronellol (Harder und Probian 1995).

Im Vergleich zu den Alkoholen ist über den aeroben Abbau der azyklischen Monoterpenkohlenstoffe nur sehr wenig bekannt. *Pseudomonas putida* Stamm S4-2 wurde mit β -Myrcen (7-Methyl-3-methylen-1,6-octadien) als einziger Kohlenstoffquelle isoliert (Narushima et al. 1982). Nach erfolgtem Wachstum wurden aus dem Kulturüberstand 2-Methyl-6-methylen-2,7-octadiensäure und die C₇-Verbindungen 4-Methylen-5-hexensäure und 4-Methyl-3-hexensäure isoliert. Ausgehend von diesen Produkten wurde als Abbaumechanismus eine Hydroxylierung der terminalen C8-Methylgruppe vorgeschlagen. Die entsprechenden C₇-Verbindungen resultieren möglicherweise aus der Abspaltung einer C₃-Einheit über die Reaktionen der β -Oxidation. Durch genetische und physiologische Studien mit dem erst kürzlich auf β -Myrcen isoliertem Bakterium, *Pseudomonas* sp. Stamm M1, wurden die postulierten, initialen Schritte des Abbaus bestätigt (Iurescia et al. 1999). So wurde in Untersuchungen mit dichten Zellsuspensionen einer Myrcen-negativen Mutante (N22) des Stammes die Akkumulation von 2-Methyl-6-methylen-2,7-octadiensäure als initiales Hydroxylierungsprodukt nachgewiesen. Desweiteren konnten vier Gensequenzen identifiziert werden, die für eine Alkohol- und eine Aldehyd-Dehydrogenase, eine Acyl-CoA-Synthetase und eine Enoyl-CoA-Hydratase kodieren.

Auch die Monoterpenalkohole Linalool, Geraniol und Citronellol werden von *P. incognita* und *Aspergillus niger* durch eine Hydroxylierung der terminalen C8-Methylgruppe metabolisiert (Madyastha et al. 1977; Madyastha und Murthy 1988). Als katalysierendes Enzym wurde in *P. putida* var. *incognita* Stamm PgG 777 eine lösliche, Linalool umsetzende Cytochrom-P450-Monooxygenase gefunden (Ullah et al. 1990).

3.2 Monozyklische Monoterpene

Limonen (4-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexen) ist das in der Natur am weitesten verbreitete monozyklische Monoterpene. Der Abbau des ungesättigten *p*-Menthen-Grundgerüsts erfordert eine Spaltung des Cyclohexenrings in ein offenkettiges Intermediat. Erste Untersuchungen zum Abbau von monozyklischen Monoterpenen wurden mit *Pseudomonas putida* Stamm PL, einem auf Limonen isolierten Bakterium, durchgeführt (Dhavalikar und Bhattacharyya 1966). Produkte, die im Kulturmedium beim Wachstum auf Limonen gefunden und nachträglich als Wachstumssubstrate identifiziert wurden, führten zum Vorschlag eines Reaktionsweges. Die Hydroxylierung der C7-Methylgruppe von Limonen führt zur Bildung von Perillaalkohol, gefolgt von einer weiteren Oxidation zur Perillasäure. Diese wird anschließend in einer Coenzym A- und ATP-abhängigen Reaktionsfolge, analog zur β -Oxidation, zu 3-Isopropenylpimelyl-CoA gespalten (Dhavalikar et al. 1966). Eine entsprechende Perillaalkohol-Dehydrogenase und eine Perillaaldehyd-Dehydrogenase konnten gereinigt und enzymatisch charakterisiert werden (Ballal et al. 1966; 1967; 1968). Pujar und Bhattacharyya (1973) beschrieben eine analoge Reaktionsfolge unter Bildung von 3-Isopropylpimelyl-CoA auch für die mikrobielle Oxidation von *p*-Menth-1-en (4-Isopropyl-1-methyl-cyclohexen). Ein Abbauweg für die offenkettige 3-Isopropenylpimelinsäure bzw. 3-Isopropylpimelinsäure wurde von Hungund et al. (1970) vorgeschlagen. Der Perillaalkohol-Weg wurde auch für andere Bakterien beschrieben, die mit Limonen als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen (Cadwallader et al. 1989; Chang und Oriel 1994; Chang et al. 1995).

Kürzlich wurde ein weiteres Limonen-verwertendes Bakterium, *Rhodococcus erythropolis* Stamm DCL14, isoliert, das im Gegensatz zum *P. putida* Stamm PL nicht in der Lage ist, mit Perillaalkohol zu wachsen (van der Werf und de Bont 1998). Biochemische Untersuchungen führten zur Postulierung eines zweiten Abbauweges. Im Unterschied zum Perillaalkohol-Weg wird der Abbau durch einen Angriff an die 1,2-Doppelbindung von Limonen durch eine FAD- und NADH-abhängige Monooxygenase eingeleitet und führt zur Bildung von Limonen-1,2-epoxid. Dieses Epoxid wird hydrolytisch zu Limonen-1,2-diol gespalten, das weiter zu 1-Hydroxy-2-oxolimonen oxidiert wird. Über eine NADPH-abhängige Monooxygenase-Reaktion entsteht 7-Hydroxy-4-isopropenyl-7,2-oxo-oxepanon. Durch spontane Umlagerung des instabilen Lactons kommt es zur Ringspaltung; als Produkt entsteht 3-Isopropenyl-6-oxoheptansäure, die voraussichtlich über die Reaktionen der β -Oxidation weiter abgebaut wird (van der Werf et al. 1999). Zwei der beteiligten Enzyme, die Limonen-1,2-epoxid-Hydrolase und die Limonen-1,2-diol-Dehydrogenase, konnten gereinigt und charakterisiert werden (Barbirato et al. 1998; van der Werf et al. 1998). Limonen-1,2-diol wurde auch als ein wesentliches Transformationsprodukt von Limonen in verschiedenen Pilzkulturen nachgewiesen (Abraham et al. 1986).

3.3 Bizyklische Monoterpene

α - und β -Pinen, Hauptkomponenten des Terpentins, sind die am häufigsten in der Natur vorkommenden bizyklischen Monoterpene. Obwohl das aerobe Wachstum mit α -Pinen (2,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-2-en) für verschiedene Mikroorganismen beschrieben wurde, ist der mikrobielle Abbau, der die Spaltung von zwei Kohlenstoffringsystemen erfordert, noch nicht vollständig aufgeklärt. Shukla und Bhattacharyya (1968) und Shukla et al. (1968) untersuchten den Metabolismus von α - und β -Pinen in *Pseudomonas* Stamm PL, einem Bakterium, das mit verschiedenen Monoterpenen als einziger Kohlenstoffquelle wächst. Basierend auf der Analyse der beim Wachstum auf α -Pinen akkumulierten Produkte wurde von den Autoren folgender Reaktionsweg vorgeschlagen: Die initiale Spaltung des Cyclobutanrings über eine Protonierung führt zur Bildung eines monozyklischen Intermediats,

Limonen oder *p*-Menth-1-en. Der weitere Abbau erfolgt auf dem bereits beschriebenen Weg über Perillaalkohol zu Pimelinsäurederivaten (Shukla und Bhattacharyya 1968). Für ein weiteres auf α -Pinen isoliertes Bakterium, *Pseudomonas* Stamm PIN 18, wird ebenfalls dieser über Limonen verlaufende Abbau vermutet (Griffiths et al. 1987a).

Im Gegensatz dazu konnte in Untersuchungen mit Zellextrakten von *Pseudomonas fluorescens* Stamm NCIMB 11671 ein NADH-abhängiger Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von α -Pinen beobachtet werden (Best et al. 1987). Als Produkt dieser Reaktion wurde 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al isoliert, das oxidativ zu 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-diensäure umgesetzt werden kann. Dieses Intermediat wurde auch von *Pseudomonas* Stamm PX1 und *Pseudomonas putida* Stamm PIN11 beim Wachstum auf α -Pinen angehäuft (Gibbon und Pirt 1971; Tudroszen et al. 1977). Anhand dieser Beobachtungen wurde eine initiale Hydroxylierung von α -Pinen zu einem 1,2-Epoxid vermutet, dessen Spaltung in einer Lyase-Reaktion zur Bildung von 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al führt. Weitere Inkubationsstudien mit Zellextrakten von *Nocardia* sp. Stamm P18.3 konnten eine eindeutige Umsetzung von α -Pinenepoxid zu dem entsprechenden Aldehyd zeigen (Griffiths et al. 1987a). Untersuchungen mit den gereinigten α -Pinenepoxid-Lyasen aus *Nocardia* sp. Stamm P18.3 (Griffiths et al. 1987b) und *P. putida* Stamm PX1 (Trudgill 1990) belegten, daß die Lyasen eine gleichzeitige Spaltung beider Ringsysteme zu einem azyklischen Produkt katalysieren (Abb. 2).

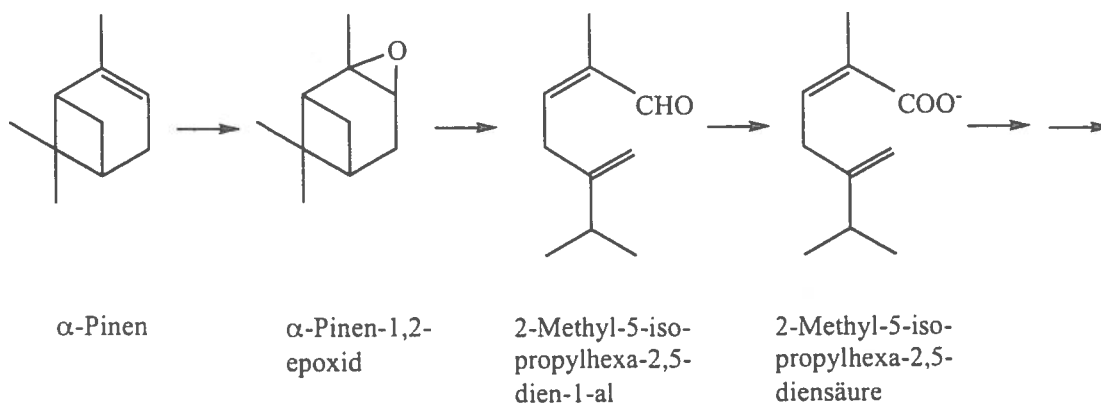


Abb. 2 Initiale Aktivierung von α -Pinen durch Bildung des 1,2-Epoxids (Griffiths et al. 1987a,b).

Ein anderer Mechanismus der mikrobiellen Ringspaltung wurde für das (sauerstoff-)funktionalisierte bicyklische Monoterpenoid Campher (1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-on) gefunden. Eingeleitet wird die Reaktionsfolge durch eine Hydroxylierung und eine Dehydrogenierung unter Bildung des entsprechenden Diketons. Durch eine biologische Baeyer-Villinger-Oxidation des Ketons wird in α -Stellung zur Carbonylgruppe ein Sauerstoffatom in das Ringsystem eingefügt. Das entstehende Lacton ist instabil und wird spontan zu einem monozyklischen Intermediat gespalten. Nach einer CoA-Aktivierung wird durch erneute Baeyer-Villinger-Oxidation das azyklische Intermediat 3,4,4-Trimethyl- Δ^3 -pimelyl-CoA gebildet (Ougham et al. 1983; Trudgill 1986). Drei der am Abbau von (+)-Campher und (-)-Campher durch *Pseudomonas putida* Stamm C1 beteiligten Baeyer-Villinger-Monooxygenasen wurden bisher gereinigt (Ougham et al. 1983; Taylor und Trudgill 1986; Jones et al. 1993). Die Beteiligung einer ähnlichen Monooxygenase Reaktion, die zu einer Ringöffnung führt, wird auch für den aeroben Abbau von 1,8-Cineol (MacRae et al. 1979; Williams et al. 1989) und Menthol (Williams und Trudgill 1994) vermutet.

4. Mikrobieller Abbau isoprenoider Naturstoffe unter anoxischen Bedingungen

Die Analyse von organischen Verbindungen in anaeroben Sedimenten zeigte einen sehr langsamen Abbau von isoprenoiden Naturstoffen. Daher werden diese Substanzen, meist Verbindungen mit 15-40 Kohlenstoffatomen, als sogenannte Biomarker genutzt (Peters und Moldewan 1993). Über den anaeroben Abbau dieser komplexen isoprenoiden Kohlenwasserstoffe ist bis heute nur sehr wenig bekannt. In Untersuchungen in anaeroben Sedimenten und mit anaerob inkubierten Seewasserproben wurde ein mikrobieller Abbau photosynthetischer Pigmente nachgewiesen (Leavitt 1993; Steenbergen et al. 1994). Methanogene Anreicherungskulturen mit Squalen als alleiniger Kohlenstoffquelle setzten das Triterpen zu Methan und CO_2 um (Schink 1985). Cholesterin wird von einem denitrifizierenden Bakterium, Stamm 72Chol, das von Harder und Probian (1997) isoliert wurde, vollständig zu Kohlendioxid mineralisiert. In jüngster Zeit wurde ein denitrifizierendes

Bakterium (Rontani et al. 1997) erhalten, das mit 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on, einem isoprenoiden Keton, als alleiniger Kohlenstoffquelle wächst. In einer sulfatreduzierenden Anreicherung (Hirschler et al. 1998) wurde die Mineralisierung von Hexadecan-2-on nachgewiesen. Die Identifizierung von 2-(1-Hydroxyethyl)pentadecanoat deutet auf eine Carboxylierung als Initialreaktion hin, eine Reaktion, die vom aeroben und anaeroben Acetonabbau bekannt ist (Ensign et al. 1998). Die Anreicherungskultur verwertet ebenfalls 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on.

Erste Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Monoterpenen wurden von Harder und Probian (1995) durchgeführt. Anreicherungen mit Linalool, Menthol, Eukalyptol sowie *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, 2-Caren und α -Pinen führten zur Isolierung von sieben nitratreduzierenden Bakterien, die in der Lage waren, mit Monoterpenen als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Nähere Untersuchungen wurden bisher nur mit den auf oxygenierten Monoterpenen isolierten Bakterien durchgeführt, die als neue Spezies der Gattung *Thauera*, *Thauera linaloolentis* und *Thauera terpenica*, innerhalb der β -Proteobakterien beschrieben wurden (Foß und Harder 1997; Foß 1998; Foß und Harder 1998). Erste physiologische Studien zum Abbau ergaben Hinweise auf unterschiedliche Reaktionen, die im folgenden kurz beschrieben werden.

Thauera linaloolentis Stamm 47Lo1^T wächst mit dem Isolationssubstrat Linalool und mit Geraniol. Die Charakterisierung von Metaboliten in wachsenden Kulturen und enzymatische Tests mit cytosolischem Zellextrakt führten zum Nachweis folgender Reaktion: eine regioselektive Umlagerung des tertiären Alkohols Linalool zu dem primären Alkohol Geraniol. Basierend auf dieser Beobachtung und der transienten Akkumulation von Geraniol wurde für die weitere Mineralisierung der beschriebene Geraniolabbauweg von *P. citronellis* postuliert (Foß und Harder 1997).

Thauera terpenica Stamm 21Mol wächst auf dem Isolationssubstrat Menthol und anderen Menthanalkoholen und -ketonen, die in *meta*-Position zur Methylgruppe eine funktionelle Sauerstoffgruppe tragen. Als Metabolite der anaeroben Oxidation von Menthol wurde Menthon gefunden. Es wird vermutet, daß der Abbau in Analogie zur Oxidation von Cyclohexanol (Dangel et al. 1988; 1989) erfolgen könnte.

Thauera terpenica Stamm 58Eu^T wurde mit Eukalyptol isoliert und wächst in Gegenwart von Nitrat auch mit einigen *p*-Menthanalkenen sowie mit α -Terpineol. Als erste Reaktion beim Abbau von Eukalyptol wurde daher eine intramolekulare Etherspaltung unter Bildung des monozyklischen Intermediats α -Terpineol vorgeschlagen.

5. Zielsetzung

Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen wurde lange Zeit als ein rein aerober Prozeß angesehen. Erst in den letzten zehn Jahren konnte eine anaerobe Mineralisierung von Kohlenwasserstoffen durch Reinkulturen nachgewiesen werden. Verschiedene Bakterien wurden isoliert, die aromatische Verbindungen (Übersicht in: Harwood und Gibson 1997; Heider und Fuchs 1997; Heider et al. 1999), Alkane (Aeckersberg et al. 1991; Rueter et al. 1994; Aeckersberg et al. 1998; Behrends 1999; So und Young 1999) oder Alkene (Schink 1985; Gilewicz et al. 1991) als alleinige organische Kohlenstoffquelle unter strikt anaeroben Bedingungen verwerten. Bisher wurde die Biochemie der Aktivierungsreaktion nur für die aromatische Verbindung Toluol aufgeklärt. Der initiale Schritt ist eine Addition von Fumarat an die Methylgruppe des Toluols, welche zur Bildung von Benzylsuccinat führt (Evans et al. 1992; Biegert et al. 1996; Beller und Spormann 1997a,b; Rabus und Heider 1998; Zengler 1999). Diese Reaktion wird durch die Benzylsuccinat-Synthase, ein Glycinradikal-Enzym, katalysiert (Coschigano et al. 1998; Leuthner et al. 1998). Benzylsuccinat wird anschließend zu Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat beim anaeroben Abbau aromatischer Verbindungen, oxidiert, bevor die Ringreduktion erfolgt.

Harder und Probian (1995) gelang erstmalig die Isolierung von Bakterien mit der Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen zyklische Alkene als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Vier nitratreduzierende Stämme wurden mit den zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen *p*-Menth-1-en (Stamm 51Men), α -Pinen (Stamm 54Pin), 2-Caren (Stamm 62Car) und α -Phellandren (Stamm 65Phen) erhalten. Die Stämme 51Men und 54Pin wurden aus Belebtschlamm (Kläranlage Lintel, Osterholz-Scharmbeck) und die Stämme 62Car

und 65Phen aus Schlammgemischen aus Mischwaldgräben (Bremen) isoliert. Eine erste partielle Charakterisierung der Stämme wurde von S. Foß (1998) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollten ergänzende Untersuchungen unternommen werden, die eine taxonomische und physiologische Charakterisierung der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme ermöglichen. Über die Biochemie der anaeroben Aktivierung nichtpolarisierter C-C-Doppelbindungen von Alkenkohlenwasserstoffen war bis zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Erste Hinweise auf die zentralen Reaktionen der anaeroben Alkenoxidation sollten durch Wachstumsuntersuchungen mit verschiedenen Monoterpenisomeren und definierten Monoterpengemischen sowie durch die Isolierung und Identifizierung von potentiellen Intermediaten gewonnen werden. Als Grundlage für weiterführende biochemische Untersuchungen war der Aufbau einer anaeroben Massenzucht der monoterpenverwertenden Bakterien geplant. Mit der gewonnenen Biomasse sollte die Monoterpenumsetzung in dichten Zellsuspensionen und zellfreien Extrakten, insbesondere in Hinblick auf die Bildung eines ionischen Aktivierungsproduktes, analysiert werden. Zentrales Ziel war die Entwicklung und die Etablierung eines anaeroben Enzymtests, um eine Aufklärung der initialen Aktivierungsreaktion *in vitro* zu ermöglichen.

Monoterpene sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet. In der Regel liegen sie als Substanzgemische vor, die neben Monoterpenen und Monoterpenoiden auch Sesquiterpene und aromatische Verbindungen enthalten. Zur Beurteilung der ökologischen Relevanz der Monoterpenoxidation sollte die Abbaubarkeit dieser natürlichen Gemische am Beispiel verschiedenen ätherischer Öle, in den Reinkulturen und in denitrifizierenden Anreicherungen untersucht werden. Anschließende molekularökologische Populationsanalysen der Anreicherungskulturen sollten durchgeführt werden, um die Häufigkeit und phylogenetische Verbreitung dieser Fähigkeit der anaeroben Monoterpenoxidation abzuschätzen.

B Ergebnisse und Diskussion

1. Beschreibung der vier monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterien

Die monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen waren einander morphologisch und physiologisch sehr ähnlich. Die Zellen aller Isolate waren bewegliche, Gram-negative Stäbchen mit einer Größe von 1,3-1,8 μm x 0,5-0,8 μm . Der G+C Gehalt von Stamm 54Pin betrug $66,9 \pm 0,3$ %. Die Bakterienstämme wuchsen im mesophilen Temperaturbereich mit einem Optimum von 30° C und in einem pH-Bereich von 5,9-8,4, mit einem Optimum bei 6,7-7,5. Alle waren fakultativ anaerob und besaßen einen strikt respiratorischen Metabolismus. Neben Nitrat, Nitrit und Distickstoffoxid wurde auch Sauerstoff als Elektronenakzeptor genutzt. Elementarer Stickstoff konnte als Produkt der Nitratreduktion nachgewiesen werden. In Kulturen mit 10 mM Nitrat wurde eine Nitritakkumulation im Medium nur unter C-limitierten Bedingungen beobachtet. Schwefelverbindungen (Sulfat, Sulfit, Thiosulfat), CO₂ oder Fumarat dienten nicht als Elektronenakzeptoren. Alle Stämme waren in der Lage, neben den Monoterpenen, auch mit einigen Amino- und Fettsäuren zu wachsen. Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen und Alkane wurden nicht verwertet. Eine Vitaminabhängigkeit während des Wachstums auf Monoterpen war nicht feststellbar. Alle Isolate wuchsen ebenfalls unter aeroben Bedingungen auf den Isolationssubstraten.

Die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren der vier Stämme war untereinander weitgehend identisch. Die Fettsäureprofile zeichneten sich bei Wachstum auf Monoterpen durch einen hohen Anteil an Hexadecanoat (22-35 %) und den Cyclopropanfettsäuren, Cycloheptadecanoat (30-33 %) und Cyclononadecanoat (6-8 %), aus, während nach Wachstum auf Acetat neben Hexadecanoat hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren gefunden wurden. Das Vorhandensein von 3-Hydroxy-tetradecanoat ist ein taxonomischer Marker für Pseudomonaden der rRNA-Gruppe II (Vancanneyt et al. 1996). Diese Fettsäure ist ebenfalls in *Alcaligenes* spp., *Achromobacter* spp., *Bordetella* spp. und *Taylorella equigenitalis*

vorhanden (Rossau et al. 1987; Weyant et al. 1995; Vandamme et al. 1996). Das Gesamtprofil der Zellfettsäuren der vier neuen Stämme, nach Wachstum auf Monoterpen, zeigte eine große Ähnlichkeit zu den Fettsäuremustern von *Achromobacter xylosoxidans* und *Alcaligenes faecalis* (Vandamme et al. 1996), während zu den *Bordetella* Spezies deutliche Unterschiede bestanden (Weyant et al. 1995).

Die phylogenetische Einordnung erfolgte auf der Basis der Sequenzdaten der 16S rRNS-Gene. Durch Vergleich mit bekannten Sequenzdaten wurden die Isolate der β -Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet. Sie bilden eine Gruppe innerhalb der Alcaligenaceae, die die Gattungen *Alcaligenes*, *Achromobacter* und *Bordetella* umfaßt (De Ley et al. 1986; Yabuuchi et al. 1998). Die Sequenzen aller vier Stämme waren zueinander sehr ähnlich und hatten den höchsten Ähnlichkeitsgrad mit den 16S rDNS-Sequenzen von *Bordetella parapertussis* (96,7 %), *Achromobacter denitrificans* (96,0 %), *Achromobacter xylosoxidans* (95,8 %) und *Alcaligenes faecalis* (95,2 %). Die *Achromobacter* Spezies sind zur Denitrifikation bzw. zu einer Reduktion bis zum Nitrit fähig, jedoch nicht die untersuchten Bakterienstämme von *Bordetella parapertussis* (Vandamme et al. 1996). Für einige Vertreter der Familie Alcaligenaceae wurde eine aerobe Verwertung von halogenierten und aromatischen Kohlenwasserstoffen beschrieben (Ewers et al. 1990; Weissenfels et al. 1990; Busse et al. 1992). *Achromobacter denitrificans* wurde auch unter denitrifizierenden Bedingungen mit Resorcinol isoliert (Stamm LuBRes1, Gorny et al. 1992).

Basierend auf der Analyse der Bakterienzellfettsäuren und den Unterschieden in den 16S rDNS-Sequenzen von mindestens 3,3 % zu *B. parapertussis*, *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans* und *A. faecalis*, wurde nach den Kriterien von Stackebrandt und Goebel (1994) vorgeschlagen, die monoterpenverwertenden, denitrifizierenden Bakterienstämme als neue Spezies, *A. defragrans*, innerhalb der Gattung *Alcaligenes* mit Stamm 54Pin als Typstamm zu definieren. Die Spezies wurden inzwischen validiert (Int. J. Syst. Bacteriol. (1998) 48: 1083).

Nach Erscheinen der Artbeschreibung (Foß et al. 1998; Teil II-B-1) wurde eine Neubeschreibung der Familie Alcaligenaceae vorgenommen; sie umfaßt zur Zeit die drei Gattungen *Alcaligenes*, *Achromobacter* und *Bordetella*. Ein Teil der zuvor als *Alcaligenes* beschriebenen Spezies, wie z.B. *A. denitrificans* und *A. xylosoxidans*, wurden als

Achromobacter Spezies reklassifiziert und validiert (Yabuuchi et al. 1998; Int. J. Syst. Bacteriol. (1998) 48: 1083).

2. Wachstumsversuche mit *Alcaligenes defragrans*

2.1 Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus

Zur Quantifizierung des anaeroben Abbaus der Monoterpene wurden Untersuchungen mit den Stämmen 54Pin^T und 65Phen durchgeführt. Die Bilanzierung des denitrifizierenden Abbaus der Isolationssubstrate α -Pinen und α -Phellandren zeigte, daß die eingesetzten Monoterpene von den Stämmen sowohl assimiliert als auch vollständig zu CO₂ oxidiert wurden. Die bei der Oxidation des dissimilierten Monoterpens gebildeten Reduktionsäquivalente entsprachen der Menge an Reduktionsäquivalenten, die für die beobachtete Reduktion von Nitrat zu elementarem Stickstoff notwendig waren. Ein Drittel der verbrauchten Menge an Monoterpen wurde zur Bildung von Biomasse assimiliert, während etwa zwei Drittel dissimiliert wurden.

In Experimenten mit Zellsuspensionen und Zellextrakten von Stamm 65Phen wurde eine Umsetzung von β -Myrcen (3,7-Dimethyl-1,3,6-octadien) zu Geraniumsäure (E,E-3,7-Dimethyl-2,6-octadiensäure) beobachtet (Teil I-B-4. u. 5.). In Wachstumsuntersuchungen mit Stamm 65Phen wurde überprüft, ob β -Myrcen unter anaeroben Bedingungen vollständig mineralisiert oder lediglich transformiert wird. Dazu wurden in quantitativen Ansätzen die mikrobiellen Umsetzungen von β -Myrcen und α -Phellandren miteinander verglichen. Die Monoterpene wurden jeweils als alleinige Kohlenstoffquelle (1 mM) mit einem Überschuß an Nitrat (20 mM) zugegeben. Nach 15 Tagen Inkubation waren die Kulturen in der stationären Wachstumsphase. Der Verbrauch von 0,90 mM β -Myrcen und 0,97 mM α -Phellandren korrelierte mit einer Nitratreduktion von 7,6 und 8,1 mM und einer Biomassenbildung von 18,4 und 21,6 mg Protein·l⁻¹. Demnach wird β -Myrcen komplett mineralisiert. Eine Bildung von Geraniumsäure wurde in diesen Ansätzen nicht beobachtet.

2.2 Versuche zur Erweiterung des Substratspektrums

Erste Untersuchungen zur Charakterisierung der vier monoterpenverwertenden Stämme wurden von S. Foß (1998) durchgeführt und zeigten, daß alle vier Stämme mit verschiedenen mono- und bicyklischen Monoterpenen als alleiniger Kohlenstoffquelle wuchsen. Unter denitrifizierenden Bedingungen wurden folgende Verbindungen verwertet: *p*-Menth-1-en, Limonen, α -Phellandren, α -Terpinen, γ -Terpinen, Terpinolen (monozyklische Monoterpenkohlenwasserstoffe), Sabinen, 2-Caren, 3-Caren, α -Pinen, β -Pinen (bicyklische Monoterpenkohlenwasserstoffe) und die Terpenalkohole α -Terpineol und Terpinen-4-ol.

In ergänzenden Untersuchungen zum Substratspektrum wurde gezeigt, daß alle *A. defragrans* Stämme auch azyklische Monoterpene als Kohlenstoffquellen nutzten. So wurde β -Ocimen (3,7-Dimethyl-1,3,6-octatrien) als erstes azyklisches Monoterpen identifiziert, welches ein Wachstum aller vier Stämme ermöglichte. Alle Stämme, mit Ausnahme von Stamm 54Pin^T, wuchsen ebenfalls mit β -Myrcen. Trotz der strukturellen Vielfalt der verwertbaren Monoterpene besaßen alle ein gemeinsames Merkmal: Sie enthielten ein sp^2 -hybridisiertes, methylsubstituiertes Kohlenstoffatom (C1 der *p*-Menthan-Nomenklatur). In Wachstumsuntersuchungen mit verschiedenen Monoterpenisomeren einer Verbindung wurden selektiv die Isomere mit einem sp^2 -hybridisierten C1-Atom anaerob vollständig abgebaut, z.B. Limonen. Das C1- sp^3 -hybridisierte Strukturisomer Isolimonen hingegen wurde von allen vier Stämmen nicht als Substrat verwertet. Diese Ergebnisse wurden am Beispiel weiterer Paare bestätigt: 2-, 3-Caren wurden metabolisiert, während die am C1-Atom sp^3 -hybridisierten Isomere 4-*cis*-, 4-*trans*-Caren kein Wachstum ermöglichten. Auch das azyklische β -Myrcen wurde im Gegensatz zu dem sp^3 -hybridisierten β -Citronellen verwertet. Das bicyklische α -Pinen diente allen Stämmen als Substrat, während das entsprechende gesättigte Isomer *trans*-Pinan kein Wachstumssubstrat darstellte. Moleküle ohne die Isopropylgruppe, wie 1-Methyl-cyclohexen und 1-Methyl-cyclohexa-1,4-dien, wurden im Gegensatz zu den korrespondierenden Monoterpenen, Menth-1-en oder γ -Terpinen, nicht umgesetzt.

Aufgrund der übereinstimmenden Substratmuster wird ein gemeinsamer Abbauweg für die Monoterpenkohlenwasserstoffe vermutet. Für den vollständigen Abbau der Monoterpene durch *A. defragrans* scheint die sp^2 -Hybridisierung am C1-Atom eine essentielle Voraussetzung zu sein. Hingegen sind die Bakterienstämme pCyN1 und pCyN2, die unter nitratreduzierten Bedingungen mit der aromatischen Verbindung *p*-Cymol isoliert wurden, in der Lage, neben einigen aromatischen Kohlenwasserstoffen auch mit den verschiedenen Monoterpenen α -Terpinen, γ -Terpinen, α -Phellandren, Limonen sowie mit dem sp^3 -hybridisierten Isolimonen zu wachsen (Harms 1998; Harms et al. 1999).

2.3 Konkurrenzversuche mit verschiedenen Monoterpenen

Erste Untersuchungen zum denitrifizierenden Wachstum auf Monoterpengemischen wurden von S. Foß (1998) durchgeführt. In den jetzigen Inkubationsstudien sollte die Verwertung von Monoterpenen innerhalb verschiedener Monoterpengemische systematisch untersucht werden.

In Wachstumsversuchen mit definierten, äquimolaren Gemischen verschiedener Monoterpene wurden die angebotenen mono- und bityklischen Verbindungen von allen vier Stämmen nicht sequentiell, sondern gleichzeitig mit unterschiedlichen Raten abgebaut. Anhand der unterschiedlichen Abbauraten wurde für Stamm 65Phen folgende Abbaureihenfolge nachgewiesen: α -Phellandren, Terpinolen, α -Terpinen, Limonen, γ -Terpinen (monozyklische Menthadiene mit je unterschiedlicher Position der Doppelbindungen); α -Pinen, 2-Caren (bityklische Monoterpene mit einer Doppelbindung); und Menth-1-en (Monozyklus mit einer Doppelbindung). Stamm 51Men zeigte nur kleinere Abweichungen innerhalb dieser Serie. Von beiden Stämmen wurden die angebotenen monozyklischen Menthadiene gegenüber den bityklischen Verbindungen bevorzugt verwertet. Dies galt auch für die mit bityklischen Monoterpenen isolierten Stämme 54Pin^T und 62Car, mit der Ausnahme, daß beide Stämme das bityklische Sabinen am effektivsten metabolisierten. Sabinen (1-Isopropyl-4-methylenbicyclo(3.1.0)hexan) ist gekennzeichnet durch einen endozyklischen Propanring, dessen Bindungswinkel eine Ringspannung der Molekülstruktur bewirkt, so daß die Ringöffnung und

die Umlagerung in eine Propylenfunktion thermodynamisch begünstigt ist (Suckling, 1988). In weiteren Wachstumsuntersuchungen wurde überprüft, ob diese erhöhte chemische Reaktivität eine effektivere Verwertung dieser Verbindung begünstigt. In detaillierten Untersuchungen mit den Stämmen 54Pin^T und 65Phen, beide entweder vorgezogen auf α -Phellandren oder Sabinen, wurden von Stamm 54Pin^T weiterhin jeweils Sabinen und von Stamm 65Phen α -Phellandren bevorzugt metabolisiert, wenn beide Verbindungen in einem Gemisch angeboten wurden (Abb. 3). Eine begünstigte Verwertung von Sabinen - ausschließlich bedingt durch die erhöhte Ringspannung - konnte somit ausgeschlossen werden. Der zeitlich parallele Abbau der unterschiedlichen Monoterpene scheint die Hypothese eines einheitlichen Abbauweges zu bestätigen. Dabei besitzen die katabolen Enzyme anscheinend eine erhöhte Affinität gegenüber monozyklischen Menthadienen.

Auch in einem Gemisch der vier Isolationssubstrate (*p*-Menth-1-en, α -Phellandren, α -Pinen, 2-Caren) wurde das monozyklische α -Phellandren von allen vier Isolaten als Substrat bevorzugt verwertet. Die nächst bevorzugte Verbindung war das jeweilige Isolationssubstrat. Dieses Merkmal konnte in Wiederholungsversuchen mehrfach bestätigt werden und ermöglichte erstmals eine physiologische Unterscheidung der vier Stämme. Weitere Differenzierungsmerkmale bestanden darin, daß Stamm 54Pin^T Myrcen und Stamm 62Car Arginin und Gluconat im Vergleich zu den anderen Stämmen nicht als Kohlenstoffquellen nutzten.

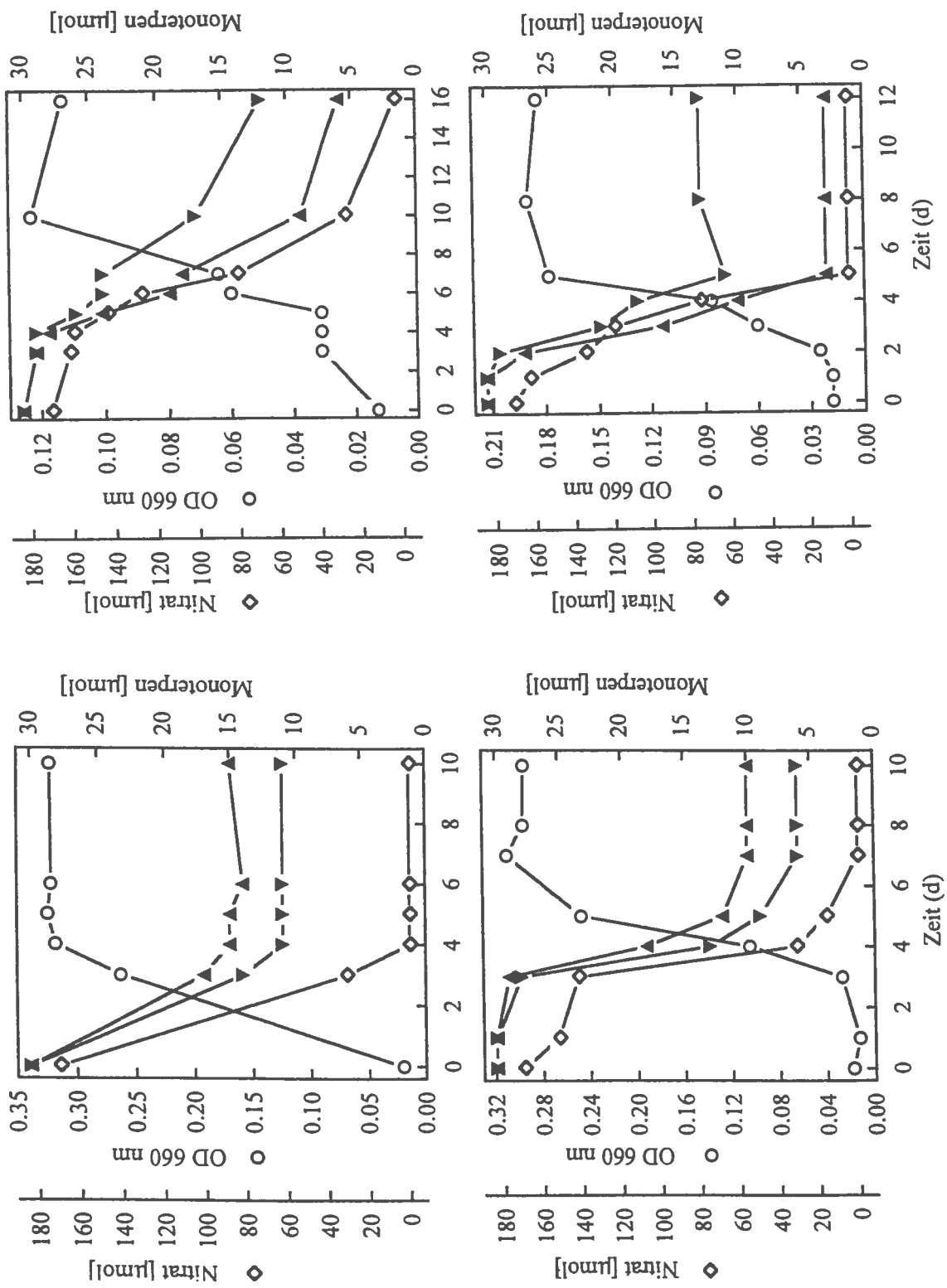


Abb. 3 Wachstum der Stämme 54Pin^T (links) und 65Phen (rechts) auf einem Gemisch aus Sabinen (▼) und α-Phellandren (▲); die Stämme wurden entweder auf Sabinen (oben) oder α-Phellandren (unten) vorgezogen.

2.4 Resistenz von *Alcaligenes defragrans* gegenüber Monoterpenen

Kohlenwasserstoffe mit einem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) zwischen 1 und 5 werden im allgemeinen als toxisch angesehen, u. a. auch die Monoterpene (Isken und Bont 1998; van der Werf et al. 1997). Die Toxizität wird vor allem durch die Akkumulation dieser Verbindungen in den Zellmembranen verursacht. Dies führt letztlich zu einer Aufhebung der Membranintegrität und damit zur Zerstörung des Membranpotentials (Sikkema et al. 1995). Um potentiell toxische Konzentrationen in der wäßrigen Phase zu verhindern, wurden in den Wachstumsansätzen der monoterpenerwertenden Bakterien die Wachstumssubstrate routinemäßig in einer wasserunlöslichen, organischen Trägerphase, 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN) vorverdünnt. In den folgenden Studien wurde das Wachstumsverhalten von *Alcaligenes defragrans* in Gegenwart erhöhter Monoterpenkonzentrationen untersucht.

Alle *Alcaligenes defragrans* Stämme sowie die mit Monoterpenoiden isolierten *Thauera terpenica* Stämme 21 Mol und 58Eu^T als auch *Thauera linaloolentis* waren in der Lage auch ohne HMN-Trägerphase in Gegenwart von 0,07 % (vol/vol) des Isolationssubstrates - übersättigte Lösung - zu wachsen. Die *Alcaligenes defragrans* Stämme 54Pin^T und 65Phen wurden im Detail untersucht; sie zeigten eine Toleranz gegenüber höheren Konzentrationen. Sie wuchsen in Gegenwart von 3 % (vol/vol) Monoterpen. Auch in Anwesenheit von 30 % (vol/vol) Limonen konnte Wachstum vom Stamm 54Pin^T beobachtet werden. Jedoch wurde eine Abnahme der Biomassenbildung von 10 g Protein pro Mol Nitratverbrauch in Gegenwart von 0,1 % (vol/vol) Limonen zu 2 g Protein pro Mol Nitratverbrauch im Ansatz mit 30 % (vol/vol) Limonen festgestellt. Ätherische Öle, die nur Monoterpenkohlenwasserstoffe enthielten (Zitronenöl und Fichtennadelöl), wurden ebenfalls ohne HMN-Phase verwertet.

Diese relative Toleranz gegenüber hohen Monoterpenkonzentrationen von *Alcaligenes defragrans* ist das erste Beispiel für ein anaerobes Bakterium mit der Fähigkeit, in Gegenwart von hohen Konzentrationen an bedingt wasserlöslichen Kohlenwasserstoffen zu wachsen. Aerobe Kohlenwasserstoff-verwertende Bakterien, die in Gegenwart von bis zu 50 % (vol/vol) Toluol oder *p*-Xylol wachsen, wurden bereits beschrieben (Inoue und Horikoshi 1989; Cruden et al. 1992).

Ein möglicher Resistenzmechanismus könnte in der Synthese von Cyclopropanfettsäuren bestehen, die in hoher Konzentration in Zellen von *Alcaligenes defragrans* nach Wachstum auf Monoterpenen gefunden wurden, nicht jedoch in Zellen, die auf Acetat wuchsen. Die physiologische Rolle der Bildung von Cyclopropanfettsäuren ist bislang nicht vollständig verstanden (Grogan und Cronan 1997).

2.5 Massenanzucht von *Alcaligenes defragrans* im Fermenter

Zur Vorbereitung von biochemischen Untersuchungen sollte eine Massenanzucht von *Alcaligenes defragrans* entwickelt und etabliert werden.

Alcaligenes defragrans ist in der Lage, in Gegenwart von hohen Konzentrationen an ungesättigten Monoterpenen zu wachsen; auch die Akkumulation von bis zu 16 mM Nitrit führte zu keiner Hemmung während des Wachstums mit 100 mM Nitrat. Dieses Resistenzverhalten ermöglichte eine Optimierung des bakteriellen Wachstums von Stamm 65Phen in einem pH-regulierten 10-Liter Fermenter durch die einmalige Zugabe von 15-22 mM Monoterpen und 100 mM Nitrat. Auf den Einsatz einer organischen Trägerphase konnte somit verzichtet werden. Die Anzucht von Stamm 65Phen wurde unter anoxischen Bedingungen bei pH 7,0 und einer Temperatur von 30° C durchgeführt. Eine vollständige Nitratreduktion erfolgte nach ca. 5-7 Tagen; dabei wurde eine optische Dichte von 2,5-3,0 erreicht, was einer Feuchtmasse von ca. 37 g entsprach (Abb. 4). Die Zellernte erfolgte jeweils unter strikt anoxischen Bedingungen.

Die maximale Denitrifikationsrate betrug 218 nmol Nitrat·(mg Protein)⁻¹·min⁻¹. Dies entspricht nach den quantitativen Bestimmungen (Teil I-B-2.1) einer Monoterpenoxidationsrate von 31 nmol Monoterpen·(mg Protein)⁻¹·min⁻¹. Wachstumsuntersuchungen in Kultur-röhrchen ergaben unter entsprechenden Bedingungen eine vergleichbare Oxidationsrate von 27 nmol Monoterpen·(mg Protein)⁻¹·min⁻¹.

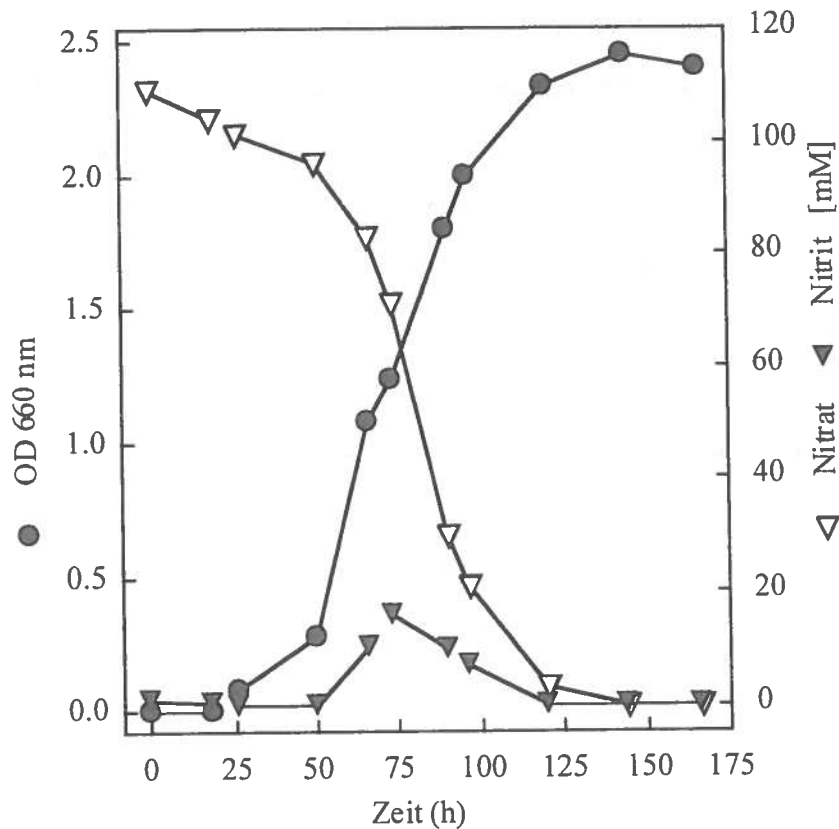


Abb. 4 Massenzucht von *Alcaligenes defragrans* Stamm 65Phen im 10-Liter Fermenter.

3. Metabolite des anaeroben Monoterpenstoffwechsels

3.1 Biotransformation von Isolimonen zu Isoterpinolen

In kometabolischen Wachstumsansätzen mit Limonen und Isolimonen wurde während des Wachstums von *Alcaligenes defragrans* Stamm 54Pin^T die Abnahme von Nitrat und Limonen, aber auch von dem sp³-hybridisierten Isolimonen beobachtet. Gaschromatographische Analysen zeigten die Entstehung einer neuen, neutralen Substanz im stöchiometrischen Verhältnis zur Isolimonen-Abnahme. Diese Verbindung wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht metabolisiert. Durch einen Vergleich des erhaltenen Massenspektrums mit veröffentlichten Spektren (McLafferty und Stauffer 1989) und durch Koinjektionsanalyse mit einem authentischen Standard wurde diese Verbindung als Isoterpinolen identifiziert,

einem C1-sp³-hybridisierten Isomer von Terpinolen. Bei der beobachteten Transformation von Isolimonen zu Isoterpinolen kommt es zu einer Umlagerung der Doppelbindung innerhalb der Isopropenyl-Seitenkette. Die mikrobielle Bildung von Isoterpinolen erfolgte nur in physiologisch aktiven Kulturen und in Gegenwart verwertbarer Monoterpene wie z.B. Limonen, α -Pinen, α -Phellandren, α -Terpinen und γ -Terpinen. In kometabolischen Ansätzen mit den Wachstumssubstraten Glutamat oder Gluconat wurde keine Abnahme oder Biotransformation von Isolimonen beobachtet. Alle vier *A. defragrans* Stämme katalysierten diese allylische Isomerisation der Doppelbindung und zeigten somit eindeutig, daß sie zu Transformationen innerhalb des Kohlenstoffgerüsts von Monoterpenen befähigt sind.

Thauera terpenica 58Eu^T, ein mit Eukalyptol isoliertes Bakterium, war ebenfalls in der Lage, unter nitratreduzierenden Bedingungen mit Limonen und einigen weiteren Monoterpenkohlenwasserstoffen zu wachsen (Foß 1998; Foß et al. 1998). Im Gegensatz zu den *A. defragrans* Stämmen wurde jedoch das Wachstum von *T. terpenica* 58Eu^T auf Limonen in Gegenwart von Isolimonen vollständig unterdrückt.

3.2 Neutrale Metabolite des Abbaus bizyklischer Monoterpene

Während des anaeroben Wachstums von *A. defragrans* auf verschiedenen bizyklischen Monoterpenen (Sabinen, α -, β -Pinen, 2-, 3-Caren) wurde eine Akkumulation von neutralen Produkten bis zu einer Konzentration von 30 μ M beobachtet. Diese mikrobiellen Transformationsprodukte wurden anhand von GC-MS-Analysen als Monoterpene, vor allem Menthadiene, identifiziert (Abb. 5). Azyklische sowie (sauerstoff)-funktionalisierte Monoterpene wurden, mit Ausnahme von Eukalyptol, nicht gefunden. Eine mögliche abiotische Transformation der bizyklischen Monoterpene konnte durch die Analysen von nichtbeimpften Kontrollansätzen ausgeschlossen werden. Ähnliche Transformationsprodukte wurden auch in den ursprünglichen Monoterpenanreicherungen gefunden (Harder und Probian 1995).

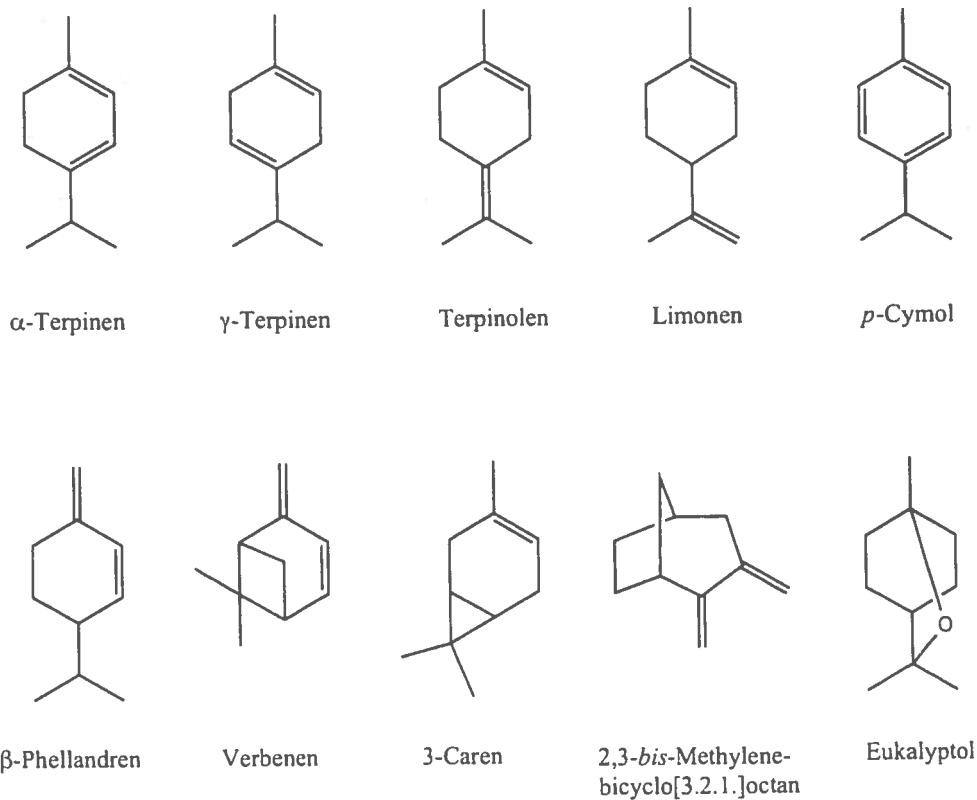


Abb. 5 Neutrale Metabolite des Abbaus bicyklischer Monoterpene durch *A. defragrans* Stamm 54Pin^T.

Die beobachtete Bildung von monozyklischen Menthadienen während des Wachstums auf bicyklischen Substraten deutet auf eine anfängliche Umlagerung der bicyklischen Strukturen zu monozyklischen Verbindungen hin, von denen dann der weitere Abbau der Monoterpene ausgeht. Entsprechende thermisch- und säure-katalysierte Umlagerungen bicyklischer Strukturen sind bekannt (Erman 1985; Cruz Costa et al. 1996) und werden zum Teil für die industrielle Synthese von mono- und azyklischen Monoterpene genutzt (Bauer und Grabe 1992). Auch beim aeroben Abbau von α -Pinen in *Pseudomonas* Stamm PL wurde eine entsprechende Transformation von α -Pinen zum monozyklischen Limonen postuliert (Shukla und Bhattacharyya 1968). Ebenso erfolgt die Biosynthese der bicyklischen Verbindungen über das monozyklische α -Terpinyl-Kation (McCaskill und Croteau 1997, Gibbs 1998). Diese Hypothese vom monozyklischen Intermediat scheint bestätigt durch die Beobachtung des gleichzeitigen Abbaus von mono- und bicyklischen Strukturen, wobei

monozyklische Menthadiene scheinbar bevorzugt werden. Die kometabolische Studie mit Isolimonen belegt, daß *A. defragrans* zu Transformationen innerhalb des Kohlenstoffgerüsts von Monoterpenen befähigt ist. Eine initiale Aktivierung durch Hydratisierung der Alkene zu den entsprechenden Alkoholen ist unwahrscheinlich, da Monoterpenalkohole in Wachstumsansätzen nicht detektiert wurden und die Alkohole das mikrobielle Wachstum von *Alcaligenes defragrans* auf Monoterpenen spezifisch hemmen (Foß 1988; Teil II-B-4). Ähnliche Beobachtungen einer inhibitorischen Wirkung von Benzylalkoholen auf den anaeroben Abbau von Toluol in nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien wurden beschrieben (Altenschmidt und Fuchs 1992; Rabus und Widdel 1995).

Eine Aromatisierung von Menthadienen zu dem Dead-End-Produkt *p*-Cymol wurde auch in nitratreduzierenden (Harder und Probian 1995) und in methanogenen Anreicherungen (Harder und Foß 1999) beobachtet. Eine *p*-Cymol-Bildung durch anaerobe Transformation von α -Terpinen wurde ebenfalls für Bakterien des Intestinaltraktes von Raupen der Mottenart *Spodoptera litura* Fabricius beschrieben. Aufgrund der Detektion von 4-Isopropyl-1,3-cyclohexadienmethanol, ein aerobes Transformationsprodukt von α -Terpinen, wird jedoch eine Anwesenheit von Sauerstoff während des Versuchs vermutet (Miyazawa et al. 1996).

3.3 Isolierung und Identifizierung saurer Metabolite

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Substratpräferenz, die aufgefundenen neutralen Metabolite und die Isolimonenumwandlung sprechen für ein Menthadien mit einem sp^2 -hybridisierten C1-Atom als Edukt für die zentrale Abbaureaktion. Die initiale Aktivierung des Menthadiens könnte über die Bildung einer ionischen, intrazellulär fixierten Verbindung verlaufen. Zur weiteren biochemischen Charakterisierung der Abbaureaktionen wurden Zellen aus der Massenzucht auf eventuell gebildete ionische Monoterpenverbindungen untersucht.

Nach anaerobem Wachstum mit Nitrat und einem Überschuß an α -Phellandren (22 mM) wurden sowohl aus Zellen vom Stamm 65Phen als auch aus dem Kulturüberstand freie organische Säuren mit zehn Kohlenstoffatomen isoliert. Die gebildeten Säuren wurden mittels GC-MS, GC, HPLC und durch Koinjektionsanalyse mit authentischen Standards identifiziert. Die aromatische Verbindung Cuminsäure (*p*-Isopropylbenzoesäure) wurde sowohl in den Zellen als auch im Kulturüberstand, in Konzentrationen von 25 und 20 μ M, gefunden. *p*-Isopropylbenzoesäure wurde ebenfalls in den Wachstumsüberständen von *p*-Cymol-verwertenden, nitratreduzierenden Bakterien nachgewiesen (Harms 1998, Harms et al. 1999). Azyklische Geraniumsäure akkumulierte in den Zellen bis zu einer Konzentration von 470 μ M; im Gegensatz dazu wurden im Kulturüberstand nur etwa 2 μ M gefunden. Anhand von GC- und HPLC-Untersuchungen wurde gezeigt, daß diese Verbindungen nicht in den zugegebenen Wachstumssubstraten enthalten waren, wobei die Nachweisgrenze für Geraniumsäure bei der HPLC-Methode bei 1 μ M lag. Neben den auf α -Phellandren gewachsenen Zellen wurde die Bildung der Geraniumsäure auch in mit Limonen gewachsenen Zellen beobachtet. Eine Akkumulation dieser Säure wurde nur in Nitrat-limitierten Zellen, nicht aber in Monoterpen-limitierten Zellen nachgewiesen. Anaerob auf Acetat und Nitrat und aerob auf Limonen gewachsene Zellen enthielten keine Geraniumsäure.

Mit der Isolierung von Geraniumsäure wurde erstmalig eine ionische Substanz als spezifisches Produkt des anaeroben Monoterpenabbaus gefunden. Die Bedeutung dieser Verbindung für den anaeroben Abbau der Monoterpene sollte in nachfolgenden Studien mit Zellsuspensionen und zellfreien Extrakten eingehend untersucht werden.

4. Zellsuspensionsversuche mit *Alcaligenes defragrans*

In Untersuchungen mit dichten Zellsuspensionen sollten die Umsatzraten von α -Phellandren und Nitrat quantitativ bestimmt werden, um zu überprüfen, ob die geernteten Zellen aus der Massenanzucht weiterhin physiologisch aktiv waren. Um zu verhindern, daß während der Untersuchungen eine Denitrifikation mit Speicherstoffen als Elektronendonator erfolgte, wurden Zellen vom Stamm 65Phen mit einer limitierenden Menge an Limonen relativ zum vorhandenen Elektronenakzeptor (Nitrat) im Fermenter angezogen. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase unter strikt anoxischen Bedingungen geerntet.

Die untersuchten Zellsuspensionen reduzierten Nitrat und verbrauchten α -Phellandren mit einer spezifischen Rate von $123 \text{ pmol} \cdot (\text{mg Protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Durch Hitze inaktivierte Zellen metabolisierten weder Nitrat noch das zugegebene Monoterpen (Abb. 6). Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, die Umsetzung von Monoterpenen in Zellsuspensionen zu untersuchen.

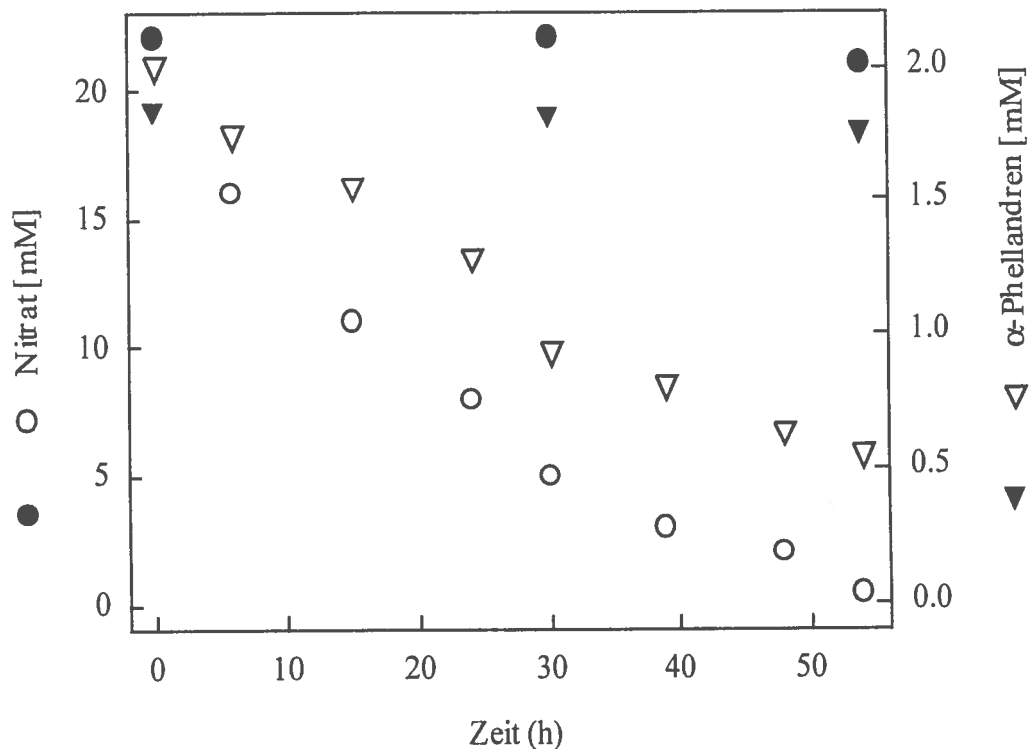


Abb. 6 Untersuchungen in dichten Zellsuspensionen mit nativen Zellen (offene Symbole) und hitze-inaktivierten Zellen (geschlossene Symbole) von Stamm 65Phen. (Einzelansätze mit reinem Phellandren, die zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert wurden.)

Die Biomassen aus den Nitrat-limitierten Fermentationen enthielten neben der Geraniumsäure auch Restmengen an Monoterpen (Wachstumssubstrat), möglicherweise assoziiert an die Lipidphasen der Zellen. Solche auf α -Phellandren gewachsene Zellen wurden für Untersuchungen zum Abbau der intrazellulär akkumulierten Geraniumsäure in dichten Zellsuspensionen verwendet. In dem Suspensionsansatz ohne Nitrat stieg die Konzentration an Geraniumsäure während des Untersuchungszeitraumes von 101 μM auf 370 μM . In der denitrifizierenden Zellsuspension wurde ein anfänglicher Anstieg der Geraniumsäure bis zu 195 μM beobachtet. Nach dem Verbrauch des Nitrats stieg die Konzentration auf 341 μM . Die Bildung von Geraniumsäure ist möglicherweise auf den Abbau von Restmengen an α -Phellandren zurückzuführen. Eine Verwertung der intrazellulär gebildeten Geraniumsäure setzte in der denitrifizierenden Suspension nach dem Verbrauch von mehr als 16 mM Nitrat ein. Am Ende des Untersuchungszeitraumes wurde in dem denitrifizierenden Ansatz eine 80%ige Abnahme der intrazellulären Geraniumsäure nachgewiesen.

Die bisher gefundenen Mengen an Geraniumsäure waren gering im Vergleich zu den angebotenen Mengen an Monoterpen. In Zellsuspensionen mit einer limitierten Menge an Nitrat wurde der Einfluß von unterschiedlichen Monoterpenen auf die Bildungsrate von Geraniumsäure untersucht. Ausgehend von den zyklischen Monoterpenen, α -Pinen, Limonen und α -Phellandren, bildeten die denitrifizierenden Zellen 50, 54 und 68 μM Geraniumsäure innerhalb von 48 h. Die azyklische Verbindung β -Myrcen hingegen erbrachte die Synthese von 508 μM Geraniumsäure; dies entsprach einer Transformation von 13 % des eingesetzten Substrats. Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen an β -Myrcen zeigten eine enge Korrelation zwischen der Bildung von Geraniumsäure und der angebotenen Menge an β -Myrcen. Mit den weiteren azyklischen Monoterpenen, β -Citronellen oder β -Ocimen, wurde keine Bildung der Geraniumsäure beobachtet. Anhand von GC-Analysen wurde eindeutig gezeigt, daß die in Gegenwart der zyklischen Monoterpene gebildeten Mengen von Geraniumsäure nicht auf eventuelle Myrcen-Verunreinigungen dieser Verbindungen zurückzuführen waren.

5. Anaerobe Umsetzung von Monoterpenen *in vitro*

Nach anaerobem Aufschluß der Zellen von Stamm 65Phen mittels French-Press und anschließender Ultrazentrifugation wurde die katalytische Aktivität der β -Myrcen-Umsetzung zu über 90 % in der löslichen Fraktion wiedergefunden. In kinetischen Studien wurde nach kurzer lag-Phase eine zeitlich lineare Umsetzung von β -Myrcen zu Geraniumsäure beobachtet, wobei insgesamt 6 % des eingesetzten β -Myrcens (10 mM) innerhalb von 24 h umgesetzt wurden. Während dieser Zeit betrug die Geraniumsäure-Bildungsrate $52 \text{ pmol} \cdot (\text{mg Protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, bei einer Proteinkonzentration von $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Verdünnte Extrakte zeigten dem Verdünnungsfaktor entsprechend eine niedrigere Aktivität. Die beobachtete Bildung erfolgte nur in Gegenwart von Myrcen und benötigte kein Nitrat. Inkubation des Extraktes für zehn Minuten bei 95° C führte zu einer vollständigen Inaktivierung der Geraniumsäure-Bildung. Die gemessene Umsatzrate ist vergleichbar mit der spezifische Aktivität der Benzylsuccinat-Synthase, dem Schlüsselenzym der anaeroben Toluol-Aktivierung, die in ähnlich präparierten Rohextrakten von *Thauera aromatica* mit $49 \text{ pmol} \cdot (\text{mg Protein})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bestimmt wurde (Leuthner et al. 1998).

Mit der Isolierung von Geraniumsäure wurde erstmalig ein ionisches Produkt der anaeroben Aktivierung von nichtaromatisierten Kohlenwasserstoffen gefunden. In den Zellsuspensionen konnte eindeutig eine Transformation von zyklischen und azyklischen Monoterpenen zu Geraniumsäure nachgewiesen werden.

Die Umsetzung der zyklischen Monoterpene erfordert eine Ringöffnung. Als mögliche Reaktion wäre eine Dezyklisierung über eine kationische Zwischenstufe denkbar (Abb. 7), die eine Umkehrung der pflanzlichen Biosynthese von zyklischen Monoterpenen darstellt (Croteau 1987; Gibbs 1988). Ein Abbau der intrazellulär gebildeten Geraniumsäure wurde in Zellsuspensionen in Gegenwart von Nitrat nachgewiesen. Geraniumsäure ist nur als Isomergemisch mit Nerylsäure erhältlich. Dieses Isomergemisch wurde von den *A. defragrans* Stämmen nicht als Wachstumssubstrat verwertet. Mit der Umsetzung von β -Myrcen zu Geraniumsäure im zellfreien Extrakten konnte der erste *in vitro* Enzymtest für die anaerobe Alken-Transformation entwickelt und etabliert werden. Dieses ermöglicht die weitere

Aufklärung dieser Reaktion und ihre Bedeutung bei der initialen Aktivierung der nichtpolarisierten C-C-Doppelbindungen von Alkenkohlenwasserstoffen auf der Grundlage von enzymatischen Untersuchungen, die möglicherweise eine Isolierung der beteiligten Enzyme erlauben.

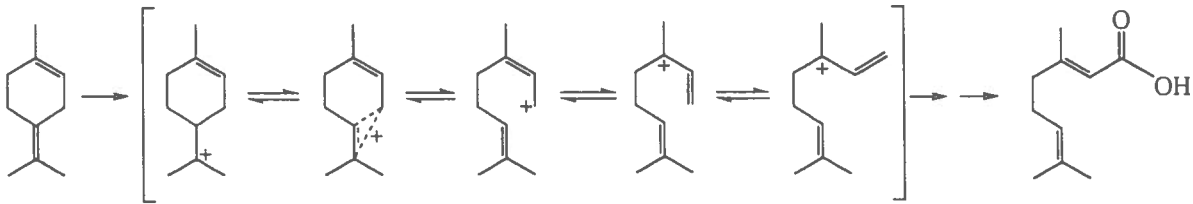


Abb. 7 Vorgeschlagene Ringöffnungsreaktion zyklischer Monoterpene.

6. Ökologische Aspekte

Alcaligenes defragrans ist in der Lage, mit definierten Monoterpengemischen zu wachsen. In weiteren Studien mit verschiedenen ätherischen Ölen als Beispiele für natürliche Monoterpengemische sollte die ökologische Relevanz der anaeroben Monoterpenoxidation bewertet werden. Erste Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Fichtennadelöl wurden bereits von S. Foß (1998) beschrieben.

Die natürlich vorkommenden ätherischen Öle variieren in ihrer chemischen Zusammensetzung: Einerseits können sie fast ausschließlich Monoterpenkohlenwasserstoffe enthalten, andererseits einen hohen Anteil an Monoterpenoiden (Formáček und Kubeczka 1982). Für die Untersuchungen wurden Zitronenöl, Kiefernadelöl und Petersiliensamenöl als Vertreter der ersten Gruppe und Campher-, Salbei-, Fenchel-, Minz- und Thymianöl als Beispiele für die zweite Gruppe ausgewählt. Um potentiell toxische Wirkungen von Inhaltsstoffen dieser Öle abzuschätzen, wurden sie in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, sowohl in HMN verdünnt als auch unverdünnt, zugegeben. Die Abbaubarkeit dieser ätherischen Ölen unter anoxischen, denitrifizierenden Bedingungen wurde

in Reinkulturen von *Alcaligenes defragrans* und in Anreicherungskulturen geprüft. Als Inokulum für die Anreicherungskulturen diente Belebtschlamm (Kläranlage Lintel, Osterholz-Scharmbeck) und Waldgrabenschlamm (Hambergen). Der Grabenschlamm erwies sich dabei als ungeeignetes Inokulum, möglicherweise zurückzuführen auf endogene toxische Inhaltsstoffe. GC-MS-Analysen der ätherischen Öle und GC-Analysen der Öle nach dem mikrobiellen Wachstum ermöglichten die Identifikation der Komponenten, die biologisch verwertet wurden. Zur Überprüfung, ob die angereicherten Bakterien phylogenetisch verwandt waren mit den *A. defragrans* Stämmen, wurde die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen mittels in situ Hybridisierung mit Gruppen-spezifischen Oligonukleotidsonden und der Spezies-spezifischen Ade441-Sonde für *Alcaligenes defragrans* (Rabus et al. 1999) analysiert.

6.1 Ätherische Öle als Wachstumssubstrat für *Alcaligenes defragrans*

Eine Nitratreduktion durch *Alcaligenes defragrans* Stamm 54Pin^T konnte auf allen Ölen in Gegenwart der HMN-Trägerphase beobachtet werden. Die anschließenden GC- und GC-MS-Analysen zeigten, daß in allen Ölen, mit Ausnahme von Minz- und Thymianöl, eine Verwertung der Monoterpene erfolgte, die schon früher als Wachstumssubstrate identifiziert wurden. Wachstum und eine vollständige Reduktion der eingesetzten 10 mM Nitrat wurde nur bei den hauptsächlich aus ungesättigten Monoterpenkohlenwasserstoffen bestehenden Zitronen-, Kiefernnadel- und Petersiliensamenöl beobachtet. Die unvollständige Nitratreduktion mit Campher-, Salbei- und Fenchelöl ist vermutlich auf einen Mangel an verwertbaren Monoterpenen innerhalb dieser Öle zurückzuführen, wohingegen Inhaltsstoffe des Minz- und Thymianöls anscheinend die Verwertung der nutzbaren Monoterpenverbindungen hemmten. Ohne HMN-Phase erfolgte Wachstum und eine vollständige Nitratreduktion nur mit Zitronen- und Kiefernnadelöl. Im Vergleich zu den HMN-Kulturen wurde ein geringerer Nitratverbrauch beobachtet, wenn Petersilien-, Fenchel-, Minz- oder Thymianöl direkt zugegeben wurde. Dies läßt auf eine toxische Wirkung dieser Öle auf *Alcaligenes defragrans* bei erhöhten Konzentrationen der Öle schließen.

6.2 Ätherische Öle als Wachstumssubstrat für Anreicherungskulturen

Ausgehend vom Belebtschlamm führten alle ätherischen Öle, mit Ausnahme von Thymianöl, innerhalb von vier Monaten zu erfolgreichen Anreicherungen, wenn sie in HMN verdünnt vorlagen. Hauptsächliche Komponenten des Thymianöls sind die aromatischen Verbindungen *p*-Cymol und Thymol. Erst kürzlich wurden zwei Bakterien isoliert, die in der Lage sind, unter anoxischen Bedingungen mit *p*-Cymol zu wachsen (Harms 1998; Harms et al. 1999). Der Abbau von Thymol wurde bisher nur für ein aerobes Bakterium beschrieben (Dagley 1971). In Untersuchungen mit aeroben Bakterien wurde von Knobloch et al. (1986) Thymol als das toxischste aller Monoterpene identifiziert.

Die einzigen Öle, die eine erfolgreiche Anreicherung auch ohne HMN-Phase ermöglichten, waren Zitronenöl und Kiefernadelöl. Die nicht erfolgte Anreicherung mit Petersiliensamen-, Campher-, Salbei-, Fenchel- und Minzöl ist möglicherweise auf toxische Effekte verschiedener Inhaltsstoffe, z.B. Polymethoxypropenylbenzole im Petersiliensamenöl, *p*-Methoxypropenylbenzole und Fenchon im Fenchelöl sowie auf den hohen Gehalt an Monoterpenalkoholen im Campher-, Salbei- und Minzöl zurückzuführen. Hingegen waren Salbei-, Minz-, Petersiliensamen- und Campheröl verwertbare Kohlenstoffquellen, wenn sie in einer HMN-Trägerphase vorverdünnt wurden.

Verbindungen, die in den verschiedenen Ölen durch die angereicherten Mikroorganismen metabolisiert wurden, entsprachen den Wachstumssubstraten der bisher auf Monoterpenen isolierten Bakterienstämme (*Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica* und *Thauera linaloolentis*). Zusätzlich wurde eine Abnahme von Bornylacetat, α -, β -Thujon, Campher und Borneol beobachtet. Methoxypropenylbenzole, Estragol, *cis*- und *trans*-Anethol wurden in den Anreicherungskulturen mit Fenchelöl teilweise verwertet. Petersiliensamenöl ist charakterisiert durch die aromatischen Insektizide Apiol und Myristicin. Eine Abnahme dieser Antibiotika und zwei verwandter Verbindungen Elemicin und 1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzol (1,2,3,4-TMPB) konnte in den Anreicherungen mit Petersiliensamenöl beobachtet werden.

Die molekulare Populationsanalyse ergab, daß die erhaltenen denitrifizierenden Bakterienpopulationen nicht von den bisher auf Monoterpenen isolierten Stämmen (*Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica* und *Thauera linaloolentis*) dominiert wurden; dies ist ein Anzeichen für die weite Verbreitung dieser metabolischen Fähigkeit der anaeroben Monoterpenoxidation unter Mikroorganismen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den zuvor von S. Foß (1998; Teil II-B-5) durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl monoterpenverwertender, nitratreduzierender Bakterien. MPN-Zählungen belegten, daß ca. 1 % der nitratreduzierenden Gesamtpopulation im Belebtschlamm und nahezu 100 % der Bakterien eines Fichtenwaldbodens zur Monoterpenoxidation befähigt waren.

Die beobachtete Diversität steht im Kontrast zu der phylogenetisch selektiven Anreicherung der vier *Alcaligenes defragrans* Stämme. Um zu überprüfen, ob möglicherweise die beschriebene Monoterpentoleranz dafür verantwortlich ist, wurden nochmals Anreicherungskulturen mit Belebtschlamm (Kläranlage Lintel, Osterholz-Scharmbeck) gestartet, in denen die Monoterpene ohne organische Trägerphase zugesetzt wurden. Innerhalb von fünf Wochen konnte bakterielles Wachstum und ein Verbrauch von mehr als 30 mM Nitrat mit *p*-Menth-1-en, allen getesteten Menthadienen (α -Phellandren, α -Terpinen, γ -Terpinen und Limonen) sowie mit Geraniumsäure beobachtet werden. Die Monoterpenverbindungen α -Pinen, *p*-Cymol und Menthol führten zu keiner erfolgreichen Anreicherung innerhalb des Untersuchungszeitraumes. Die anschließende molekularökologische Analyse der Anreicherungen bestätigte den Einfluß der erhöhten Monoterpenkonzentration auf die phylogenetische Zusammensetzung der sich entwickelnden Bakterienpopulationen. Während im Belebtschlamm nur eine geringe Anzahl an *Alcaligenes defragrans*-verwandten Bakterien gefunden wurden, machten diese nach erfolgter Anreicherung den wesentlichen oder sogar den dominanten Anteil innerhalb der mikrobiellen Population aus.

Literaturverzeichnis

- Abraham, W.R., Stumpf, B., Kieslich, K. (1986) Microbial transformation of terpenoids with 1-*p*-menthene skeleton. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 24-30.
- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 4-14.
- Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Widdel, F. (1998) Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 170: 361-369.
- Altenschmidt, U., Fuchs, G. (1992) Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* 174: 4860-4862.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R., Knowles, R. (1998) Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 520-525.
- Andrews, R.E., Parks, L.W., Spence, K.D. (1980) Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 301-304.
- Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A. (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10600-10605.
- Baldwin, I.T., Schultz, J.C. (1983) Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: Evidence for communication between plants. *Science* 221: 277-279.

- Ballal, N.R., Bhattacharyya, P.K., Rangachari, P.N. (1966) Perillyl alcohol dehydrogenase from a soil *Pseudomonad*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 473-478.
- Ballal, N.R., Bhattacharyya, P.K., Rangachari, P.N. (1967) Perillyl aldehyde dehydrogenase from a soil *Pseudomonad*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29: 275-280.
- Ballal, N.R., Bhattacharyya, P.K., Rangachari, P.N. (1968) Microbiological transformation of terpenes. Part XIV. Purification & properties of perillyl alcohol dehydrogenase. *Indian J. Biochem.* 5: 1-6.
- Barbirato, F., Verdoes, J.C., de Bont, J.A.M., van der Werf, M.J. (1998) The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases. *FEBS Lett.* 438: 293-296.
- Bauer, K., Grabe, D. (1982) Riech- und Aromastoffe, Band 20, pp. 199-262. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- Behrends, A. (1999) Physiologie und substratspezifische Proteinbildung denitrifizierender Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation kurzkettiger Alkane. Dissertation, Universität Bremen.
- Beller, H.R., Spormann, A.M. (1997a) Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* 179: 670-676.
- Beller, H.R., Spormann, A.M. (1997b) Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3729-3731.

- Best, D.J., Floyd, N.C., Magalhaes, A., Burfield, A., Rhodes, P.M. (1987) Initial steps in the degradation of α -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis* 1: 147-159.
- Biegert, T., Fuchs, G., Heider, J. (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* 238: 661-668.
- Billinger, J., Sherman, P.W. (1998) Antimicrobial functions of spices. Why some like it hot. *Q. Rev. Biol.* 73: 3-49.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R. (1998) Plant terpenoids synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4126-4133.
- Bohlmann, J., Steele, C.L., Croteau, R. (1997) Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) - cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)(4S)-limonene synthase, and (-)(1S,5S)-pinene synthase. *J. Biol. Chem.* 272: 21784-21792.
- Bolin, B. (1983) The carbon cycle, pp. 41-45. In: B. Bolin und R.B. Cook (eds.), *The major biogeochemical cycles and their interactions*. John Wiley Sons, Chichester, England.
- Busse, H.J., El-Banna, T., Oyaizu, H., Auling, G. (1992) Identification of xenobiotic isolates from the beta subclass of the *Proteobacteria* by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 19-26.
- Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., Higgins, D.P. (1989) Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *J. Food Sci.* 54: 1241-1245.

- Cantwell, S.G., Lau, E.P., Watts, D.S., Fall, R.R. (1978) Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 135: 324-333.
- Chang, H.C., Gage, D.A., Oriel, P. (1995) Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *J. Food Sci.* 60: 551-553.
- Chang, H.C., Oriel, P. (1994) Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolation of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Food Sci.* 59: 660-662, 686.
- Coschigano, P.W., Wehrman, T.S., Young, L.Y. (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.
- Croteau, R. (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87: 929-954.
- Cruden, D.L., Wolfram, J.H., Rogers, R.D., Gibson, D.T. (1992) Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2723-2729.
- Cruz Costa, M.C., Johnstone, R.A.W., Whittaker, J.D. (1996) Catalysis of gas and liquid phase ionic and radical rearrangements of α - and β -pinene by metal(IV)phosphate polymers. *J. Mol. Cat. A: Chem.* 104: 251-259.
- Dagley, S. (1971) Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Adv. Micro. Physiol.* 6: 1-46.
- Dangel, W., Tschech, A., Fuchs, G. (1988) Anaerobic metabolism of cyclohexanol by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 150: 358-362.

- Dangel, W., Tschech, A., Fuchs, G. (1989) Enzyme reactions involved in anaerobic cyclohexanol metabolism by a denitrifying *Pseudomonas* species. Arch. Microbiol. 152: 273-279.
- De Ley, J., Segers, P., Kersters, K., Mannheim, W., Lievens, A. (1986) Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, *Alcaligenaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 405-414.
- Dhavalikar, R.S., Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbial transformation of terpenes. Part VIII. Fermentation of limonene by a soil *Pseudomonad*. Indian J. Biochem. 3: 144-157.
- Dhavalikar, R.S., Rangachari, P.N., Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbiological transformations of terpenes. Part IX. Pathway of degradation of limonene in a soil *Pseudomonad*. Indian J. Biochem. 3: 158-164.
- Ensign, A.S., Small, F.J., Allen, J.R., Sluis, M.K. (1998) New roles for CO₂ in the microbial metabolism of aliphatic epoxides and ketones. Arch. Microbiol. 169: 179-187.
- Erman, W.F. (1985) Chemistry of the monoterpenes: An encyclopedic handbook, Part A. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Evans, P.J., Ling, W., Goldenschmidt, B., Ritter, E.R., Young, L.Y. (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. Appl. Environ. Microbiol. 58: 496-501.
- Ewers, J., Freier-Schröder, D., Knackmuss, H.J. (1990) Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. Arch. Microbiol. 154: 410-413.

- Fall, R.R., Brown, J.L., Schaeffer, T.L. (1979) Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. Appl. Environ. Microbiol. 38: 715-722.
- Fichan, I., Larroche, C., Gros, J.B. (1999) Water solubility, vapor pressure, and activity coefficients of terpenes and terpenoids. J. Chem. Eng. Data 44: 56-62.
- Formáček, V., Kubeczka, K.H. (1982) Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. John Wiley Sons, Chichester, New York, Brisbane.
- Foß, S. (1998) Mikrobieller Abbau isoprenoider Natustoffe: Anaerobe Oxidation von Monoterpenen durch nitratreduzierende Bakterien. Dissertation, Universität Bremen.
- Foß, S., Harder, J. (1997) Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. FEMS Microbiol. Lett. 149: 71-75.
- Foß, S., Harder, J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. Syst. Appl. Microbiol. 21: 365-373.
- Gershenzon, J., Croteau, R. (1991) Terpenoids, pp. 165-219. In: G.A. Rosenthal und M.R. Berenbaum (eds.), Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites, 2nd Ed. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Gibbon, G.H., Pirt, S.J. (1971) The degradation of α -pinene by *Pseudomonas* PXI. FEMS Lett. 18: 103-105.

- Gibbs, R.A. (1998) Prenyl transfer and the enzymes of terpenoid and steroid biosynthesis, pp. 31-118. In: M. Sinnott (ed.), *Comprehensive biological catalysis: a mechanistic reference*, Vol. 1., Academic Press, London.
- Gilewicz, M., Monpert, G., Acquaviva, M., Mille, G., Bertrand, J.C. (1991) Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 252-256.
- Gorny, N., Wahl, G., Brune, A., Schink, B. (1992) A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 158: 48- 53.
- Griffiths, E.T., Bociek, S.M., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Sissons, D.J., Trudgill, P.W. (1987a) Bacterial metabolism of α -pinene: Pathway from α -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P18.3. *J. Bacteriol.* 169: 4972-4979.
- Griffiths, E.T., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Trudgill, P.W. (1987b) Purification and properties of α -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. strain P18.3. *J. Bacteriol.* 169: 4980-4983.
- Grogen, D.W., Cronan, J.E. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 429-441.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Gradel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W.A., Pierce, T., Schules, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J., Zimmerman, P. (1995) A global model of natural volatile organic compound emission. *J. Geophys. Res.-Atmosph.* 100: 8873-8892.
- Harder, J., Foß, S. (1999) Anaerobic formation of the aromatic *p*-cymene from monoterpenes by methanogenic enrichment cultures. *Geomicrobiol. J.* 16: 295-305.

- Harder, J., Probian, C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3804-3808.
- Harder, J., Probian, C. (1997) Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 167: 269-274.
- Harms, G. (1998) Anaerober Abbau von *p*-Cymen und anderen Dialkylbenzenen durch neu isolierte Bakterienarten. Dissertation, Universität Bremen.
- Harms, G., Rabus, R., Widdel, F. (1999) Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon, *p*-cymene, by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.*, in press.
- Harwood, C.S., Gibson, J. (1997) Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: A process unique to prokaryotes? *J. Bacteriol.* 179: 301-309.
- Heider, J., Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* 243: 577-596.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 459-473.
- Hirschler, A., Rontani, J.F., Raphel, D., Matheron, R., Bertrand, J.C. (1998) Anaerobic degradation of hexadecan-2-one by a microbial enrichment culture under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1576-1579.
- Hoffmann, W., Janitschke, L., Fleig, H. (1982) Terpene, Band 22, pp. 535-552. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.

- Hulin, V., Mathot, A.G., Mafart, P., Dufosse, L. (1998) Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. *Sci. Aliment.* 18: 563-582.
- Hungund, B.L., Bhattacharyya, P.K., Rangachari, P.N. (1970) Terminal oxidation pattern of a soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Arch. Microbiol.* 71: 258-270.
- Inoue, A., Horikoshi, K. (1989) A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338: 264-266.
- Isken, S., de Bont, J.A.M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* 2: 229-238.
- Iurescia, S., Marconi, A.M., Tofani, D., Gambacorta, A., Paternò, A., Devirgiliis, C., van der Werf, M.J. (1999) Identification and sequencing of β -myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2871-2876.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Svendsen, A.B. (1987) Antimicrobial activity of essential oils- a 1976-1986 literatur-review- aspects of the test methods. *Planta Med.* 53: 395-398.
- Jones, K.H., Smith, R.T., Trudgill, P.W. (1993) Diketocamphane enantiomer-specific "Baeyer-Villiger" monooxygenases from camphor-grown *Pseudomonas putida* ATCC 17453. *J. Gen. Microbiol.* 139: 797-805.
- Karp, F., Croteau, R. (1988) Role of hydroxylases in monoterpene biosynthesis, pp. 173-198. In: P. Schreier (ed.), *Bioflavour '87*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Kieslich, K. (1976) *Microbial transformation of non-steroid cyclic compounds*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumpf, K., Thede, B., Washausen, P. (1986) Transformation of terpenoids, pp. 367-394. In: E.J. Brunke (ed.) Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weis, N., Weigand, H. (1988) Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests, pp. 287-299. In: P. Schreier (ed.), Bioflavour '87. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.M., Vigenschow, H. (1986) Action of monoterpenoids on energy metabolism, pp. 429-446. In: E.J. Brunke (ed.), Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Leavitt, P.R. (1993) A review of factors that regulate carotenoid and chlorophyll deposition and fossil pigment abundance. *J. Paleolimnol.* 9: 109-127.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schrägger, H., Heider, J. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* 28: 615-628.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., Schwender, J. (1997b) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101: 643-652.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997a) Biosynthesis of isoprenoids in higher-plant chloroplasts via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400: 271-273.
- Loomis, W.D., Croteau, R. (1980) Biochemistry of terpenoids, pp. 363-419. In: P.K. Stumpf (ed.), *The Biochemistry of Plants* 4. Acad. Press New York.

- MacRae, I.C., Alberts, V., Carman, R.M., Shaw, I.M. (1979) Products of 1,8-cineole oxidation by a *Pseudomonad*. Aust. J. Chem. 32: 917-922.
- Madyastha, K.M., Bhattacharyya, P.K., Vaidyanathan, C.S. (1977) Metabolism of monoterpene alcohol, linalool, by a soil *Pseudomonad*. Can. J. Microbiol. 23: 230-239.
- Madyastha, K.M., Murthy, N.S.R.K. (1988) Regiospecific hydroxylation of acyclic monoterpene alcohols by *Aspergillus niger*. Tetrahedron Lett. 29: 579-580.
- McCaskill, D., Croteau, R. (1997) Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis, pp. 107-146. In: R.G. Berger (ed.), Biotechnology of aroma compounds. Springer-Verlag, Berlin.
- McGarvey, D.J., Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. Plant Cell 7: 1015-1026.
- McLafferty, F.W., Stauffer, D.B. (1989) The Wiley/NBS Registry of mass spectral data. Wiley and Sons, New York.
- Mikami, Y. (1988) Microbial conversion of terpenoids. Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 6: 271-320.
- Miyazawa, M., Wada, T., Kameoka, H. (1996) Biotransformation of α -terpinene in common cutworm larvae (*Spodoptera litura* Fabricius). J. Agric. Food Chem. 44: 2889-2893.
- Narushima, H., Omori, T., Minoda, Y. (1982) Microbial oxidation of beta-myrcene, pp. 525-531. In: C. Verina, K. Singh (eds.), Advances in biotechnology, 3. Pergamon Press, Oxford, England.

- Ougham, H.J., Taylor, D.G., Trudgill, P.W. (1983). Camphor revisited: Involvement of a unique monooxygenase in the metabolism of 2-oxo- Δ^3 -4,5,5-trimethylcyclopentenyl-acetic acid by *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 153: 140-152.
- Paré, P.W., Tumlinson, J.H. (1997) Induced synthesis of plant volatiles. Nature 385: 30-31.
- Peters, K.E., Moldewan, J.M. (1993) The biomarker guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Pujar, B.G., Bhattacharyya, P.K. (1973) Microbiological transformation of terpenes. Part XVIII. Pathway of degradation of 1-*p*-menthene in a soil *Pseudomonad* (PL-strain). Indian J. Biochem. Biophys. 10: 170-172.
- Rabus, R., Heider, J. (1998) Initial reaction of anaerobic metabolism of alkylbenzene in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. Arch. Microbiol. 170: 377-348.
- Rabus, R., Widdel, F. (1995) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. Arch. Microbiol. 164: 448-451.
- Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., Widdel, F. (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. Environ. Microbiol. 1: 145-157.
- Rohmer, M. (1993) The biosynthesis of triterpenoids of the hopane series in the Eubacteria: A mine of new enzyme reaction. Pure Appl. Chem. 65: 1293-1298.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringermeier, S., Sahm, H. (1996) Glycerinaldehyde-3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. J. Amer. Chem. Soc. 118: 2564-2566.

- Rontani, J.F., Gilewicz, M.J., Michotey, V.D., Zheng, T.L., Bonin, P.C., Bertrand, J.C. (1997) Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 636-643.
- Rossau, R., Kersters, K., Falsen, E., Jantzen, E., Segers, P., Union, A., Nehls, L., De Ley, L. (1987) *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* com. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 198-210.
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H.W., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458.
- Sacchettini, J.C., Poulter, C.D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277: 1788-1789.
- Schink, B. (1985) Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 69-77.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde-3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316: 73-80.
- Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F.W., Lichtenthaler, H.K. (1997) Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414: 129-134.

- Seto, H., Watanabe, H., Furihata, K. (1996) Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathway in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovifer*. *Tetrahedron Lett.* 37: 7979-7982.
- Seubert, W. (1960) Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *J. Bacteriol.* 79: 426-434.
- Seubert, W., Fass, E. (1964a) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. IV. Reinigung und Eigenschaften der β -Isohexenylglutaconyl-CoA-Hydratase und β -Hydroxy- β -Isohexenylglutaryl-CoA-Lyase. *Biochem. Z.* 341: 23-34.
- Seubert, W., Fass, E. (1964b) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. V. Der Mechanismus des Isoprenoidabbaues. *Biochem. Z.* 341: 35-44.
- Seubert, W., Fass, E., Remberger, U. (1963) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. III. Reinigung und Eigenschaften der Geranylcarboxylase. *Biochem. Z.* 338: 265-275.
- Seubert, W., Remberger, U. (1963) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. II. Die Rolle der Kohlensäure. *Biochem. Z.* 338: 245-264.
- Sharkey, T.D., Singaas, E.L. (1995) Why plants emit isoprene. *Nature* 374: 769.
- Shukla, O.P., Bhattacharyya, P.K. (1968) Microbial transformation of terpenes. Part XI. Pathway of degradation of α - and β -pinenes by soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Indian. J. Biochem.* 5: 92-101.

- Shukla, O.P., Moholay, M.N., Bhattacharyya, P.K. (1968) Microbial transformation of terpenes. Part X. Fermentation of α - & β -pinenes by soil *Pseudomonad* (PL-strain). Indian. J. Biochem. 5: 79-91.
- Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385: 718-721.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59: 201-222.
- So, C.M., Young, L.Y. (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2969-2976.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994) Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849.
- Steenbergen; C.L.M., Korthals, H.J., Dobrynin, E.G. (1994) Algal and pigments in non-laminated lacustrine sediment: Studies of their sedimentation, degradation and stratigraphy. FEMS Microbiol. Ecol. 13: 335-352.
- Suckling, C.J. (1988) The cyclopropyl group in studies of enzyme mechanism and inhibition. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27: 537-552.
- Takahashi, S., Kuzuyama, H.W., Seto, H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9879-9884.

- Taylor, D.G., Trudgill, P.W. (1986) Camphor revisited: Studies of 2,5-diketocamphane-1,2-monooxygenase from *Pseudomonas putida* ATCC 17453. *J. Bacteriol* 165: 489-497.
- Trudgill, P.W. (1984) Microbial degradation of the alicyclic ring, pp. 131-180. In: D.T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Trudgill, P.W. (1986) Terpenoid metabolism by *Pseudomonas*, pp. 503-528. In: I.C. Gunsalus (ed.), *The bacteria, Vol. 10, The biology of Pseudomonads*. Academic Press, Inc., New York.
- Trudgill, P.W. (1990) Microbial metabolism of monoterpenes - recent developments. *Biodegradation* 1: 93-105.
- Trudgill, P.W. (1994) Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes, pp. 33-61. In: C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Tudroszen, N.J., Kelly, D.P., Millis, N.F. (1977) α -Pinene metabolism by *Pseudomonas putida*. *Biochem. J.* 168: 315-318.
- Ullah, A.J.H., Murray, R.I., Bhattachatyya, P.K., Magner, G.C., Gunsalus, I.C. (1990) Protein components of a cytochrom P-450 linalool 8-methyl hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 265: 1345-1351.
- Uribe, S., Ramirez, R., Peña, A. (1985) Effects of β -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 161: 1195-1200.

- Vancanneyt, M., Witt, S., Abraham, W.R., Kersters, K., Frederickson, H.L. (1996) Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of pseudomonads: a taxonomic evaluation. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 528-540.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., de Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., Hinz, K.H. (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 849-858.
- van der Werf, M.J., de Bont, J.A.M., Leak, D.J. (1997) Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55: 147-177.
- van der Werf, M.J., de Bont, J.A.M. (1998) Screening for microorganisms converting limonene into carvone, pp. 231-234. In: K. Kieslich, C.P. van der Beek, J.A.M. de Bont und W.J.J. van den Tweel (eds.), *New frontiers in screening for microbial biocatalysts; Studies in organic chemistry 53*. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- van der Werf, M.J., Overkamp, K., de Bont, J.A.M. (1998) Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. *J. Bacteriol.* 180: 5052-5057.
- van der Werf, M.J., Swarts, H.J., de Bont, J.A.M. (1999) *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2092-2102.
- Ward, B.B., Courtney, K.J., Langenheim, J.H. (1997) Inhibition of *Nitrosomonas europaea* by monoterpenes from coastal redwood (*Sequoia sempervirens*) in whole-cell studies. *J. Chem. Ecol.* 23: 2583-2598.

- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., Williamson, G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* 19: 1799-1807.
- Weissenfels, W.D., Beyer, M., Klein, J. (1990) Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 479-484.
- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F.M., Steigerwalt, A.G., O'Conner, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W., Brenner, D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1-7.
- White, C.S. (1986) Volatile and water-soluble inhibitors of nitrogen mineralization and nitrification in a ponderosa pine ecosystem. *Biol. Fert. Soils* 2: 97-104.
- White, C.S. (1988) Nitrification inhibition by monoterpenoids: theoretical mode of action based on molecular structures. *Ecology* 69: 1631-1633.
- White, C.S. (1994) Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. *J. Chem. Ecol.* 20: 1381-1406.
- Williams, D.R., Trudgill, P.W., Taylor, D.G. (1989) Metabolism of 1,8-cineole by a *Rhodococcus* species: Ring cleavage reactions. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1957-1967.
- Williams, D.R., Trudgill, P.W. (1994) Ring cleavage reactions in the metabolism of (-)-menthol and (-)-menthone by a *Rhodococcus* sp.. *Microbiology* 140: 611-616.
- Wilt, F.M., Miller, G.C., Everett, R.L., Hackett, M. (1993) Monoterpene concentration in fresh, senescent, and decaying foliage of single-leaf pinyon (*Pinus monophylla* Torr. & Fern.: Pinaceae) from the western great basin. *J. Chem. Ecol.* 19: 185-194.

- Wood, S.E., Gaskin, J.F., Langenheim, J.H. (1995) Loss of monoterpenes from *Umbellularia californica* leaf litter. *Biochem. Syst. Ecol.* 23: 581-519.
- Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Kosako, Y., Ezaki, T. (1998) Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) com. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) com. nov.. *Microbiol. Immunol.* 42: 429-438.
- Zeidler, J.G., Lichtenthaler, H.K., May, H.U. (1997) Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z. Naturforsch.* 52c: 15-23.
- Zengler, K. (1999) Mikrobielle Diversität und neuartige Fähigkeiten beim anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen. Dissertation, Universität Bremen.
- Zimmer, W. (1997) Funktion und Bedeutung der Isoprenabgabe durch Pflanzen. *BiuZ* 27: 34-39.
- Zimmerman, P.R., Chatfield, R.B., Fishman, J., Crutzen, P.J., Hanst, P.L. (1978) Estimates on the production of CO and H₂ from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation. *Geophys. Res. Lett.* 5: 679-682.

Teil II: Publikationen

A Publikationsliste mit Erläuterungen

Diese Dissertation beruht auf den folgenden fünf Publikationen bzw. Manuskripten. Die angefügten Erläuterungen sollen meinen Beitrag an der jeweiligen Arbeit aufzeigen.

- 1. *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene, and α -phellandrene) and nitrate**

Sabine Foß, Udo Heyen and Jens Harder

Durchführung der Fettsäure-Analytik, der quantitativen Wachstumsversuche und der Experimente mit Terpengemischen. Redaktionelle Mitarbeit am Manuskript.

- 2. Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by denitrifying *Alcaligenes defragrans***

Udo Heyen and Jens Harder

Entwicklung des Konzepts und Durchführung aller mikrobiologischen und analytischen Arbeiten. Redaktionelle Mitarbeit am Manuskript.

3. Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in *Alcaligenes defragrans*

Udo Heyen and Jens Harder

Entwicklung des Konzepts und Durchführung aller mikrobiologischen und analytischen Arbeiten. Gemeinsame Erstellung des Manuskripts mit J. Harder.

4. Monoterpene tolerance of denitrifying *Alcaligenes defragrans*

Udo Heyen, Christina Probian, Sabine Foß and Jens Harder

Gemeinsame Entwicklung des Konzepts mit J. Harder. Durchführung aller mikrobiologischen Arbeiten zur Monoterpenkohlenwasserstoff-Toleranz in den Reinkulturen und den Anreicherungen. Redaktionelle Mitarbeit am Manuskript.

5. Denitrification on essential oils

Jens Harder, Udo Heyen, Christina Probian and Sabine Foß

Gemeinsame Entwicklung des Konzepts mit J. Harder. Durchführung aller mikrobiologischen Arbeiten zum anaeroben Abbau ätherischer Öle sowie ein Teil der GC-Analysen. Redaktionelle Mitarbeit am Manuskript.

B Publikationen

***Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene, and α -phellandrene) and nitrate**

Sabine Foß, Udo Heyen and Jens Harder*

Systematic and Applied Microbiology (1998) 21: 237-244

Max-Planck-Institut for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

* Corresponding author

Abstract

Four pseudomonad strains 51Men, 54Pin, 62Car and 65Phen were recently isolated on the monoterpenes (+)-menthene, α -pinene, 2-carene and α -phellandrene as sole carbon source and nitrate as electron acceptor. These bacteria were characterised. The motile, mesophilic, Gram-negative rods had a strictly respiratory metabolism. Monoterpenes as carbon sources were completely mineralised to carbon dioxide. The physiology of all strains was very similar, but displayed an individual utilisation preference for the isolation substrate. The fatty acid composition of whole cells showed a high degree of similarity to that of *Alcaligenes faecalis*. Comparative 16S rDNA data analysis placed the isolates into the beta-subclass of *Proteobacteria* in a common offshoot together with *Alcaligenes* and *Bordetella* species. On the basis of these characteristics, the strains are described as a new species belonging to the genus *Alcaligenes*, *A. defragrans* sp. nov., with strain 54Pin (DSM 12141^T) as type strain.

Introduction

Monoterpenes are an important natural source of alkenoic hydrocarbons. They are the primary product of the monoterpene biosynthesis in plants. Naturally occurring hydroxylated monoterpenes are made by the activity of plant hydroxylases on alkenoic monoterpenes. Oxygenation is the typical activation reaction for alkenes in general, because these compounds with a carbon-carbon double bond as sole functional group are as such not degradable on the β -oxidation pathway. Enzymes of aerobic microorganisms, mono- and dioxygenases, require molecular oxygen as a cosubstrate to transform alkenes into degradable substances (Hartmans et al. 1989; Hartmans et al. 1991; Miura and Dalton 1995). The degradation of alkenoic monoterpenes has been studied in aerobic microorganisms, primarily with α -pinene. Strains that were isolated on α -pinene as sole carbon sources were identified as species of the genera *Pseudomonas* (Bhattacharyya et al. 1960; Trudgill 1986), *Mycobacterium* (van Ginkel et al. 1987) and *Nocardia* (Griffiths et al. 1987a) and as *Serratia marcescens* (Wright et al. 1986). Several degradation pathways have been proposed on the basis of accumulated metabolites, but only Griffiths et al. (1987a,b) studied the microbial process on the subcellular level. Their studies suggest the presence of two catabolic pathways in microorganisms: (I) α -pinene monooxygenation yields α -pinene oxide, where three rings are cleaved in an isomerising lyase reaction and the product *cis*-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal is further degraded, or (II) the initial reaction may involve a ring cleavage of the cyclobutane in α -pinene, thus producing limonene and other monoterpenes. Whether oxygenases are essential for the further degradation of these initial products, has not been investigated.

Alkenes are also degraded in the absence of molecular oxygen, in methanogenic communities (hexadecene: Schink 1985) and by sulfate- and nitrate-reducing bacteria (hexadecene: Aeckersberg et al. 1991; heptadecene: Gilewicz et al. 1991). The catabolic pathway has only been revealed for acetylene, an alkyne (Rosner and Schink 1995). Recently we reported that alkenoic monoterpenes can serve as sole carbon sources for denitrifying bacteria (Harder and Probian 1995). The isolates acquired on the alkenoic monoterpenes (+)-menthene, α -pinene, 2-carene, and α -phellandrene are described in this contribution.

Materials and Methods

Culture conditions. Anoxic media and cultivation techniques were used in this study (Widdel and Bak 1992). The medium contained in 1 l of distilled water: 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NH_4Cl , 0.5 g KH_2PO_4 , 0.1 g CaCl_2 and 0.85 g NaNO_3 . After autoclaving, 2 ml chelated trace element mixture (per l: 2100 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg H_3BO_3 , 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 24 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 144 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.2 g EDTA, pH 6.0), 2 ml selenite-tungstate solution (Widdel and Bak 1992), 1 ml of each vitamin solution (Aeckersberg et al. 1991), and 50 ml NaHCO_3 solution (1 M) were added, and the pH was adjusted to 7.0.

To verify that the process occurred not only in oxygen-free, but also in chemically reduced media, anoxic media were prereduced in control experiments with either 4 mM ascorbate or 1 mM ferrous sulfide. The strains did not utilise ascorbate as carbon and energy source. Thus, ascorbate could routinely be added to assure anaerobic conditions in the culture. FeS (0.5 M) was prepared from $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and Na_2S (Hanert 1981). In FeS -reduced media, the reduced state was confirmed by decolourisation of resazurin (1 mg l^{-1}).

Strain maintenance. Stock cultures were performed in culture tubes (21 ml) with 15 ml anoxic medium and 0.4 ml degassed anoxic 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) as carrier phase under an N_2 - CO_2 (90:10, v:v) atmosphere. Selective growth conditions were used (4 mM monoterpene and 10 mM nitrate). Transfer of an inoculum of 6.7 % v:v into freshly prepared culture media occurred every two months. The culture tubes were incubated at $28\text{ }^\circ\text{C}$ in an inverted position with an angle of about fifteen degrees from the horizontal on a rotary shaker rotating at 60 rpm. Thus, the surface between medium and carrier phase was enlarged to improve the supply of monoterpene, and a detrimental contact of the heptamethylnonane phase to the butyl rubber stopper was avoided. Grown cultures were transferred to the fridge and kept at $8\text{ }^\circ\text{C}$ till the next transfer.

Growth experiments. Substrate utilisation and competition tests were also performed in culture tubes. A HMN phase was used for unpolar or potentially toxic substances. Substrate competition experiments contained $30\text{ }\mu\text{mol}$ monoterpene in total. This corresponds

to a calculated concentration of 2 mM monoterpene for the aqueous phase. Growth was monitored by turbidimetry at 660 nm, and nitrate, nitrite and monoterpene content were analysed in the late stationary phase.

The quantification of monoterpene degradation was determined in 156ml serum bottles that contained 100 ml of anoxic medium, 10 ml of HMN, 1 mmol nitrate and 200 μ mol monoterpene. Inoculation occurred with 1 % v:v. Control experiments lacked either monoterpene or nitrate or cells. The data presented in table 3 were determined after 29 days of incubation. In separate experiments, a He-CO₂ atmosphere (90:10, v:v) was used to measure the formation of dinitrogen.

Chemical analysis of biomass, educts and products. Turbidimetric determinations at 660 nm were performed to measure biomass formation. The cell dry weight determination was performed as described (Harder 1997). Ammonium was measured by the indophenol method, nitrate and nitrite by HPLC and gases by packed-column gas chromatography as described (Harder and Probian 1997). Monoterpenes were determined by dual-column capillary-column gas chromatography (Foß and Harder 1997).

Light microscopy. Cells were observed with a standard phase contrast microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with an oil immersion objective 100/1.6. Dense cultures were wet mounted on glass slides coated with 2% washed agar (Pfennig and Wagener 1986) and photographed using an Ortho 25 film (Agfa-Gevaert, Leverkusen, Germany). For cultures with an OD_{660nm} of below 0.2, a centrifugation step was required to obtain a sufficiently dense culture.

Stains. The Gram-stain was performed with a kit (Merck, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's protocol. Flagella were stained according to Gray (1926).

Lipid analysis. Cells for the analysis of whole cell fatty acids as methyl ester (FAME) were grown on either the isolation substrate or acetate and nitrate, and harvested by centrifugation. The cell pellet was resuspended in 20 mM ammonium acetate to wash the cells. After centrifugation, the cell pellet was freeze-dried. FAME synthesis was performed close to the method of Sasser (1997). 0.52 ml aqueous NaOH (30 g NaOH dissolved in 100 ml water) and 0.5 ml methanol were added to 40 mg dry cells to start the saponification. The mixture was vortexed, incubated for 5 min at 100 °C, mixed again and incubated for 30 min at

100 °C. After cooling in an ice-bath, 2 ml of a mixture of 6.0 N HCl and methanol (1.85:1, v:v) were added. After vortexing, the mixture was incubated for 10 min at 80 °C, followed by cooling. The methyl esters were extracted by addition of 1.25 ml of hexane/methyl tert-butyl ether (1:1, v:v). After vortexing, a few NaCl crystals were added to facilitate the phase separation. The lower aqueous phase was withdrawn. The organic phase was washed with 3 ml 0.3 M NaOH. Two-third of the organic phase were transferred into a vial for subsequent GC-analysis. Separation of FAMES was performed on a PVMS 54 column (5% phenyl, 0.32 mm by 50 m, 0.32 µm film thickness; Perkin Elmer, Überlingen, Germany) with H₂ at a flow rate of 2.0 ml min⁻¹ and the following temperature programme: injection port 300 °C; column 140 °C for 2 min, increasing to 270 °C at 4 °C min⁻¹, 270 °C for 0.1 min, increasing to 300 °C at 10 °C min⁻¹, and 300 °C for 5 min; flame ionisation detector 350 °C. Separation optimisation and FAME identification were performed with a FAME reference mix and a bacterial FAME mix (Supelco, Deisenhofen, Germany).

G+C content. DNA was isolated by chromatography on hydroxylapatite according to the procedure of Cashion et al. (1977). The G+C content was determined by HPLC according to Mesbah et al. (1989). The determination was performed at the DSMZ, Braunschweig.

16S rDNA sequencing and analysis. The extraction of genomic DNA, PCR amplification and sequencing of the 16S rDNA gene of the isolates were performed by F. A. Rainey, DSMZ, as described (Harder and Probian 1997). A 16S rDNA sequence of *A. denitrificans* DSM30026^T is currently deposited as *A. xylosoxidans* in the EMBL-gene bank under accession no. M22509 - due to the the taxonomic history of both species (Dewhirst et al 1989). For this work, F. A. Rainey, DSMZ, Braunschweig, kindly provided the sequence of the type strain of *A. xylosoxidans* (DSM 10346^T). *Alcaligenes denitrificans* DSM 30026^T was again sequenced and the phylogenetic analysis was performed at the DSMZ. First, the closest relatives were determined using the database ARB (Strunk and Ludwig 1995). A fine resolution of relatedness was performed using the ae2 editor (Maidak et al. 1994). The phylogenetic dendrogram was reconstructed using treeing algorithms contained in the PHYLIP package (Felsenstein 1993).

Results

Strain 51Men was isolated on (+)-menthene, strain 54Pin on α -pinene, strain 62Car on 2-carene and strain 65Phen on α -phellandrene. The denitrifying bacteria grew on a monoterpene as sole carbon and energy source in anoxic and chemically reduced media, formed homogeneous colonies and were microscopically pure (Harder and Probian 1995). The purity of the isolates was confirmed in liquid media under fermentative and denitrifying conditions (AC broth (Difco, Detroit, Michigan) or yeast extract (5 g l⁻¹); AC broth, yeast extract (5 g l⁻¹), acetate (2 mM), pyruvate (2 mM) or fumarate (2 mM) in the presence of 10 mM nitrate) and on oxic nutrient plates (per l: 5 g peptone, 3 g meat extract, 15 g agar; the pH was adjusted to 7.0). Cells that grew in the presence of a utilisable substrate and oxygen or nitrate showed the morphology of the isolated bacteria. No growth occurred in fermentative media. All strains grew as colourless white colonies on MacConkey plates that turned yellow in the course of growth.

Cells of all four strains were small rods, 1.3-1.8 μ m x 0.5-0.8 μ m in size (Fig. 1). All strains were motile with peritrichous flagella. The cell walls stained Gram-negative. The G+C content of strain 54Pin was 66.9 \pm 0.3 %. The whole cell fatty acid analysis demonstrated a strong dependence on the culture conditions (Table 1). Unsaturated fatty acids that were present in acetate-grown cells were replaced by fatty acids containing cyclopropane rings in cells grown on a monoterpene that was dissolved in heptamethylnonane.

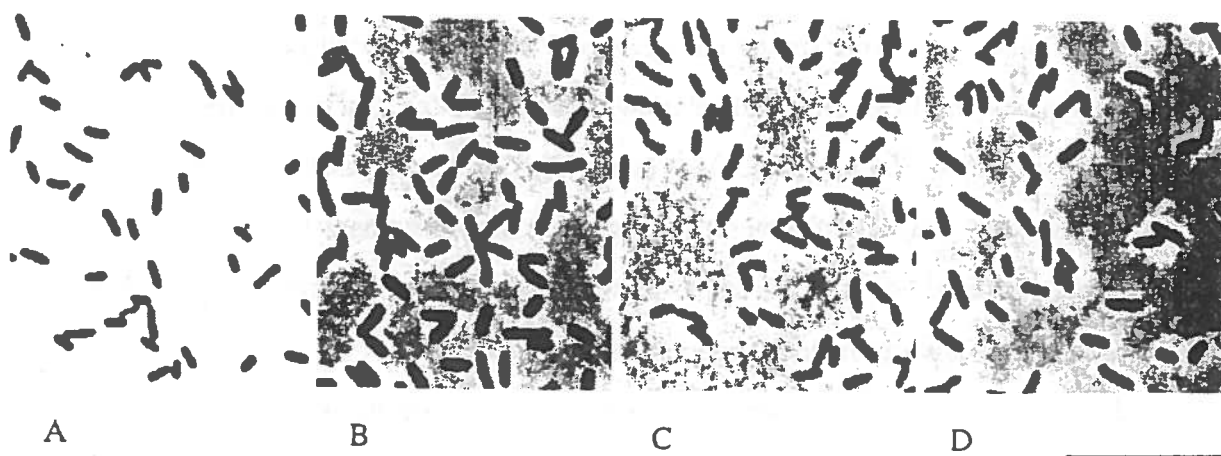


Fig. 1. Phase contrast micrographs of cells of strains 51Men (A), 54Pin (B), 62Car (C) and 65Phen (D) grown with a monoterpene and nitrate (bar 10 μ m).

Table 1. Whole cell fatty acid composition of isolated strains^a

Fatty acid	Strain 51Men (menthene)	Strain 54Pin (pinene)	Strain 62Car (carene)	Strain 65Phen (phellandrene)	Strain 54Pin (acetate)	Strain 65Phen (acetate)
Dodecanal ^b	4.0	3.6	3.7	6.5	4.5	4.8
12:0	5.5	5.9	6.2	8.1	6.0	5.7
14:0	1.0	2.6	1.3	0.7	0.4	0.5
15:0	0.5	2.2	1.6	1.6	0.0	0.0
3-OH 14:0	1.7	2.1	2.2	1.3	1.0	0.8
16:1 9-cis	5.1	1.7	3.1	9.4	28.6	19.2
16:0	34.1	35.1	33.9	21.5	24.6	28.6
17:0 cyclo	32.6	32.7	32.9	30.4	7.6	18.3
18:1 11-cis or 9-trans	3.6	1.7	3.1	8.6	19.7	18.4
19:0 cyclo	8.4	7.8	7.9	6.2	0.2	1.2

^a Cells were grown under denitrifying conditions either on a monoterpene that was dissolved in heptamethyl-nonane or on acetate. Amounts of fatty acids are given in percentage. Only fatty acids that were present in at least one sample at levels above 1 % are included. Therefore, the percentages may not add up to 100%.

^b Dodecanal was identified by GC-MS and by GC together with a standard. The determined ECL value in our separation system is 10.96.

The presence of 3-hydroxy-tetradecanoate is a taxonomic marker for the pseudomonads of rRNA group II (Vancanneyt et al. 1996) and is also present in *Alcaligenes* spp., *Bordetella* spp., and *Taylorella equigenitalis* (Rossau et al. 1987; Weyant et al. 1995; Vandamme et al. 1996). The absence of 2-hydroxy-dodecanoate and the presence of dodecanal in the isolates is a major difference to the described fatty acid pattern of *Alcaligenes* and *Bordetella* species.

Growth on the isolation substrate and nitrate exhibited a mesophilic temperature range with an optimum around 30 °C. On acetate and nitrate, the growth rates of strains 54Pin and 65Phen at 30 and 37 °C were similar and decreased at 42 °C. The strains grew optimally at neutral pH-values (Table 2). The maximal growth rate of 0.045 h⁻¹ on monoterpene and nitrate was also observed in chemically prereduced media, thus confirming that the microbial process is not hampered by the lack of molecular oxygen. In addition, anaerobically grown cultures showed a lag phase before they started to grow with oxygen as electron acceptor. Vitamins were not necessitated for growth on monoterpene and nitrate.

Electron acceptors for growth on the isolation substrate were oxygen, nitrate, nitrite and dinitrogen oxide. Nitrite accumulation was only observed occasionally in cultures that were limited by the amount of electron donor or were started with 20 mM nitrate. Balanced

incubations never accumulated nitrite (Fig. 2). Nitrate, nitrite and dinitrogen oxide reduction to dinitrogen was concluded from nitrate and nitrite analysis, from the production of gas, from the failure to detect other gases (dinitrogen oxide, methane) by gas chromatography performed with nitrogen as carrier gas, from the formation of dinitrogen in cultures containing a He-CO₂ atmosphere by gas chromatography with helium as carrier gas, and from the assimilation of ammonium during growth. No growth was observed with thiosulfate (10 mM), sulfite (2 and 10 mM), sulfate (10 mM), fumarate (25 mM) as electron acceptor or under fermentative conditions.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolated *A. defragrans* strains.

	strain 51Men	strain 54Pin	strain 62Car	strain 65Phen
Cell size (µm x µm)	1.3-1.8 x 0.6-0.8	1.3-1.8 x 0.5-0.8	1.3-1.8 x 0.5-0.8	1.3-1.8 x 0.5-0.6
Growth parameter on monoterpene and nitrate				
pH-range	6.4-8.3	6.3-8.4	5.9-7.9	5.9-7.9
pH-optimum	7.1-7.8	6.7-7.5	6.7-7.5	6.7-7.5
Temperature range	n.d.	15-40 °C	n.d.	n.d.
Vitamin demand	none	none	none	none

The fate of monoterpenes during denitrification was quantitatively analysed (Table 3). The amount of electrons consumed by the denitrification process can be provided by the complete oxidation to carbon dioxide of approximately 60 % of the consumed amount of monoterpene. Roughly one-third of the monoterpene consumed was used for biomass formation.

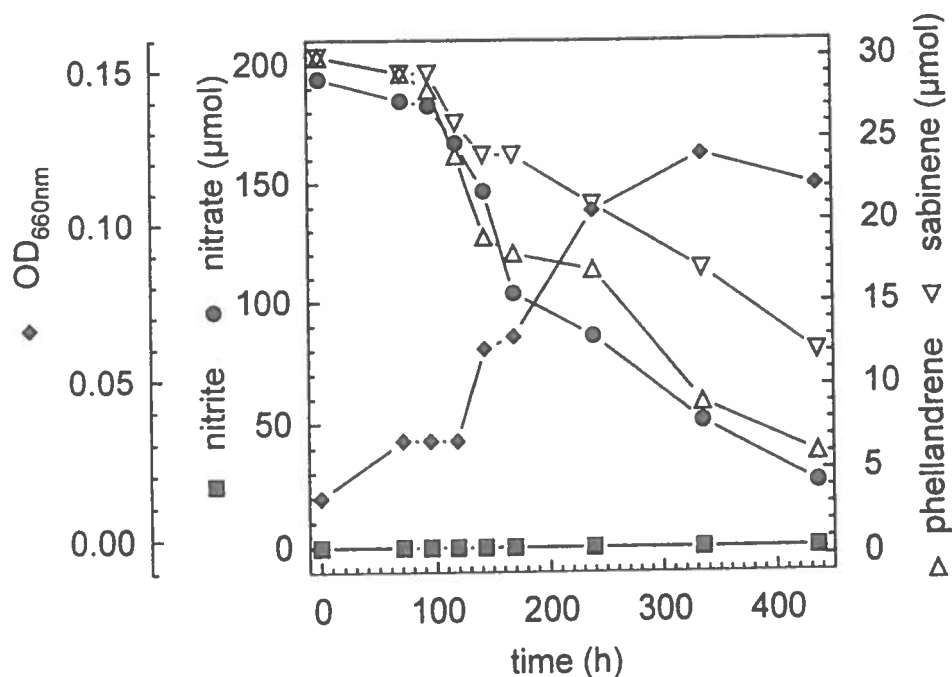


Fig. 2. Growth of strain 65Phen on phellandrene, sabinene and nitrate.

Table 3. Quantification of monoterpene consumption and nitrate reduction by *A. defragrans*.

	strain 54Pin	strain 65Phen
Amount of monoterpene consumed (μmol)	146	126
Amount of nitrate consumed (μmol)	984	894
Amount of nitrite formed (μmol)	0	0
Amount of gas formed (ml)	12	11
Amount of biomass formed (mg) ^a	9.75	8.11
Electron ratio ^b	1.66	1.58
Electron balance ^c	1.33	1.28

^a Calculated from the increase in optical density using an experimentally determined conversion factor ($1 \text{ OD}_{660\text{nm}} = 321 \text{ mg dry wt. l}^{-1}$ for strain 54Pin and $1 \text{ OD}_{660\text{nm}} = 327 \text{ mg dry wt. l}^{-1}$ for strain 65Phen).

^b Calculated ratio of numbers of electrons released during complete mineralisation of the monoterpene consumed to numbers of electrons consumed by nitrate reduction. For nitrate reduction, two electrons were considered to be accepted for each molecule of nitrite formed and five electrons for nitrate molecules that were consumed and not recovered as nitrite.

^c Calculated ratio of numbers of electrons donated by complete oxidation of the dissimilated amount of monoterpene to carbon dioxide to numbers of electrons consumed by nitrate reduction. The assimilated amount of monoterpene was calculated via the cell dry weight formed and the following assimilation equation: $17 \text{ C}_{10}\text{H}_{16} + 60 \text{ H}_2\text{O} + 54 \text{ CO}_2 \rightarrow 56 \text{ <C}_4\text{H}_7\text{O}_3\text{>}$. The dissimilated amount of monoterpene was calculated by subtracting the amount of monoterpene assimilated from the amount of monoterpene consumed.

Carbon sources used were restricted to some amino acids, fatty acids and monoterpenes. The isolates were not able to utilise sugars. Under denitrifying conditions all strains utilised (concentrations are given in mM in parenthesis) acetate (10), propionate (5), butyrate (5), hexanoate (5), heptanoate (5), octanoate (5), pyruvate (5), malate (5), succinate (5), fumarate (5), 3-methylbutyrate (5), glutarate (5), glutamate (5), alanine (5), valine (5), ethanol (10) and the monoterpenes (+)-*p*-menth-1-ene (4), (+)-limonene (4), (-)- α -phellandrene (4), α -terpinene (4), γ -terpinene (4), (+)-sabinene (4), (+)-2-carene (4), (+)-3-carene (4), (-)- α -pinene (4), (-)- β -pinene (4), terpinolene (4), (+)- α -terpineol (4), and (+)-terpinen-4-ol (4). All strains except 54Pin grew on myrcene (4). Structural formulas for the monoterpenes are given in Fig. 3. Arginine (5) and gluconate (5) supported biomass formation of all strains except 62Car. No growth occurred on D-glucose (5), D-fructose (5), D-sorbitol (5), meso-inositol (5), D-ribose (5), D-arabinose (5), D-xylose (5), D-saccharose (5), D-trehalose (5), D-cellobiose (5), ascorbate (5), phenylalanine (5), formate (40), L-tartrate (2, 10), adipate (2, 5), pimelate (2, 5), suberate (2, 10), sebacate (2, 10), itaconate (2, 10), methanol (40), cyclohexanol (2), cyclohexane-1,2-diol (2), cyclohexane-1,4-diol (2), decane (2), hexadecane (2), heptamethylnonane, cyclohexane (2), benzoate (2), toluene (2), 2,6-dimethyloctane (4), 3,7-dimethyl-1-octene (4), (-)- β -citronellene (4), 3,7-dimethyloctanol-1 (4), (-)- β -citronellol (4), geraniol (4), nerol (4), linalool (4), (+)-*trans*-isolimonene (4), *p*-cymene (4), (+)-perilla alcohol (4), (-)-carveol (4), (+)-dihydrocarveol (4), menthol (4), menthone (4), (+)-isopulegol (4), (+)-isomenthol (4), (+)-pulegone (4), (-)-carvone (4), (+)-dihydrocarvone (4), (-)-*trans*-pinane (4), eucalyptol (4), (-)-*cis*-myrtenol (4), (+)-*trans*-myrtenol (4), (-)-myrtenol (4), (+)-isopinocampheol (4), (-)-borneol (4), (+)-fenchol (4), (α + β)-thujone (4), (+)-fenchone (4), (-)-verbenone (4), (+)-campher (4). Denitrifying growth of all strains was also observed on pine needle oil. This essential oil represents a natural substrate.

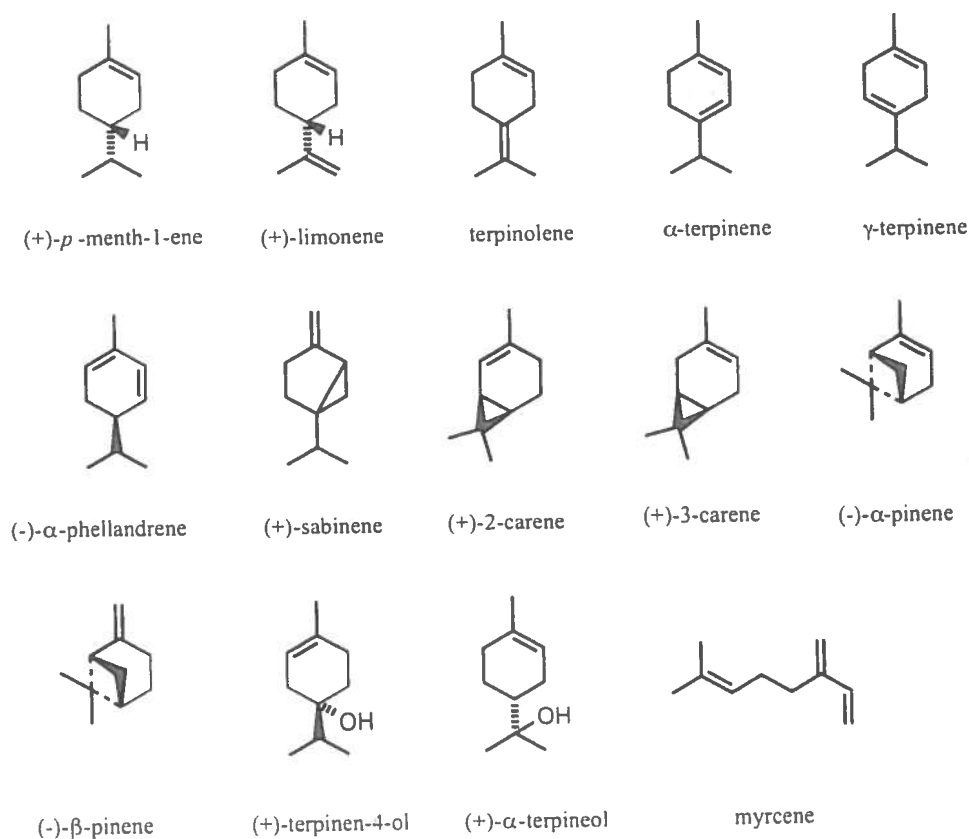


Fig. 3. Monoterpene structures.

In our initial studies on the biodegradation pathway of monoterpenes, mixtures of monoterpenes that were supporting growth as single substrate were tested. The strains displayed an individual monoterpene utilisation pattern (Fig. 2 and Table 4). In a mixture of the isolation substrates, α -phellandrene was the preferred substrate for all four strains. Strain 65Phen utilised also menth-1-ene, however, the bicycles were not degraded efficiently. The overall substrate consumption pattern was similar for the strains 51Men and 62Car, but both strains exhibited the highest relative preference for the monoterpene that was the sole substrate in the enrichment and isolation of the strain. Similarly, strain 54Pin demonstrated a preference for α -pinene. The alkenoic monoterpenes are all barely soluble in water. The maximal solubility of the alkenes was reported to be 100-200 μ M monoterpene (Weidenhamer et al. 1993). Our determinations yielded similar values. Thus, a solubility-based mass transfer control of the observed selectivity seems to be excluded. The individual preference might be caused by the substrate specificity of the enzymes that initially transform the monoterpenes.

Table 4. Monoterpene utilisation pattern in competition experiments

Strain	Relative substrate preference (%) ^a			
	α -phellandrene	menth-1-ene	2-carene	α -pinene
65Phen	100	52	17	0
51Men	100	70	84	39
62Car	100	54	91	43
54Pin	100	46	73	80

^a 100 % corresponds to α -phellandrene consumption of 6.58 μ mol (65Phen), 6.73 μ mol (51Men), 4.54 μ mol (62Car) and 6.44 μ mol (54Pin).

The 16S rRNA gene sequences of the isolates were determined and deposited at the EMBL Data Library under accession numbers AJ005448 (strain 51Men), AJ005447 (strain 54Pin), AJ005449 (strain 62Car) and AJ005450 (strain 65Phen). The sequence similarity between the strains 51Men, 62Car and 65Phen was 99.8%. Strains 54Pin and 65Phen had an identical 16S rDNA sequence. The 16S rRNA gene sequence of the type strains of *A. denitrificans* (ATCC 15173^T = DSM 30026^T) and *A. xylooxidans* (DSM 10346^T) was 99.7%. The 16S rDNA dissimilarity search to phylogenetically related organisms yielded approximately equal degrees of dissimilarity between the isolates and species of the *Bordetella* group (*Alcaligenes xylooxidans*, *Alcaligenes denitrificans* and *Bordetella parapertussis*) and to *Alcaligenes faecalis* (Tab. 5, Fig. 4).

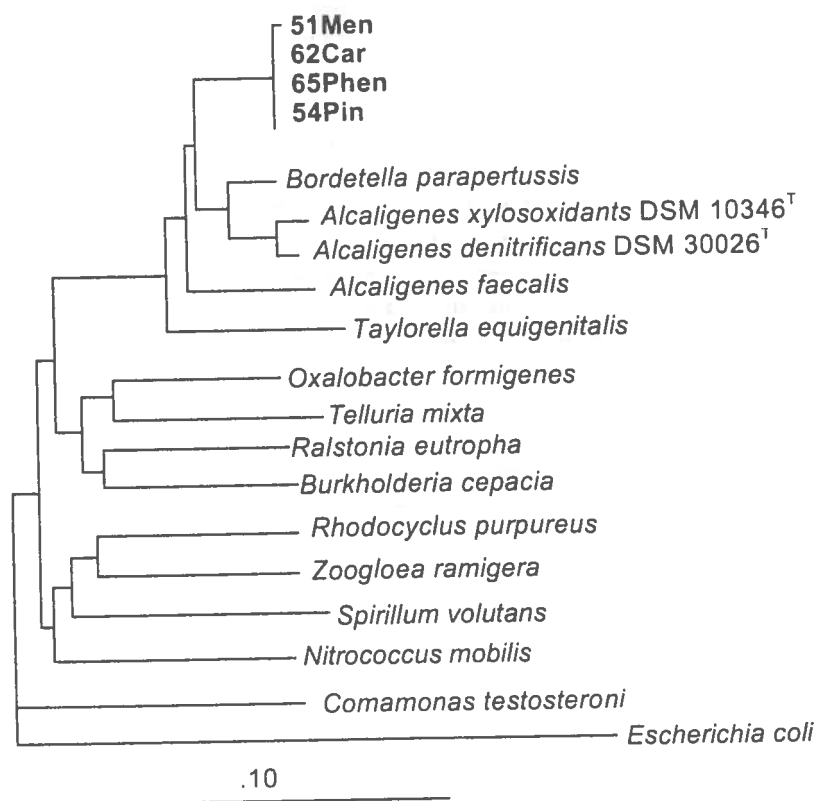


Fig. 4. Phylogenetic dendrogram indicating the position of strains 51Men, 54Pin, 62Car and 65Phen. The scale bar represents 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotides. The root was determined by inclusion of *Escherichia coli* as an outgroup. The phylogenetic analysis was performed by F. A. Rainey and E. Stackebrandt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany).

Table 5. 16S rDNA dissimilarity values between isolated strains and related species

Strains	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1. Strain 54Pin									
2. Strain 51Men	0.2								
3. Strain 62Car	0.2	0.2							
4. Strain 65Phen	0.0	0.2	0.2						
5. <i>Bordetella parapertussis</i>	3.3	3.4	3.3	3.3					
6. <i>Alcaligenes xylooxidans</i>	4.0	4.2	4.1	4.0	1.8				
7. <i>Alcaligenes denitrificans</i>	4.0	4.1	4.0	4.0	1.4	0.3			
8. <i>Alcaligenes faecalis</i>	4.8	4.9	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8		
9. <i>Taylorella equigenitalis</i>	5.6	5.7	5.6	5.6	6.3	6.5	6.3	6.6	
10. <i>Oxalobacter formigenes</i>	9.0	9.2	9.1	9.0	8.2	9.2	9.1	9.7	10.0

Discussion

The family *Alcaligenaceae* (De Ley et al. 1986) incorporates members of the genera *Bordetella* and *Alcaligenes*. *Bordetella* includes the species *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. avium* (De Ley et al. 1986), *B. holmesii* (Weyant et al. 1995), *B. hinzii* (Vandamme et al. 1995) and *B. trematum* (Vandamme et al. 1996). In contrast to these pathogenic parasites, *Alcaligenes* species are not only isolated from human samples, but are also regularly found in environmental samples. In clinical samples, *Alcaligenes* species are seldom encountered in the genitourinary tract and rarely in the gastrointestinal tract. They present around 0.35 % of all aerobic Gram-negative rods isolated from clinical specimen (Pickett et al. 1991). One of the species, *A. xylosoxidans*, is recognised as an opportunistic pathogen occasionally involved in disease formation (Isenberg and D'Amato 1991; Pickett et al. 1991; Decrè et al. 1992). The genus accommodates currently *A. faecalis* as type species, *A. piechaudii* and two species with a long taxonomic history which were recently assessed as *A. denitrificans* and *A. xylosoxidans* (Vandamme et al. 1996). Many strains isolated aerobically on aromatic or halogenated compounds were tentatively assigned to the species *A. xylosoxidans* (Ewers et al. 1990) and *A. denitrificans* (Weissenfels et al. 1990; Busse et al. 1992). Strain LuBRes1 was isolated under denitrifying conditions on resorcinol and was tentatively affiliated with *A. denitrificans* (Gorny et al. 1992). These studies propose a significant role for *Alcaligenes* species in the environment, even in deep subsurface environments (Boivin-Jahns et al. 1995).

Our characterisation of monoterpene-degrading denitrifiers indicated that the isolated strains share common taxonomic features with *Alcaligenes* species. The 16S rDNA sequence divergence between the isolates and *B. parapertussis*, *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans* and *A. faecalis* is according to the study of Stackebrandt and Goebel (1994) sufficient evidence to describe the isolates as a new species. The 16S rRNA gene sequences of *A. piechaudii* is currently not available. In contrast to *A. xylosoxidans*, the isolates are not able to utilise glucose and xylose. Itaconate, sebacate and suberate are supporting growth of *A. xylosoxidans* and *A. denitrificans*, but not of *A. faecalis* and the isolated strains (Kersters and De Ley 1984). Nitrate respiration to dinitrogen was only reported for *A. xylosoxidans* and *A. denitrificans*. *A. piechaudii* is unable to denitrify (Vandamme et al. 1996). The fatty acid methyl ester

analyses indicate that the isolated strains belong to the β -2 subgroup of the *Proteobacteria* (Woese 1987). Taken together, the observations show that the isolated strains do not belong to any of the characterised *Alcaligenes* species.

Sequence similarity analysis based on the highly conserved 16S rRNA gene can not adequately indicate recently evolved genera. For example, the physiologically diverse genera *Afipia* (human pathogens), *Bradyrhizobium* (plant symbionts), *Nitrobacter* (chemolithotrophs), and *Rhodopseudomonas palustris* (photosynthetic anaerobe) differ in their 16S rDNA sequence less than 3% (Teske et al. 1994). As our isolates have several taxonomic markers (motility, lipid fatty acids, growth substrates) in common with *Alcaligenes* species, especially with *A. faecalis*, and as long as information concerning differentiation is limited, the isolated strains may be assigned as a new species to the genus *Alcaligenes*. The isolation and genotypical characterisation of more environmental species related to *A. faecalis* and our proposed species, *A. defragrans*, is required to justify a concept recently suggested by Vandamme et al. (1996): as *A. xylooxidans*, *A. piechaudii* and *A. denitrificans* are genotypically more closely related to the type species of *Bordetella* than to *A. faecalis*, the type species of the genus *Alcaligenes*, it might be appropriate to reclassify the opportunistic and obligate pathogenic species of the family *Alcaligenaceae* in the genus *Bordetella* and the non-pathogenic species in the genus *Alcaligenes*.

Description of *Alcaligenes defragrans*. *Alcaligenes defragrans* sp. nov. Al.ca.li'ge.nes de.fra.grans; L. prep. *de* from, away; L. adj. *fragrans* sweet-scented; M.L. *defragrans* to annihilate fragrance, referring to the capacity to degrade monoterpenes.

Gram-negative, rod-shaped cells, 1.3-1.8 μm long by 0.5-0.8 μm wide, with rounded ends. Cells are motile with peritrichous flagella and occur as single unit. The facultatively anaerobic chemoorganotrophic metabolism is strictly oxidative. Oxygen, nitrate, nitrite or dinitrogen oxide can serve as electron acceptor. Carbon and energy sources include (+)-*p*-menth-1-ene, (+)-limonene, (-)- α -phellandrene, α -terpinene, γ -terpinene, (+)-sabinene, (+)-2-carene, (+)-3-carene, (-)- α -pinene, (-)- β -pinene, terpinolene, (+)- α -terpineol, (+)-terpinen-4-ol, and many volatile fatty acids. Sugar compounds and aromatic hydrocarbons

are not utilised under denitrifying conditions. Growth parameters are summarised in Table 1. The G+C content of strain 54Pin was 66.9 ± 0.3 %. The strains were selectively enriched in freshwater minimal medium with nitrate and a monoterpene that was dissolved in an organic carrier phase (Harder and Probian 1995). Strains 51Men and 54Pin were isolated from activated sludge and strains 62Car and 65Phen from a ditch in a forest in 1995. The type strain 54Pin is deposited as DSM12141^T at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany. Strains 51Men, 62Car, and 65Phen are deposited at the DSM as DSM12144, DSM12142, and DSM12143 respectively.

Acknowledgement. We like to thank O. Kniemeyer, who kindly helped in the FAME analysis, and C. Probian for technical assistance. We are grateful to P. Schulze, Universität Bremen, for performing GC-MS analysis and to Prof. H.-G. Trüper, Universität Bonn, for advice on bacterial nomenclature. This study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to J. H..

References

- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 5-14.
- Bhattacharyya, P.K., Prema, B.R., Kulkarni, B.D., Pradhan, S.K. (1960) Microbiological transformation of monoterpenes: hydration of α -pinene. *Nature* 187: 689-690.
- Boivin-Jahns, V., Bianchi, A., Ruimy, R., Garcin, J., Daumus, S., Christen, R. (1995) Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3400-3406.
- Busse, H.J., El-Banna, T., Oyaizu, H., Auling, G. (1992) Identification of xenobiotic-degrading isolates from the beta subclass of the *Proteobacteria* by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 19-26.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J., Franklin, M. (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* 81: 461-466.
- Decrè, D., Arlet, G., Danglot, C., Lucet, J.C., Fournier, G., Bergogne-Bérézin, E., Philippon, A. (1992) A β -lactamase-overproducing strain of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylooxidans* isolated from a case of meningitis. *J. Antimicro. Chemoth.* 30: 769-779.
- De Ley, J., Segers, P., Kersters, K., Mannheim, W., Lievens, A. (1986) Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, *Alcaligenaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 405-414.
- Dewhirst, F.E., Pasteur, B.J., Bright, P.L. (1989) *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, and *Vitreoscilla* species comprise a major branch of the beta group *Proteobacteria* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparison: transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to the family *Neisseriaceae* (emend.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 258-266.
- Ewers, J., Freier-Schröder, D., Knackmuss, H.J. (1990) Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Arch. Microbiol.* 154: 410-413.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (phylogenetic inference package) version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Foß, S., Harder, J. (1997) Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 71-75.
- Gilewicz, M., Monpert, G., Acquaviva, M., Mille, G., Bertrand, J.C. (1991) Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 252-256.
- Gorny, N., Wahl, G., Brune, A., Schink, B. (1992) A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 158: 48-53.
- Gray, P.H.H. (1926) A method of staining bacterial flagella. *J. Bacteriol.* 12: 273-274.
- Griffiths, E.T., Bociek, S.M., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Sissons, D.J., Trudgill, P.W. (1987a) Bacterial metabolism of α -pinene: pathway from α -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain p18.3. *J. Bacteriol.* 169: 4972-4979.
- Griffiths, E.T., Harries, P.C., Jeffcoat, R., Trudgill, P.W. (1987b) Purification and properties of α -pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. strain p18.3. *J. Bacteriol.* 169: 4980-4983.

- Hanert, H.H. (1981) The genus *Galionella*, pp. 509-515. In: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes*. Springer, Berlin.
- Harder, J. (1997) Anaerobic degradation of cyclohexane-1,2-diol by a new *Azoarcus* species. *Arch. Microbiol.* 168: 199-204.
- Harder, J., Probian, C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3804-3808.
- Harder, J., Probian, C. (1997) Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 167: 269-274.
- Hartmans, S., de Bont, J.A.M., Harder, W. (1989) Microbial metabolism of short-chain unsaturated hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 235-264.
- Hartmans, S., Weber, F.J., Somhorst, D.P.M., de Bont, J.A.M. (1991) Alkene monooxygenase from *Mycobacterium*, a multicomponent enzyme. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2555-2560.
- Isenberg, H.D., D'Amato, R.F. (1991) Indigenous and pathogenic microorganisms of humans, pp. 15-28. In: A. Balows, W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. ASM, Washington.
- Kerstens, K., De Ley, J. (1984) Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936^{AL}, pp. 361-373. In: N.R. Krieg, J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. I. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Maidak, B.L., Larsen, N., McCaughey, J., Overbeek, R., Olsen, G.J., Fogel, K., Blandy, J., Woese, C.R. (1994) The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res.* 22: 3485-3487.
- Mesbah, M., Premanchandran, U. Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bact.* 39: 159-167.
- Miura, A., Dalton, H. (1995) Purification and characterization of the alkene monooxygenase from *Nocardia corallina* B-276. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 853-859.
- Pfennig, N., Wagener, S. (1986) An improved method for preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J. Microb. Meth.* 4: 303-306.
- Pickett, M.J., Hollis, D.G., Bottone, E.J. (1991) Miscellaneous Gram-negative bacteria, pp. 410-428. In: A. Balows, W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. ASM, Washington.
- Rosner, B.M., Schink, B. (1995) Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein. *J. Bacteriol.* 177: 5767-5772.
- Rossau, R., Kersters, K., Falsen, E., Jantzen, E., Segers, P., Union, A., Nehls, L., De Ley, J. (1987) *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 198-210.
- Sasser, M. (1997) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI, Newark.
- Schink, B. (1985) Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 69-77.

- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Strunk, O., Ludwig, W. (1995) ARB - a software environment for sequence data. Department of Microbiology, Technical University of Munich, Munich, Germany.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 6623-6630.
- Trudgill, P.W. (1986) Terpenoid metabolism by *Pseudomonas*, pp. 483-528. In: I.C. Gunsalus (ed.), *The bacteria: a treatise on structure and function*, Vol. X, *The biology of Pseudomonas*. Academic press, New York.
- Vancanneyt, M., Witt, S., Abraham, W.R., Kersters, K., Frederickson, H.L. (1996) Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of pseudomonads: a taxonomic evaluation. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 528-540.
- Vandamme, P., Hommez, J., Vancanneyt, M., Monsieurs, M., Hoste, B., Cookson, B., Wirsing von König, C.H., Kersters, K., Blackall, P.J. (1995) *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 37-45.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., Hinz, K.H. (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rürger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 849-858.
- van Ginkel, C.G., Welten, H.G.J., de Bont, J.A.M. (1987) Oxidation of gaseous and volatile hydrocarbons by selected alkene-utilizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2903-2907.
- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., Williamson, G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* 19: 1799-1897.
- Weissenfels, W.D., Beyer, M., Klein, J. (1990) Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 479-484.
- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F.M., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W., Brenner D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1-7.
- Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, pp. 3352-3378. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wright, S.J., Caunt, P., Carter, D., Baker, P.B. (1986) Microbial oxidation of alpha-pinene by *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 23: 224-227.

**Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by
denitrifying *Alcaligenes defragrans***

Udo Heyen and Jens Harder*

FEMS Microbiology Letters (1998) 169: 67-71

Max-Planck-Institut for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

* Corresponding author

Abstract

Alcaligenes defragrans strains denitrify on monoterpenes with an unsaturated hydrocarbon structure. A new cometabolic reaction, the formation of isoterpinolene from isolimonene, was detected in cultures that grew on a monoterpene. The biotransformation of isolimonene, a monocyclic monoterpene with a sp^3 -hybridized C1 atom of the menthane skeleton, contrasts with the complete mineralization of monoterpenes with a sp^2 -hybridized C1 atom. This selectivity indicates a demand for a sp^2 -hybridized C1 atom as structural property for monoterpenes that can be oxidized by *A. defragrans*.

Introduction

Environmental concerns have led to an intensive research on anaerobic degradation of hydrocarbons, which resulted in the isolation of new bacteria capable of degrading alkanes (Aeckersberg et al. 1991; Rueter et al. 1994) and aromatic compounds (Lovley et al. 1989; Dolfing et al. 1990). So far, only the biochemistry of the initial activation reaction of toluene has been revealed. A carbon-hydrogen bond of the methyl group is added to a fumarate molecule by the action of benzylsuccinate synthase, a putative glycine radical enzyme (Biegert et al. 1996; Coschigano et al. 1998). This unprecedented observation is of considerable interest for our understanding of enzymes (Harwood and Gibson 1997; Heider and Fuchs 1997) and raises the question how the mineralization of alkanes and alkenes is commenced.

Isoprene and monoterpenes are the largest natural source of alkenes. Estimated annual emission rates are in the order of 5×10^{14} g/year⁻¹ for each class of compounds (Zimmermann et al. 1978). We have recently shown that monoterpenes were microbially degradable in the absence of molecular oxygen (Harder and Probian 1995). The isolation of denitrifying microbes on (+)-*p*-menth-1-ene, (-)- α -phellandrene, (+)-2-carene and (-)- α -pinene yielded four strains that were described as *Alcaligenes defragrans* sp. nov. (Foß et al. 1998). In this study, neutral metabolites formed during monoterpene consumption were analyzed and identified. We report the stoichiometric formation of isoterpinolene (2,4(8)-*p*-menthadiene, 6-methyl-3-(1-methylethylidene)-cyclohexene) from isolimonene and propose a structural requirement for the central hydrocarbon activation reaction.

Materials and Methods

A. defragrans strains 51Men, 54Pin^T, 62Car and 65Phen and *Thauera terpenica* strain 58Eu^T were cultivated anaerobically on monoterpene and nitrate as sole electron donor and acceptor, respectively, on a bicarbonate-buffered defined medium with a 2,2,4,4,6,8,8-heptamethyl-nonane (HMN) phase as described (Harder and Probian 1995; Foß and Harder 1998; Foß et al.

1998). Typically, 30 μmol monoterpene and 150 μmol nitrate were present in 1.5 ml HMN phase and 15 ml freshwater medium before inoculation. Turbidimetric determinations at 660 nm were performed to measure biomass formation. Samples of the aqueous and the HMN phases were withdrawn with sterile, N_2 -flushed plastic and glass syringes, respectively. Nitrite and nitrate were quantified by anion exchange HPLC as described (Harder and Probian 1995). Concentrations of monoterpenes relate to the aqueous phase. Monoterpenes were determined by dual-column capillary-column gas chromatography (Foß and Harder 1997) and by gas chromatography-mass spectroscopy (Harder and Probian 1995). Compounds were identified by mass spectroscopy and retention time analysis (Kováts indices). The commercially not available isoterpinolene was synthesized by acid-catalyzed isomerization of α -phellandrene according to the literature (Erman 1985). A 1.5-ml portion of 100 mM α -phellandrene in HMN was mixed once with 20 ml of 60% (w/w) aqueous sulfuric acid and then incubated for 30 min at 67 °C. The reaction yielded according to GC analysis a mixture of α -phellandrene (70.6%), α -terpinene (23.0%), γ -terpinene (3.3%) and isoterpinolene (3.2%) and was used as isoterpinolene standard.

Results and Discussion

The monoterpenes supporting denitrifying growth of *A. defragrans* strains contain a common structural motif: the methyl group-carrying carbon atom (C1 in the menthane skeleton nomenclature (Erman 1985)) is sp^2 -hybridized. For example, limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene were utilized, but not isolimonene or (-)-*trans*-pinane (Foß et al. 1998). Therefore we investigated the fate of isolimonene, a monocyclic compound with a sp^3 -hybridized C1 atom, in cultures of *A. defragrans* strains and *T. terpenica* 58Eu^T, which is also capable of growing anaerobically on a limited range of unsaturated monoterpenes (Foß and Harder 1998). Isolimonene does not support microbial growth or denitrification of the strains (Foß and Harder 1998; Foß et al. 1998).

In cultures of *A. defragrans* strain 54Pin^T on limonene and nitrate, isolimonene disappeared and a new neutral metabolite accumulated corresponding to the decline of

isolimonene (Fig. 1). A comparison of the mass spectrum obtained by GC-MS (Fig. 2A) with published spectra (McLafferty and Stauffer 1989) identified the metabolite as isoterpinolene. Because the differentiation from other structural isomers, e.g. terpinolene, was predominantly based on differences in the signal intensity of mass ions, a retention time analysis was performed and yielded a Kovats retention index (RI) of 1091 for the metabolite. The published RI values of isoterpinolene and terpinolene, 1085 and 1088, respectively (Bestmann et al. 1985), were close to the determined value. Therefore an identification by coinjection with isoterpinolene or terpinolene standards was performed (Fig. 2B). The new metabolite comigrated with isoterpinolene, thus corroborating the GC-MS analysis.

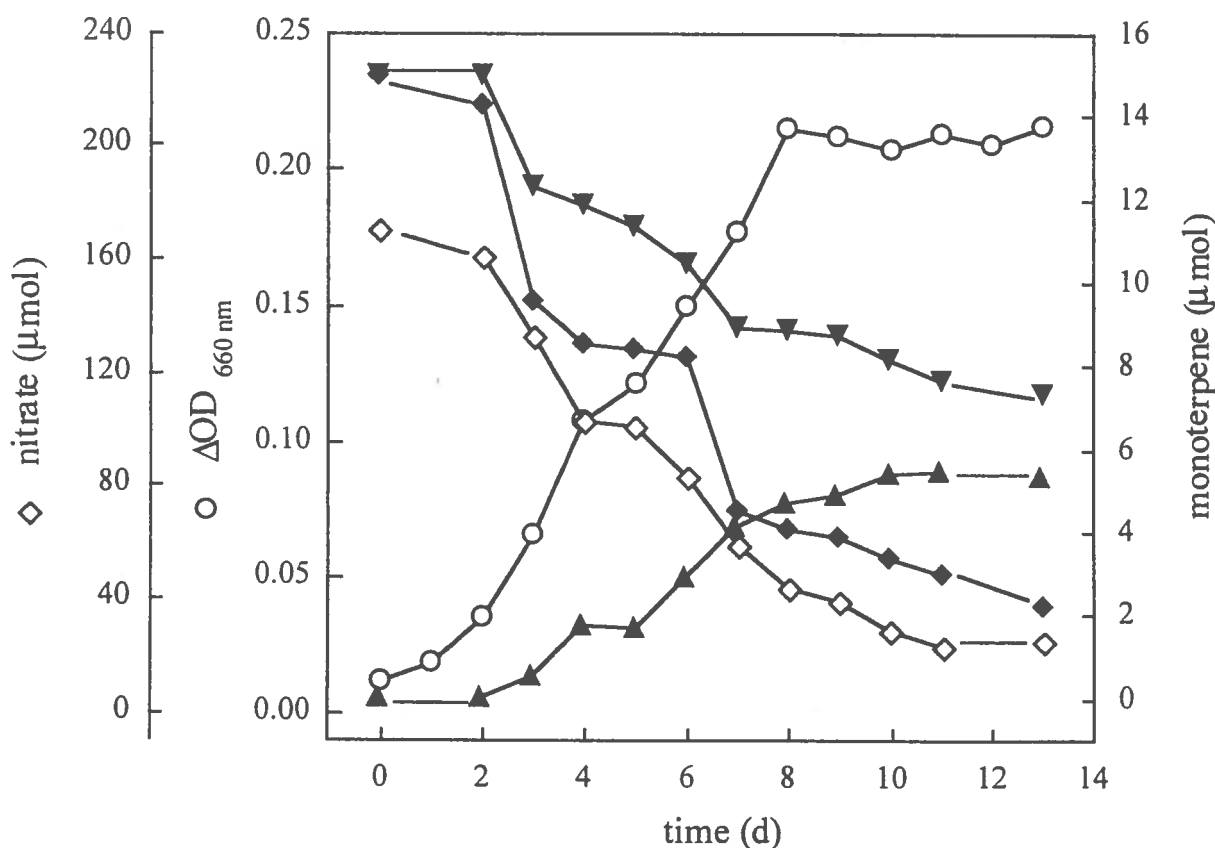


Fig. 1. Formation of a new metabolite (▲) during growth (O) of *A. defragrans* 54Pin^T on limonene (◆), isolimonene (▼) and nitrate (◇). A culture tube contained 3 ml HMN and 17 ml fresh water medium.

The microbial synthesis of isoterpinolene from isolimonene required the presence of a physiologically active culture and the presence of a monoterpene as growth substrate (Table 1). The concentration of 1 mM of limonene in the presence of 10 mM of nitrate represents a carbon limitation. Hence isolimonene and isoterpinolene could be oxidized when the bacteria had the required physiological traits. However, the recovery of between 64-98 % of the consumed isolimonene as isoterpinolene attests that these compounds are not efficiently metabolized further during an incubation time of 3 weeks. Analysis of the electron balances indicates that more electrons became available from the complete oxidation of the disappeared amount of the growth-supporting monoterpene to carbon dioxide than are required for the reduction of the consumed amounts of nitrate. Electron ratios of 1.1-1.5 resemble earlier experiments (Harder and Probian 1995; Foß and Harder 1997) and sustain the hypothesis that isoterpinolene is a dead-end product.

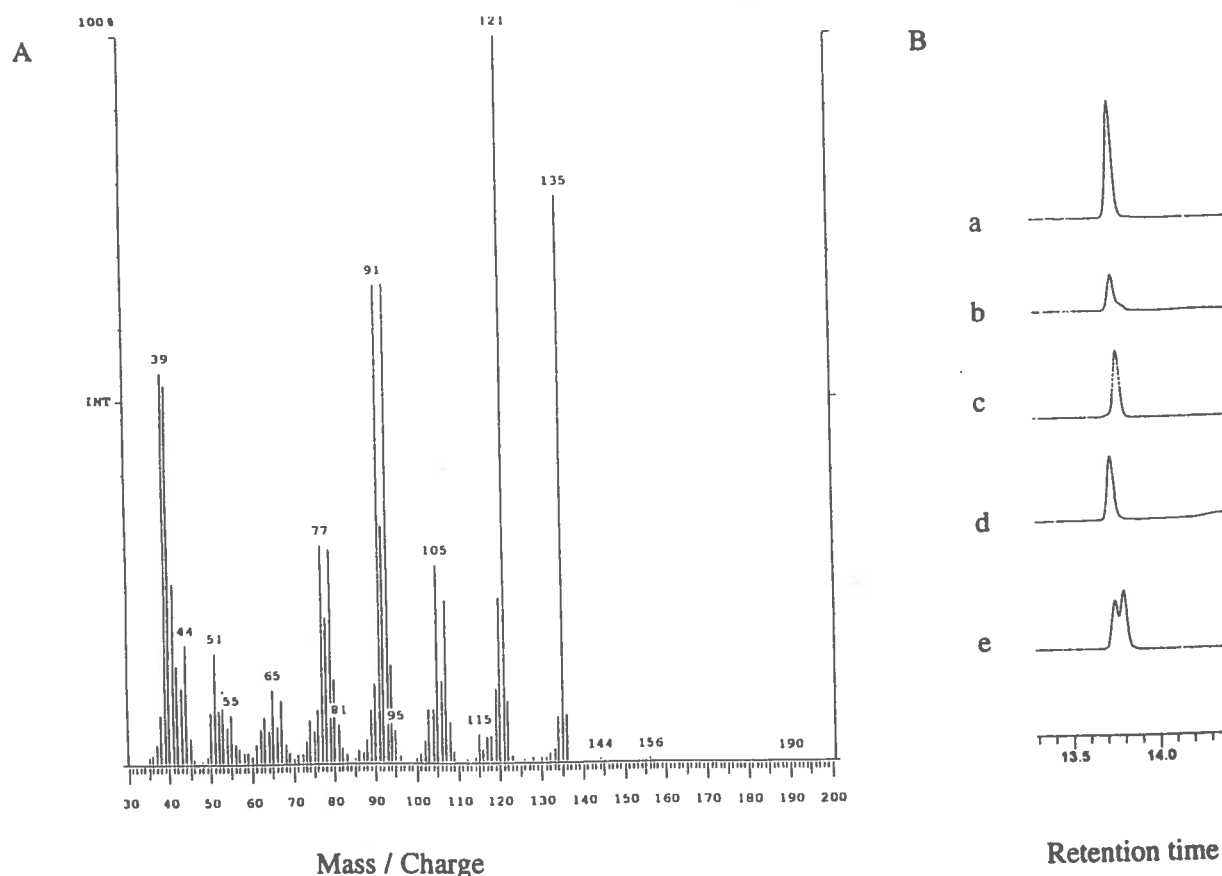


Fig. 2. A: Mass spectrum of the new metabolite. B: GC analysis of the metabolite (trace a), isoterpinolene (b), terpinolene (c), and standard additions of the metabolite and isoterpinolene (d) and the metabolite and terpinolene (e).

Surprisingly, the growth-supporting monoterpene was not completely consumed. A comparison of all strains indicated a toxic effect. All four *A. defragrans* strains catalyzed the allylic isomerization, but not *T. terpenica* 58Eu^T isolated on eucalyptol. Microbial growth of this strain on limonene (1 mM) was completely suppressed in the presence of isolimonene (1 mM), but could be restored by the addition of 5 mM acetate. Thus isolimonene causes a specific inhibition of the limonene degradation.

Isoterpinolene formation from isolimonene occurred with all monoterpenes tested as substrate for growth ((-)- α -pinene, limonene, (-)- α -phellandrene or a mixture of α -terpinene and γ -terpinene), but could not be detected in cultures utilizing either glutamate (5 mM) or gluconate (5 mM). This difference might be caused by either the absence of monoterpene degrading enzymes in these cultures or the low solubility of monoterpenes (ca. 50 μ M for alkenes) that restricts the rates of turnover in comparison to the fast growth rate on a highly water-soluble substrate.

Table 1 Quantification of monoterpene metabolism by nitrate-reducing *A. defragrans* strains and *T. terpenica* 58Eu^T

Strain and substrate	Bacterial growth ($\Delta\text{OD}_{660\text{nm}}$)	Amount of nitrate consumed (μmol , % consumption)	Amount of growth terpene consumed (μmol , % consumption)	Amount of isolimonene consumed (μmol , % consumption)	Amount of isoterpinolene formed (μmol)
<i>Alcaligenes defragrans</i> 54Pin ^T					
Limonene (2 mM)	0.222	154 (100)	17.0 (59)	0.0	0.0
Isolimonene (2 mM)	0.017	15 (10)	-	0.2	0.0
Limonene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.156	105 (76)	12.9 (86)	2.3 (15)	2.1
α -Pinene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.139	101 (66)	13.2 (88)	10.1 (67)	9.5
<i>Alcaligenes defragrans</i> 51Men					
Limonene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.204	122 (85)	14.2 (95)	1.7 (11)	1.1
<i>Alcaligenes defragrans</i> 62Car					
Limonene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.053	77 (51)	7.8 (52)	1.4 (9)	0.9
<i>Alcaligenes defragrans</i> 65Phen					
Limonene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.122	125 (81)	12.3 (82)	2.9 (19)	2.3
α -Phellandrene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.151	118 (79)	13.7 (91)	5.6 (37)	5.5
<i>Thauera terpenica</i> 58Eu ^T					
Limonene (2 mM)	0.190	138 (95)	14.1 (47)	0.0	0.0
Limonene (1 mM) + isolimonene (1 mM)	0.019	26 (18)	0.0	0.0	0.0

In summary, the accumulation of isoterpinolene as the product of an allylic rearrangement of isolimonene (Fig. 3) manifests the capacity of *A. defragrans* to activate alkene bonds of unsaturated monoterpenes and the necessity of a sp^2 -hybridized C1 atom with localized bonds for the further metabolism in which the monoterpene may be transformed into an ionic compound that stays intracellular as substrate.

Acknowledgement We like to thank Sabine Foß for critical discussions. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to J.H.) and the Max-Planck-Gesellschaft.

References

- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 5-14.
- Bestmann, H. J., Kobold, U. Vostrowsky, O. (1985) Gasphasen-Dehydratisierung von *p*-Menthenolen durch Reaktionsgaschromatographie. Korrelation der Eliminierungsprodukte mit Bildungsenthalpien aus Kraftfeldberechnungen. *Liebigs. Ann. Chem.* 1986: 234-241.
- Biegert, T., Fuchs, G., Heider, J. (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* 238: 661-668.
- Coschigano, P.W., Wehrman, T.S. Young, L.Y. (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1650-1656.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., Schwarzenbach, R. P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154: 336-341.
- Erman, W. F. (1985) *Chemistry of the monoterpenes*, 1709 pp. Marcel Dekker, New York.
- Foß, S. Harder, J. (1997) Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 71-75.
- Foß, S. Harder, J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 365-373.
- Foß, S., Heyen, U. Harder, J. (1998) *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene and α -phellandrene) and nitrate. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 237-244.
- Harder, J. Probian, C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3804-3808.
- Harwood, C.S., Gibson, J. (1997) Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J. Bacteriol.* 179: 301-309.
- Heider, J., Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* 243: 577-596.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schlitz, E., Schägger, H., Heider, J. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycy radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* 28: 615-628.
- Lovley, D. R., Baedecker, M. J., Lonergan, D. J., Cozarelli, I. M., Phillips, E. J. P., Siegel, D. I. (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* 339: 297-299.
- McLafferty, F. W. Stauffer, D. B. (1989) *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*, 6315 pp. Wiley & Sons, New York.

Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458.

Zimmermann, P. R., Chatfield, R.B., Fishman, J., Crutzen, P.J., Hanst, P.L. (1978) Estimates of the production of CO and H₂ from the oxidation of hydrocarbon emissions from vegetation. *Geophys. Res. Lett.* 5: 679-682.

**Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene
metabolism in *Alcaligenes defragrans***

Udo Heyen and Jens Harder

Manuscript in preparation

Max-Planck-Institut for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Abstract

Monoterpenes with an unsaturated hydrocarbon structure are mineralized anaerobically by the denitrifying β -proteobacterium *Alcaligenes defragrans*. Organic acids present in cells and culture broth were examined to identify potential products of the monoterpene activation reaction. Geranic acid had accumulated to 0.5 mM in cells grown on α -phellandrene under nitrate-limitation. Cell suspensions of *Alcaligenes defragrans* strain 65Phen produced geranic acid from β -myrcene, α -phellandrene, limonene, and α -pinene. The alicyclic acid was consumed by cell suspensions during carbon limitation. Myrcene yielded the highest transformation rates. The formation of geranic acid was catalyzed *in vitro* by heat-labile substances present in cytosolic extracts. These results suggest that the anaerobic monoterpene mineralization pathway involves ring opening reactions that reverse partly the biosynthetic pathway of monoterpenes in plants.

Introduction

The mineralization of organic matter by microorganisms is often severely hampered by the chemical structure of the substrate. One evolutionary solution is presented by mono- and dioxygenases that catalyze the oxidative functionalization of recalcitrant compounds, i.e., hydrocarbons. Microbial mineralization of these substances does also occur in nature in the absence of molecular oxygen, and in the last decade anaerobic bacteria were isolated on alkylbenzenes (Lovley et al. 1989; Dolfing et al. 1990; Heider et al. 1999), alkanes (Aeckersberg et al. 1991; Rueter et al. 1994; So and Young 1999) and alkenes (Gilewicz 1991). The biochemistry of the initial activation reactions has so far only been revealed for toluene. Catalysis via radicals seems to be involved in the addition of toluene to fumarate by the enzyme benzylsuccinate synthase, a putative glycine radical enzyme (Coschigano et al. 1998; Leuthner et al. 1998). This novel enzyme raises the question how the activation of alkanes and alkenes is commenced.

Monoterpenes are alkenes ubiquitous in nature. The enrichment and isolation of *Alcaligenes defragrans* and *Thaurea terpenica* demonstrated the physiological trait of anaerobic monoterpene mineralization (Harder and Probian 1995; Foß and Harder 1998; Foß et al. 1998). The former species catalyzes cometabolically the transformation of isolimonene to isoterpinolene (Heyen and Harder 1998). This 3,1-hydrogen- Δ^1 - Δ^3 -mutase reaction confirms the microbial activation of alkene bonds that are not polarized by adjacent functional groups. Here we report our efforts to identify the first ionic compound of the mineralization pathway present in *Alcaligenes defragrans*.

Material and Methods

Materials. *Alcaligenes defragrans* strains 51Men, 54Pin^T, 62Car, and 65Phen were maintained in our laboratory under selective conditions (Foß and Harder 1998). Monoterpenes have a low solubility of 50 to 200 µM in water; presented concentrations are solely calculated values that related to the aqueous phase in the experiment. Geranic acid (85% purity) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) and contained two isomers, 3,7-dimethyl-2,6-*trans,trans*-octadiene acid (geranic acid) and 3,7-dimethyl-2,6-*cis,trans*-octadiene acid (neric acid).

Culture conditions and cell harvest. Microorganisms were cultured without oxygen as described (Widdel and Bak 1992; Foß and Harder 1998). The Hungate technique was applied in all experiments to obtain anoxic conditions (Macy et al. 1972). Cultivation on acetate and nitrate occurred in 5-l bottles. Large-scale cultures on monoterpenes were established in a 10l-fermenter (Biostat A, Braun Biotech, Melsungen, Germany) equipped with pH- and temperature-controls maintaining pH 7.0 and 30 °C. A four blade impeller was run at 150 rpm to optimize mass transfer from the monoterpene phase (10 to 22 mM of terpene) to the aqueous phase containing 100 mM of nitrate in anaerobic single-fed batch fermentations. Cell harvest started with the addition of an additional reductant, finally 50 µM of Fe(II)Cl₂ and 2 mM of dithiothreitol. Then cells were transferred by gas pressure to centrifuge tubes. After centrifugation (11300x g for 20 min at 4 °C), the pellets were suspended in equal volumes of anoxic, nitrate-free medium, transferred to serum flasks, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Aerobic cultures were grown in phosphate buffered medium (Harder and Probian 1995).

Anaerobic cell suspension experiments. A twenty-ml aliquot of frozen cell suspensions was rapidly thawed and diluted in 80 ml of anoxic, nitrate-free medium. The obtained cell suspension was stirred for 20 min at room temperature with an internal magnetic bar and then dispensed into 15-ml vials or 30-ml tubes. The reactions were started by adding carbon sources and/or nitrate from anoxic stock solutions. Monoterpenes were diluted in 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane to obtain manageable solutions. Incubation took place at 28 °C in the dark with efficient phase mixing via an internal magnetic bar. Reactions were

stopped by addition of 0.4 ml of 100 mM sodium hydroxide per ml of sample (geranic acid analysis) or by addition of 2 ml of hexane (monoterpene analysis).

Preparation of anaerobic cell-free extracts and *in vitro* experiments. Cells were suspended in one volume of 100 mM of HEPES, pH 7.0, inside an anaerobic chamber and passed three times through a French Press cell at 7.6 MPa. Cellular fractions were obtained by centrifugation at 150 000x g for 45 min. The reactions were performed anaerobically with 1-ml aliquots in 2-ml vials as described above for cell suspension experiments.

Metabolite preparation. For the preparation of free fatty acids, 20 g wet cells were disintegrated with a French Press and then dialyzed against 0.75 l of distilled water for 24 h at 4 °C. The water containing the metabolites as well as the culture broth of the fermentation (10l) were acidified to pH 2.0 with sulfuric acid (60% w/v), and extracted three times with 0.1 l of diethylether per l of sample. The combined ether phases were clarified by centrifugation (3800x g for 10 min at 4 °C), and extracted three times with 300 ml of 50 mM NaOH per l of ether phase. The aqueous phases were neutralized with HCL and concentrated by freeze-drying. For GC and GC-MS analysis, 10 to 20 mg of sample was derivatized with 2 ml BF₃ in methanol (10% w/v) at 60 °C for 1 h and the methyl esters were then extracted with 1.25 ml of hexane. Control experiments revealed that this method yielded methanol adducts and rearrangements. Hence, trimethylsulfonium-hydroxide was applied to obtain methyl esters (Butte 1983).

Monoterpenes were recovered by addition of 2 ml of hexane per 5 ml of cell suspension, intensive mixing for 10 min, and phase separation by centrifugation (3800x g 10 min at 4 °C). Camphene in hexane was added as internal standard prior to GC analysis.

For HPLC analysis of acids, 1ml-samples were stopped with NaOH solution and were incubated at 80 °C for 20 min. After centrifugation (11300x g for 20 min), the supernatants were acidified with 150 µl of phosphoric acid (1.5 M) and centrifuged again. Supernatants obtained were filtrated (pore size 0.45 µm) prior to HPLC analysis.

Chemical analysis. Whole cell protein was determined after lysis by the method of Bradford (Harder and Probian 1997). Nitrite and nitrate analysis by HPLC and monoterpene analysis by GC was performed as described (Harder and Probian 1995; Foß and Harder 1997). Organic acid methyl esters were analysed with the following temperature program: injection

port temperature, 250 °C; column temperature, 60 °C for 2 min, increasing to 200 °C at a rate of 4 °C min⁻¹, 200 °C for 0.1 min, increasing to 220 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, 220 °C for 5 min; detection temperature, 280 °C. Mass spectra of methyl esters were obtained using a Finnigan MAT 8200 system (Finnigan, Bremen, Germany) in the EI mode (70 eV) with a scan speed of 1 s decade⁻¹ and an ion source temperature of 200 °C after separation by a temperature gradient on a DB-5 column (0.32 mm by 30 m, 0.25 µm film thickness). Organic acid were separated by RP-HPLC on a Spherisorb OD S2 column (5 by 250 mm, Grom, Herrenberg, Germany) with 0.75 mM aqueous phosphoric acid and acetonitrile (45:55 v:v) as eluent at 1 ml min⁻¹ at 25 °C. UV-detection was performed as scan and at 215 and 235 nm. Identification of metabolites was based on coherent data sets from GC-MS, retention time, and standard addition analysis.

Results

Monoterpene and nitrate consumption rates *in vivo*. *Alcaligenes defragrans* is solvent tolerant to monoterpenes (Heyen et al. 1999). Accumulation of nitrite, up to 16 mM, and other metabolites of the denitrification process did not hamper growth on 100 mM of nitrate. These features of resistance allowed the optimization of bacterial growth in a pH-controlled fermenter as single fed-batch culture on 22 mM of monoterpene and 100 mM of nitrate in the absence of an organic carrier phase. Maximum denitrification rates were 218 nmol nitrate (mg protein)⁻¹ min⁻¹. This comprises according to earlier quantitative determination (Foß et al. 1998) a monoterpene oxidation rate of 31 nmol monoterpene (mg protein)⁻¹ min⁻¹.

Free fatty acids in cells and culture fluid. Whole cells, water-soluble cellular compounds with a mass of less than 10 kDa, and culture fluids were surveyed via extraction, derivatization, and GC and GC-MS analysis for acidic oxidation products of the initial anaerobic monoterpene mineralization pathway present in *Alcaligenes defragrans* strain 65Phen. Free acids containing ten carbon atoms were found in the culture fluid and in cells of cultures that were grown anaerobically on α-phellandrene (Fig. 1), but not in cells of cultures

grown anaerobically on acetate. Cumic acid (*p*-isopropyl-benzoic acid) was present in cells as well as in culture broth at concentrations of 25 and 20 μM , respectively, after consumption of close to 22 mM of α -phellandrene and 100 mM of nitrate. Free geranic acid had accumulated to a concentration of 470 μM in cells, but the culture liquid did contain only 2 μM of geranic acid. Analysis of the monoterpenes supplied as substrate did not reveal the presence of geranic acid, as judged by GC and by HPLC with an UV-detection limit of 1 μM of geranic acid. When cells from several fermentations on α -phellandrene or limonene and nitrate were analyzed by the HPLC method, geranic acid was found in the biomass of nitrate-limited, but not in that of monoterpene-limited cultures. In addition, anaerobic cells grown on acetate and aerobic cells grown on limonene did not contain geranic acid.

Monoterpene, geranic acid, and nitrate metabolism in anaerobic cell suspensions. Cells of strain 65Phen were grown with a limited amount of limonene to avoid denitrification from intracellular storage compounds in cell suspension experiments. The biomass was harvested in the late exponential growth phase and suspended under strictly anoxic conditions. Cell suspensions reduced nitrate and consumed α -phellandrene with a specific rate of 123 pmol (mg protein)⁻¹ min⁻¹. Heat-inactivated inocula did not metabolize the carbon source and the electron acceptor.

The biomass of nitrate-limited fermentations contained geranic acid and a residual amount of growth-supporting monoterpene probably associated with lipid phases. The fate of geranic acid was studied in such cells grown on α -phellandrene during a suspension experiment (Fig. 2). In the absence of nitrate, the concentration of geranic acid increased from 101 μM to 370 μM in the assay. In denitrifying cell suspensions, the initial increase of geranic acid stopped at 195 μM . Nitrate depletion correlated with a further increase to 341 μM of geranic acid. These formation of geranic acid may originate from the microbial metabolism of residual α -phellandrene. The denitrifying cell suspensions started to consume geranic acid after the reduction of over 16 mM of nitrate. Three quarter of geranic acid present disappeared. Nitrate reduction was at this stage of the cell suspension limited to nitrite formation, likely a sign of electron donor limitation.

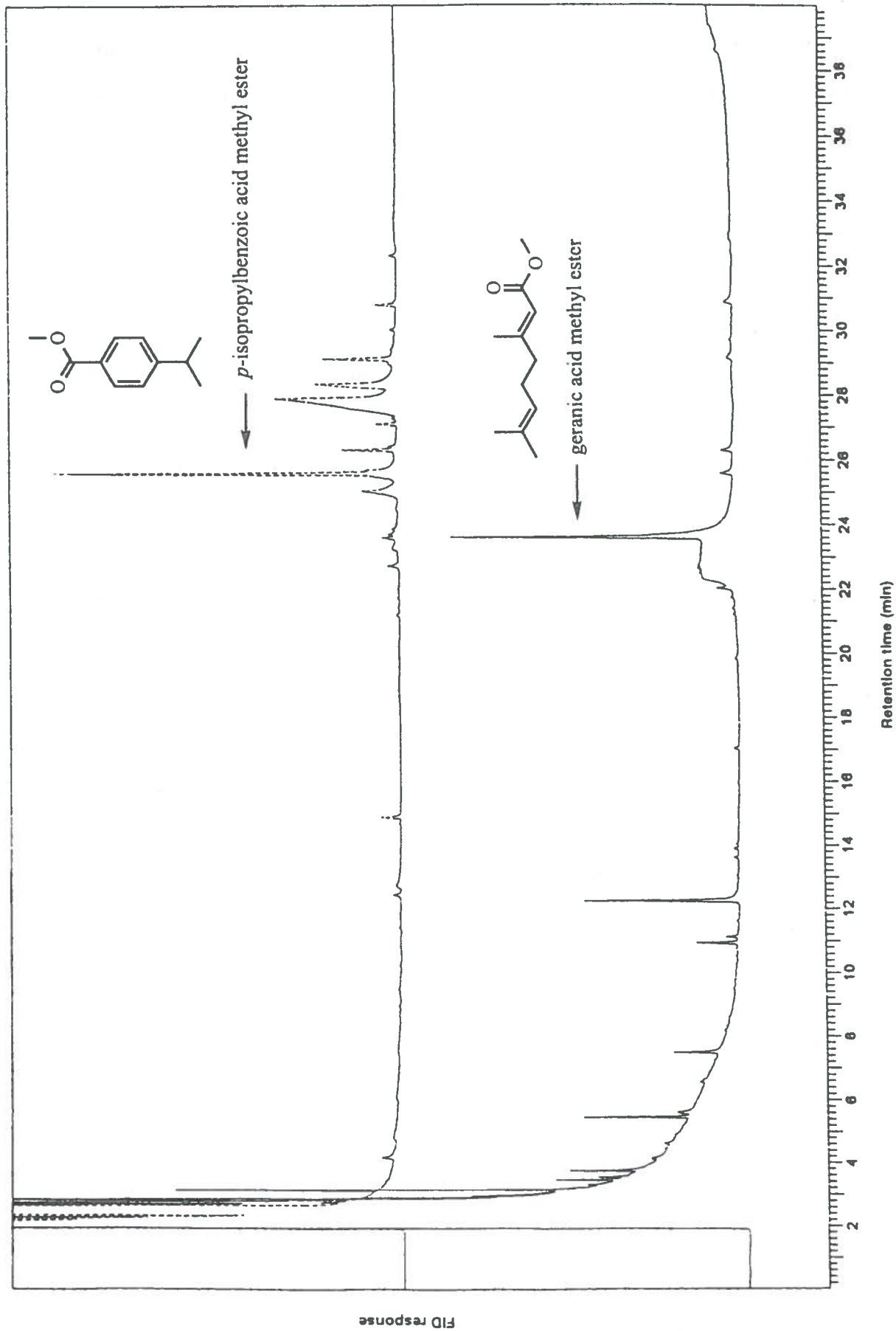


Fig. 1. GC analysis of organic acids present in culture fluid (top trace) and in cells (bottom trace).

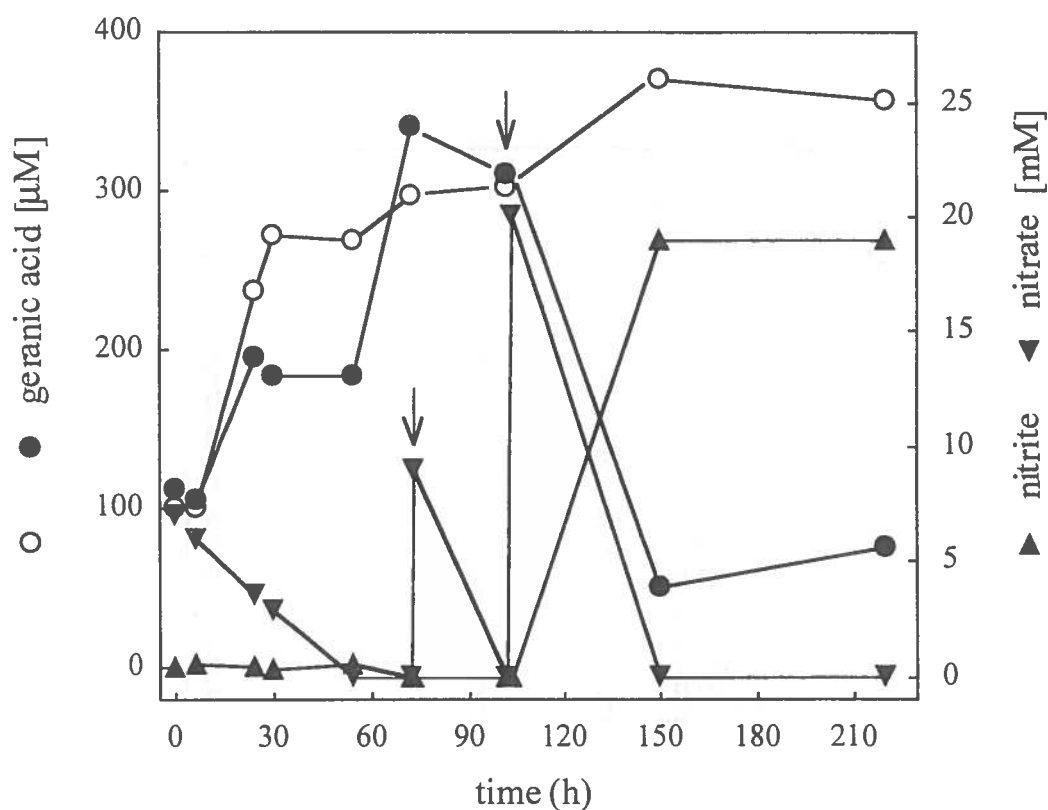


Fig. 2. Metabolism of geranic acid in the presence (●) and in the absence (○) of nitrate by dense cell suspensions of *Alcaligenes defragrans* strain 65Phen. Arrows show the addition of nitrate (9, 20 mM) after consumption.

The amounts of geranic acid formed in the different experiments were small with respect to the monoterpene supplied. Hence we tested various monoterpenes as precursors for geranic acid in nitrate-limited cell suspensions with 5 mM of nitrate and 4 mM of monoterpene. The denitrifying cells produced within two days 50, 54 and 68 μM of geranic acid from α -pinene, limonene, and α -phellandrene, respectively. The acyclic β -myrcene supported the synthesis of 508 μM of geranic acid, presenting a transformation rate of approximately 13% of the myrcene supplied. Cell suspension experiments with different amounts of myrcene indicated a tight correlation between yield of geranic acid to the supply of myrcene (Fig. 3). To test whether an acyclic monoterpene is essential, we examined citronellene and the growth substrate ocimene. These monoterpenes did not support geranic acid formation. Myrcene was not present, according to GC analysis, in the monoterpenes α -pinene, limonene, and α -phellandrene which did support geranic acid formation.

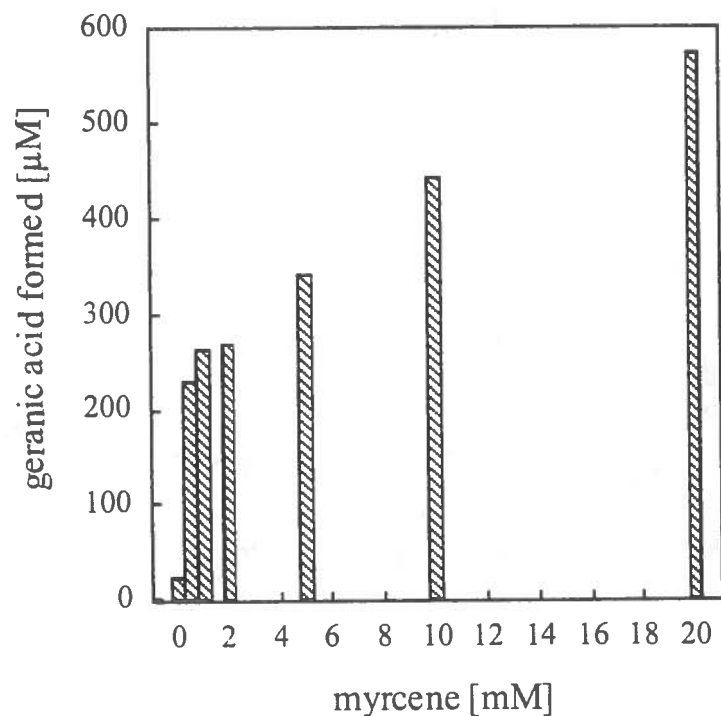


Fig. 3. Geranic acid formation by cell suspensions of *Alcaligenes defragrans* strain 65Phen related to the amount of myrcene provided.

Geranic acid formation in cell-free extracts. Cells of strain 65Phen were fractionated to locate the site of geranic acid formation. The catalytic activity was preserved after cell disintegration by passage through a French Press under anoxic conditions and was recovered to over 90% in the soluble fraction after ultracentrifugation, an indication for a cytosolic location. After a small lag phase, the reaction proceeded linear up to a turnover of 6% of 10 mM of myrcene within one day of incubation (Fig. 4). During this time, the geranic acid synthesis rate was $52 \text{ pmol (mg protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ at a protein concentration of $10 \text{ mg protein ml}^{-1}$. The reaction required myrcene, but did not require nitrate. Incubation of the extract for 10 min at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ inactivated completely the capacity to form geranic acid (Tab. 1).

Tab. 1. Geranic acid formation by cell-free cytosolic extracts. The assay were incubated for 20 h.

Experiment	Protein content (mg ml ⁻¹)	Myrcene provided (mM)	Geranic acid formed (mM)
Complete	10.1	10	0.590
- myrcene	10.1	0	0.000
+ heat treatment (95°C for 10 min)	10.1	10	0.000
+ nitrate (20 mM)	10.1	10	0.581
diluted extract (1:5)	1.85	10	0.127
diluted extract (1:10)	1.15	10	0.029

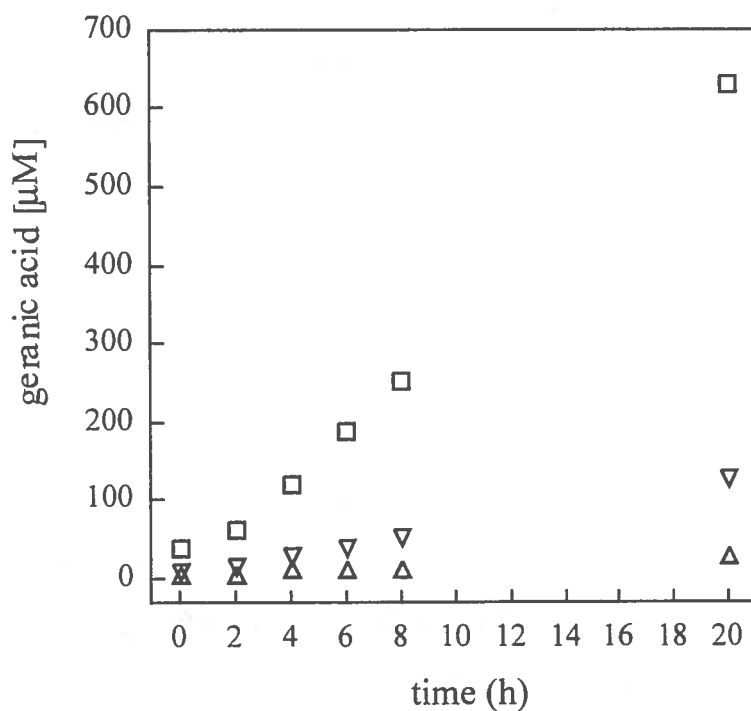


Fig. 4. Time- and protein-dependence of geranic acid formation by cell-free cytosolic extracts. Protein concentration (mg·ml⁻¹): □ 10.1, ▽ 1.85, Δ 1.15.

Growth experiments with *Alcaligenes defragrans*. Myrcene supports denitrifying growth of *Alcaligenes defragrans* strains 51Men, 62Car and 65Phen, but not growth of the type strain 54Pin^T (Foß et al. 1998). In an extended survey, ocimene was identified as the first

acyclic monoterpene that supports growth of all four strains. The degradation of myrcene and, as control, of α -phellandrene was studied with *Alcaligenes defragrans* strains 65Phen in monoterpene-limited experiments containing 1 mM of monoterpene and 20 mM of nitrate, to verify the complete mineralization of myrcene. After 15 days of incubation, the cultures were in the late stationary growth phase. The consumption of 0.90 mM of myrcene and of 0.97 mM of α -phellandrene went with the denitrification of 7.6 and 8.1 mM of nitrate and a biomass formation of 18.4 and 21.6 mg protein l⁻¹, respectively. Geranic acid was not detectable in these cultures.

Other substrates tested as sole organic carbon source included monoterpenoic acids and methylcyclohexenes. Cumic acid (0.5 mM) and the available isomer mixture of geranic acid and neric acid (0,5 mM) did not support denitrification and growth of *Alcaligenes defragrans* strains. Molecules lacking the isopropyl group, 1-methyl-cyclohexene and 1-methyl-cyclohexa-1,4-diene, were not utilized, in contrast to the corresponding monoterpenes, menth-1-ene and γ -terpinene.

Discussion

The mineralization of hydrocarbons by aerobic microorganisms requires molecular oxygen (for monoterpenes, review Trudgill 1994; Iurescia et al. 1999; van der Werf et al. 1999). In the absence of the cosubstrate, anaerobic bacteria have to use a different biochemistry, which still contains many unknown features (Fuchs 1999). Interested in alkenes, we chose natural monoterpenes as substrates for the isolation of anaerobic, nitrate-respiring bacteria (Harder and Probian 1995). In this study, we describe the first identification of an ionic product obtained from the initial anaerobic hydrocarbon activation reaction. Geranic acid, *E,E*-3,7-dimethyl-2,6-octadienic acid, was found as major metabolite formed in nitrate-limited cells that were grown anaerobically on monoterpenes. The identification of geranic acid involved GC and HPLC analysis with mass spectra, FID and UV-scan detection. Retention time analysis as well as the mass spectrum indicated the *trans,trans* configuration.

Experiments with cell suspensions and cell free extracts showed that cyclic monoterpenes (α -pinene, limonene, and α -phellandrene) and myrcene served as metabolic precursor of geranic acid. Myrcene transformation went with higher rates. This may be attributed to the fact that the other compounds have to experience a ring opening reaction in order to become acyclic. Ring opening reactions can involve ionic or radical intermediates. Thermal rearrangement of α - and β -pinenes is industrially used to obtain ocimene and myrcene, respectively. The mechanisms involves biradicals and comprises a decyclization of the menthane carbocycle (Erman 1985). A transformation of cyclic monoterpenes into acyclic monoterpenes via ionic intermediates has, to our knowledge, never been reported (Erman 1985; Cruz Costa et al. 1996). The opposite is well known: all natural cyclic monoterpenes are synthesized via cationic intermediates (Croteau 1987; Gibbs 1998). Hence, future studies on the anaerobic formation of geranic acid from monoterpenes will expand our knowledge frontier of enzymatic catalysis. The development of the first *in vitro* assay for anaerobic alkene transformation has provided the means.

Acknowledgement. We thank Peter Schulze, Universität Bremen, for GC-MS analysis. This study was supported by the Max-Planck-Society and the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 4-14.
- Butte, W. (1983) Rapid method for the determination of fatty-acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for trans-esterification. *J. Chrom.* 261: 142-145.
- Coschigano, P.W., Wehrman, T.S., Young, L.Y. (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1650-1656.
- Croteau, R. (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87: 929-954.
- Cruz Costa, M.C., Johnstone, R.A.W., Whittaker, J.D. (1996) Catalysis of gas and liquid phase ionic and radical rearrangements of α - and β -pinene by metal(IV)phosphate polymers. *J. Mol. Cat. A: Chem.* 104: 251-259.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., Schwarzbach, R.P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154: 336-341.
- Erman, W.F. (1985) Chemistry of the monoterpenes: An encyclopedic handbook, Part A. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Foß, S., Harder, J. (1997) Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 149: 71-75.
- Foß, S., Harder, J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 365-373.
- Foß, S., Heyen, U., Harder J. (1998) *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene and α -phellandrene) and nitrate. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 237-244.
- Fuchs, G. (1999) Novel reactions and catalytic mechanisms in anaerobic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 339-340.
- Gibbs, R.A. (1998) Prenyl transfer and the enzymes of terpenoid and steroid biosynthesis, pp. 31-118. In: M. Sinnott (ed.), *Comprehensive biological catalysis: a mechanistic reference*, Vol. 1. Academic Press, London.
- Gilewicz, M., Monpert, G., Acquaviva, M., Mille, G., Bertrand, J.C. (1991) Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 252-256.
- Harder, J., Probian C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3804-3808.
- Harder, J., Probian C. (1997) Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 167: 269-274.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., Widdel, F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 459-473.
- Heyen, U., Harder, J. (1998) Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by denitrifying *Alcaligenes defragrans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 169: 67-71.

- Heyen, U., Probian, C., Foß, S., Harder, J. (1999) Monoterpene tolerance of denitrifying *Alcaligenes defragrans*, in preparation.
- Iurescia, S., Marconi, A.M., Tofani, D., Gambacorta, A., Paternò, A., Devirgiliis, C., van der Werf, M.J. (1999) Identification and sequencing of β -myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2871-2876.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schlitz, E., Schägger, H., Heider, J. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* 28: 615-628.
- Lovley, D.R., Baedeker, M.J., Lonergan, D.J., Cozzarelli, I.M., Phillips, E.J.P., Siegel, D.I. (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* 339: 297-300.
- Macy, J.M., Snellen, J.E., Hungate, R.E. (1972) Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1318-1323.
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H.W., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458.
- So, C.M., Young, L.Y. (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2969-2976.
- Trudgill, P.W. (1994) Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes, pp. 33-61. In: C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- van der Werf, M.J., Swarts, H.J., de Bont, J.A.M. (1999) *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2092-2102.
- Widdel, F., Bak F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd Ed. Springer, Berlin.

Monoterpene tolerance of denitrifying *Alcaligenes defragrans*

Udo Heyen, Christina Probian, Sabine Foß and Jens Harder

Manuscript in preparation

Max-Planck-Institut for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Abstract

Organic solvents are toxic for microorganisms. We now report that *Alcaligenes defragrans* tolerates a pure monoterpene phase during denitrifying growth, i. e., 30% (vol/vol) limonene. Molecular analysis of enrichment cultures on monoterpenes and nitrate revealed a large population of *Alcaligenes defragrans*-affiliated bacteria, indicating an ecological advantage of the monoterpene tolerance.

Introduction

The isolation of anaerobic microorganisms on water-soluble hydrocarbons is severely hampered by the toxicity of the substrates. Alkylbenzenes and monoterpenes have partition coefficient values of $\log P_{\text{octanol/water}}$ between 1 and 5 and are, in general, toxic (van der Werf 1997; Isken and Bont 1998). The toxicity is due to accumulation in cell membranes, causing finally a disruption of the protein-lipid bilayer structure and the membrane potential (Sikkema et al. 1995). Hence, successful anaerobic growth procedures maintained a low concentration in the aqueous phase either by a repeated fed (Altenschmidt and Fuchs 1991) or by an organic carrier phase that is nearly water-insoluble, not biodegradable, and not toxic, e.g., mineral oil or 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (Rabus et al. 1993; Harder and Probian 1995).

Ten years ago, the first aerobic bacterium was isolated that thrived in the presence of 50% (vol/vol) toluene (Inoue and Harikoshi 1989). Next, solvent-tolerant bacteria were cultivated that utilized the organic phase, e. g. grew on 50% (vol/vol) *p*-xylene (Cruden et al. 1992; reviewed in Isken and Bont 1998). In this study, we show that anaerobic microorganisms also possess the physiological capacity of tolerance towards organic solvents.

Results and Discussion

Resistance of *Alcaligenes defragrans* against a monoterpene phase. Our isolation procedure of monoterpene-degrading denitrifying bacteria comprised 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) as organic phase to reduce the toxic effects of monoterpenes (Harder and Probian 1995). Now we tested the biocidal effect of different monoterpenes applying anoxic media and cultivation techniques as described earlier (Widdel and Bak 1992; Harder and Probian 1995; Foß et al. 1998). Biomass formation was measured turbidimetrically at 660 nm. Whole cells were lysed in hot, alkaline solution, and protein was determined by the method of Bradford as described (Harder and Probian 1997). *Alcaligenes defragrans* (Foß et al. 1998) and *Thauera* spp. strains (Foß and Harder 1998) were from our laboratory collection. Due to the low solubility, 50 to 200 µM (Weidenhamer et al. 1993), the monoterpene supplied formed an organic phase in the culture tubes, and all presented monoterpene concentrations are only calculated values that relate to the aqueous phase in the experiment. In the absence of the HMN phase, all *Alcaligenes defragrans* strains, 51Men, 54Pin^T, 62Car, and 65Phen, *Thauera terpenica* strains 21Mol and 58Eu^T, and *Thauera linaloolentis* grew on their isolation substrate in the presence of a monoterpene phase (4 mM of monoterpene). *Alcaligenes defragrans* strains 54Pin^T and 65Phen exhibited an extreme tolerance towards growth substrates: they prospered on concentrations of up to 200 mM α-pinene and α-phellandrene, respectively, that corresponded to 3% (vol/vol) monoterpene. Strain 54Pin^T thrived also on 30% (vol/vol) limonene. The biomass yield decreased from 10 g of protein per mol of nitrate consumed on 2 mM of monoterpene and 10 mM of nitrate to 2 g of protein per mol of nitrate consumed on 30% (vol/vol) limonene and 10 mM nitrate. Essential oils containing only monoterpenes (lemon oil, spruce needle oil) were also utilized without an organic carrier phase.

The high monoterpene resistance of *Alcaligenes defragrans* is, to our knowledge, the first example for an anaerobic bacterium with the physiological trait of tolerance towards organic solvents. One tolerance mechanism of *Alcaligenes defragrans* may be the presence of large amounts of cyclopropane fatty acids in monoterpene-grown cells (Foß et al. 1998).

However, the physiological role of cyclopropane fatty acid synthesis is not well understood (Grogan and Cronan 1997).

Resistance of *Alcaligenes defragrans* 54Pin^T against monoterpene alcohols. The toxicology of monoterpenes and monoterpenoids, as defined by studies with aerobic organisms, has shown that monoterpenoids are more toxic than monoterpenes, causing a reduction of the energy conservation rate (Knobloch et al. 1986). *Alcaligenes defragrans* does not utilize monoterpene alcohols and ketones (Foß et al. 1998). Hence, we tested the effect of monoterpene alcohols on growth of *Alcaligenes defragrans* 54Pin^T on 20 mM of acetate, 2 mM of α -pinene (diluted in 0.5 ml of HMN) or 20 μ l of spruce needle oil (Roth, Karlsruhe, Germany). The presence of 1 mM of (-)-carveol, (-)-myrtenol, (+)-isopinocampheol, (+)-isopulegol, menthol, (+)-perilla alcohol, or *cis*-verbenol impaired marginally growth on acetate, 4 to 8 d⁻¹. In contrast, these alcohols caused reduced growth rates and biomass yields during growth on α -pinene or spruce needle oil. The extent of inhibition depended on the individual monoterpenoid and on the amount of substrate present. Carveol, myrtenol and perilla alcohol completely suppressed growth on 2 mM of α -pinene diluted in a HMN phase above 100 μ M of alcohol. Nitrate reduction on 20 μ l of spruce needle oil, that corresponded to a menthadiene concentration of 8.6 mM, was not observed in the presence of 1 mM of carveol within one month of incubation.

Enrichments of denitrifying bacteria on monoterpenes in the absence of HMN. Originally, we isolated on four different monoterpenes four strains of *Alcaligenes defragrans* but no strain of another genus (Harder and Probian 1995; Foß et al. 1998). To test whether the solvent tolerance of *Alcaligenes defragrans* may contribute as major selection factor, we started enrichment cultures without an organic carrier phase. The culture bottles contained 200 ml of freshwater medium with 10 mM of monoterpene and 5 ml of activated sludge as inoculum. Overpressure due to gas formation was determined with a gas-tight syringe and depletion of nitrate (initially 10 mM) was observed with a semi-quantitative indicator strip (Merck, Darmstadt, Germany). Upon electron acceptor depletion, 10 mM of nitrate were re-established in the enrichment culture by addition of an anoxic nitrate stock solution (5 M). Microbial growth and consumption of totally more than 30 mM of nitrate was observed within five weeks with menth-1-ene, all menthadienes tested (α -phellandrene, α -terpinene,

γ -terpinene, limonene) and geranic acid, but not with α -pinene, *p*-cymene, menthol or without added organic carbon source. To identify the growth success of bacteria closely related to *Alcaligenes defragrans* in these enrichment cultures, the cells grown were characterized by fluorescent in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligodeoxynucleotide probes that were labelled with the fluorescent dye Cy3.18 (Biological Detection Systems, Pittsburgh, Pa.). In a nested approach (Amann et al. 1995), probes EUB338 for *Bacteria*, BET42a with a non-labelled competitor probe, GAM42a, for *Proteobacteria* of the beta subclass, AT1458 for the genera *Thauera* and *Azoarcus* plus *Alcaligenes defragrans*, and the species-specific probe Ade441 for *Alcaligenes defragrans* were applied as described (Manz et al. 1992; Rabus et al. 1999). Bacteria detectable with the probe Ade441 were present in small amounts in the inoculum (activated sludge, Table 1). After successful growth of the enrichments, *Alcaligenes defragrans*-related bacteria were a major part of the microbial population or dominated it (Tab. 1).

Table 1 Detection of *Alcaligenes defragrans* in denitrifying enrichment cultures on monoterpenes (10 mM) by fluorescent in situ hybridization.

Culture	Probe-positive cells / DAPI-stained cells (%)			
	EUB338	BET42a	AT1458	Ade441
Activated sludge (inoculate)	77 ± 10	36 ± 11	4 ± 4	3 ± 3
<i>Alcaligenes defragrans</i> (pure strains)	96 ± 2	97 ± 2	94 ± 6	97 ± 2
Enrichment cultures on				
α -phellandrene	43	45	17	0
α -terpinene	75	68	30	54
γ -terpinene	81	56	12	41
limonene	77	79	49	74
menth-1-ene	83	65	40	63
geranic acid	63	33	27	29

The probe AT1458 specific for the *Azoarcus-Thauera* group and for *Alcaligenes defragrans* (Rabus et al. 1999) detected apparently less cells than the probe Ade441. This may be a problem of the in situ accessibility of the 16S rRNA. According to a study with *Escherichia coli* (Fuchs et al. 1998), the probe Eco440 has one of the brightest signals, whereas probes Eco1455 and Eco 1464 have only 37% and 4%, respectively, of the brightness of probe Eco 440.

Concluding remarks. *Alcaligenes defragrans* tolerates the presence of a monoterpene phase and can be selectively enriched on monoterpenes without a carrier phase. This first example of an anaerobic solvent-tolerant bacterium opens new horizons for the application of such bacteria in biotechnology, e.g., biocatalysis in organic solvents.

Acknowledgements We thank Dr. Rudi Amann for providing the facilities for in situ hybridization and Dr. Andreas Schramm for helpful discussions. This study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to J. H..

References

- Altenschmidt, U., Fuchs G. (1991) Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. Arch. Microbiol. 156: 152-158.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169.
- Cruden, D. L., Wolfram, J. H., Rogers, R. D., Gibson, D. T. (1992) Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2723-2729.
- Foß, S., Harder, J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. Syst. Appl. Microbiol. 21: 365-373.
- Foß, S., Heyen, U., Harder J. (1998) *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene and α -phellandrene) and nitrate. Syst. Appl. Microbiol. 21: 237-244.
- Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann R. 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4973-4982.
- Grogan, D. W., Cronan, J. E. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 429-441.
- Harder, J., Probian C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3804-3808.
- Harder, J., Probian C. (1997) Anaerobic mineralisation of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. 167: 269-274.
- Inoue, A., Horikoshi K. (1989) A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. Nature 338: 264-266.
- Isken, S., de Bont, J. A. M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. Extremophiles 2: 229-238.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H. M., Vogenschow H. (1986) Action of monoterpenoids on energy metabolism. pp. 429-446. In: E.J. Brunke (ed.), Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. System. Appl. Microbiol. 15: 593-600.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., Widdel F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1444-1451.
- Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., Widdel R. (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. Environ. Microbiol. 1: 145-157.

- Sikkema, J., de Bont, J. A. M., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
- van der Werf, M. J., de Bont, A. A. M., Leak, D. J. (1997) Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55: 147-177.
- Weidenhamer, J. D., Macias, F. A., Fischer, N.H., Williamson G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? *J. Chem. Ecol.* 19: 1799-1807.
- Widdel, F., Bak F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd Ed. Springer, Berlin.

Denitrification on essential oils

Jens Harder, Udo Heyen, Christina Probian and Sabine Foß

Manuscript in preparation

Max-Planck-Institut for Marine Microbiology, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Abstract

Essential oils represent a surrogate for plant volatile organic compounds, a major carbon source in nature. Enrichment of anaerobic microorganisms was attempted from sewage sludge, with essential oils as organic substrate and nitrate as electron acceptor. Lemon and pine needle oil supported microbial growth in the presence of pure oil, whereas parsley seed, camphor, sage, fennel, and mint oil were only utilized when the essential oils were diluted in 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane. Thyme oil did not support denitrification. GC analyses of the essential oils after microbial consumption revealed the disappearance of monoterpenes, of several monoterpenoids, and of methoxy-propenyl-benzenes.

Most-probable-number determinations for denitrifying populations in sewage sludge and forest soil yielded 10^6 to 10^7 monoterpene-utilizing cells ml^{-1} , representing a significant portion of the total cultivable nitrate-reducing population. This common occurrence of the metabolic trait together with the utilization of essential oils suggests that plant hydrocarbons and other volatiles released from litter and roots may be anaerobically mineralized in the soil, thereby restricting the diffusive flux of these greenhouse compounds into the atmosphere.

Introduction

Plants produce volatile organic compounds that diffuse into the atmosphere and the soil. Monoterpenes are a major group of these volatiles. Primarily synthesized monoterpenes are unsaturated hydrocarbons that contribute together with isoprene to the thermal tolerance of plants (Sharkey and Singaas 1995). A second physiological function is the defence against herbivores: plants induce the synthesis upon insect damage (Gershenzon and Croteau 1991; Paré and Tumlinson 1997). Monoterpenes are also oxidized in plants by oxygenases. The products, monoterpene alcohols and ketones, are named monoterpenoids.

Essential oils are obtained by steam distillation of plant parts. These mixtures of plant volatiles contain mainly monoterpenes and monoterpenoids together with some aromatic compounds and sesquiterpenes. The oils are used as flavours, fragrances and pharmaceutical products. The latter utilization is based on antimicrobial properties (Janssen et al. 1987; Billing and Sherman 1998; Hulin et al. 1998). The toxicology of monoterpenes and monoterpenoids, as defined by studies with aerobic organisms, has shown that monoterpenoids are more toxic than monoterpenes. This is presumably due to a higher bioavailability caused by a higher watersolubility (Weidenhamer et al. 1993) and the presence of alcohol and ketone groups which can react with proteins. Membranes have been identified as one target site where monoterpenes act (Sikkema et al. 1995). The presence of monoterpenes in forest litter may cause, according to recent studies, an ecological important inhibition of ammonium and methane oxidation (Ward et al. 1997; Amaral et al. 1998; White 1988).

Monoterpenes and monoterpenoids are known to be anaerobically biodegradable since a few years (Harder and Probian 1995; reviewed in Hylemon and Harder 1998). In this study, we investigated, to our knowledge for the first time, the biodegradability of representative essential oils under anoxic, denitrifying conditions using sewage sludge, forest ditch mud, or *Alcaligenes defragrans* as inoculum. *Alcaligenes defragrans* represents the first bacterium isolated that mineralizes monoterpenes anaerobically (Harder and Probian 1995; Foß et al. 1998). The contribution of bacteria related phylogenetically to *Alcaligenes defragrans* to the degrading population in enrichment cultures was determined by whole cell in situ

hybridization with fluorescent 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. The population size of denitrifying monoterpene-utilizing bacteria was appraised to test whether the metabolic capacity is common in nature.

Materials and Methods

Culture conditions. Anoxic media and cultivation techniques were used as described (Widdel and Bak 1992; Foß et al. 1998). *Alcaligenes defragrans* strain 54Pin^T was from our laboratory culture collection. Experiments performed with the species included a chemical reductant, 4 mM of ascorbate. Due to the low solubility, all presented monoterpene concentrations are calculated values that relate to the aqueous phase in the experiment. Natural oils (Italian lemon oil, pine needle oil, parsley seed oil, camphor oil, Dalmatian sage oil, fennel oil, mint oil (China), and thyme oil) were obtained from Roth, Karlsruhe, Germany.

Enrichment cultures on essential oils were attempted in 250ml-round bottle flasks with 5 ml of activated sludge or 20 ml of a mud-ditch water slurry from a forest ditch as inoculate. The cultures were incubated for four months at 28 °C in the dark. Overpressure due to gas formation was determined regularly with a gas-tight syringe and depletion of nitrate (initially 10 mM) was observed with a semi-quantitative indicator strip (Merck, Darmstadt, Germany). Upon electron acceptor depletion, 10 mM of nitrate were re-established in the enrichment culture by addition of an anoxic nitrate stock solution (5 M).

The size of denitrifying populations in activated sewage sludge from a local wastewater treatment plant (Lintel, Osterholz-Scharmbeck, Germany) and in soil of a local forest near Bremen was estimated with most-probable-number dilutions in liquid medium (APHA, 1969). MPN counts were performed in steps of a tenfold dilution with three portions per dilution. Each portion contained 10 ml of freshwater medium including 10 mM of nitrate (Foß et al. 1998) and (i) a mixture of acetate, butyrate, succinate, lactate and ethanol (1 mM of each compound), (ii) a mixture of eucalyptol, 2-carene, α -pinene, (+)-sabinene and α -terpinene (0.3 mM of each compound in totally 0.4 ml of HMN), or (iii) 1.5 mM of α -terpinene in 0.4 ml of HMN. The MPN culture tubes were incubated for eight weeks at 20 °C in the dark.

They were placed on a rotary shaker (60 rpm) in an inverted position with an angle of fifteen degrees above the horizontal to improve the bioavailability of the monoterpene.

Chemical analyses. Semi-quantitative measurements of nitrate consumption were performed with an indicator strip (Merck, Darmstadt, Germany). Nitrate and nitrite were determined quantitatively by HPLC (Harder and Probian 1995). Monoterpenes were analysed by capillary-column GC with a Perkin-Elmer Autosystem gas chromatograph (Überlingen, Germany) equipped with flame ionization detectors, a CTC A200S autosampler and a Turbochrom digital data-analyzing system. Compounds were separated by using an Optima-5 column (0.32 mm by 50 m, 0.25 μm film thickness, Macherey-Nagel), H_2 at a flow rate of 2 ml min^{-1} , and the following temperature programs: injection port temperature, 270 $^{\circ}\text{C}$; column temperature, 60 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min, increasing to 140 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, increasing to 320 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 40 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, 320 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min; flame ionization detector 350 $^{\circ}\text{C}$. GC-MS was performed as described by Harder and Probian (1995). Compound identification was based on relative retention times, mass spectra and, in several cases, comparison with authentic standards. The composition of the essential oils agreed with analyses published by Formáček and Kubeczka (1982).

In situ hybridization with oligodeoxynucleotide probes. The presence of *Alcaligenes defragrans* in enrichment cultures was detected with 16S rRNA-targeted oligodeoxynucleotide probes that were labelled with the fluorescent dye Cy3.18 (Biological Detection Systems, Pittsburgh, Pa.). In a nested approach (Amann et al. 1995), probes EUB338 for *Bacteria*, BET42a with a non-labelled competitor probe, GAM42a, for *Proteobacteria* of the beta subclass, AT1458 for the genera *Thauera* and *Azoarcus* plus *Alcaligenes defragrans*, and the species-specific probe Ade441 for *Alcaligenes defragrans* were applied as described (Manz et al. 1992; Rabus et al. 1999).

Results

Enrichments of denitrifying bacteria on essential oils. Essential oils vary in their chemical composition from oils containing only monoterpenes to oils with a large amount of monoterpenoids (Formáček and Kubeczka 1982). We selected lemon, pine needle, and parsley seed oil as examples of the former group, and campher, sage, fennel, mint, and thyme oil as representatives of the latter group. The essential oils served as sole electron donor in attempts to enrich denitrifying bacteria from sewage sludge or a forest ditch mud sample. We enriched also on essential oils diluted in 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) that is nearly water-insoluble, not biodegradable, and not poisonous, in order to reduce detrimental effects of the essential oils. Forest ditch mud was an inferior inoculum, probably due to endogeneous toxic compounds. Lemon and pine needle oil enabled growth of enrichment cultures from sewage sludge in the absence of an organic carrier phase. To the opposite, thyme oil did not support denitrification even in the presence of HMN. Other essential oils containing monoterpenoids were not toxic when diluted into HMN, e.g., sage and mint oil were excellent carbon sources for enrichment cultures (Tab. 1).

Denitrification of 10 mM of nitrate is coupled to the mineralization of 1.2 to 1.5 mM of monoterpene, according to pure culture studies (Foß and Harder 1997; Foß and Harder 1998; Foß et al. 1998). We tested two amounts of essential oil. The lower amount, corresponding to 4 mM of monoterpene, was expected to limit nitrate reduction closely to 30 mM of nitrate and to select for consumption of all substances present in the oil. The higher amount, corresponding to 10 mM of monoterpene, was anticipated to reveal the compounds preferentially consumed. Nitrate reduction correlated with the amount of oil supplied (Tab. 1). GC and GC-MS analyses of the essential oils, and GC analyses of the residual essential oil after microbial growth enabled the identification of compounds that were biologically consumed or formed (Tab. 2). Myrcene was the least degradable monoterpene in lemon oil, whereas camphene and α -thujene were recalcitrant in pine needle oil. Camphene was also fractionous in camphor and sage oil. Parsley seed oil is characterized by the aromatic insecticides apiole and myristicin. These antibiotics and two related compounds, elemicin and 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzene (1,2,3,4-TMPB), were depleted in the enrichment

Table 1 Essential oils as growth substrates for enrichment cultures and *Alcaligenes defragrans*.

Essential oil	Activated sludge as inoculate		Forest ditch mud as inoculate		<i>A. defragrans</i> 54Pin [†]	
	- HMN ^a	- HMN ^b + HMN ^a	- HMN ^c	- HMN ^d + HMN ^c	- HMN ^e	+ HMN ^e
Lemon oil	+	++	-	+++	+++	+++
Pine needle oil (<i>Pinus</i>)	+	++	-	++	++	+++
Parsley seed oil	-	-	-	-	+	+++
Camphor oil	-	+	-	+	+	+
Sage oil	-	++	-	-	±	±
Fennel oil	-	-	-	-	-	±
Mint oil	-	++	-	-	-	±
Thyme oil	-	-	-	-	-	±

^a 96 µl essential oil, corresponding to 0.62 ‰ vol essential oil / vol aqueous phase and to 4 mM monoterpene; 3.2 % vol HMN / vol aqueous phase.

^b 240 µl essential oil, corresponding to 1.55 ‰ vol essential oil / vol aqueous phase and to 10 mM monoterpene; 3.2 % vol HMN / vol aqueous phase.

^c 96 µl essential oil, corresponding to 0.56 ‰ vol essential oil / vol aqueous phase and to 4 mM monoterpene; 2.9 % vol HMN / vol aqueous phase.

^d 240 µl essential oil, corresponding to 1.41 ‰ vol essential oil / vol aqueous phase and to 10 mM monoterpene; 2.9 % vol HMN / vol aqueous phase.

^{a-d} Nitrate concentrations were monitored. Upon electron acceptor depletion, 10 mM nitrate were added. Each (+) indicates the consumption of 10 mM nitrate by the culture. Endogeneous electron donors present in the inoculum caused according to control experiments the consumption of less than 10 mM nitrate. Heptamethylnonane did not serve as electron donor.

^e 0.65 ‰ vol essential oil / vol aqueous phase, corresponding to 4 mM monoterpene; 6.5 % vol HMN / vol aqueous phase. Consumption of nitrate (10 mM) occurred not at all (-), up to 20 % (±), up to 50 % (+), more than 50 % (++) or completely (+++).

Table 2 Biological consumption of essential oils by denitrifying enrichment cultures.

Essential oil /compound	Content ^a (%)	Recovery after incubation (%) ^b	
		4 mM	10 mM
Lemon oil			
α-pinene	1.3	0	n.d. ^c
sabinene	1.3	1	n.d.
β-pinene	11.5	0	n.d.
myrcene	0.7	18	n.d.
limonene	71.7	0	n.d.
γ-terpinene	9.0	0	n.d.
neral	0.6	0	n.d.
geranial	0.3	0	n.d.
geranyl acetate	0.3	3	n.d.
geranyl acetate	0.3	5	n.d.
Pine needle oil			
α-thujene	0.2	68	112
α-pinene	35.7	0	60
camphene	4.5	28	109
β-pinene	28.4	0	47
myrcene	2.4	0	83
3-carene	4.2	1	86
cymene	2.6	0	82
limonene	11.5	0	34
γ-terpinene	0.2	1	88
terpinolene	1.2	0	16
α-terpineol	0.2	0	0
bornyl acetate	1.9	1	34
Parsley seed oil			
α-pinene	22.4	5	84
β-pinene	15.4	4	81
cymene	1.3	21	57
eucalyptol	3.3	44	47
cresol	2.4	6	132
α-terpineol	2.4	0	1
camphor	0.4	0	0
myristicin	29.8	7	0
elemicin	4.7	1	1
1,2,3,4-TMPB	3.1	0	0
apiol	9.3	0	0
Camphor oil			
α-pinene	1.2	3	92
camphene	0.4	58	110
sabinene	0.6	5	76

Mint oil

α-pinene	0.9	5	108
β-pinene	1.1	3	104
myrcene	0.5	4	110
3-octanol	0.6	0	0
limonene	2.3	0	93
isopulegol	0.9	0	0
menthone	20.4	0	67
isomenthone	11.7	0	37
neomenthol	4.1	0	11
menthol	46.1	0	3
isomenthol	1.4	0	0
α-terpineol	0.5	0	15
pulegone	0.3	0	2
peritone	1.0	0	0
menthyl acetate	0.6	1	68

Thyme oil

α-pinene	0.2	94	105
camphene	0.3	93	104
myrcene	0.3	92	108
3-carene	0.4	94	107
cymene	42.6	86	110
limonene	0.9	15	18
γ-terpinene	3.7	91	115
terpinolene	1.4	89	114
endo-fenchol	5.1	77	115
borneol	1.5	72	107
α-terpineol	2.3	81	107
thymol	33.5	86	109
carvacrol	4.6	81	108

^a Essential oil composition was analysed by GC with a flame-ionization detector and individual contents were calculated from peak areas. Sesquiterpenes present in several oils could not unambiguously be identified and were not included in the table.

^b Enrichment cultures containing 96 μl or 240 μl of essential oil - correspondingly 4 or 10 mM monoterpene, respectively - were incubated together with chemical control experiments that included 240 μl of oil, 5 ml of HMN and 150 ml of anoxic fresh water medium. After incubation, all cultures were extracted with 6 ml of hexane and the organic phase was analysed by GC-FID. Peak areas of individual compounds recovered from the control experiments were set to 100%. The standard deviation of GC determinations is ± 5%.

^c n. d. not determined. A hexane phase was not recoverable due to a high surfactant activity of the culture.

β-pinene

myrcene	0.9	3	96
α-phellandrene	1.0	12	154
α-terpinene	0.3	11	157
cymene	0.6	0	297
eucalyptol	2.0	1	125
trans-ocimene	33.5	0	21
γ-terpinene	0.3	74	277
terpinolene	1.2	10	131
endo-fenchol	2.2	0	87
camphor	11.4	0	0
borneol	32.1	0	107
4-terpineol	0.6	0	11
α-terpineol	5.6	2	0
trans-isosafrole	2.9	0	0
	1.5	0	0

Sage oil

α-thujene	0.6	3	31
α-pinene	2.8	1	14
camphene	6.3	38	108
sabinene	0.8	0	2
β-pinene	0.7	0	19
myrcene	0.6	13	62
α-terpinene	0.7	6	151
cymene	6.3	0	6
eucalyptol	9.8	0	0
terpinolene	0.8	0	10
α-thujone	21.8	0	0
β-thujone	4.9	0	1
camphor	27.5	0	57
borneol	1.8	0	0
4-terpineol	0.5	31	7
bornyl acetate	1.8	0	13
sabiny acetate	1.0	0	4

Fennel oil

α-pinene	2.3	57	26
myrcene	0.3	78	90
limonene	4.0	41	32
γ-terpinene	0.4	84	104
fenchone	4.8	101	111
fenchyl acetate	0.5	0	0
α-terpineol	1.7	0	0
estragol	5.1	40	119
cis-anethole	1.0	41	107
trans-anethole	74.3	65	91

cultures. The organic phase recovered from campher oil enrichments corresponding to 10 mM of monoterpene contained increased amounts of myrcene, α -phellandrene, α -terpinene, cymene, *trans*-ocimene, and γ -terpinene. Monoterpenoid consumption from mint oil resembled the substrate range of *Thauera terpenica* strain 21Mol (Fosß and Harder 1998). Other major monoterpenoids degraded were bornylacetate, eucalyptol, α -terpineol, 4-terpineol, α -thujone, β -thujone, camphor, and borneol. Methoxy-propenyl-benzenes, estragol, *cis*- and *trans*-anethole, were partially depleted from fennel oil. Traces of limonene disappeared from thyme oil.

The cells grown in these enrichment cultures were characterized by fluorescent in situ hybridization in a nested approach, in order to identify the growth success of bacteria that are phylogenetically closely related to *Alcaligenes defragrans* (Amann et al. 1995). Bacteria detectable with the oligonucleotide probes AT1458 and Ade441 that are specific for the genera *Azoarcus* and *Thauera*, and for *Alcaligenes defragrans* (Rabus et al. 1999) were found in enriched populations, but did not dominate the populations (Tab. 3). The probe AT1458 specific for the *Azoarcus-Thauera* group and for *Alcaligenes defragrans* detected apparently sometimes fewer cells than probe Ade441. This might be a problem of the in situ accessibility of the 16S rRNA. According to a study with *Escherichia coli* (Fuchs et al. 1998), the probe Eco440 has one of the brightest signals, whereas probes Eco1455 and Eco1464 have only 37% and 4%, respectively, of the brightness of probe Eco440.

Growth of *Alcaligenes defragrans* on essential oils. The aforementioned essential oils were tested as growth substrates for *Alcaligenes defragrans*. Nitrate reduction of *Alcaligenes defragrans* strain 54Pin^T occurred on all essential oils in the presence of an organic carrier phase (Tab. 1). GC and GC-MS analyses indicated the consumption of monoterpenes that were previously identified as growth substrates for the strain in all oils except mint and thyme oil (data not shown). Consequently, the incomplete reduction of nitrate observed with camphor, sage and fennel oil in HMN-containing cultures was due to a limiting amount of growth-supporting monoterpenes in these oils, whereas compounds present in mint and thyme oil inhibited the consumption of monoterpenes. Reduced nitrate consumption was observed in cultures containing parsley seed, fennel, mint, and thyme oil and no HMN, an indication of the antimicrobial property of these essential oils.

Table 3 Detection of *Alcaligenes defragrans* in growing^a denitrifying enrichment cultures on essential oils by fluorescent in situ hybridization.

Essential oil	Amount of oil	Presence of HMN	Probe-positive cells / DAPI-stained cells (%)			
			EUB338	BET42a	AT1458	Ade441
<i>Activated sludge as inoculate</i>						
Lemon oil	96 µl	-	67	33	11	12
	240 µl	-	91	74	44	77
	96 µl	+	75	25	27	24
	240 µl	+	82	59	10	9
Pine needle oil (<i>Pinus</i>)	96 µl	-	66	3	0	0
	240 µl	-	68	46	20	43
	96 µl	+	67	26	22	17
	240 µl	+	92	47	5	25
Camphor oil	96 µl	+	56	34	32	26
	240 µl	+	62	22	11	6
Parsley seed oil	240 µl	+	72	50	48	44
Mint oil	96 µl	+	85	20	9	0
	240 µl	+	85	37	36	11
Sage oil	240 µl	+	28	3	0	2
<i>Forest ditch mud as inoculate</i>						
Lemon oil	96 µl	+	89	35	4	0
	240 µl	+	69	51	0	5
Pine needle oil	96 µl	+	52	51	5	11
	240 µl	+	66	50	11	24
Camphor oil	96 µl	+	63	40	14	12
Sage oil	240 µl	+	28	3	0	2

^a All cultures had consumed more than 10 mM nitrate (see Tab. 1). Ten cultures with lower nitrate consumption were tested by FISH. Nine of these enrichments showed a low hybridization with AT1458 and Ade441: ≤ 72 % for EUB338, ≤ 30 % for BET42a, ≤ 12 % for AT1458, and ≤ 12 % for Ade441. The exception was the enrichment on 96 µl parsley seed oil containing activated sludge and HMN: 100 % cells hybridized with EUB338, 85 % with BET42a, 65 % with AT1458, and 87 % with Ade441.

Population size of monoterpene-mineralizing denitrifying microorganisms.

Most-probable-number estimations with a mixture of primary fermentation products, a mixture of monoterpenes, and α -terpinene were performed to quantify the cultivable denitrifying bacteria and the monoterpene-utilizing subpopulation (Tab. 4). The physiological capacity was widespread: one in one hundred and fifty nitrate-reducing bacteria present in sewage sludge and each denitrifying microbe in coniferous soil grew anaerobically on the natural unsaturated hydrocarbons.

Table 4 MPN determination of denitrifying bacteria.

Carbon source and electron donor	Population size of denitrifying bacteria	
	Activated sludge (cells ml ⁻¹) ^a	Coniferous soil (cells ml ⁻¹) ^a
Acetate, butyrate, succinate, lactate and ethanol	4.7 (0.7 - 14) x 10 ⁸	1.0 (0.2 - 2.9) x 10 ⁷
α -Terpinene, sabinene, 2-carene, α -pinene and eucalyptol	3.1 (0.5 - 16) x 10 ⁶	1.6 (0.2 - 8.7) x 10 ⁶
α -Terpinene	3.1 (0.5 - 16) x 10 ⁶	1.6 (0.2 - 8.7) x 10 ⁷

^a Values in parentheses describe 95% confidence limits

Discussion

Carbon sources available for microorganisms in nature are constituted of mixtures of substances, e.g., the volatiles that diffuse from plant parts or litter into atmospheric or soil habitats. The annual emission rate of plant volatiles into the atmosphere is estimated to be 1.5×10^{15} g C / year⁻¹ (Guenther et al. 1995), representing more than 1% of the carbon assimilated by plants (Bolin 1983). We have previously shown that monoterpenes and monoterpeneoids can be mineralized anaerobically by denitrifying *Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica*, and *Thauera linaloolentis* (Foß and Harder 1998; Foß et al. 1998). Now we wanted to apply substrate conditions more related to the environmental situation. Essential

oils were considered as a suitable substitute for plant volatiles and served as sole carbon sources in studies with enrichment cultures and *Alcaligenes defragrans*. In nature, a concentration gradient is present from the releasing plant part to its environment. Therefore our enrichment cultures were not shaken to allow initially the transient formation of a gradient of oil components from the lighter organic phase to the mud on the bottom of the culture bottle.

Denitrifying enrichment populations grew within four months of incubation on several essential oils, with the exception of thyme oil. Major constituents of this oil are the aromatic cymene and the phenolic thymol. Recently, *Azoarcus* sp. strain pCyN1 and *Thauera* sp. strain pCyN2 were isolated on cymene under denitrifying conditions (Harms 1998). The degradation of thymol has so far only been observed in aerobic bacteria involving oxygenation reactions (Dagley 1971). Knobloch et al. (1986) identified thymol as one of the most toxic monoterpenoids. Hence, the failure to enrich on thyme oil may be caused by the biocidal property of the oil. Enrichments were also not formed on parsley seed, camphor, sage, fennel, and mint oil in the absence of an organic carrier phase as diluting solvent. This can be explained by the toxic effects of polymethoxy-propenyl-benzenes in parsley seed oil, of *p*-methoxy-propenyl-benzenes and fenchone in fennel oil, and of monoterpenoids in camphor, sage and mint oil. The only essential oils supporting microbial growth of enrichments without an organic carrier phase were lemon and pine needle oils whose content is dominated by monoterpenes.

Reducing equivalents for nitrate reduction of the enrichment cultures were expected to originate from the oxidation and mineralization of parts of the essential oils. GC analyses after incubation of the enrichment cultures revealed indeed a consumption of monoterpenes and monoterpenoids; small absolute increases of some monoterpenes were only observed in a culture on camphor oil, similar to earlier observations in enrichment cultures (Harder and Probian 1995). Quantitative formation of cymene, as observed under methanogenic enrichment conditions (Harder and Foß 1999), or of dead-end metabolites, e.g., isoterpinolene (Heyen and Harder 1998), did not occur. The compounds consumed included growth substrates for pure strains (*Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica*, and *Thauera linaloolentis*) and enrichment cultures already established (reviewed by Heyen and Harder 1998) as well as substances

that have not been shown to be biodegradable under anoxic conditions, notably mono- and poly-methoxy-propenyl-benzenes.

The growth of denitrifying populations on essential oils suggests that plant volatiles released from roots or litter in the soil can serve as carbon source for anoxic soil bacteria. To support this opinion, we determined the microbial population able to grow on monoterpenes with the most-probable-number technique. Earlier we demonstrated that primary fermentation products as substrate support the whole cultivable denitrifying population (Kniemeyer et al. 1999). Menthadienes together with an organic carrier phase were used to minimize toxic effects. We found a large population size of monoterpene-degrading denitrifying bacteria. This is likely a biological response to the huge participation of monoterpenes in the global carbon cycle. Additional evidence for a wide distribution of the metabolic capability was provided by FISH analyses of the enrichment cultures: the denitrifying cultures were not dominated by β -proteobacteria related to the isolated denitrifying species *Alcaligenes defragrans*, *Thauera terpenica*, and *Thauera linaloolentis*.

Research in chemical ecology of plant volatiles, notably the monoterpenes, was in the past focused on plant-eucaryal herbivore interactions. Now our study indicated that even anaerobic bacteria are capable of utilizing plant volatiles and that this metabolic skill is common. Hence volatiles released from litter or roots may be mineralized before they diffuse into the atmosphere and contribute to the greenhouse effect. It seems desirable to study in more detail the ecological interactions between plants, soil microbes, monoterpenes and other volatiles, and processes inhibited by the volatiles, e.g., aerobic methane and ammonia oxidation.

Acknowledgements We thank Dr. Rudi Amann for providing the facilities for in situ hybridization. This study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to J. H..

References

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R., Knowles, R. (1998) Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl Environ Microbiol* 64: 520-525.
- American Public Health Association (ed.) (1969) Estimation of bacterial density, pp. 604-609. In: Standard methods for the examination of water and wastewater including bottom sediments and sludge. American Public Health Association, Washington, D. C.
- Billing, J., Sherman, P.W. (1998) Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *Q Rev Biol* 73: 3-49.
- Bolin, B. (1983) The carbon cycle, pp. 41-45. In: B. Bolin and R.B. Cook (eds.), The major biogeochemical cycles and their interactions. John Wiley Sons, Chichester, England.
- Dagley, S. (1971) Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Adv Micro Physiol* 6: 1-46.
- Formáček, V., Kubezcka, K.H. (1982) Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. p. 373. John Wiley Sons, Chichester.
- Foß, S., Harder, J. (1997) Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol Lett* 149: 71-75.
- Foß, S., Harder, J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *Syst Appl Microbiol* 21: 365-373.
- Foß, S., Heyen, U., Harder, J. (1998) *Alcaligenes defragrans* sp. nov., description of four strains isolated on alkenoic monoterpenes ((+)-menthene, α -pinene, 2-carene and α -phellandrene) and nitrate. *Syst Appl Microbiol* 21: 237-244.
- Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R. (1998) Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64: 4973-4982.
- Gershenzon, J., Croteau, R. (1991) Terpenoids, pp. 165-219. In: G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum (eds.), Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites, 2nd Ed. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W.A., Pierce, T., Schules, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J., Zimmermann, P. (1995) A global model of natural volatile organic compound emission. *J Geophys Res - Atmosph* 6: 8873-8892.
- Harder, J., Foß, S. (1999) Anaerobic formation of the aromatic hydrocarbon *p*-cymene from monoterpenes by methanogenic enrichment cultures. *Geomicrobiol J*, in press.
- Harder, J., Probian, C. (1995) Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* 61: 3804-3808.

- Harms, G. (1998) Anaerober Abbau von *p*-Cymen und anderen Dialkylbenzenen durch neu isolierte Bakterienarten. Dissertation, University of Bremen, Germany.
- Heyen, U., Harder, J. (1998) Cometabolic isoterpinolene formation from isolimonene by denitrifying *Alcaligenes defragrans*. FEMS Microbiol Lett 169: 67-71.
- Hulin, V., Mathot, A.G., Mafart, P., Dufosse, L. (1998) Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. Sci Aliment 18: 563-582.
- Hylemon, P.B., Harder, J. (1998) Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. FEMS Microbiol Rev 22: 475-488.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C, Svendsen, A.B. (1987) Antimicrobial activity of essential oils - a 1976-1986 literature-review - aspects of the test methods. Planta Med 53: 395-398.
- Kniemeyer, O., Probian., C, Rosselló-Mora, R., Harder, J. (1999) Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on dimethylmalonate. Appl Environ Microbiol 65: 3319-3324.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.M., Vigneschow, H. (1986) Action of monoterpenoids on energy metabolism, pp. 429-446. In: E.J. Brunke (ed.), Progress in essential oil research. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. System Appl Microbiol 15: 593-600.
- Paré, P.W., Tumlinson, J.H. (1997) Induced synthesis of plant volatiles. Nature 385: 30-31.
- Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., Widdel, F. (1999) Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. Environ Microbiol 1: 145-157.
- Sharkey, T.D., Singaas, E.L. (1995) Why plants emit isoprene. Nature 374: 769.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59: 201-222.
- Ward, B.B., Courtney, K.J., Langenheim, J.H. (1995) Inhibition of *Nitrosomonas europaea* by monoterpenes from coastal redwood (*Sequoia sempervirens*) in whole-cell studies. J Chem Ecol 23: 2583-2598.
- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., Williamson, G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? J Chem Ecol 19: 1799-1807.
- White, C.S. (1988) Nitrification inhibition by monoterpenoids: theoretical mode of action based on molecular structures. Ecology 69: 1631-1633.
- Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, pp. 3352-3378. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, und K.H. Schleifer (eds.), The Prokaryotes, 2nd Ed. Springer, Berlin, Germany.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Widdel danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die Bereitschaft, die Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie zu ermöglichen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Jens Harder danke ich besonders für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit („Haste schon neue Ergebnisse?“), die tatkräftige Unterstützung und für die vielen wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Dr. Sabine Foß gilt mein besonderer Dank für die anfängliche Einführung in das Thema. Auch Olaf Kniemeyer danke ich für die Einweisung in die Fettsäure-Analytik. Bei beiden sowie bei Jannis Ioannidis bedanke ich mich für das gemeinsame Durchstehen der ‘Vip-Seminare’.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christina Probian für das gute Hand-in-Hand-Arbeiten, für die Einweihung in die Geheimnisse der ‘Anaeroben-Welt’, der super Laboratmosphäre, den Spaß mit den Spritzflaschen und natürlich für die all morgendlichen Dienstgespräche („Teechen?“).

Mein Dank gilt nicht zuletzt allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie und des gesamten Instituts, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Dr. Gerda Harms und Anja Heinrichsdorff möchte ich mich für die zahlreichen Plaudereien in unserer ‘Muttersprache’ bedanken. Mark Hünken danke ich für sein engagiertes Arbeiten während seines Praktikums. Weiterhin möchte ich mich bei Bernd Stickfort für die stets prompte Besorgung von Literatur bedanken.

Danken möchte ich Herrn Dr. P. Schulze vom Fachbereich II der Universität Bremen für die Einführung und die gemeinsame Durchführung zahlreicher GC-MS-Analysen.

Ansonsten möchte ich ganz herzlich all jenen - außerhalb des Instituts - danken, die auf die eine oder andere Art und Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonderem Dank gilt Andreas für das Korrekturlesen und die Einführung in die parallele Deklination von Attributen, die sich mit *als* oder *wie* auf ein anderes Satzglied beziehen.

