

Mikrobieller Abbau isoprenoider Naturstoffe:
Anaerobe Oxidation von Monoterpenen
durch nitratreduzierende Bakterien

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

dem Fachbereich Biologie / Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Sabine Foß
aus Pforzheim

Bremen 1998

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Foß, Sabine:

Mikrobieller Abbau isoprenoider Naturstoffe : Anaerobe Oxidation von
Monoterpenen durch nitratreduzierende Bakterien / vorgelegt von Sabine Foß. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 1998

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 1998

ISBN 3-89712-295-2

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Widdel

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Fischer

Tag des Promotionskolloquiums: 27.05.1998

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 1998

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 1998

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89712-295-2

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Abteilung Mikrobiologie (Prof. Dr. F. Widdel) des Max-Planck-Instituts für marine Mikrobiologie in Bremen im Rahmen des Projekts "Anaerober Abbau isoprenoider Naturstoffe durch Mikroorganismen" (Dr. J. Harder) des Schwerpunktprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft "Neuartige Reaktionen und Katalysemechanismen bei anaeroben Mikroorganismen" von Dezember 1994 bis November 1997 durchgeführt. Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht.

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. (in Druck)

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. (in Druck)

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	VI
A. Einleitung	1
1. Struktur, Biosynthese und Vorkommen von Terpenoiden	1
1.1. Grundstruktur und Biosynthese isoprenoider Naturstoffe	1
1.2. Vorkommen biogener Kohlenwasserstoffe	7
2. Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen durch Bakterien	8
2.1. Aliphatische Alkane	9
2.2. Alizyklische Kohlenwasserstoffe und carbozyklische Alkohole	10
2.3. Aliphatische Alkene	11
2.4. Aromatische Verbindungen	11
2.4.1. Initiale Aktivierung von aromatischen Verbindungen	11
2.4.2. Reduktion und Ringspaltung von Resorcin und Phloroglucin	13
2.4.3. Reduktion von Benzoyl-CoA	13
2.5. Isoprenoide Naturstoffe	14
3. Abbau von Monoterpenen durch aerobe Mikroorganismen	15
3.1. Azyklische Monoterpene: Citronellol, Geraniol und Linalool	15
3.2. Monozyklische Monoterpene: Limonen und Menthol	17
3.3. Bicyklische Monoterpene: 1,8-Cineol (Eucalyptol) und α -Pinen	18
4. Ziele dieser Arbeit	20
B. Material und Methoden	21
1. Chemikalien und Gase	21
2. Mikroorganismen und Probenmaterial	21
3. Mikrobiologische Methoden	21
3.1. Medien	21
3.1.1. Herstellung des anoxischen Mineralmediums	21
3.1.2. Mineralmedium für nitratreduzierende Bakterien	22
3.1.3. Zusammensetzung der Stammlösungen für nitratreduzierende Bakterien	22
3.1.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren	25
3.1.5. Elektronenakzeptoren	25
3.1.6. Minimalmedium-Agarplatten (Bottle Plates) für aerobes und denitrifizierendes Wachstum	25

II Inhaltsverzeichnis

3.1.7. Mineralmedium für methanogene Anreicherungen	26
3.1.8. Zusammensetzung der Stammlösungen für methanogene Medien	26
3.2. Kultivierung	28
3.2.1. Reinheitskontrollen	28
3.2.2. Stammkulturen	28
3.2.3. Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten (Bottle Plates)	28
3.3. Charakterisierung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme	29
3.3.1. Phasenkontrastmikroskopische Fotografie und Gram-Färbung	29
3.3.2. Wachstumsexperimente zur physiologischen Charakterisierung	29
3.3.2.1. Bestimmung des Temperaturoptimums	30
3.3.2.2. Bestimmung des pH-Optimums	30
3.3.2.3. Vitaminbedarf	30
3.3.2.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren	30
3.3.2.5. Elektronenakzeptoren	31
3.4. Wachstumsexperimente zur anaeroben Oxidation von Monoterpenen	31
3.4.1. Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus in denitrifizierenden Reinkulturen	31
3.4.2. Transformationsprodukte des Monoterpenmetabolismus	32
3.4.3. Anaerobes Wachstum auf ätherischen Ölen	32
3.4.4. Denitrifizierendes Wachstum ausgewählter Isolate auf Monoterpengemischen	32
3.4.5. Anaerobe Monoterpenoxidation in Gegenwart von Monoterpenalkoholen	33
3.5. Massenkulturen zur Gewinnung von Bakterienzellmasse	33
3.6. Zellzahlen nitratreduzierender, monoterpenverwertender Mikroorganismen (most probable number)	34
3.7. Anreicherungen unter methanogenen Bedingungen	34
4. Analytische Methoden	35
4.1. Bestimmung von Nitrat und Nitrit	35
4.2. Bestimmung der Permanentgase N_2O und N_2	35
4.3. Photometrische Bestimmung von Ammonium	36
4.4. Gaschromatographische Analyse der Monoterpene	36
4.4.1. Dual-Kapillarsäulen-Analyse	36
4.4.2. Retentionsindex-System	37
4.4.3. Bestimmung von Monoterpenen mit Gaschromatographie/Massenspektroskopie	38
4.4.4. Analyse von Monoterpenen aus der organischen Trägerphase	38
4.4.5. Analyse von Monoterpenen aus der wäßrigen Phase	38
4.5. Bestimmung des Proteingehalts ganzer Zellen	39
4.6. Bestimmung der 16S rRNS-Gensequenzen	39

4.7. Bestimmung des G+C-Gehalts der DNS	39
4.8. DNS-DNS-Hybridisierung	40
4.9. Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren	40
5. Biochemische Methoden	40
5.1. Herstellung von Rohextrakten	40
5.2. Nachweis von enzymatischen Aktivitäten	41
C. Ergebnisse	43
Teil I - Phylogenetische Einordnung und physiologische Charakterisierung der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme	43
1. Reinheitskontrollen	43
2. Taxonomische Einordnung der monoterpenverwertenden Isolate	43
2.1. Phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit <i>Thauera</i> spp. innerhalb der <i>β-Proteobacteria</i>	43
2.1.1. 16S rRNS-Gensequenzen der <i>Thauera</i> spp.	43
2.1.2. G+C-Gehalt der DNS der <i>Thauera</i> spp.	44
2.1.3. DNS-DNS-Hybridisierung der <i>Thauera</i> spp.	45
2.1.4. Bakterienzellfettsäuren der <i>Thauera</i> spp.	45
2.2. Phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit <i>Alcaligenes</i> spp. innerhalb der <i>β-Proteobacteria</i>	46
2.2.1. 16S rRNS-Gensequenzen der <i>Alcaligenes</i> sp. Stämme	46
2.2.2. Bakterienzellfettsäuren der <i>Alcaligenes</i> sp. Stämme	47
3. Physiologische Charakterisierung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme	49
3.1. <i>Thauera</i> spp. 47Lol, 21Mol und 58Eu	49
3.1.1. Morphologie und Gram-Färbung	49
3.1.2. Temperatur- und pH-Optima	50
3.1.3. Vitaminabhängigkeit	50
3.1.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren	51
3.1.5. Elektronenakzeptoren	52
3.2. <i>Alcaligenes</i> sp. 51Men, 65Phen, 62Car und 54Pin	54
3.2.1. Morphologie und Gram-Färbung	54
3.2.2. Temperatur- und pH-Optima	55
3.2.3. Vitaminabhängigkeit	55
3.2.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren	56
3.2.5. Elektronenakzeptoren	57

Teil II - Monoterpene als Kohlenstoffquellen des mikrobiellen Wachstums nitratreduzierender Bakterien	59
1. Aerobes Wachstum mit Monoterpenen	59
2. Anaerobe Oxidation von Monoterpenen	59
2.1. <i>Thauera</i> spp.	59
2.2. <i>Alcaligenes</i> sp.	63
3. Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus	65
Teil III - Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Monoterpenen	69
1. <i>Thauera</i> sp. 47Lol	69
1.1. Wachstum von Stamm 47Lol mit azyklischen Monoterpenen	69
1.2. Anaerobe Oxidation von Linalool, Geraniol und Nerol durch Stamm 47Lol	71
1.3. Regioselektive Umlagerung von Monoterpenalkoholen in cytosolischen Extrakten	74
2. <i>Thauera</i> sp. 21Mol	77
2.1. Wachstum von Stamm 21Mol auf Pfefferminzöl	77
3. <i>Thauera</i> sp. 58Eu	78
3.1. Wachstum von Stamm 58Eu auf ätherischen Ölen	78
3.2. Transformationsprodukte des Eucalyptolabbaus	78
3.3. Anaerober Abbau mono- und bizyklischer Monoterpene durch Stamm 58Eu	79
4. <i>Alcaligenes</i> sp.	79
4.1. Wachstum auf ätherischem Fichtennadelöl	79
4.2. Transformationsprodukte des anaeroben Abbaus mono- und bizyklischer Monoterpenkohlenwasserstoffe	82
4.3. Anaerobe Oxidation mono- und bizyklischer Monoterpene durch Stamm 54Pin	84
4.4. Einfluß von Monoterpenalkoholen auf den anaeroben Abbau mono- und bizyklischer Monoterpene	86
Teil IV - Mikrobieller Abbau von Monoterpenen unter anoxischen Bedingungen	88
1. Populationsgröße monoterpenverwertender, denitrifizierender Bakterien	88
2. Abbau von Monoterpenkohlenwasserstoffen und Bildung von <i>p</i> -Cymol unter methanogenen Bedingungen	90
3. Anaerobe Oxidation von α -Pinen unter methanogenen Bedingungen	93

D. Diskussion	95
1. Taxonomische Einordnung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme	95
2. Nachweis des anaeroben Abbaus von Monoterpenen durch nitratreduzierende Bakterien	96
3. Hypothesen zur anaeroben Oxidation der Monoterpene in denitrifizierenden Bakterien	97
3.1. Linalool	97
3.2. Menthol	98
3.3. Eucalyptol	99
3.4. Monoterpenkohlenwasserstoffe	100
4. Ökologische Aspekte des anaeroben Monoterpenabbaus	106
5. Entstehung von <i>p</i> -Cymol aus Monoterpenkohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen	107
E. Zusammenfassung	109
F. Literaturverzeichnis	111
G. Anhang	121
1. Trivialnamen und systematische Bezeichnung einiger Monoterpene	121
2. Retentionszeiten und Kovats-Indizes (KI) incl. Literaturangaben einiger Monoterpene	122
3. Kalibrierung einiger Monoterpene	124
4. Zusammensetzung von Pfefferminz- und Fichtennadelöl	126
5. Wachstumsansätze (Massenkulturen) von <i>Thauera</i> sp. Stamm 47Lol	129
6. Spektroskopische Daten der Monoterpenalkohole	130
7. Kurzbeschreibung der Neuisolate	131

Danksagung**Lebenslauf**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
(bi)dest.	(bi)destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CoA (CoA-SH)	Coenzym A
d	Tage
DAB	Deutsches Arzneibuch
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ΔG°	Änderung der freien (Gibbs'schen) Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen (pH = 7,0; [1 M])
ΔOD_{660}	Zunahme der optischen Dichte
ECL	equivalent chain length
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
Fortsetz.	Fortsetzung
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GC	gas chromatograph(y)
G+C	Guanin + Cytosin
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunden
[H]	Reduktionsäquivalente
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMG	3-Hydroxy-3-methyl-glutarat
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HPLC	high performance liquid chromatography
IPP	Isopentenyldiphosphat
KI	Kovats-Retentionsindex
Konz.	Konzentration
M	molar [1 M = 1 mol/l]

MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MPN	most probable number
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
OD ₆₆₀	Optische Dichte bei 660 nm
Pa	Pascal [1 Pa]
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat, Orthophosphat
psi	pounds per square inch
Ret.zeit	Retentionszeit
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
s(p)p.	Spezies
T	Zeit
Tab.	Tabelle
Tg	Tera-gramm [1 Tg = 10 ¹² g]
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	ultraviolettes/sichtbares Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Zus.setz.	Zusammensetzung

Bakterienstämme:

21Mol	<i>Thauera terpenica</i> ; isoliert mit Menthol und Nitrat
47Lol	<i>Thauera linaloolentis</i> ; Typstamm; isoliert mit Linalool und Nitrat
51Men	<i>Alcaligenes defragrans</i> ; isoliert mit <i>p</i> -Menth-1-en und Nitrat
54Pin	<i>Alcaligenes defragrans</i> ; Typstamm; isoliert mit α -Pinen und Nitrat
58Eu	<i>Thauera terpenica</i> ; Typstamm; isoliert mit Eucalyptol und Nitrat
62Car	<i>Alcaligenes defragrans</i> ; isoliert mit 2-Caren und Nitrat
65Phen	<i>Alcaligenes defragrans</i> ; isoliert mit α -Phellandren und Nitrat
B.par.	<i>Bordetella paratussis</i>
Alc.x.	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>
Alc.d.	<i>Alcaligenes denitrificans</i>
Alc.f.	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Tay.e.	<i>Taylorella equigenitalis</i>
O.for.	<i>Oxalobacter formigenes</i>

A. EINLEITUNG

Die ursprünglich für Monoterpenkohlenwasserstoffe von ihrem Vorkommen im Terpentinöl her abgeleitete Bezeichnung "Terpene" wird heute für eine Gruppe von Naturstoffen benutzt, deren Struktur sich durch Vervielfachung von Isopren-Einheiten ergibt (Isopren-Regel). Unter dem erweiterten Begriff "Terpenoide" werden auch Verbindungen erfaßt, die durch Umlagerungsreaktionen als natürliche Abbauprodukte oder synthetische Derivate aus den Terpenkohlenwasserstoffen abgeleitet werden können (Hoffmann et al., 1982). Terpenoide sind die größte Gruppe natürlich vorkommender Verbindungen; mehr als 23 000 einzelne Isoprenoidverbindungen sind bereits beschrieben, und die Zahl der neu isolierten Substanzen nimmt jährlich zu (Sacchetti und Poulter, 1997). Terpene kommen in allen Organismen vor, insbesondere jedoch in höheren Pflanzen. Nicht zuletzt aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt haben Terpenoide die unterschiedlichsten Funktionen als Pflanzenhormone (Gibberelline, Abscisinsäure), photosynthetische Pigmente (Phytol, Carotinoide), Elektronentransportmoleküle (Ubichinon, Plastochinon) oder Strukturelemente der Zellmembranen (Sterole und Hopane), um nur einige Beispiele zu nennen. Geochemische Studien haben indes gezeigt, daß viele isoprenoide Naturstoffe in Sedimenten in der Regel sehr langsam oder nicht abgebaut werden, und daher einige Substanzen, meist Verbindungen mit 15 - 40 Kohlenstoffatomen, als sogenannte Biomarker genutzt werden können (Peters und Moldewan, 1993). Über den Abbau isoprenoider Substanzen ist relativ wenig bekannt. Bisher wurde nur der Abbau einzelner Terpene durch aerobe Mikroorganismen beschrieben, wobei die Verbindungen meist durch Oxygenasen angegriffen wurden.

1. Struktur, Biosynthese und Vorkommen von Terpenoiden

1.1. Grundstrukturen und Biosynthese isoprenoider Naturstoffe

Monoterpene sind chemisch als C_{10} -Verbindungen definiert, welche sich formal aus zwei Isopren-Einheiten (C_5H_8) zusammensetzen. Diese Verbindungen gehören zu der auch zahlenmäßig großen Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite. Monoterpene finden sich als geruchsintensive Stoffwechselprodukte vorwiegend in pflanzlichen ätherischen Ölen. Die Kohlenstoffskelette der Monoterpene besitzen eine Vielzahl verschiedener Strukturen, die azyklisch, monozyklisch oder bityklisch aufgebaut sein können, wobei bei bityklischen Verbindungen C_6-C_3 -, C_6-C_4 - und C_6-C_5 -Ringsysteme unterschieden werden (Abb. 1). Üblicherweise werden die Verbindungen mit Trivialnamen belegt, da die systematische Nomenklatur bei den komplexen Strukturen wenig praktikabel ist (Tab. G1, Anhang).

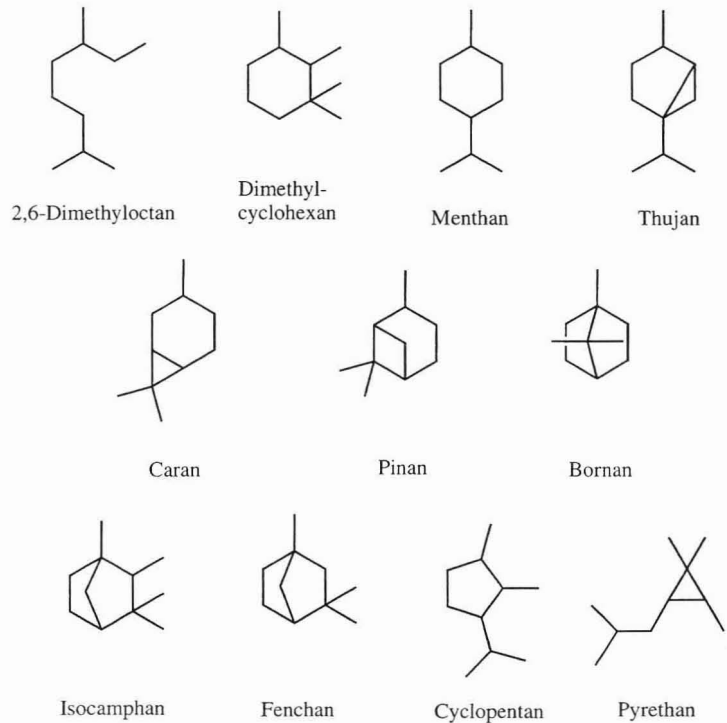


Abb. 1. Chemische Grundgerüste und Nomenklatur der Monoterpene.

Die aus Eukaryonten bekannte, "klassische" Biosynthese der Terpene verläuft über Mevalonsäure (C_6), wobei 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) aus drei Molekülen Acetyl-Coenzym A gebildet wird (Mevalonat-Weg). Die aktivierten "Isopren-Einheiten" der Terpenoidbiosynthese, Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), entstehen durch Decarboxylierung und Isomerisierung des Mevalonsäurediphosphats (Abb. 2). Neuere Untersuchungen über die Biosynthese von Hopanoiden in Eubakterien (Rohmer et al., 1993) führten zur Entdeckung eines zweiten, unabhängigen Synthesewegs des Isopentenylidiphosphats (Abb. 2). Als Zwischenstufe dieser Biosynthese wurde 1-Desoxyxylulose-5-phosphat ermittelt (Rohmer et al., 1996). Der sogenannte Desoxyxylulose-Weg verläuft über die Thiaminpyrophosphat-abhängige Kondensation einer C_2 -Einheit aus Pyruvat an die C_2 -Carbonylgruppe eines Triosephosphats und die anschließende Transposition zu Isopentenylidiphosphat (Schwendner et al., 1997). Es zeigte sich, daß der Desoxyxylulose-Weg bei Pflanzen in den Plastiden lokalisiert ist, während die Biosynthese isoprenoider Verbindungen im Cytosol auf dem Mevalonat-Weg erfolgt (Lichtenthaler et al., 1997a).

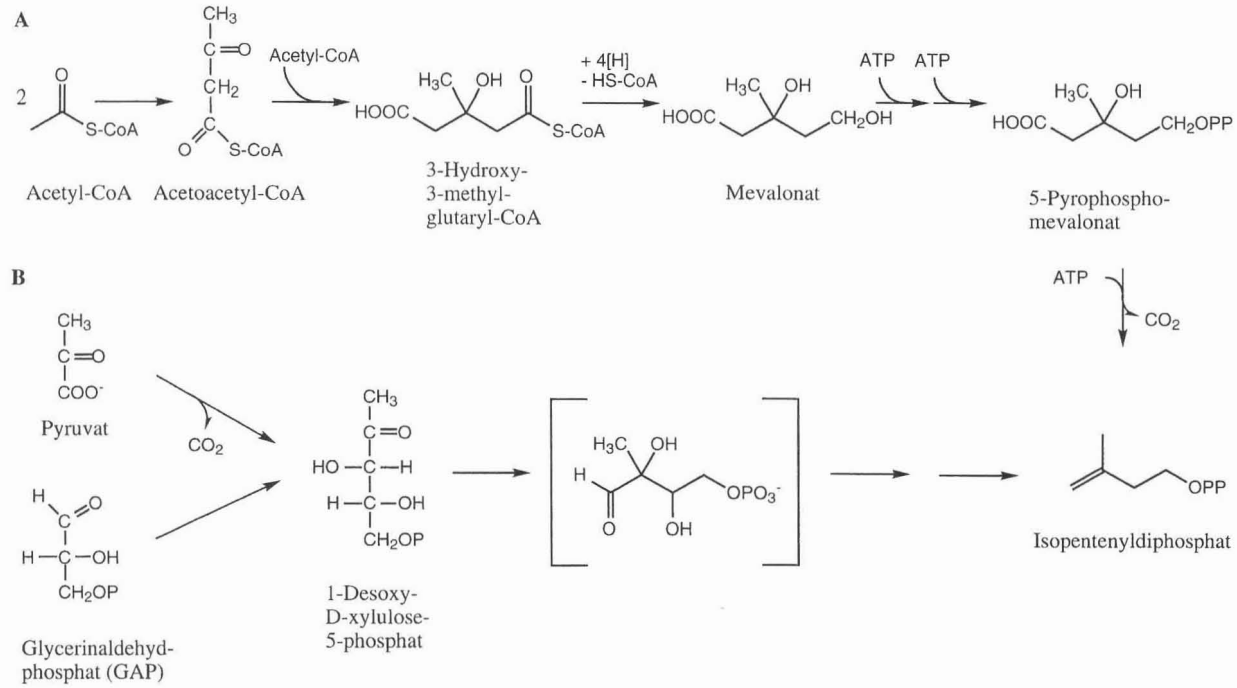


Abb. 2. Biosynthese der Vorstufe der Terpenoidsynthese Isopentenylidiphosphat über den Mevalonat-Weg (A) und über den Desoxy-xylulose-Weg (B) nach Rohmer et al. (1993); Lichtenthaler et al. (1997).

Entsprechend der Zahl der Isopren-Einheiten können Hemiterpane (C_5), Monoterpane (C_{10}), Sesquiterpane (C_{15}), Diterpane (C_{20}), Sesterterpane (C_{25}), Triterpane und Sterane (C_{30}) und Tetraterpane (C_{40}) unterschieden werden (Abb. 4). Terpene, die neun oder mehr Isopren-Einheiten enthalten (C_{40+}), werden als Polyterpane bezeichnet.

Die Bildung von Monoterpenen erfolgt durch sogenannte Kopf-Schwanz-Kondensation von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) unter Abspaltung von Pyrophosphat zu Geranylidiphosphat (GPP). Höhere Terpene werden durch Prenyltransferasen gebildet, die die Verlängerung um eine C_5 -Einheit katalysieren (Abb. 3). Durch Kopf-Kopf-Kondensation werden Terpene mit 30 und mehr Kohlenstoffatomen gebildet; so entstehen Triterpane und Sterane aus zwei Molekülen Farnesylidiphosphat bzw. Tetraterpane aus zwei Molekülen Geranylgeranylidiphosphat (Abb. 3). Die meisten Terpenoidverbindungen besitzen zyklische Strukturen in ihrem Kohlenstoffgerüst, deren Bildung durch Cyclasen oder Synthasen katalysiert wird. Die Röntgenstruktur einiger Terpenoidsynthasen ist inzwischen aufgeklärt (Sacchetti und Poulter, 1997).

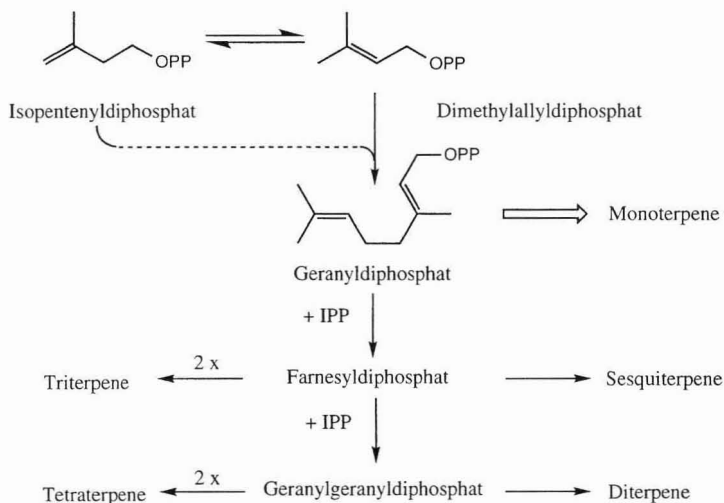


Abb. 3. Biosynthese der Terpene.

Hemiterpane (C_5)

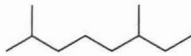


2-Methylbutan



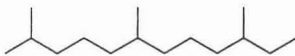
Isopren (2-Methylbuta-1,3-dien)

Monoterpane (C_{10})



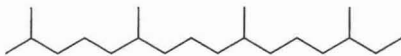
2,6-Dimethyloctan

Sesquiterpane (C_{15})



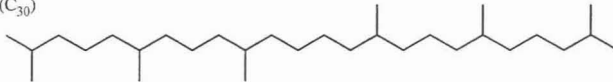
Farnesan (2,6,10-Trimethyldodecan)

Diterpane (C_{20})



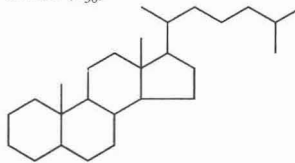
Phytan (2,6,10,14-Tetramethylhexadecan)

Triterpane (C_{30})

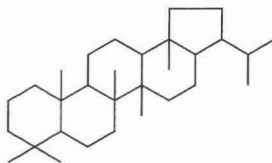


Squalan ($C_{30}H_{62}$)

Sterane (C_{30})

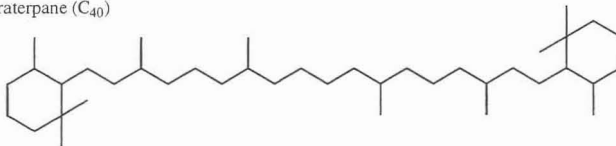


Cholestan ($C_{27}H_{48}$)



Hopan ($C_{30}H_{52}$)

Tetraterpane (C_{40})



Perhydro- β -carotin

Abb. 4. Chemische Grundstrukturen verschiedener Terpenoidklassen in der Natur häufig vorkommender isoprenoider Verbindungen.

Die Biosynthese der azyklischen und zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffe geht von Geranyldiphosphat (GPP) aus. Die an diesen Reaktionen beteiligten Synthasen bzw. Cyclasen sind membrangebunden und benötigen zweiwertige Metallionen als Cofaktoren (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) (Bohlmann et al., 1997). Eine direkte Zyklisierung von Geranylpyrophosphat ist stereochemisch nicht möglich. Daher kommt es zur Bildung eines allylischen Kations, das zu einem gebundenen Linalyldiphosphat-Intermediat isomerisiert, welches ionisiert und zyklisiert wird. Das enzymgebundene α -Terpinyl-Kation bildet das universelle Intermediat der Zyklisierungsreaktionen. Die bis heute bekannten Cyclasen oder Synthasen katalysieren die Bildung von Monoterpenkohlenwasserstoffen wie z. B. α -Pinen, β -Pinen, Sabinen, Limonen, α -Terpinen und γ -Terpinen. Die Vielzahl der oxygenierten Monoterpene werden in Pflanzen aus den zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen durch nachfolgende Oxidation unter Beteiligung von Cytochrom P450-Enzymen und molekularem Sauerstoff gebildet (Karp und Croteau, 1988).

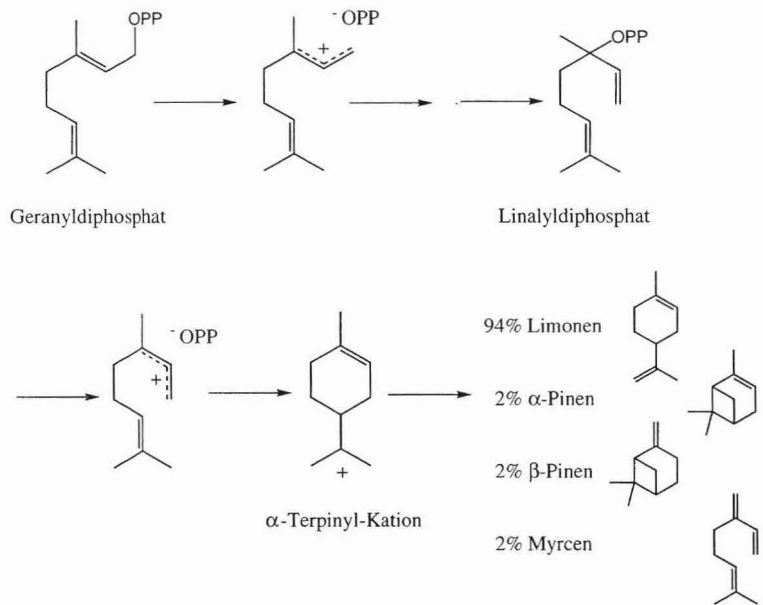


Abb. 5. Schema der Isomerisierung und Zyklisierung von Geranylpyrophosphat zu mono- und bicyklischen Monoterpenen am Beispiel der Limonen-Synthase (nach McGarty und Croteau, 1995).

1.2. Vorkommen biogener Kohlenwasserstoffe

Beträchtliche Mengen flüchtiger organischer Verbindungen werden überwiegend von verschiedenen Pflanzen in die Atmosphäre abgegeben. Zimmerman et al. (1978) schätzten die weltweite jährliche Emission biogener Kohlenwasserstoffe auf $4,8 \times 10^8$ t. Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) und Monoterpene bilden zusammen den wesentlichen Anteil (55 - 75 %) der biogen emittierten, sogenannten Nicht-Methan-Kohlenwasserstoffe (non-methane hydrocarbons, NMHC). Nach neueren Bestimmungen betragen die Emissionsraten an Isopren und Monoterpenen zusammen ca. 630 Tg Kohlenstoff pro Jahr ($1 \text{ Tg} = 10^{12} \text{ g}$), wobei die biogene Isoprenfreisetzung etwa viermal so hoch wie die Emissionsrate der Monoterpene ist (Guenther et al., 1995). Die globalen Emissionsraten der NMHC liegen damit in der Größenordnung der jährlichen Freisetzungsraten von Methan (ca. 500 Tg Kohlenstoff pro Jahr; Graedel und Crutzen, 1994).

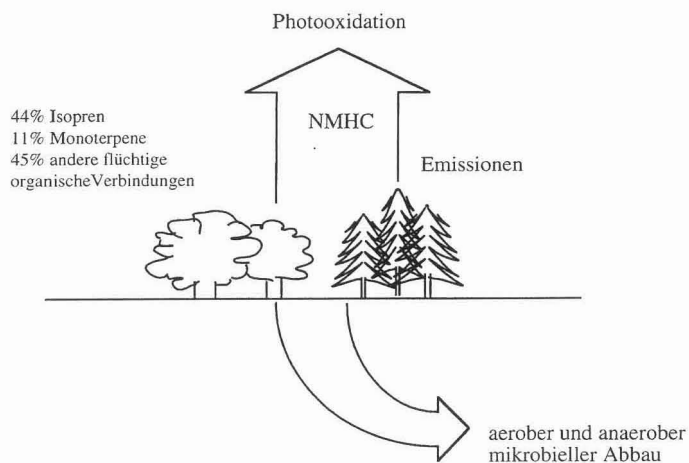


Abb. 6. Prozentuale Anteile von Isopren und Monoterpenen an der weltweiten Freisetzung flüchtiger organischer Verbindungen nach Guenther et al. (1995), wobei die jährliche Emission auf 1150 Tg Kohlenstoff geschätzt wurde.

Die flüchtigen organischen Verbindungen wie Isopren und Monoterpene spielen in der Chemie der Troposphäre, in Luftschichten zwischen 0 - 15 km, eine wichtige Rolle (Zimmer et al., 1997). Sie beeinflussen aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit den Abbau anderer klimarelevanter Spurengase wie Methan. Die Bildung von Photosmog in Gegenwart von Sauerstoffverbindungen und anthropogenen Luftschadstoffen (Stickoxide) sowie die Schädlichkeit der entstehenden Reaktionsprodukte (O_3 , CO, Peroxide und Radikale) rückten Monoterpene und andere

NMHC in das Blickfeld der Klima- und Atmosphärenforschung. Umfangreiche Emissionsuntersuchungen verschiedener Vegetationstypen wurden in den letzten Jahren durchgeführt. Wälder bildeten dabei die Hauptquelle für die Emission ungesättigter Kohlenwasserstoffe wie Isopren oder Monoterpene. Isopren konnte als Hauptbestandteil der Emission vieler Laubbäume (*Quercus* spp., *Eucalyptus* spp. und *Populus* spp.) und Nadelbäume (*Picea* spp.) nachgewiesen werden (Zimmer, 1997). Die relativen Anteile einzelner biogener Kohlenwasserstoffe sowie die absolut emittierten Mengen variieren dabei beträchtlich zwischen verschiedenen Pflanzenarten und Standorten, wobei die Emissionsraten im allgemeinen bei höheren Temperaturen und größerer Lichtintensität ansteigen.

Der Gehalt an Monoterpenen in Nadeln, z. B. von *Pinus monophylla* wurde mit ca. 5 mg/g Trockengewicht angegeben (Wilt et al., 1993). In Blättern von *Umbellularia californica* finden sich bis zu 20 mg/g Trockengewicht, wobei hierbei ca. 16 % auf Monoterpenkohlenwasserstoffe entfallen (Wood et al., 1995). Die Analysen bereits verfärbten Blattlaubs (grün, gelb, braun) von *Umbellularia californica* ergaben einen annähernd gleichbleibenden Monoterpengehalt, d. h. ein Abbau der Verbindungen in den Blättern durch die Pflanze fand anscheinend nicht statt. Dagegen wurden in der Nadelschicht unterhalb von *Pinus monophylla* in 5 - 12 cm Tiefe nur noch 0,12 mg/g Monoterpene gefunden, dies entspricht ca. 2,4 % des Gehalts in frischen Nadeln (Wilt et al., 1993). Auch in der Laubschicht unter *Umbellularia californica*-Beständen wurden nach einem Jahr oder länger weniger als 10 % des Monoterpengehalts frisch gefallener Blätter gefunden (Wood et al., 1995).

Wirtschaftliche Bedeutung haben Monoterpene und einige wenige Sesquiterpene als Duft- und Aromastoffe, ferner werden einige Terpene als Pharmaka verwendet. Monoterpene bilden neben Sesquiterpenen die Hauptinhaltsstoffe ätherischer Pflanzenöle, so daß diese Verbindungen aus terpenhaltigem Pflanzenmaterial meist durch Wasserdampfdestillation oder Extraktion gewonnen werden und die reinen Terpene durch fraktionierte Destillation daraus isoliert werden können.

2. Anaerober Abbau von Kohlenwasserstoffen durch Bakterien

Organisches Material, wie z. B. die Klasse der hier untersuchten Kohlenwasserstoffe und (sauerstoff-)funktionalisierten Derivate, wird von einer Vielzahl aerober Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Pilzen) als Kohlenstoffquelle genutzt. Molekularer Sauerstoff dient als terminaler Elektronenakzeptor des Metabolismus und ist zudem Reaktionspartner bei der initialen Oxidation aliphatischer, alizyklischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe, die durch mischfunktionelle Monoxygenasen (Hydrolasen) und Dioxygenasen katalysiert wird (Britton, 1984; Gibson und Subramanian, 1984; Trudgill, 1984; Young, 1984; Dagle, 1985). Bei Vorhandensein großer Mengen organischen Materials kann der vorhandene Sauerstoff infolge intensiver Oxidation durch aerobe Mikroorganismen vollständig verbraucht werden, so daß an-

oxische Zonen in Böden, an Süßwasserstandorten und in marinen Sedimenten entstehen. In Abwesenheit von molekularem Sauerstoff erfolgt der mikrobielle Katabolismus organischen Materials durch Fermentation oder anaerobe Respiration. Organische Verbindungen werden unter Beteiligung anorganischer Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Eisen (III), Sulfat oder Kohlendioxid mineralisiert. Gelangen Kohlenwasserstoffe in anoxische Bereiche, so stellt sich die Frage, ob und wie diese Verbindungen durch anaerobe Bakterien abgebaut werden können. Bislang wurden zahlreiche phototrophe, respiratorische (nitrat-, eisen-, sulfatreduzierende) sowie fermentative Bakterien isoliert, die aromatische Verbindungen assimilieren, mineralisieren bzw. vergären können.

2.1. Aliphatische Alkane

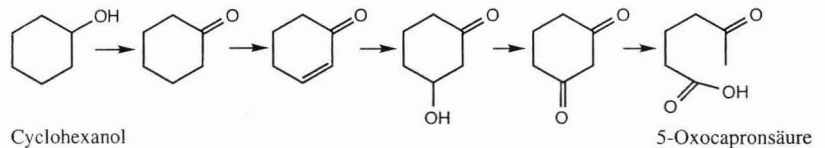
Alkane sind neben den aromatischen Kohlenwasserstoffen die reaktionsträgsten chemischen Verbindungen. Der mikrobielle Abbau einiger aliphatischer Kohlenwasserstoffe unter anoxischen Bedingungen wurde durch Reinkulturen nitrat- bzw. sulfatreduzierender Bakterien gezeigt. Hexadecan wird durch ein mesophiles, sulfatreduzierendes Bakterium, Stamm Hxd3 (*Desulfobacterium* sp.), vollständig mineralisiert (Aeckersberg et al., 1991). Das Bakterium metabolisiert Alkane mit einer Kettenlänge von 12 bis 20 Kohlenstoffatomen. Ein thermophiles, sulfatreduzierendes Bakterium, Stamm TD3, das mit *n*-Decan als alleiniger Kohlenstoffquelle isoliert wurde, mineralisiert *n*-Alkane der homologen Reihe von Hexan bis Hexadecan, wobei *n*-Alkane mit der Kettenlänge C₈-C₁₂ bevorzugt umgesetzt werden (Rueter et al., 1994). Gleichzeitig wurden nitratreduzierende Bakterien isoliert, die die Alkane Octan bzw. Hexan als Kohlenstoffquelle nutzen (Rueter et al. 1994; Ehrenreich, 1996; Rueter et al., 1996; Behrends, pers. Mitteilung). Für ein aus einem Ölfeld isoliertes Bakterium, Stamm HD-1, wurde ein autotrophes Wachstum mit CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle in Gegenwart von H₂ unter anoxischen Bedingungen beschrieben (Morikawa et al., 1996). In Gegenwart von Tetradecan war die Stimulation des anaeroben Wachstums von HD-1 beobachtet worden, wobei als Intermediat des Abbaus 1-Dodecen identifiziert wurde. Allerdings wurden von den Autoren keine weiteren Angaben zur Physiologie dieses Bakteriums und über die Stöchiometrie des katabolen Abbaus gemacht.

Die Initialreaktion der anaeroben Oxidation gesättigter aliphatischer Kohlenwasserstoffe ist bisher unbekannt. Von Aeckersberg et al. (1991) wird eine Carboxylierungs- oder Carbonylierungsreaktion postuliert. Die Dehydrogenierung des Alkans zum korrespondierenden Alken erscheint eher unwahrscheinlich, da dieses thermodynamisch, z. B. mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor, eine endergone Reaktion darstellt, und der anaerobe Abbau von 1-Alkenen und Alkanen im sulfatreduzierenden Stamm Hxd3 die Induktion unterschiedlicher Enzymsysteme erfordert (Aeckersberg, 1994).

2.2. Alizyklische Kohlenwasserstoffe und carbozyklische Alkohole

Während über den anaeroben Abbau von Cyclohexan unter anoxischen Bedingungen bisher noch nichts bekannt ist, wurde die anaerobe Oxidation von Cyclohexanol durch ein nitratreduzierendes Bakterium (Stamm K601) gezeigt (Dangel et al., 1988; 1989). Cyclohexanol wird über Cyclohexanon zu 2-Cyclohexenon oxidiert, das zu 3-Hydroxycyclohexenon hydratisiert und dann zu 1,3-Cyclohexadion dehydrogeniert wird. Die Ringspaltung des Dions erfolgt hydrolytisch zur 5-Oxocapronsäure (Abb. 7). Yugari (1961) untersuchte den Abbau von *trans*-Cyclohexan-1,2-diol durch ein *Pseudomonas*-ähnliches Bodenbakterium. Der vorgeschlagene Abbauweg beinhaltet keine Oxygenierungsreaktionen, vielmehr erfolgte die Ringspaltung des Cyclohexan-1,2-dions gleichfalls hydrolytisch. Die Oxidation von Cyclohexan-1,2-diol über 2-Hydroxycyclohexanon zu Cyclohexan-1,2-dion und die Hydrolyse zum Adipinsäuresemialdehyd wurde ebenfalls für den Katabolismus eines denitrifizierenden Bakteriums, *Azoarcus* sp. 22Lin, unter anaeroben Wachstumsbedingungen gefunden (Harder, 1997).

Pseudomonas sp. K 601 (Dangel et al., 1988; 1989)



"Bodenbakterium" (Yugari, 1961); *Azoarcus* sp. 22Lin (Harder, 1997)

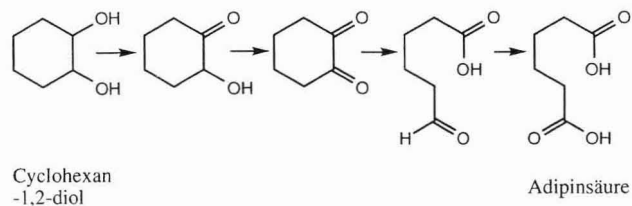


Abb. 7. Anaerobes Abbau von Cyclohexanol und Cyclohexan-1,2-diol durch nitratreduzierende Bakterien.

2.3. Aliphatische Alkene

Bisher ist nur für wenige Alkene ein Abbau durch anaerobe Bakterien gezeigt, wobei das Vorhandensein einer terminalen Doppelbindung die anaerobe Oxidation zu begünstigen scheint. Unter nitratreduzierenden Bedingungen wurde 1-Heptadecen durch ein marines Bakterium umgesetzt (Gilewicz et al., 1991). In methanogenen Anreicherungskulturen wurde 1-Hexadecen abgebaut, wobei die Methanbildung eine 78-91%ige Umsetzung des Alkens ergab und Acetat in den Kulturen nachgewiesen werden konnte (Schink, 1985a). In Folgekulturen dieser methanogenen Anreicherungskulturen konnte jedoch unter entsprechenden Versuchsbedingungen keine Methanbildung mit Hexadecan oder Heptadecan beobachtet werden. Von Schink (1985a) wurde als Initialreaktion des anaeroben Abbaus von 1-Alkenen die Hydratisierung der endständigen Doppelbindung zum korrespondierenden primären Alkohol vorgeschlagen.

Der Abbau eines Alkins (Ethin, Acetylen) durch *Pelobacter acetylenicus* wurde ebenfalls beschrieben (Schink, 1985b; Rosner und Schink, 1995). Der fermentative Abbau erfolgt hierbei über die Hydratisierung zum Acetaldehyd und die nachfolgende Disproportionierung zu Acetat und Ethanol.

2.4. Aromatische Verbindungen

Aromatische Verbindungen sind durch ein delokalisiertes π -Elektronensystem gekennzeichnet und weisen daher eine besondere chemische Stabilität auf. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß eine Vielzahl aromatischer Verbindungen durch Bakterien in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff vollständig mineralisiert werden. Diverse aromatische Ausgangssubstrate werden unter anoxischen Bedingungen in die zentralen Intermediate Benzoyl-CoA, Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) oder Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) überführt. Diese Verbindungen bilden die Substrate für die enzymatische Reduktion des aromatischen Rings, welche das aromatische π -Elektronensystem aufhebt (Evans und Fuchs, 1988; Tschsch, 1989; Schink et al., 1992; Elder und Kelly, 1994; Fuchs et al., 1994; Heider und Fuchs, 1997).

Die am Abbau aromatischer Verbindungen in anaeroben Bakterien beteiligten Enzyme wurden zum Teil bereits in vitro untersucht (Fuchs et al., 1994; Heider und Fuchs, 1997) bzw. die kodierenden Gene der beteiligten Enzyme identifiziert (Egland et al., 1997; Harwood und Gibson, 1997).

2.4.1. Initiale Aktivierung von aromatischen Verbindungen

Auf einige Reaktionen des Abbaus aromatischer Verbindungen in anaeroben Bakterien soll im folgenden näher eingegangen werden. Der anaerobe Abbau von Phenol durch nitrat- und sulfat-

reduzierende Bakterien wird über eine Carboxylierung in *para*-Position zur Hydroxylgruppe eingeleitet (Bak und Widdel, 1986; Tschsch und Fuchs, 1987). Dabei ist Phenol selbst nicht direkt das Substrat der Carboxylierungsreaktion, sondern erst nach der Phosphorylierung zu Phenylphosphat erfolgt die Carboxylierung zu 4-Hydroxybenzoat (Lack und Fuchs, 1994). Im Gegensatz dazu wird der anaerobe Abbau von Cresolen in denitrifizierenden Bakterien wahrscheinlich durch die Oxidation des Methylsubstituenten initiiert (Rudolphi et al., 1991).

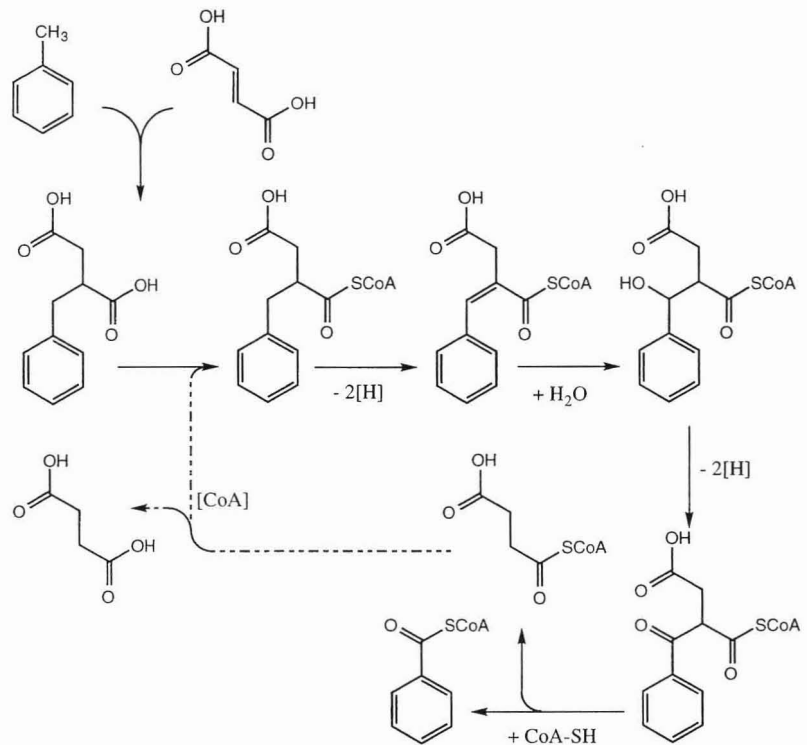


Abb. 8. Bildung von Benzylsuccinat aus Toluol und Fumarat und hypothetischer Reaktionsweg für die Oxidation von Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA über die β -Oxidation (Biegert et al., 1996).

Die Hydroxylierung der Methylgruppe von *m*-Cresol und der Abbau über 3-Hydroxybenzoat ist für nitratreduzierende Bakterien beschrieben (Bonting et al., 1995). Für die Initialreaktion des anaeroben Abbaus von Ethyl- und Propylbenzol wird eine Hydroxylierung der Methylengruppe

angenommen, die zur Bildung der sekundären Alkohole 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenylpropanol führt (Rabus und Widdel, 1995a; Ball et al., 1996). Inzwischen wurde allerdings gezeigt, daß der anaerobe Abbau von Toluol nicht direkt über eine Methylhydroxylierung (Altschmidt und Fuchs, 1992) erfolgt, vielmehr die Addition von Fumarat an Toluol die Initialreaktion des anaeroben Abbaus in nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien darstellt (Abb. 8) (Biegert et al., 1996; Beller und Spormann, 1997a, b).

Der anaerobe Abbau von Phenylacetat erfolgt über die α -Oxidation der Carboxymethylgruppe, da die β -Oxidation durch den β -ständigen Phenylring blockiert ist. Phenylacetyl-CoA wird zu Phenylglyoxylat oxidiert, das oxidativ zu Benzoyl-CoA decarboxyliert wird (Mohamed et al., 1993; Schneider et al., 1997).

2.4.2. Reduktion und Ringspaltung von Resorcin und Phloroglucin

Die zueinander *meta*-ständigen Hydroxylgruppen der Polyphenole Resorcin und Phloroglucin destabilisieren das π -Elektronensystem aufgrund der auftretenden Keto-Enol-Tautomerie bereits so stark, daß in fermentativen Bakterien wie *Pelobacter* sp. oder *Clostridium* sp. eine Reduktase die Aromazität dieser Moleküle ohne vorherige Aktivierung aufheben kann. Resorcin und Phloroglucin werden zu 1,3-Dioxocyclohexan (Kluge et al., 1990) bzw. 1,3-Dioxo-5-hydroxycyclohexan (Haddock und Ferry, 1989; Brune und Schink, 1992) reduziert, in welchen eine Ketogruppe in β -Position die Spaltung begünstigt. Diese Verbindungen werden hydrolytisch zu der korrespondierenden 5-Oxocyclohexansäure bzw. 3-Hydroxy-5-oxohexansäure gespalten und durch Enzyme der β -Oxidation zu Verbindungen des Intermediärstoffwechsels abgebaut. Eine direkte Hydrolyse von Resorcinol zu 5-Oxohex-2-encarboxylat ohne vorherige Reduktion des aromatischen Rings wurde für *Alcaligenes denitrificans* (Stamm LuBRes1) beschrieben (Gorny et al., 1992).

2.4.3. Reduktion von Benzoyl-CoA

Benzoat und einige Derivate werden vor der Reduktion des aromatischen Kerns durch Bildung eines Coenzym A-Thioesters aktiviert. So sind inzwischen mehrere CoA-Thioestersynthetasen gereinigt und charakterisiert worden, die unter Hydrolyse von ATP zu AMP und PPi die Veresterung einer aromatischen Säure mit Coenzym A katalysieren (Geissler et al., 1988; Altschmidt et al., 1991; Biegert et al., 1993).

Das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA wird zu Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA reduziert (Koch et al., 1993); diese Reaktion wird in *Thauera aromatica* K172 durch die Benzoyl-CoA-Reduktase (dearomatisierend) katalysiert (Boll und Fuchs, 1995). Die Reduktion von Benzoyl-CoA erfolgt nur unter strikt anoxischen Bedingungen und wird durch die Hydrolyse von zwei

Molekülen ATP ermöglicht (Boll und Fuchs, 1995; Boll et al., 1997). Die resultierende, alizyklische Verbindung 6-Hydroxycyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA oder Cyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA wird zu 3-Hydroxypimelyl-CoA bzw. Pimelyl-CoA gespalten (Koch et al., 1993; Boll und Fuchs, 1995; Gibson und Gibson, 1992; Harwood und Gibson, 1997). Die nachfolgenden Reaktionen der β -Oxidation führen zu Acetyl-CoA und Glutaryl-CoA (Koch et al., 1993). Glutaryl-CoA kann zu Crotonyl-CoA dehydrogeniert und decarboxyliert (Glutaryl-CoA-Dehydrogenase) werden, das weiter zu zwei Molekülen Acetyl-CoA oxidiert wird (Härtel et al., 1993).

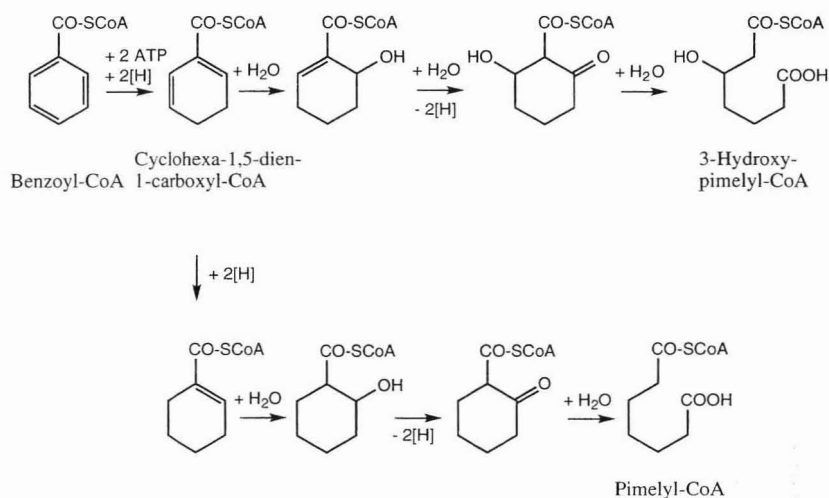


Abb. 9. Anaerobe Oxidation von Benzolat durch die Benzoyl-CoA-Reduktase (dearomatisierend), die die Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA in *Thauera aromatica* K172 katalysiert (nach Boll und Fuchs, 1995).

2.5. Isoprenoide Naturstoffe

Untersuchungen des Abbaus isoprenoider Verbindungen beschäftigen sich in geologischen Studien häufig mit den Diterpenen Pristan (C_{19}), Phytan (C_{20}) oder Phytol (C_{20}), die als sogenannte Biomarker verwendet werden (Peters und Moldewan, 1993). Solche azyklischen Isoprenoide entstehen während der Ablagerung organischen Materials in oxischen und anoxischen Zonen und leiten sich u.a. von den Chlorophyllen a und b, Bacteriochlorophyll a, Carotinoiden, α - und β -Tocopherol oder den Etherlipiden der Archaeobakterien ab.

Über den anaeroben Abbau isoprenoider Kohlenwasserstoffe ist sehr wenig bekannt. Squalen (2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexa-en) wurde in methanogenen Anreicherungskulturen zu ca. 50% abgebaut, was auf einen unvollständigen Abbau schließen läßt (Schink, 1985a). Möglicherweise tritt eine partielle Reduktion der Doppelbindungen auf, welche den vollständigen Abbau behindert. Unter nitratreduzierenden Bedingungen wurden in Anreicherungskulturen, die aus einem mit Dieselöl kontaminierten Aquifer stammten, ein 90%iger Abbau des eingesetzten Pristans (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) beschrieben (Bregnard et al., 1997). Ein marines, denitrifizierendes Bakterium (*Marinobacter* sp. Stamm CAB) konnte mit 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on, einem isoprenoiden Keton, als einziger Kohlenstoffquelle aerob und unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat wachsen. Während des anaeroben Wachstums konnte 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-ol sowie Z-3,7-Dimethylocten-2-säure und Z-3,7,11-Trimethyldodecen-2-säure nachgewiesen werden (Rontani et al., 1997).

3. Abbau von Monoterpenen durch aerobe Mikroorganismen

Mikroorganismen, u. a. *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. und *Nocardia* spp., die aerob kürzerkettige, aliphatische Alkenkohlenwasserstoffe metabolisierten, wuchsen auch mit einigen Monoterpenen (van Ginkel et al., 1987). Dagegen wurden nur wenige Mikroorganismen gezielt mit Monoterpenen als alleinige Kohlenstoffquelle isoliert, so daß der mikrobielle Abbau von Monoterpenen nur für einzelne Verbindungen untersucht ist. Die Mehrzahl der bisher zum Katabolismus der Monoterpene veröffentlichten Daten beschränken sich dabei auf die Identifizierung der in den Kulturmedien gefundenen Stoffwechselprodukte und die Postulierung davon abgeleiteter Abbauwege, wobei der Schwerpunkt auf der Erforschung der initialen Oxygenierungsreaktionen lag (Trudgill, 1984; 1986; 1990; 1994). Untersuchungen auf enzymatischer Ebene liegen nur in wenigen Fällen vor. In den folgenden Abschnitten sind die Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau einzelner Monoterpene dargestellt.

3.1. Azyklische Monoterpene: Citronellol, Geraniol und Linalool

Der aerobe Abbau der verzweigten Monoterpene Citronellol (3,7-Dimethyloct-6-enol) und Geraniol (3,7-Dimethylocta-2,6-dienol) in *Pseudomonas citronellolis* wurde bereits vor mehr als dreißig Jahren von Seubert und seinen Mitarbeitern untersucht und aufgeklärt (Seubert, 1960; Seubert und Remberger, 1963; Seubert et al., 1963; Seubert und Fass, 1964a; 1964b). *P. citronellolis* wächst aerob mit 3,7-Dimethyl-1-octanol, Citronellol, Geraniol, Nerol und Far-

nesol (C₁₅), jedoch nicht mit Phytol (C₂₀) als einziger Kohlenstoffquelle (Seubert, 1960; Fall et al., 1979).

Der Abbau von Geraniol wird durch die Oxidation der primären Alkoholgruppe zur Carboxylgruppe eingeleitet. Die nachfolgenden Reaktionen verlaufen auf der Stufe des aktivierten Coenzym A-Thioesters. Die konventionellen Reaktionen der β -Oxidation sind durch die Methylgruppe in 3-Position zur aktivierten Carboxylfunktion blockiert. Erst die Carboxylierung der Methylgruppe durch eine Biotin-abhängige Carboxylasereaktion (Geranyl-CoA-Carboxylase; Seubert et al., 1963) ermöglicht den weiteren Abbau. Die Hydratisierung der 2,3-Doppelbindung führt zur Bildung der korrespondierenden 3-Hydroxysäure und der anschließenden Freisetzung von Essigsäure in einer Lyase-Reaktion. Über die nachfolgenden Reaktionen der β -Oxidation und weitere Methylgruppeneliminierungen werden die Monoterpene Geraniol, Citronellol und Farnesol vollständig abgebaut.

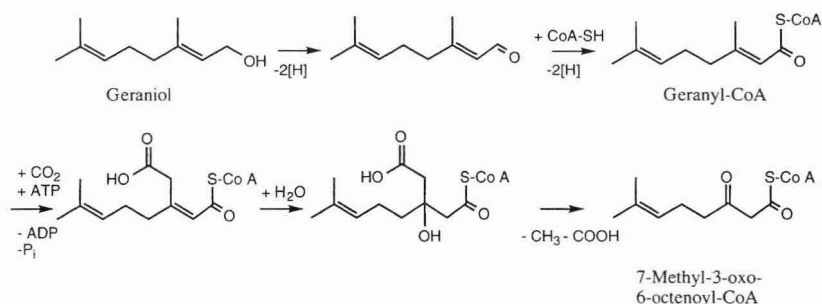


Abb. 10. Mikrobieller Abbau von Geraniol in *Pseudomonas citronellolis*.

Der Abbau anderer methylverzweigter Kohlenwasserstoffe durch *P. citronellolis* wurde von Fall et al. (1979) untersucht. *n*-Decan verwertende Mutanten (Dec+) konnten neben 2,6-Dimethyl-2-octen auch 3,6-Dimethyloctan und 2,6-Dimethyldecen metabolisieren. Der Abbau von 2,6-Dimethyl-2-octen erfolgte durch eine Kombination der Abbauewege für Alkane und Monoterpenalkohole über die terminale Oxidation zu Citronellol (Alkanmonooxygenase-Reaktion) und die anschließende Carboxylierung von Geranyl-CoA (Geranyl-CoA-Carboxylase).

Darüberhinaus wurde das aerobe Wachstum mit verzweigten Isoprenoiden wie 3,7-Dimethyl-1-octanol, Citronellol, Geraniol, *cis*-Geraniumsäure und Farnesol (C₁₅) und die Beteiligung einer Biotin-abhängigen Acyl-CoA-Carboxylase-Reaktion am Abbau dieser Verbindungen auch für die Organismen *P. aeruginosa* und *P. mendocina* gezeigt (Cantwell et al., 1978).

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Nitrat konnte *P. citronellolis* 3,7-Dimethyl-1-octanol und Citronellol vollständig oxidieren, jedoch nicht mit 2,6-Dimethyloctan,

3,7-Dimethyl-1-octen, Citronellen, Geraniol, Nerol, Linalool oder Phytol wachsen (Harder und Probian, 1995).

Im Gegensatz zum oxidativen Abbau von Citronellol und Geraniol in *Pseudomonas citronellolis* konnte die Hydroxylierung der terminalen C8-Methylgruppe aller azyklischen Monoterpenalkohole für *P. incognita* gezeigt werden. *P. incognita* wurde mit Linalool als einziger Kohlenstoffquelle isoliert, wuchs aber auch mit den azyklischen Monoterpenalkoholen Geraniol und Citronellol (Madyastha et al., 1977). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben, daß in *P. putida* var. *incognita* PpG 777 eine lösliche Cytochrom P450-Monooxygenase die Hydroxylierung der C8-Methylgruppe zu 8-Hydroxylinalool katalysiert (Ullah et al., 1990).

Der Abbau des tertiären Monoterpenalkohols Linalool durch Pilze erfolgt soweit bekannt unter Beteiligung von Monooxygenase- oder Epoxygenase-Reaktionen. Als Transformationsreaktionen sind z.B. in *Aspergillus niger* ebenfalls die Hydroxylierung der terminalen Methylgruppe (Madyastha und Murthy, 1988) bzw. bei *Diplodia gossypina* ATTC 10936 die Epoxygenierung zu 2,6-Dimethyl-oct-7-en-2,3,6-triol beschrieben (Kieslich et al., 1986).

3.2. Monozyklische Monoterpene: Limonen und Menthol

Der Abbau von monozyklischen Monoterpenen, deren nicht funktionalisierte Grundstruktur das *p*-Menthan (4-Isopropyl-1-methyl-cyclohexan) bildet, erfordert die Spaltung des Cyclohexanrings in ein offenkettiges Intermediat. Dhavaliker und Bhattacharyya (1966) isolierten ein Bakterium, *Pseudomonas* sp. Stamm PL, das aerob mit Limonen, *p*-Menth-1-en und einigen bizyklischen Monoterpenen als Kohlenstoffquelle wuchs. Die Analyse der zahlreichen, beim Wachstum auf Limonen akkumulierten Metabolite deutete auf Reaktionen an den Kohlenstoffatomen C1, C2, C4, C6, C7 und C9 des Substrats hin. Als wahrscheinlichster Reaktionsweg wurde die Hydroxylierung der C7-Methylgruppe zu Perillylalkohol, nachfolgende Reaktionen der β -Oxidation und die Ringspaltung zu 3-Isopropenylpimelyl-CoA postuliert (Dhavalikar und Bhattacharyya, 1966; Dhavalikar et al., 1966). Ein Abbauweg für das offenkettige Produkt der Ringspaltung 3-Isopropenylpimelinsäure bzw. 3-Isopropylpimelinsäure wurde von Hungund et al. (1970) postuliert.

Shukla et al. (1987) isolierten mit (-)-Menthol ein strikt aerobes, Gram-positives Bakterium, *Rhodococcus* sp. M-1, das einige Strukturisomere wie (+)-Isomenthol, (\pm)-Neomenthol, (-)-Menthone, (-)-Isopulegol, (\pm)-Neoisopulegol, (\pm)-Isopulegol, Pulegon und Menthan-3,4-diol als Wachstumssubstrate verwertete. Aus dem Kulturmedium und aus Zellsuspensionen konnten Menthon, 3,7-Dimethyl-6-hydroxy-octansäure und 3,7-Dimethyl-6-oxo-octansäure isoliert werden. Die Autoren postulierten die Oxidation von (-)-Menthol zu (-)-Menthon, wenn auch die initiale Oxidation von (-)-Menthol in zellfreien Extrakten nicht gezeigt werden konnte. Der weitere Abbau verläuft über die Monooxygenase-katalysierte Bildung eines Lactons (biologische Baeyer-Villinger-Reaktion), das in einer Hydrolase-Reaktion zu 3,7-Dimethyl-6-hydroxy-

octansäure gespalten wird. Dieser Abbauweg wird durch die Untersuchungen von Williams und Trudgill (1994) bestätigt, die in Zellextrakten von *Corynebacterium* sp. RWM1 zwar weder eine Menthol-Oxidase- noch eine Menthol-Dehydrogenase-Aktivität nachweisen, jedoch eine NADPH-abhängige Menthon-3,4-Monooxygenase-Reaktion und die Bildung des Lactons 3,7-Dimethyl-6-octanolid zeigen konnten.

3.3. Bicyklische Monoterpene: 1,8-Cineol (Eukalyptol) und α -Pinen

MacRae et al. (1979) zeigten, daß 1,8-Cineol (Eukalyptol) als Kohlenstoffquelle für das Wachstum von *Pseudomonas flava* dient, ein Bakterium, das von der Oberfläche von Eukalyptusblättern isoliert wurde. Die identifizierten Metabolite sprechen für eine Hydroxylierung des Rings am C2-Atom und die Dehydrogenierung zum entsprechenden Keton (2-Oxocineol). Williams et al. (1989) konnten die initiale Hydroxylierung am C6-Atom des 1,8-Cineols und die Beteiligung einer 6-Hydroxycineol-Dehydrogenase und einer NADPH-abhängigen Monooxygenase an der Ringspaltung von 1,8-Cineol in *Rhodococcus* sp. C1 zeigen. Die ringspaltende Monooxygenase katalysiert eine biologische Baeyer-Villinger-Reaktion, die zur Bildung eines instabilen Lactons führt, welches einer hydrolytischen Spaltung unterliegt. Über den weiteren Abbau der entstehenden Produkte ist nichts bekannt.

Obwohl das aerobe Wachstum mit α -Pinen als einziger Kohlenstoffquelle für einige Mikroorganismen beschrieben wurde, ist der mikrobielle Abbau dieses bicyklischen Monoterpens noch nicht vollständig aufgeklärt. Shukla und Bhattacharyya (1968a, b) untersuchten den Metabolismus von α - und β -Pinen in *Pseudomonas* sp. Stamm PL. Die Vielzahl der Metabolite, die aus Kulturen isoliert und identifiziert werden konnten, deuteten auf eine Umlagerung der Pinene zu den monozyklischen Intermediaten Limonen oder *p*-Menth-1-en hin. Der weitere Abbau verläuft über die Oxygenierung der C7-Methylgruppe (C10 des α -Pinens) zu Perillylalkohol bzw. Phellandrol. Die Ringspaltung der korrespondierenden Säuren durch Reaktionen der β -Oxidation führt zu 3-Isopropylpimelinsäure bzw. 3-Isopropenylpimelinsäure (Abb. 11).

Die von Gibbon und Pirt (1971) mit α -Pinen als Kohlenstoffquelle isolierten *Pseudomonas*-Stämme NCIB 10684 und NCIB 10687 akkumulierten u. a. 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-diensäure, 2,5,6-Trimethylhept-3-ensäure und 3,4-Dimethylvaleriansäure, daneben in Sauerstoff-limitierten Kulturen auch Limonen und α -Terpineol. Trudoszen et al. (1977) fanden in Kulturen von *Pseudomonas putida* (Stamm PIN11) zusätzlich die Akkumulation von 3-Isopropylbut-3-ensäure.

Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen des Metabolismus von α -Pinen in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, daß eine initiale Monooxygenierung von α -Pinen zu α -Pinenoxid (Epoxid) stattfindet (Abb. 11), dessen Spaltung zu 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al führt (Best et al., 1987).

Auch ein Gram-positives Isolat, *Nocardia* sp. P18.3, wuchs mit α -Pinen und α -Pinenoxid, und Zellextrakte dieses Bakteriums katalysierten die Umsetzung von α -Pinenoxid zu 2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (Griffiths et al., 1987a). Die die Ringöffnung katalysierende α -Pinenoxid-Lyase-Reaktion bewirkt dabei die gleichzeitige Spaltung beider Ringsysteme zu einem offenkettigen Produkt.

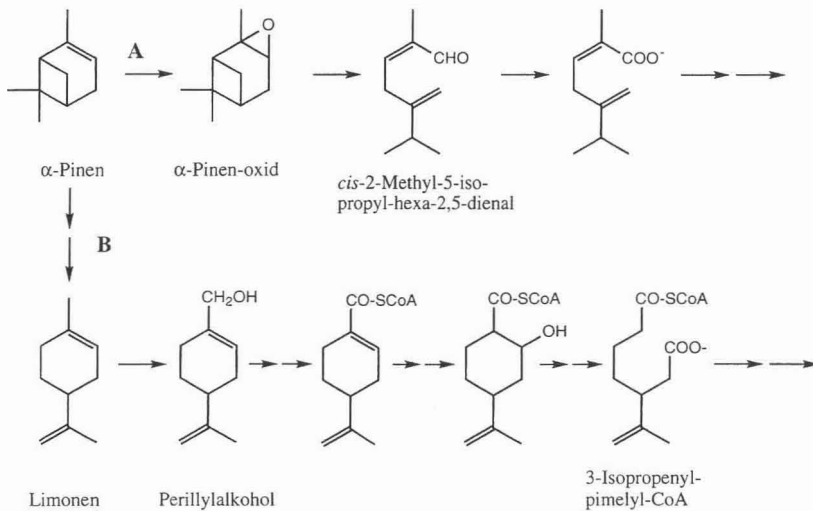


Abb. 11. Mikrobieller Abbau von α -Pinen durch (A) Epoxygenierung zu α -Pinenoxid in *Pseudomonas* sp. PX1, *P. fluorescens* NCIMB 117671 und *Nocardia* sp. oder durch (B) Umlagerung zu Limonen in *Pseudomonas* sp. PL und *Pseudomonas* sp. NCIMB 10687 (nach Griffiths et al., 1987b).

Ein Vergleich der bisher veröffentlichten Untersuchungen deutet daraufhin, daß mindestens zwei unabhängige Abbauwege für α -Pinen existieren. Die Induktion der α -Pinenoxid-Lyase konnte in *Pseudomonas* sp. PX1, *P. fluorescens* NCIMB 11671 und *Nocardia* sp. P18.3 gezeigt werden (Griffiths et al., 1987b). Im Gegensatz dazu verläuft der Abbau von α -Pinen in *Pseudomonas* spp. PL und PIN 18 (NCIMB 10687) wahrscheinlich über einen anderen Weg, für den eine Umlagerung zu monozyklischen Intermediaten, die Oxidation der C7-Methylgruppe und die Ringspaltung durch Reaktionen der β -Oxidation postuliert wurde.

Über den Abbau von Monoterpenen der Strukturklasse der Thujane und Carane (C₆-C₃-Biszyklen) durch Mikroorganismen konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden.

Zusammenfassend geben alle bisherigen Untersuchungen des aeroben Stoffwechsels einzelner Monoterpene nur ein unvollständiges Bild der Stoffwechselwege, die am Abbau dieser Verbindungen und an der Transformation zu Intermediaten des zentralen Metabolismus beteiligt sind.

4. Ziele dieser Arbeit

Isoprenoide Verbindungen besitzen eine Reihe von chemischen Strukturelementen, welche sich für die Untersuchung der Mechanismen der anaeroben Oxidation von Kohlenwasserstoffen in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff anbieten. Neben methylverzweigten, aliphatischen Alkenen beinhaltet die Klasse der Monoterpene auch monozyklische und bicyklische Kohlenwasserstoffe, wobei die bicyklischen Monoterpene Propan- und Butan-Ringe enthalten.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß ein mikrobieller Abbau bestimmter Monoterpene unter nitratreduzierenden Bedingungen stattfindet, und es lagen Isolate aus Anreicherungskulturen auf verschiedenen Monoterpenen vor (Harder und Probian, 1995).

Die monoterpenerwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme sollten taxonomisch und physiologisch charakterisiert werden, und die vollständige Mineralisierung der Monoterpene in Gegenwart von Nitrat sollte in Reinkulturen gezeigt werden. Die physiologischen Untersuchungen sollten erste Hinweise auf die Stoffwechselwege der anaeroben Monoterpenoxidation unter nitratreduzierenden Bedingungen geben. Exemplarische Zellzählungen monoterpenerwertender, denitrifizierender Bakterienpopulationen und Wachstumsexperimente mit natürlich vorkommenden Monoterpenen sollten eine Abschätzung der ökologischen Bedeutung der anaeroben Monoterpenoxidation ermöglichen.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Chemikalien und Gase

Handelsübliche Chemikalien mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" oder "reinst" wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die verwendeten Monoterpenen wurden von den Firmen Fluka, Roth (Karlsruhe) und Sigma bezogen und hatten einen Reinheitsgrad (GC) zwischen 90 % und 99 %. Die ätherischen Öle stammten von den Firmen Dudel (Gifhorn) und Caelo (Hilden). Gase der Reinheit 4.5 bis 5.0 (Stickstoff, Kohlendioxid, Wasserstoff, Helium und entsprechende Gemische) wurden von der Firma Messer-Griesheim (Krefeld) geliefert.

2. Organismen und Probenmaterial

Die monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme wurden aus Belebtschlamm oder aus Schlammgemischen von Gräben örtlicher Mischwälder isoliert (Harder und Probian, 1995). Bakterienisolate auf den Monoterpenen *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, 2-Caren, α -Pinen, Eucalyptol, Linalool und Menthol wurden von Dr. J. Harder zur Verfügung gestellt. Reinheitskontrollen der im mikroskopischen Bild einheitlich erscheinenden Isolate mit alternativen Kohlenstoffquellen (s. Abschnitt 3.2.1. in Material und Methoden, Abschnitt 1. in Teil I der Ergebnisse) sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen bestätigten, daß denitrifizierende Reinkulturen erhalten wurden, die im folgenden als Bakterienstämme 51Men, 65Phen, 62Car, 54Pin, 47Lol, 58Eu und 21Mol bezeichnet werden.

Als Inokulum für die Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen wurde Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage (Lintel, Osterholz-Scharmbeck) eingesetzt. Für die Abschätzung der Populationsgröße monoterpenverwertender, nitratreduzierender Bakterien wurden Belebtschlammproben und Bodenproben unter Koniferen (Fichten) verwendet.

3. Mikrobiologische Methoden

3.1. Medien

3.1.1. Herstellung des anoxischen Mineralmediums

Die hitzestabilen Salze des Grundmediums wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert (Widdel, 1980; Ochs, Bovenden-

Lenglern).

Nach dem Abkühlen des Mediums unter einer N_2/CO_2 -Gasatmosphäre (90/10, v/v) wurden die hitzelablen Komponenten des Mediums aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 2 M HCl auf 7,0 - 7,2 eingestellt. Mit Überdruck (10 kPa) wurde das Medium über ein Glasrohr (Abfüllglocke) in sterile Flaschen gefüllt, die gasblasenfrei vollständig gefüllt und mit Schraubdeckeln verschlossen wurden (Widdel und Bak, 1992).

3.1.2. Mineralmedium für nitratreduzierende Bakterien

Zusammensetzung des Mineralmediums für nitratreduzierende Bakterien:

	pro 1 Medium
KH_2PO_4	0,50 g
NH_4Cl	0,50 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,10 g
$NaNO_3$	0,85 g

Eine 20x konzentrierte Stammlösung der Mineralsalze wurde routinemäßig verwendet.

Dem autoklavierten und abgekühltem Medium wurden folgende Lösungen steril zugegeben:

	pro 1 Medium
Spurenelement-Lösung (EDTA-komplexiert)	2 ml
Selenat-Wolframat-Lösung	2 ml
7-Vitamine-Lösung	1 ml
Vitamin B_{12} -Lösung	1 ml
Thiamin (B_1)-Lösung	1 ml
Riboflavin (B_2)-Lösung	1 ml
$NaHCO_3$ (1 M)	50 ml
HCl (2 M)	1 ml

Das Medium wurde entweder in gasblasenfrei, vollständig gefüllten Flaschen mit Schraubverschluß (50 ml) oder in Serumflaschen mit Butylstopfen unter einer N_2/CO_2 -Gasatmosphäre (90/10, v/v) aufbewahrt. Die Begasung dieser Gefäße erfolgte nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972).

3.1.3. Zusammensetzung der Stammlösungen für nitratreduzierende Bakterien

Spurenelement-Lösung (EDTA-komplexiert)

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2,1 g
Na_2-EDTA	5,2 g
in 50 ml bidest. H_2O unter Erwärmen lösen	
H_3BO_3	30 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	100 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	190 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	24 mg
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mg
...	

CuSO ₄ ·5H ₂ O	25 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36 mg

Unter Rühren wurde mit NaOH (5 M) der pH-Wert auf pH 6,0 eingestellt, die Lösung mit bidest. H₂O auf 1 l aufgefüllt und in verschlossenen Schraubdeckelgefäßen autoklaviert.

Selenat-Wolframat-Lösung

NaOH	200 mg
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	6 mg
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	8 mg
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in verschlossenen Schraubdeckelgefäßen autoklaviert.

7-Vitamine-Lösung (nach Aeckersberg et al., 1991)

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (10 mM), pH 7,1	100,0 ml
4-Aminobenzoesäure	4,0 mg
D-(+)-Biotin	2,0 mg
Nicotinsäure	10,0 mg
Ca-D-(+)-Pantothenat	5,0 mg
Pyridoxin·2 HCl	15,0 mg
Folsäure	4,0 mg
Liponsäure	1,5 mg

Die Lösung wurde mittels Membranfilter (Nitrocellulose, Porengröße 0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltriert und in Schraubdeckelflaschen kühl (4 °C) und dunkel aufbewahrt.

Vitamin B₁₂-Lösung (nach Aeckersberg et al., 1991)

Cyanocobalamin	5,0 mg
bidest. H ₂ O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und kühl (4 °C) und dunkel aufbewahrt.

Thiamin (B₁)-Lösung (nach Aeckersberg et al., 1991)

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (25 mM), pH 3,4	100,0 ml
Thiamin·2 HCl	10,0 mg

Die Lösung wurde sterilfiltriert und kühl (4 °C) und dunkel aufbewahrt.

Riboflavin (B₂)-Lösung (nach Aeckersberg et al., 1991)

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (25 mM), pH 3,2	100,0 ml
Riboflavin	2,5 mg

Die Lösung wurde sterilfiltriert und kühl (4 °C) und dunkel aufbewahrt.

Natriumhydrogencarbonat (1 M)



84 g/l

Die Lösung wurde in Serumflaschen portionsweise (30; 50; 60; 100 ml) bis zur Sättigung mit CO_2 begast und anschließend unter einer CO_2 -Atmosphäre mit geringem Überdruck in Klemmgestellen autoklaviert.

Ascorbatlösung (1 M)

Ascorbinsäure (17,6 g) wurde im Eisbad in anaerobisiertem bidest. H_2O mit NaOH unter Rühren neutralisiert und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde über einen Sterilfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 μm) direkt in ein begasbares, zuvor anaerobisiertes und sterilisiertes Spezialgefäß filtriert und unter N_2 -Atmosphäre bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt (Abb. 12).

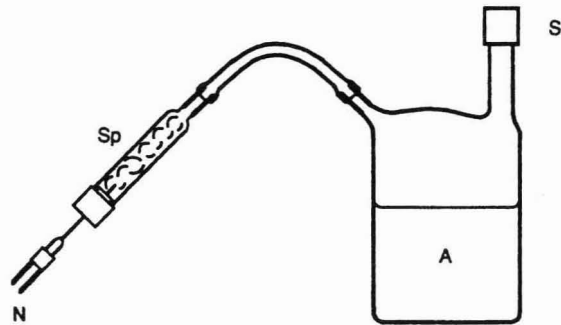


Abb. 12. Spezialgefäß zur anoxischen Lagerung von sauerstofffreien, sterilen Lösungen (A). Der mit Watte gestopfte Begasungsaufsatz (B) wurde mit einem Butylstopfen verschlossen, der mit einem Schraubdeckel mit Öffnung gesichert war. So konnte das Gefäß über eine Nadel mit Stickstoff (N_2) begast werden. Die Öffnung des Spezialgefäßes war mit einem Schraubdeckel mit Teflondichtung (S) verschlossen. Das Gefäß (und darin befindliches Heptamethylnonan oder Paraffinöl) konnten durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert werden. Proben wurden durch die Öffnung unter einem ständigen Strom von N_2 anaerob entnommen (Aeckersberg et al., 1991). Dieses Gefäß wurde zur Lagerung anoxischer, steriler Lösungen von Ascorbat, Heptamethylnonan oder Paraffinöl eingesetzt.

3.1.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren

Wasserlösliche organische Substrate wurden den Wachstumsansätzen direkt aus konzentrierten Stammlösungen (0,1-1 M) zugesetzt. Temperaturlabile Substanzen wurden sterilfiltriert, alle übrigen Stammlösungen wurden autoklaviert. Freie Carbonsäuren wurden durch Zugabe nahezu äquimolarer Mengen an NaOH in Lösung gebracht, und der pH-Wert der Lösung wurde zwischen pH 8 und 9 eingestellt.

Unlösliche organische Substrate wurden als verdünnte Lösung in einer inerten Trägerphase zugegeben. Als Trägerphase wurde routinemäßig 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (Aldrich, Steinheim) eingesetzt, das in Spezialgefäßen (Abb. 12; Aeckersberg et al., 1991) durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert und unter N_2 -Atmosphäre aufbewahrt wurde. Die wasserunlöslichen organischen Substrate wurden unverdünnt sterilfiltriert (Lösungsmittelresistente Filter (aus regenerierter Cellulose), Porengröße 0,2 μm , Schleicher & Schuell, Dassel) und in Glasgefäßen mit Teflondichtung bei 4 °C dunkel aufbewahrt.

3.1.5. Elektronenakzeptoren

Wasserlösliche Elektronenakzeptoren wurden den Wachstumsansätzen direkt aus konzentrierten Stammlösungen (1 M) zugesetzt, die durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert wurden. Distickstoffoxid wurde als Reingas (N_2O , 2.0; Messer-Griesheim, Krefeld) direkt über die Gasphase mittels einer Spritze den Kulturen steril zugegeben.

3.1.6. Minimalmedien-Agarplatten (Bottle Plates) für aerobes und denitrifizierendes Wachstum

Agar zur Herstellung von Selektivmedium-Agarplatten wurde mit destilliertem Wasser kalt gewaschen, um lösliche organische Verunreinigungen zu entfernen. Hierzu wurde ca. 3,3 g Agar agar (Difco, Detroit, Michigan, USA) in ca. 300 ml dest. H_2O suspendiert, 15 min gerührt, und nach Sedimentation wurde der Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt und der Agar in 100 ml H_2O dest. aufgenommen.

Die hitzestabilen Salze (pro 1 l dest. H_2O : 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g NH_4Cl ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 1,0 g NaCl) wurden in dest. H_2O gelöst und mit 2 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Das Mineralsalzmedium und der mit dest. H_2O gewaschene Agar (30 g/l) wurden getrennt autoklaviert und danach steril zusammengegeben. Zu dieser abgekühlten Lösung (ca. 60 °C) wurden die Spurenelement-, Se-W- und die einzelnen Vitamin-Lösungen steril hinzugefügt. Ca. 9 ml Minimalmedium-Agar wurde in 100 ml Achteckflaschen gefüllt und die Polymerisation des Agars auf Eis beschleunigt.

Für die Kultivierung unter anoxischen Bedingungen wurde die Mineralsalzlösung in mit Stopfen verschlossenen Serumflaschen anaerobisiert, Nitrat (10 mM) als Elektronenakzeptor zugesetzt und alle nachfolgenden Arbeitsschritte unter ständiger N_2 -Begasung durchgeführt.

3.1.7. Mineralmedium für methanogene Anreicherungen

Zusammensetzung des methanogenen Mineralmediums

	pro 1 Medium
NaCl	1,00 g
KCl	0,50 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g
NH ₄ Cl	0,25 g
Na ₂ SO ₄	0,20 g

Dem autoklavierten und abgekühltem Medium wurden folgende Supplemente zugegeben:

	pro 1 Medium
Spurenelement-Lösung (EDTA-komplexiert)	1 ml
Selenat-Wolframat-Molybdat-Lösung	1 ml
7-Vitamine-Lösung	1 ml
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml
Thiamin (B ₁)-Lösung	1 ml
Riboflavin (B ₂)-Lösung	1 ml
NaHCO ₃ (1 M)	30 ml
Cystein (0,5 M)	2 ml
Resazurin (1 g/l)	1 ml

Das Medium wurde mit 2 M HCl auf pH 7,0 eingestellt, und die Kulturansätze wurden mit FeS-Suspension chemisch reduziert (Endkonzentration 1 - 2 mM). Resazurin diente als Redoxindikator.

3.1.8. Zusammensetzung der Stammlösungen für methanogene Medien

Spurenelement-Lösung (EDTA-komplexiert) für methanogene Anreicherungsmedien

	pro 1 Medium
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,1 g
Na ₂ -EDTA	7,8 g
in 50 ml bidest. H ₂ O unter Erwärmen lösen	
H ₃ BO ₃	60 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1000 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	380 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	240 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	288 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	72 mg

Mit NaOH (5 M) wurde der pH-Wert auf pH 6,0 eingestellt; die Lösung wurde mit bidest. H₂O auf 1 l aufgefüllt und in verschlossenen Schraubdeckelgefäßen autoklaviert.

Selenat-Wolframat-Molybdat-Lösung

NaOH (10 mM)	400 mg
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	32 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	24 mg
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	6 mg
bidest. H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in verschlossenen Schraubdeckelflaschen autoklaviert.

Vitamin-Lösungen

Die verwendeten Vitaminlösungen entsprachen den Vitaminlösungen für nitratreduzierende Bakterien.

Cystein (0,5 M)

L-Cystein	6,1 g
bidest. H ₂ O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße), anaerobisiert und kühl (4 °C) aufbewahrt.

Resazurin-Lösung

Resazurin	100,0 mg
bidest. H ₂ O	ad 100,0 ml

Natriumsulfid (1 M)

Zur Herstellung einer 1 M NaS-Lösung wurden möglichst klare Kristalle von Na₂S·9H₂O verwendet. Die Kristalle wurden in dest. H₂O unter einer N₂-Atmosphäre gelöst und in mit Butylstopfen verschlossenen Serumflaschen autoklaviert. Die Lösung wurde dunkel bei 4 °C aufbewahrt.

Eisen(II)sulfid-suspension (nach Hanert, 1981)

Eisensulfid (Fe(II)S) wird durch eine Fällungsreaktion äquimolarer Mengen an Eisensulfat (FeSO₄·7H₂O) und Natriumsulfid (Na₂S·9H₂O) erhalten. Gleiche Volumenteile anaerober Lösungen (0,2 M) wurden zusammengegeben. Das sich bildende FeS-Präzipitat wurde wiederholt mit anaeroben dest. H₂O gewaschen, bis das Präzipitat neutral reagierte. Die Suspension wurde auf eine Endkonzentration von 0,2 M eingestellt und unter einer N₂-Atmosphäre in Serumflaschen autoklaviert. Vor der Entnahme von Aliquots wurde die Suspension durch Schwenken homogen verteilt.

3.2. Kultivierung

3.2.1. Reinheitskontrollen

Die Bakterienisolate wurden im Phasenkontrastmikroskop (Axioplan; Zeiss, Oberkochen) auf ein einheitliches Erscheinungsbild der Zellen geprüft. Daneben wurden die Bakterienstämme in verschiedenen Medien unter fermentativen und denitrifizierenden Bedingungen kultiviert bzw. Ausstriche auf Vollmedienplatten aerob inkubiert und auf das Auftreten von andersartigen Zelltypen bzw. die Einheitlichkeit der Kolonieform überprüft. Folgende Medien wurden eingesetzt:

- a) fermentativ: AC-broth (Difco, Detroit, Michigan, USA), Mineralmedium mit Hefeextrakt (5 g/l);
- b) anoxisch in Gegenwart von Nitrat: AC-broth, Mineralmedium mit Hefeextrakt (5 g/l), Acetat (2 mM), Pyruvat (2 mM) oder Fumarat (2 mM) und 10 mM Nitrat;
- c) aerob: Vollmedienplatten mit Pepton (5 g/l); Fleischextrakt (3 g/l) und Agar (15 g/l) bei pH 7,0-7,2.

3.2.2. Stammkulturen

Die routinemäßige Kultivierung der denitrifizierenden Reinkulturen erfolgte in 20 ml Schraubdeckelröhrchen in 15 ml Mineralmedium mit 10 mM Nitrat und 4 mM Monoterpen, 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel sowie 0,4 ml 2,2,4,4,6,8,8,-Heptamethylnonan (HMN) als organischer Trägerphase. Die als Kohlenstoffquellen verwendeten Monoterpene wurden steril zugegeben. Hierzu wurden die Monoterpene entweder unter Stickstoffbegasung als Reinsubstanzen direkt in die Trägerphase gegeben oder als anaerobe, in HMN gelöste, konzentrierte Lösungen zugesetzt. Die Kulturgefäße wurden nach der Hungate-Technik unter N_2/CO_2 -Begasung (90/10, v/v) steril mit Butylstopfen oder Butylsepten und Gewindelochkappen verschlossen (Bryant, 1972). Die Selektivmedien wurden mittels einer mit Stickstoff gespülten Spritze mit ca. 6,7 % (v/v) einer gut gewachsenen Stammkultur beimpft und auf einem Rotationsschüttler (Certomat R; Braun, Melsungen) bei 60 upm und 28 °C inkubiert, wobei durch die Invertierung der Röhrchen und die Inkubation in Schräglage der Kontakt zwischen Butylstopfen und organischer Phase vermieden wurde und eine möglichst große Grenzfläche zwischen organischer und wäßriger Phase erzielt werden sollte. Gewachsene Kulturen wurden bei 4 °C gelagert und alle 6 - 8 Wochen auf neues Selektivmedium übertragen.

3.2.3. Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten (Bottle Plates)

Für die Kultivierung der Bakterienstämme auf Agarplatten wurden ca. 0,1 ml einer Bakterienkultur mit einer am Ende rundgeschmolzenen Pasteurpipette ausgestrichen. Das jeweilige Monoterpen wurde als Reinsubstanz (ca. 20 µl) nach dem Ausstreichen in das Kulturgefäß (Achteckflasche) gegeben. Die Kulturgefäße wurden mit teflonisierten Septen und Schraubver-

schlüssen bzw. mit Butylstopfen unter Begasung mit N_2 nach der Hungate-Technik verschlossen und liegend bei 28 °C inkubiert, wobei die Versorgung mit Monoterpenen über die Gasphase erfolgte.

3.3. Charakterisierung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme

3.3.1. Phasenkontrastmikroskopische Fotografie und Gram-Färbung

Für die Erstellung der Phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden Zellen der sieben Bakterienstämme, die anaerob mit den jeweiligen Monoterpensubstraten und Nitrat gewachsen waren, auf Agarobjektträgern fixiert und fotografiert (Pfennig und Wagener, 1986). Hierzu wurde ca. 2 ml einer mehrmals mit dest. H_2O gewaschenen Agarlösung (2 %, w/v) in einem Wasserbad geschmolzen und auf einen Objektträger aufgebracht. Tropfen einer Bakterien suspension wurden auf die Agar-beschichteten Objektträger aufgebracht, und die Aufnahmen der Bakterienstämme unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops (Axiophot; Zeiss, Oberkochen) und eines Schwarzweißfilms (Agfaortho Prof. 25; Agfa-Gevaert, Leverkusen) erstellt. Die Gram-Färbung der Bakterienstämme wurde entsprechend den Herstellerangaben mit einem Färbetest für die Mikroskopie durchgeführt (Gram-color; Merck, Darmstadt).

3.3.2. Wachstumsexperimente zur physiologischen Charakterisierung

Wachstumsversuche wurden, sofern nicht anders angegeben, in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) mit 10 ml Medium für nitratreduzierende Bakterien durchgeführt. Aus Vorratsgefäßen wurde das Minimalmedium mit Glaspipetten in sterile Röhrchen überführt. Beim Auslaufen des Mediums wurde die Spitze der Glaspipette unterhalb der ansteigenden Flüssigkeitsoberfläche mitgeführt, um den Kontakt mit der Luft so gering wie möglich zu halten. Danach wurden Ascorbat, die jeweiligen Elektronendonatoren und -akzeptoren und gegebenenfalls weitere Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Anschließend wurden die Röhrchen nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972) mit N_2/CO_2 (90/10, v/v) steril begast und mit Butylsepten und Gewindelochkappen verschlossen. Wurde ein wasserunlösliches Substrat in 0,5 ml Heptamethylnonan als inerte Trägerphase gelöst zugegeben, so wurden die Röhrchen auf einem Schüttler bei 60 upm inkubiert. Ansätze mit wasserlöslichen Substraten wurden aufrecht stehend inkubiert. Die Wachstumsansätze zur physiologischen Charakterisierung wurden mit 2 % (v/v) einer gut gewachsenen Kultur angeimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde als Zunahme der Absorption bei 660 nm (optische Dichte, OD_{660}) bestimmt. Die Messung wurde entweder direkt mit den Schraubdeckelröhrchen (Hungate-Röhrchen) oder in Kunststoffküvetten durchgeführt.

3.3.2.1. Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung der Temperaturoptima wurden die Kulturen unter selektiven Wachstumsbedingungen (4 mM Monoterpen, 10 mM Nitrat, 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel) in einem temperierbaren Wasserbad bei 5, 10, 15, 20, 25, 28, 32, 35, 40 und 50 °C inkubiert, wobei die Inkubation aus Platzgründen ruhend erfolgte. Das Wachstum wurde über die Zunahme der optischen Dichte bei 660 nm (UV-VIS-Spectrophotometer; Shimadzu Europa, Duisburg) bzw. die Abnahme von Nitrat verfolgt.

3.3.2.2. Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung der pH-Optima wurde ein mehrfach gepuffertes Mineralmedium verwendet. Das mit 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, pK_s -Wert 8,1), 10 mM 2-Morpholinoethansulfonat (MES, pK_s -Wert 6,1) und 30 mM Bicarbonat gepufferte Medium konnte durch Zugabe von 2 M HCl oder 2 M NaOH-Lösung auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt werden (pH 5,5 - 10,0). Die Monoterpene wurden als anaerobe Lösung in HMN (2,5 %, v/v) zugegeben. Der pH-Wert wurde in einem Parallelansatz nach dem Animpfen und in den Wachstumsansätzen nach Erreichen einer stationären optischen Dichte (OD_{660}) gemessen. Im Gegensatz zu den carbonatgepufferten Mineralmedium trat in TRIS/MES/ HCO_3^- -gepufferten Medien keine Änderung des pH-Werts während des Wachstums der Stämme auf.

3.3.2.3. Vitaminbedarf

Das Vitaminbedürfnis der Bakterienstämme wurde unter selektiven Wachstumsbedingungen in Gegenwart des jeweiligen Monoterpens (Isolationssubstrat) und Nitrat ermittelt. Die monoterpenverwertenden Stämme wurden in Mineralmedien kultiviert, die keine Vitamine enthielten. Das Wachstum in mehreren Folgepassagen wurde beobachtet, wobei 0,1 % (v/v) gewachsener Kulturen als Inokulum der nächsten Passage dienten. Zur Bestätigung bzw. Identifizierung der Abhängigkeit des denitrifizierenden Wachstums der monoterpenverwertenden Bakterienstämme von einzelnen Vitaminen wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt (10^{-2} - 10^{-8}). Dabei fehlte dem Mineralmedium für nitratreduzierende Bakterien jeweils eine Vitaminkomponente der routinemäßig zugesetzten Vitaminlösungen.

3.3.2.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren

Für die Untersuchung verschiedener Verbindungen als mögliche Kohlenstoffquellen des Wachstums mit Nitrat als Elektronenakzeptor wurden die wasserlöslichen Substrate (Kohlenhydrate, organische Säuren, Aminosäuren) direkt aus konzentrierten sterilen Stammlösungen (0,2 - 1 M) zugegeben. Wasserunlösliche Substrate (z. B. Kohlenwasserstoffe) wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan als inerte Trägerphase zugesetzt. Konzentrationsangaben bezie-

hen sich, wenn nicht anders angegeben, auch in den Ansätzen mit organischer Trägerphase auf die wäßrige Phase.

3.3.2.5. Elektronenakzeptoren

Neben Nitrat, Nitrit und Distickstoffoxid wurden Sulfat, Thiosulfat, Sulfit, Carbonat und Fumarat als alternative terminale Elektronenakzeptoren unter anoxischen Bedingungen für das Wachstum der Bakterienstämme mit 4 mM Monoterpenen als Kohlenstoffquelle getestet.

Aerobe Wachstumsansätze mit 10 ml Mineralmedium wurden in Schraubdeckelflaschen (50 ml), die mit teflonbeschichteten Butylsepten und Schraubdeckel verschlossen waren, durchgeführt. Die Monoterpene wurden wie bei den anaeroben Ansätzen in Anwesenheit von Heptamethylnonan als inerte Trägerphase zugegeben. Der Gasraum (40 ml) enthielt ausreichend Sauerstoff für die vollständige Oxidation der eingesetzten Substratmengen. Das Minimalmedium enthielt kein Ascorbat und wurde mit anaerob gewachsenen Kulturen (3 %, v/v) beimpft. Für ein aerobes Wachstum auf Minimalagar wurde die Bottle Plates-Technik verwendet, wobei der Mineralmedium-Agar aerob hergestellt wurde, und die Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff und Monoterpen über die Gasphase in geschlossenen Gefäßen erfolgte.

Zur Überprüfung der vollständigen Reduktion von Nitrat zu Stickstoff wurden die Stämme in einer He/CO₂-Atmosphäre inkubiert. Hierzu wurde die N₂/CO₂-Gasphase in verschlossenen Kulturröhrchen gegen He/CO₂ ausgetauscht. Um eine mögliche Ammonifikation des Nitrats analytisch erfassen zu können, wurde der Gehalt an Ammonium im Mineralmedium auf 0,1 mM NH₄⁺ reduziert und der Nitratgehalt auf 20 mM erhöht.

3.4. Wachstumsexperimente zur anaeroben Oxidation von Monoterpenen

3.4.1. Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus in denitrifizierenden Reinkulturen

Kulturen für stöchiometrische Ansätze wurden in Serumflaschen (150 ml) mit 120 ml Medium mit 10 mM Nitrat und 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel durchgeführt, welche mit teflonisierten Butylsepten verschlossen waren. Um anoxische Wachstumsbedingungen sicherzustellen, wurden alle Gefäße bereits vor Zugabe des Mediums mit N₂/CO₂ begast. Anaerobes Heptamethylnonan (10 ml) diente als inerte Trägerphase. Die Monoterpene wurden als Reinsubstanzen direkt mittels Mikroliterspritzen oder als konzentrierte, anaerobisierte HMN-Lösungen zugegeben. Die noch nicht beimpften Ansätze wurden ca. 15 h (über Nacht) bei 28 °C inkubiert, damit noch eventuell vorhandener Sauerstoff mit dem Reduktionsmittel reagieren konnte. Als Inokulum wurden 5 % (v/v) einer gut gewachsenen Kultur eingesetzt. Die Wachstumsansätze wurden auf einem Schüttler bei 120 upm inkubiert, wobei die Serumflaschen invertiert wurden. Proben für chemische Analysen (OD₆₆₀, Nitrat, Nitrit) wurden routinemäßig mit sterilen, mit Stickstoff-gespülten Spritzen bzw. mit Ethanol-sterilisierten Mikroliterspritzen (Monoterpene in

organischer Trägerphase) entnommen. Die Proben der organischen Phase wurden für die gaschromatographische Analyse in der Regel 1:10 (v/v) in Hexan verdünnt. Alternativ wurde die organische Phase bei Versuchsende mit dem 10-fachen Volumen Hexan extrahiert.

3.4.2. Transformationsprodukte des Monoterpenmetabolismus

Kulturen der denitrifizierenden Bakterienstämme wurden in 70 ml Serumflaschen, die 50 ml anaerobes Mineralsalzmedium plus 20 mM Nitrat und 4 mM des jeweiligen Monoterpens (Isolationssubstrat) in 2 ml Heptamethylnonan enthielten, unter Rühren auf einem Magnetrührer bei 28 °C inkubiert. Während des Wachstums der Stämme sowie nach längerer Inkubation in Gegenwart von Monoterpenen nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden Proben der organischen Heptamethylnonan-Phase entnommen und direkt gaschromatographisch analysiert.

3.4.3. Anaerobes Wachstum auf ätherischen Ölen

Monoterpene sind neben Sesquiterpenen die Hauptinhaltsstoffe natürlicher ätherischer Öle. Die chemische Zusammensetzung der ätherischen Öle variiert stark in Abhängigkeit von dem zur Gewinnung verwendeten pflanzlichen Material. Zur Bestimmung der Hauptkomponenten der in den Experimenten eingesetzten ätherischen Öle wurde eine 0,1 % (v/v) Lösung in Hexan gaschromatographisch analysiert (Injektor 250 °C, Detektor 350 °C, Temperaturprogramm 60 °C für 2 min, 3 °C/min, 300 °C für 3 min, Split ca. 1:12). Die Zusammensetzung der untersuchten ätherischen Öle und die identifizierten Monoterpenverbindungen sind in Tabelle G6 und G7 im Anhang wiedergegeben. Die Monoterpenkomponenten wurden anhand der Kovats-Indizes und der Retentionszeiten authentischer Reinsubstanzen identifiziert (siehe Tab. G3 im Anhang). Für die Analyse der Wachstumsansätze wurde das Temperaturprogramm wie folgt verändert: 60 °C für 2 min, 3 °C/min, 180 °C für 0,1 min, 10 °C/min, 300 °C für 5 min.

Wachstumsversuche mit ätherischen Ölen (Fichtennadel- und Pfefferminzöl) wurden in 50 ml Serumflaschen durchgeführt, die 30 ml anaerobes Süßwassermedium mit 10 mM Nitrat sowie 2 ml Heptamethylnonan, dem das ätherische Öl in verschiedenen Mengen (0,2 %, v/v; 1,0 %, v/v) zugesetzt war, enthielten und mit teflonisierten Butylsepten verschlossen waren. Als Inokulum dienten 2 % (v/v) gut gewachsener Kulturen. Proben zur Bestimmung der optischen Dichte, von Nitrat und Nitrit und für die gaschromatographische Analyse wurden regelmäßig steril und anaerob entnommen.

3.4.4. Denitrifizierendes Wachstum ausgewählter Isolate auf Monoterpengemischen

Anaerobe Wachstumsversuche mit Monoterpengemischen wurden, wie bereits bei der Bilanzierung der anaeroben Monoterpenoxidation beschrieben, in 150 ml Serumflaschen mit 120 ml Medium, 10 ml Heptamethylnonan als organische Trägerphase und 1200 µmol Nitrat

(10 mM) durchgeführt; die Flaschen wurden mit Teflon-beschichteten Butylsepten verschlossen. Die Bakterienkulturen wurden unter einer N_2/CO_2 -Gasatmosphäre (90/10, v/v) auf einem Rotationsschüttler bei ca. 120 upm und bei 28 °C kultiviert. Monoterpengemische äquimolarer Mengen azyklischer Monoterpene (Mix 1) und mono- und bityklischer Monoterpene (Mix 2) wurden als 10-fach konzentrierte Lösungen in Heptamethylnonan hergestellt bzw. Reinsubstanzen einzelner Monoterpene ((±)-Linalool, Geraniol oder Nerol) direkt zugegeben (ca. 240 μ mol Monoterpen/Versuchsansatz). Mix 1 setzte sich aus 2,6-Dimethyloctan, 3,7-Dimethyloct-1-en, 3,7-Dimethyl-1-octanol, β -Citronellen, β -Citronellol, Geraniol, Nerol und Linalool zusammen. Das Gemisch vorwiegend mono- und bityklische Monoterpenkohlenwasserstoffe (Mix 2) enthielt *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, Limonen, α -Terpinen, γ -Terpinen, *p*-Cymol, Eucalyptol, Terpinen-4-ol, Sabinen, 2-Caren, 3-Caren und α -Pinen. Die Endkonzentrationen dieser Verbindungen betrug jeweils 0,2 mM bezogen auf die wäßrige Phase.

3.4.5. Anaerobe Monoterpenoxidation in Gegenwart von Monoterpenalkoholen

Die anaerobe Oxidation mono- bzw. bityklischer Monoterpene (α -Phellandren, α -Pinen) und der Einfluß von Monoterpenalkoholen auf Kulturen der Stämme 65Phen und 54Pin wurde in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) in Gegenwart von äquimolaren Mengen der Monoterpene bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen der Monoterpenalkohole (0 - 1 mM) untersucht. Während der Inkubation auf einem Schüttler (60 upm) wurde die optische Dichte bei 660 nm bestimmt und die Wachstumsraten ermittelt.

3.5. Massenkulturen zur Gewinnung von Bakterienzellmasse

Die Anzucht größerer Bakterienmengen wurde unter Beibehaltung des Volumenverhältnisses von wäßriger und organischer Phase (ca. 100:4, v/v) in Achteckflaschen (100 ml; 500 ml) durchgeführt. Die Achteckflaschen wurden nach der Hungate-Technik mit N_2/CO_2 (90/10, v/v) begast und mit einem Butylstopfen verschlossen, der mittels eines Schraubdeckels mit Lochöffnung gesichert wurde. Die Inkubation erfolgte liegend auf einem Rotationsschüttler bei 70 upm, wobei die verwendeten Achteckflaschen eine größere Grenzfläche zwischen der organischen Trägerphase und dem Medium aufwiesen als volumengleiche Steilbrustflaschen. Die Kultivierung war alternativ auch in Rundflaschen oder Steilbrustflaschen bis zu einem Kulturvolumen von 1 l unter Rühren (ca. 100 upm) mittels eines Magnetstäbchens auf einem Magnetrührer möglich. Anstelle von Heptamethylnonan konnte auch dickflüssiges Paraffin (Paraffinum liquidum; DAB10-Qualität) der Firma Lamotte (Bremen) als Trägerphase eingesetzt werden.

Die Anzucht von Stamm 47Lol für die Gewinnung von Bakterienzellmasse wurde in dem pH-regulierten Fermenter Biostat A (Braun Biotech, Melsungen) in einem Kulturvolumen von 10 l

durchgeführt. Das Medium für die Kultivierung entsprach dem in Abschnitt 3.1.2., Material und Methoden, angegebenen Medium für nitratreduzierende Bakterien, jedoch mit der zweifachen Menge an Spurenelementen und ohne den Zusatz von Ascorbat. Die zugesetzte Menge an Nitrat (20 - 70 mM) und Monoterpen (Linalool) wurde im Vergleich zur routinemäßigen Kultivierung erhöht. Die Kohlenstoffquelle Linalool wurde in Abhängigkeit von Bakterienzellwachstum und Nitratreduktion diskontinuierlich in Portionen von ca. 2 mM (Endkonzentration) der Trägerphase zugegeben. Die Ernte der Bakterienzellen aus der wäßrigen Phase erfolgte direkt über ein Rohr am Boden des Fermenters.

3.6. Zellzahlen nitratreduzierender, monoterpenverwertender Mikroorganismen (most probable number)

Die Populationsgrößen monoterpenverwertender, denitrifizierender Bakterien zweier exemplarisch ausgewählter Standorte (Belebtschlamm, Boden unter Fichten) wurden mittels serieller Verdünnungsreihen mit drei Parallelen (Most Probable Number, MPN-Zellzahl; American Public Health Association, 1969) und mit je drei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen in Gegenwart von 10 mM Nitrat miteinander verglichen. Als Kohlenstoffquellen wurden verbreitete Gärungsprodukte (Acetat, Lactat, Butyrat, Succinat und Ethanol, je 1 mM), ein Gemisch aus fünf Monoterpenen (α -Terpinen, Eucalyptol, Sabinen, 2-Caren, α -Pinen, je 0,3 mM) bzw. α -Terpinen (1,5 mM) als einzige Kohlenstoffquelle angeboten.

3.7. Anreicherungen unter methanogenen Bedingungen

Anreicherungen unter methanogenen Bedingungen wurden in anoxischen, mit FeS-reduzierten und mit Bicarbonat gepufferten Mineralmedien begonnen. Die Anreicherungsansätze in den mit teflonisierten Butylsepten verschlossenen Serumflaschen (150 ml) enthielten 50 ml Mineralsalzmedium und wurden mit 50 ml Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage (Linteln) beimpft. Die Monoterpene α -Phellandren, Sabinen, 2-Caren und α -Pinen wurden als Reinsubstanzen (0,2 %, v/v) in Heptamethylnonan (10 ml) als organischer Trägerphase zugesetzt. Anoxische Bedingungen wurden durch die Zugabe von 0,2 mM FeS gewährleistet. Der Kontrollansatz enthielt autoklavierten Belebtschlamm und je ein Viertel der Substanzmenge aller vier eingesetzten Monoterpene. Während der Kultivierung der Anreicherungskulturen bei 28 °C wurden anaerob entnommene Proben der organischen Phase gaschromatographisch vermessen. Folgepassagen mit 150 ml anaerobem Medium für methanogene Kulturen, die in Duranglasflaschen (250 ml) mit 10 % (v/v) Transferinokulum kultiviert wurden, enthielten zusätzlich 2 mM Acetat als Kohlenstoffquelle sowie 20 ml organische Heptamethylnonan-Phase, der ca. 2,4 mmol (bzw. 0,24 mmol) Monoterpen zugesetzt wurden. Um den Stofftransfer der Monoterpene aus der

Heptamethylnonan-Phase in die wäßrige Phase zu erhöhen, erfolgte die Inkubation der Folgepassagen unter Rühren auf einem Magnetrührer bei ca. 50 upm.

4. Analytische Methoden

4.1. Bestimmung von Nitrat und Nitrit

Der qualitative Nachweis und eine semiquantitative Bestimmung von Nitrat wurde mittels Teststäbchen (Nitrat-Test, Merckoquant, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung von Nitrat und Nitrit erfolgte durch Ionenchromatographie mit einer HPLC-Anlage der Firma Sykam (Gilching/München) über eine A09 Mikro-Anionenaustauschersäule (125 mm x 3 mm). Als Laufmittel wurde eine 70 mM NaCl-Lösung verwendet. Die Trennung erfolgte isokratisch und isotherm mit einer Flußrate von 1 ml/min bei 50 °C. Die Anionen Nitrit (Retentionszeit: 1.4 min) und Nitrat (Retentionszeit: 2.0 min) wurden bei 220 nm mit einem Spektralphotometer (Modell S 3200, Sykam, Gilching/München) detektiert. Die Kalibrierung der quantitativen Bestimmung erfolgte mit Lösungen von KNO_3 und KNO_2 in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,0 mM. Proben aus Bakterienkulturen wurden vor der Analyse zentrifugiert (13.000 upm, Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg), filtriert (0,45 μm , Nylon Arcodisc4, GelmanSciences, Michigan, USA) und gegebenenfalls mit bidest. H_2O verdünnt. Die Probenaufgabe erfolgte routinemäßig mit einem Autosampler (Modell 851-AS, Jasco, Tokyo, Japan). Die Datenaufnahme und -auswertung wurde mit der Pyramid[®]-Software (Axxiom Chromatography, Moorpark, California, USA) durchgeführt.

4.2. Bestimmung der Permanentgase N_2O und N_2

Die Bestimmung von Distickstoffoxid und Stickstoff wurde gaschromatographisch mit gepackten Säulen und mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektion durchgeführt (GC-8A-Gaschromatograph, Shimadzu Europa, Duisburg). Methan, Kohlendioxid und Distickstoffoxid wurden über eine Poraplot Q-Säule (3 mm x 2 m) isotherm bei 40 °C mit Stickstoff als Trägergas getrennt; die Injektor- und Detektortemperatur lag bei 110 °C. Bei einer Trägergasflußrate von 16 ml/min eluierten Kohlendioxid und Distickstoffoxid nach 1.6 und 1.8 Minuten. Stickstoff und Sauerstoff wurden auf einer 5Å-Molekularsieb-Säule (3 mm x 2 m) isotherm bei 40 °C mit Helium als Trägergas getrennt. Bei einer Flußrate des Heliums von 32 ml/min eluierten Sauerstoff und Stickstoff nach 0.6 und 1.6 Minuten.

4.3. Photometrische Bestimmung von Ammonium

Ammonium wurde durch die Umsetzung mit Phenol in Gegenwart von Hypochlorit in basischer Lösung zu Indophenol bestimmt (Boltz und Taras, 1978).

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Lösung A:	Phenol	3	g
	Na-Nitroprussid	0,003	g
	bidest. H ₂ O	ad 100	ml
Lösung B:	NaOH	2	g
	in 80 ml bidest. H ₂ O lösen		
	13 % NaClO-Lösung	2	ml
	bidest. H ₂ O	ad 100	ml

Beide Lösungen wurden in dunklen Flaschen aufbewahrt und vor jeder Bestimmung frisch angesetzt.

Für die Durchführung des Nachweises wurden die Lösungen in einem Reagenzglas wie folgt zusammengegeben:

Probe oder dest. H ₂ O	10,0 ml
Lösung A	1,0 ml
Lösung B	1,0 ml

Die Proben wurden gegebenenfalls so verdünnt, daß die erwartete Ammonium-Konzentration unterhalb von 0,1 mM lag. Die Probelösung wurde im Reagenzglas mit Lösung A vermischt. Anschließend wurde Lösung B zugesetzt, erneut gemischt und der Reaktionsansatz verschlossen für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei 635 nm gegen einen ammoniumfreien Leerwert gemessen. Die Kalibrierung wurde im Bereich von 0,001 - 0,1 mM mit (NH₄)₂SO₄ vorgenommen.

4.4. Gaschromatographische Analyse der Monoterpene

4.4.1. Dual-Kapillarsäulen-Analyse

Obwohl Kapillarsäulen eine hohe Trennleistung bieten, trennen sie unter Umständen nicht alle Komponenten in komplexen Gemischen oder Strukturisomere mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Dieses gilt insbesondere für die untersuchte Substanzklasse der Monoterpene bzw. für ätherische Öle, so daß Koelutionen von Komponenten auftreten können. Problematisch dabei ist, daß Flammenionisationsdetektoren keine individuelle Identifikation der Peaks leisten können.

Die Analyse einer Probe auf zwei Säulen mit verschiedenen Polaritäten kann simultan durch die Dual-Säulen-Technik erreicht werden. Hierbei werden zwei Kapillarsäulen mit einem GC-Inlet und jede Säule mit einem eigenen Detektor verbunden. Die Bestätigungssäule sollte eine signifikant unterschiedliche Polarität im Vergleich zur primären Säule aufweisen, da sich aufgrund der unterschiedlichen Polarität die Elutionsreihenfolge und die Retentionszeiten relativ zur pri-

mären Säule ändern. Möglicherweise können so koeluiierende Verbindungen auf der einen oder anderen Säule getrennt werden.

Die Monoterpene wurden mittels Dual-Kapillarsäulen-Gaschromatographie (GC-14A Gaschromatograph, Shimadzu Europa, Duisburg) mit einer unpolaren SE54-Säule (50 m x 0,32 mm, 0,5 µm Filmdicke; Macherey & Nagel, Düren) und einer polaren CW20M-Säule (50 m x 0,32 mm, 0,5 µm Filmdicke; Macherey & Nagel, Düren) bestimmt. Die Detektion erfolgte durch zwei Flammenionisationsdetektoren (FID); Trägergas war Wasserstoff mit einer Flußrate von 2 ml/min. Das Temperaturprogramm wurde für die einzelnen Experimente jeweils entsprechend den Anforderungen verändert; für die Analyse von Monoterpengemischen wurden z. B. folgende Trennbedingungen gewählt: Injektortemperatur 250 °C, Detektortemperatur 280 °C, Temperaturprogramm 60 °C für 2 min, 5 °C/min, 120 °C, 20 °C/min, 220 °C für 5 min.

Eine ausreichende Trennung der Komponenten von Monoterpengemischen konnte mit einer PVMS 54-Säule (50 m x 0,32 mm, 0,3 µm Filmdicke) (J&W, Mainz-Kastel) mit Wasserstoff als Trägergas (Flußrate 2,4 ml/min) erzielt werden (Gaschromatograph; Perkin-Elmer, Überlingen). Die Peakidentifikation erfolgte ebenfalls durch Flammenionisationsdetektion. Die Datenaufnahme und -bearbeitung erfolgte mit der Turbochrom® 4.2-Software der Firma Perkin-Elmer (Überlingen). Die Identifizierung der Monoterpene erfolgte durch Vergleichsanalysen mit im Handel erhältlichen authentischen Referenzsubstanzen (Retentionszeiten, Additionsanalysen). Falls keine Reinsubstanzen zur Verfügung standen, erfolgte die vorläufige Identifizierung aufgrund der Retentionsindizes nach Literaturangaben (Kovats-Indizes von Monoterpenen).

4.4.2. Retentionsindex-System

Der Retentionsindex nach Kovats (KI_a) mißt die relative Retention einer Komponente a, wobei *n*-Alkane als Standardreferenz verwendet werden. Der Retentionsindex einer Komponente wird anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$KI_a = 100 N + 100 n \cdot (\log t'_{Ra} - \log t'_{RCN}) / (\log t'_{RC(N+n)} - \log t'_{RCN})$$

- mit t'_R = Netto-Retentionszeiten (nach Abzug der Totzeit) der Komponente a bzw. der *n*-Alkane C_N und $C_{(N+n)}$
 N = Kohlenstoffzahl des kürzeren *n*-Alkans
 n = Differenz zwischen den Kohlenstoffzahlen der beiden *n*-Alkane N und $N+n$, die die Komponente a umgeben.

Der ursprüngliche Kovats-Index wurde für isotherme Trennungen definiert (Kovats et al., 1965). Der Retentionsindex wurde von Van den Dool und Kratz (1963) auf die temperaturprogrammierte Gaschromatographie erweitert. Wenn ein lineares Temperaturprogramm verwendet wird, nehmen die Retentionszeiten einer homologen *n*-Alkanreihe linear mit der Kohlenstoffzahl zu. In diesem Fall gilt folgende Gleichung:

$$KI_a = 100 N + 100 n \cdot (t_{Ra} - t_{RCN}) / (t_{RC(N+n)} - t_{RCN})$$

wobei t_{Ra} , t_{RCN} und $t_{RC(N+n)}$ die Retentionszeiten der Komponente a bzw. der n -Alkane C_N und $C_{(N+n)}$ sind, die die Komponente a einschließen.

Die hohe Trennleistung von Kapillarsäulen und die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten erlauben eine Peakidentifikation anhand der berechneten Retentionsindizes. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß der Kovats-Index unter isothermen Trennbedingungen nur von der stationären Phase und der Temperatur abhängt, temperaturprogrammierte Indizes jedoch die Angabe der Dimension der Kapillarsäule, der Schichtdicke der Trennphase, des Temperaturprofils, der Trägergasart und -geschwindigkeit erfordern.

4.4.3. Bestimmung von Monoterpenen mit Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Die Identifizierung einzelner Monoterpene wurde gegebenenfalls mittels Massen-selektiver Detektion (GC/MS) abgesichert. Die GC/MS-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Schulze, Fachbereich 2, Universität Bremen, durchgeführt. Für die gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse wurden die Proben in organischen Lösemitteln (z.B. Heptamethylnonan) auf einer NB-54-Säule (30 m x 0,32 mm, 0,25 μ m Filmdicke; Nordion, Fa. Seerkamp, Achim) mit Helium als Trägergas und folgendem Temperaturprogramm aufgetrennt: Injektortemperatur 250 °C, Temperaturprogramm 60 °C für 2 min, 10 °C/min, 240 °C. Massenspektren der Komponenten wurden mit einem MAT 8200-Massenspektroskop (Finnigan MAT, Bremen) im EI Modus mit 70 eV, einer Scan-Geschwindigkeit von 1 Sekunde pro Decade und einer Ionenquellentemperatur von 200 °C erhalten.

4.4.4. Analyse von Monoterpenen aus der organischen Trägerphase

Die Monoterpene konnten direkt aus der Heptamethylnonan-Phase bestimmt werden, hierzu wurden üblicherweise 1 μ l einer Probe der HMN-Phase direkt gaschromatographisch analysiert. Proben der organischen HMN-Phase wurden bei -18 °C in mit PTFE-Septen verschlossenen Probengefäßen gelagert (Zinsser-Analytik, Frankfurt). Teilweise wurden die Proben vor der Analyse mit Hexan verdünnt. Eine externe Kalibrierung erfolgte über Konzentrationsreihen der Reinsubstanzen in Heptamethylnonan oder Hexan in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 50 mM.

4.4.5. Analyse von Monoterpenen aus der wäßrigen Phase

Die Monoterpenalkohole Linalool, Nerol und Geraniol sowie die Monoterpenaldehyde Neral und Geranial konnten auch in wäßrigen Proben bzw. zellfreien Extrakten nachgewiesen werden. Hierfür wurde das Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analysen wie folgt

verändert: Injektortemperatur 250 °C; Detektortemperatur 280 °C; Temperaturprogramm 110 °C für 2 min, 10 °C/min, 220 °C für 1 min.

4.5. Bestimmung des Proteingehalts ganzer Zellen

Die Proben aus Kulturmedien wurden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 13 000 upm, 5 min). Pellet und Überstand wurden getrennt mit 0,5 N NaOH bei 100 °C für 10 min aufgeschlossen. Die Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (1976) erfolgte entsprechend der Microassay-Vorschrift von BioRad (1994). Nitrit, das in einigen Kulturen während des Wachstums der Bakterienstämme gebildet wurde, störte dabei die Nachweisreaktion. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 1,0 µg BSA/ml bestimmt, wobei die Coomassie-Färbung des Albumins wie folgt korrigiert wurde: 1 mg Serumalbumin entspricht 2 mg bakteriellen Proteins (BioRad, 1994).

4.6. Bestimmung der 16S rRNS-Gensequenzen

Für die phylogenetische Einordnung der monoterpenverwertenden Isolate wurden die 16S rRNS-Gensequenzen ermittelt. Die Extraktion genomischer DNS und die Amplifikation der 16S rDNS mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden von Dr. F. Rainey (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt (Rainey et al., 1992; 1993). Nach der Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die 16S rDNS-Sequenzen mit publizierten Sequenzdaten verglichen, wobei das Alignment manuell vorgenommen wurde. Die Berechnung der phylogenetischen Distanzen und die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte nach der Methode von Jukes und Cantor (1969) und unter Verwendung des Algorithmuses von DeSoete (1983) durch Dr. F. Rainey und Prof. Dr. E. Stackebrandt (DSMZ, Braunschweig).

4.7. Bestimmung des G+C-Gehalts der DNS

Für die Bestimmung des G+C-Gehalts wurde DNS nach der von Cashion et al. (1977) beschriebenen Methode chromatographisch über Hydroxylapatit isoliert. Der G+C-Gehalt der DNS wurde entsprechend der Methode von Mesbah et al. (1989) mittels HPLC bestimmt. Die Bestimmung des G+C-Gehalts der DNS wurde an der DSMZ, Braunschweig durchgeführt.

4.8. DNS-DNS-Hybridisierung

Die DNS-DNS-Hybridisierungen wurden nach der Methode von DeLey et al. (1970) mit einem Gilford System 2600 Spektrophotometer mit Gilford 2527-R Thermoprogrammgeber und Plotter an der DSMZ, Braunschweig durchgeführt.

4.9. Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren

Die Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren der *Thauera* spp. und *Alcaligenes* sp. Stämme wurde von U. Heyen bestimmt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aus Kulturen der Stämme, die mit dem jeweiligen Monoterpensubstrat und Nitrat gewachsen waren, wurden die Bakterienzellfettsäuren verestert und extrahiert. Die Methylierung der Fettsäuren aus gefriergetrocknetem Zellmaterial erfolgte nach der Methode von Sasser (1997) und die Fettsäuremethylester (FAME) wurden gaschromatographisch analysiert (Perkin-Elmer, Überlingen). Die Methylester der bakteriellen Fettsäuren wurden auf einer PVMS 54-Säule (5 % Phenylsiloxan; 50 m x 0,32 mm, 0,32 µm Filmdicke) mit H₂ als Trägergas bei einer Flußrate von 2,0 ml/min getrennt (Injektortemperatur 300 °C, Detektortemperatur 350 °C, Temperaturprogramm 140 °C für 2 min, 4 °C/min, 270 °C für 0.1 min, 10 °C/min, 300 °C für 5 min) und mittels Flammenionisationsdetektion bestimmt. Die Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte mit Standards bekannter FAME und eines Referenzgemisches bakterieller FAME (Supelco, Deisenhofen).

5. Biochemische Methoden

5.1. Herstellung von Rohextrakten

Bakterienkulturen von *Thauera* sp. Stamm 47Lol wurden in der spät-exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 12 000 g (JA10-Rotor, 8000 upm) für 25 min in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckman, Palo Alto, CA, USA) bei 4 °C aerob geerntet. Die Zellpellets wurde in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 resuspendiert.

Der Aufschluß der Bakterienzellsuspensionen in Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 erfolgte mittels Hochdruck (French Press, American Instruments Co. Inc., Silver Spring, USA) durch dreimalige Passage bei 70 MPa (900 psi) unter aeroben Bedingungen.

Durch Zentrifugation bei 40 000 g (JA20-Rotor, 18 000 upm) für 20 min bei 4 °C wurde ein zellfreier Rohextrakt gewonnen. Ein zytosolischer Zellextrakt wurde nach Ultrazentrifugation (L-70 Ultrazentrifuge, Beckman) bei 240 000 g (70.1 Ti-Rotor, 50 000 upm) für 45 min bei 4 °C erhalten. Der zytosolische Zellextrakt wurde gegen 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert

(Visking-Dialysierschlauch, Ø 6 mm; Ausschlußgröße: 10 000 Dalton; Boehringer Ingelheim, Heidelberg). Teilmengen der Bakteriensuspensionen sowie der Bakterienzellextrakte wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bzw. -70 °C gelagert.

5.2. Nachweis von enzymatischen Aktivitäten

Experimente zur enzymkatalysierten Isomerisierung von Linalool und Geraniol in Zellextrakten von *Thauera* sp. Stamm 47Lol wurden aerob in 100 mM HEPES-Puffer, pH 7,0 durchgeführt. Experimentell wurde die Reaktion mit Geraniol als Substrat gestartet. Hierzu wurde die Abnahme von Geraniol und die Zunahme von Linalool in Geraniol-gesättigtem HEPES-Puffer gaschromatographisch verfolgt (Löslichkeit einiger Monoterpene, s. Tab. G5 im Anhang).

C. ERGEBNISSE

Teil I - Phylogenetische Einordnung und physiologische Charakterisierung der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterien

1. Reinheitskontrollen

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden monoterpenverwertenden Isolate aus nitratreduzierenden Anreicherungen (Harder und Probian, 1995) wurden durch Kultivierung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen auf ihre Reinheit überprüft. Die Bakterienkulturen zeigten im mikroskopischen Bild unter nitratreduzierenden Wachstumsbedingungen ein einheitliches, morphologisches Bild. Aerobes Wachstum der Bakterienzellen auf Vollmediumagarplatten ergab die Bildung morphologisch einheitlichen Kolonieformen. Diese Reinheitskontrollen bestätigten, daß sieben nitratreduzierende Bakterienstämme auf den Monoterpensubstraten Linalool (Stamm 47Lol), Menthol (Stamm 21Mol), Eucalyptol (Stamm 58Eu), *p*-Menth-1-en (Stamm 51Men), α -Phellandren (65Phen), 2-Caren (62Car) und α -Pinen (54Pin) erhalten worden waren.

2. Taxonomische Einordnung der monoterpenverwertenden Isolate

2.1. Phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit *Thauera* spp. innerhalb der β -*Proteobacteria*

2.1.1. 16S rRNS-Gensequenzen der *Thauera* spp.

Die Bestimmung der 16S rRNS-Gensequenzdaten und die phylogenetische Einordnung der monoterpenverwertenden Isolate durch Dr. F. Rainey, DSMZ, Braunschweig, ergab die Zugehörigkeit der Bakterienstämme 47Lol, 21Mol und 58Eu zur β -Gruppe der *Proteobacteria*. Die Bakterienstämme sind innerhalb der β -*Proteobacteria* mit Spezies der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* näher verwandt.

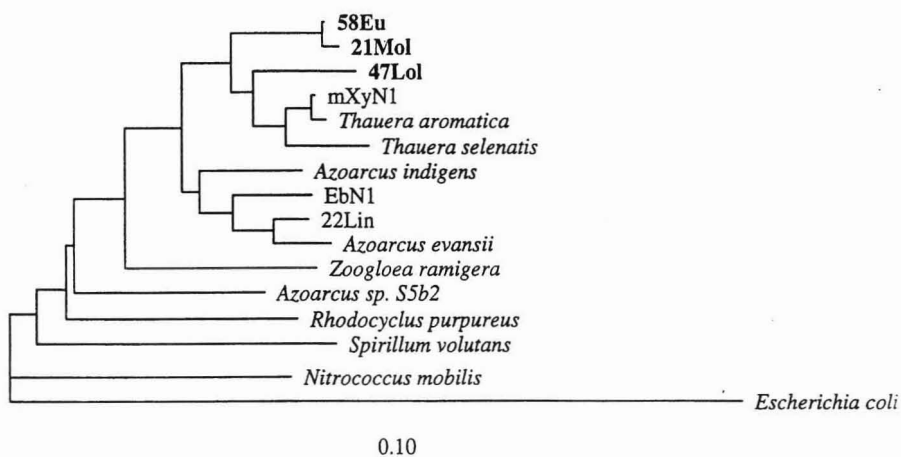


Abb. 13. Phylogenetische Position der mit sauerstoffhaltigen Monoterpenen isolierten, nitrat-reduzierenden Stämme 21Mol, 47Lol und 58Eu innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria*. Der eingezeichnete Balken entspricht einem Austausch von 10 von 100 Nukleotiden.

2.1.2. G+C-Gehalt der DNS der *Thauera* spp.

Der G+C-Gehalt der DNS der monoterpenverwertenden Bakterienstämme war mit 65,6 mol% (Stamm 47Lol), 63,9 mol% (Stamm 21Mol) und 64,2 mol% (Stamm 58Eu) ähnlich zu den G+C-Gehalten von *Thauera selenatis* (66,0 mol%; Macy et al., 1993), *Thauera aromatica* (67,0 mol%; Anders et al., 1995), *Azoarcus evansii* (67,5 mol%; Anders et al., 1995) und *Azoarcus indigens* (66,6 mol%; Reinhold-Hurek et al., 1993) und bestätigten das aus den 16S rDNS-Sequenzen abgeleitete Verwandtschaftsverhältnis mit Spezies der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus*.

2.1.3. DNS-DNS-Hybridisierung der *Thauera* spp.

Die Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung ergaben Werte für die DNS-DNS-Ähnlichkeit von 36,0 % für die Stämme 47Lol und 21Mol bzw. von 40,6 % für die Stämme 47Lol und 58Eu. Die Homologie der DNS der Stämme 21Mol und 58Eu betrug 68,5 %. Die Einordnung der Stämme 21Mol und 58Eu als zwei verschiedene Spezies innerhalb der Gattung *Thauera* allein aufgrund der genotypischen Daten war nicht eindeutig möglich, da die DNS-DNS-Homologie im Grenzbereich der taxonomischen Speziesdefinition liegt (Stackebrandt und Goebel, 1994).

2.1.4. Bakterienzellfettsäuren der *Thauera* spp.

Für die Analyse der bakteriellen Zellfettsäuren wurden die monoterpenverwertenden Stämme unter nitratreduzierenden Bedingungen auf den jeweiligen Monoterpensubstraten angezogen. Die Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren der monoterpenverwertenden Bakterienstämme 47Lol, 21Mol und 58Eu waren nahezu identisch und recht ähnlich den Fettsäureprofilen von *Thauera aromatica* und *Azoarcus evansii*. Hexadecanoat (29 - 31 %) und *cis*-9-Hexadecenoat (47 - 58 %) bildeten den Hauptanteil der bakteriellen Fettsäuren der monoterpenverwertenden Stämme.

Tab. 1. Prozentuale Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren der neu isolierten, monoterpenverwertenden Stämme 21Mol, 47Lol und 58Eu und einiger *Thauera* und *Azoarcus* spp.

Fettsäure ¹	Stamm 47Lol	Stamm 21Mol	Stamm 58Eu	<i>Thauera</i> <i>aromatica</i>	<i>Azoarcus</i> <i>evansii</i>	<i>Azoarcus</i> <i>indigenus</i>
3-OH-10:0	2,9	1,4	2,3	4,9	5,2	5,0
12:0	5,7	4,9	5,5	8,5	8,6	6,5
16:1, <i>cis</i> -9	47,1	58,2	49,4	53,4	54,9	33,5
16:0	28,5	28,6	30,6	25,9	24,9	34,6
18:1 ²	12,9	4,8	9,0	3,7	4,5	8,3

¹ Die Fettsäuren sind mit der Anzahl der C-Atome, der Doppelbindungen und der Position der Hydroxylgruppe bezeichnet.

² 18:1 entspricht $\Sigma(18:1, cis-9; 18:1, cis-11)$

Die Angaben zu den Stämmen 47Lol, 21Mol und 58Eu stammen von U. Heyen (pers. Mitteilung), die Daten für *A. indigenus*, *A. evansii* und *T. aromatica* sind Anders et al. (1995) entnommen.

2.2. Phylogenetische Verwandtschaft der Isolate mit *Alcaligenes* spp. innerhalb der β -Proteobacteria

2.2.1. 16S rRNS-Gensequenzen der *Alcaligenes* sp. Stämme

Die phylogenetische Einordnung der Bakterienstämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen auf der Basis der Sequenzdaten der 16S rDNS zeigt Abb. 14. Diese monoterpenverwertenden Isolate bilden eine Gruppe innerhalb der Alcaligenaceae, die *Alcaligenes* und *Bordetella* Spezies innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria* umfaßt.

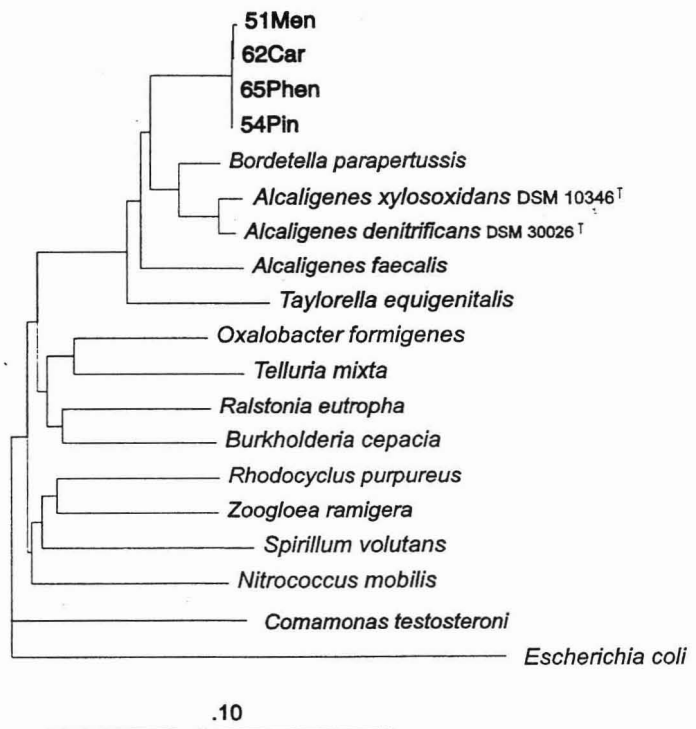


Abb. 14. Phylogenetische Position der mit Monoterpenkohlenwasserstoffen isolierten, denitrifizierenden Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria*. Der eingezeichnete Balken entspricht einem Austausch von 10 von 100 Nukleotiden.

Eine Differenzmatrix wurde basierend auf den 16S rDNS-Sequenzdaten der monoterpenverwertenden Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen und verwandter Organismen der β -Gruppe der *Proteobacteria* erstellt. Die 16S rDNS-Sequenzen der Stämme 54Pin und 65Phen sind identisch und unterschieden sich von 51Men und 62Car um 0,2 %. Die Sequenzen waren zu 96,7 % ähnlich zu der Sequenz von *Bordetella paratussis* und zu 95,8 - 96,0 % zu den 16S rDNS-Sequenzen von *Alcaligenes xylosoxidans* und *Alcaligenes denitrificans*. Andere 16S rDNS-Sequenzen, die mehr als 90 % Ähnlichkeit zu den 16S rDNS-Sequenzen der monoterpenverwertenden Bakterienstämme hatten, waren die Sequenzen von *Alcaligenes faecalis*, *Taylorella equigenitalis* und *Oxalobacter formigenes*.

Tab. 2. 16S rDNS-Sequenz-Ähnlichkeitsdifferenzmatrix nach Jukes und Cantor (1969) der monoterpenverwertenden Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen und verwandter Organismen der β -Untergruppe der *Proteobacteria*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 62Car									
2 54Pin	0,2								
3 65Phen	0,2	0,0							
4 51Men	0,2	0,2	0,2						
5 B.par.	3,3	3,3	3,3	3,4					
6 Alc.x.	4,1	4,0	4,0	4,2	1,8				
7 Alc.d.	4,0	4,0	4,0	4,1	1,4	0,3			
8 Alc.f.	4,8	4,8	4,8	4,9	4,8	4,8	4,8		
9 Tay.e.	5,6	5,6	5,6	5,7	5,3	6,5	6,3	6,6	
10 O.for.	9,1	9,0	9,0	9,2	8,2	9,2	9,1	9,7	10,0

B.par., *Bordetella paratussis*; Alc.x., *Alcaligenes xylosoxidans*; Alc. d., *Alcaligenes denitrificans*; Alc.f., *Alcaligenes faecalis*; Tay.e., *Taylorella equigenitalis*; O.for., *Oxalobacter formigenes*

2.2.2. Bakterienzellfettsäuren der *Alcaligenes* sp. Stämme

Die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren der Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen war untereinander weitgehend identisch. Die Fettsäureprofile der vier Stämme zeichneten sich durch einen hohen Anteil an Hexadecanoat (22 - 35 %) und Cycloheptadecanoat (30 - 33 %) aus. Das Gesamtprofil der vier monoterpenverwertenden Stämme war relativ ähnlich zu der Zusammensetzung der Zellfettsäuren von *Alcaligenes xylosoxidans* und *Alcaligenes faecalis*. Die Fettsäureprofile der neu isolierten Stämme unterschieden sich von *Alcaligenes denitrificans* und *Alcaligenes piechaudii* in dem geringeren Gehalt an Tetradecanoat (1 - 3 % gegenüber 6 %). Im Vergleich mit den genannten *Alcaligenes* Spezies war der Gehalt an Cyclonadecanoat der monoterpenverwertenden Bakterienstämme höher (6 - 8 % gegenüber 1 - 2 %). Das Profil der

Tab. 3. Prozentuale Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren der monotерpenverwertenden Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen und verwandter Organismen der Gattungen *Alcaligenes* und *Bordetella*.

Fettsäure	Stamm 51Men	Stamm 54Pin	Stamm 62Car	Stamm 65Phen	<i>A. xylos- oxidans</i>	<i>A. deni- trificans</i>	<i>A. fae- calis</i>	<i>A. pie- chaudii</i>	<i>B. para- pertussis</i>	<i>B. per- tussis</i>	<i>B. bron- chisepta</i>
ECL 10.96	4,0	3,6	3,7	6,5	—	—	—	—	—	—	—
12:0	5,5	5,9	6,2	8,1	< 1	1,6	2,1	< 1	NN	NN	2
2-OH-12:0	NN	NN	NN	NN	3,9	2,9	3,4	3,2	NN	NN	4
14:0	1,0	2,6	1,3	0,7	1,1	6,4	1,7	6,1	5	6	6
15:0	0,5	2,2	1,6	1,6	—	—	—	—	NN	1	NN
2-OH-14:0	NN	NN	NN	NN	4,8	NN	NN	NN	NN	NN	NN
3-OH-14:0	1,7	2,1	2,2	1,3	11,2 ²	10,2 ²	13,6 ²	9,1 ²	9	1	5
16:1, <i>cis</i> -9	5,1	1,7	3,1	9,4	5,8	4,3	2,9	3,1	40	6	27
16:0	34,1	35,1	33,9	21,5	35,2	35,2	30,0	31,7	32	40	35
17:0, <i>cyclo</i>	32,6	32,7	32,9	30,4	28,4	29,4	33,8	35,0	NN	35	14
2-OH-16:0	NN	NN	NN	NN	1,5	1,0	NN	1,0	—	—	—
18:1 ¹	3,6	1,7	3,1	8,6	< 1	2,4	3,9	3,7	1	NN	2
19:0, <i>cyclo</i>	8,4	7,8	7,9	6,2	1,1	1,0	2,1	1,0	NN	NN	NN

ECL, Identität der Verbindung nicht geklärt; NN, nicht analytisch nachgewiesen; — keine Angaben

¹ 18:1 entspricht Σ (18:1, *cis*-11; 18:1, *trans*-9; 18:1, *trans*-6)

² Angabe entspricht Σ (16:1, *iso*; 3-OH-14:0)

Alle Angaben zu den Stämmen 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen stammen von U. Heyen (pers. Mitteilung), die Daten für *A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. faecalis* und *A. piechaudii* sind Vandamme et al. (1996) und für *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchisepta* sind Weyant et al. (1995) entnommen.

Bakterienzellfettsäuren der vier Bakterienstämme unterschied sich von *Bordetella parapertussis* und *Bordetella bronchisepta* im deutlich geringeren Gehalt an *cis*-9-Hexadecenoat (2 - 9 % gegenüber 27 - 40 %). Auf der Basis der Zellfettsäuren lassen sich die neu isolierten Stämme nicht voneinander bzw. von den *Alcaligenes* Spezies, aber deutlich von den *Bordetella* Spezies unterscheiden.

3. Physiologische Charakterisierung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme

3.1. *Thauera* spp. 47Lol, 21 Mol und 58Eu

3.1.1. Morphologie und Gram-Färbung

Zellen der Bakterienstämme 21Mol, 47Lol und 58Eu waren kleine, leicht ovale Stäbchen, mit einer Größe von 1,3-1,8 μm x 0,8-1,0 μm ; 1,4-2,7 μm x 0,5-0,8 μm bzw. 1,6-2,2 μm x 0,8-1,0 μm . Alle Zellen waren beweglich und in der Gram-Färbung Gram-negativ. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Isolate sind in Abb. 15 wiedergegeben.

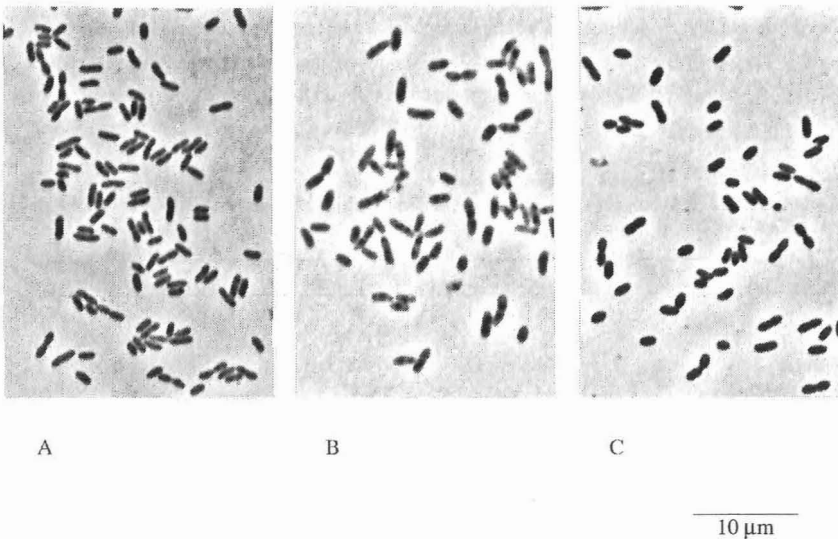


Abb. 15. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Reinkulturen der *Thauera* spp. Stämme 47Lol (A), 58Eu (B) und 21Mol (C) anaerob gewachsen mit Linalool, Eucalyptol bzw. Menthol plus Nitrat. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 10 μm .

3.1.2. Temperatur- und pH-Optima

Das Optimum des Wachstums aller *Thauera* spp. Stämme in Selektivmedien mit Monoterpenen und Nitrat lag im mesophilen Temperaturbereich und bei neutralen pH-Werten. Die *Thauera* spp. 47Lol und 58Eu wuchsen in einem Temperaturbereich von 15 - 35 °C (47Lol) bzw. von 10 - 35 °C (58Eu). Unterhalb von 10 °C und oberhalb von 40 °C wurde kein Wachstum beobachtet. Das pH-Optimum der *Thauera* spp. Stämme lag zwischen pH 7,2 - 7,4 (21Mol), pH 7,0 - 7,3 (47Lol) und pH 7,9 - 8,8 (58Eu). Ein Wachstum, wenn auch mit z.T. deutlich geringeren Wachstumsraten war im Bereich von pH 6,4 - 9,3 (21Mol), pH 6,8 - 8,4 (47Lol) und pH 6,4 - 9,7 (58Eu) zu beobachten.

3.1.3. Vitaminabhängigkeit

Das Vitaminbedürfnis der isolierten Stämme wurde unter selektiven Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Monoterpenen und Nitrat geprüft. Es zeigte sich, daß die Stämme 21Mol und 47Lol in vitaminfreiem Medium über sieben Folgepassagen (0,1 % (v/v), Transferinokulum) wuchsen, ohne daß eine Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber Kontrollansätzen auf vitaminhaltigem Medium erkennbar war. Stamm 58Eu wuchs bereits in der zweiten Folgepassage in vitaminfreiem Medium nicht mehr. In seriellen Verdünnungsreihen (10^{-2} - 10^{-8}) mit Mineralmedien, denen jeweils eine Vitaminkomponente fehlte, konnte Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) als das für das Wachstum dieses Stamms notwendige Vitamin bestimmt werden. Die Vitamin B₁₂-Abhängigkeit wurde in Folgepassagen, die Vitamin B₁₂ als einzige Vitaminkomponente enthielten, bestätigt.

Tab. 4. Charakteristika der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden *Thauera* spp. Stämme unter selektiven Wachstumsbedingungen mit den jeweiligen Monoterpensubstraten als Kohlenstoffquelle.

<i>Thauera</i> sp.	Stamm 21 Mol	Stamm 47Lol	Stamm 58Eu
Isolationssubstrat	Menthol	Linalool	Eucalyptol
Zellform	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Zellgröße (µm x µm)	1,3-1,8 x 0,8-1,0	1,4-2,7 x 0,5-0,8	1,6-2,2 x 0,8-1,0
Beweglichkeit	beweglich	beweglich	beweglich
Temperaturbereich (°C)	nicht bestimmt	15 - 35	10 - 35
Temperaturoptimum (°C)	nicht bestimmt	32	32
pH - Bereich	6,4 - 9,3	6,8 - 8,4	6,4 - 9,7
pH - Optimum	7,2 - 7,4	7,0 - 7,3	7,9 - 8,8
Verdopplungszeit (h)	23,3	22,3	15,0
Vitaminbedarf	-	-	Cyanocobalamin

3.1.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren

Unter nitratreduzierenden Wachstumsbedingungen wurden von den *Thauera* spp. Stämme 47Lol, 21Mol und 58Eu einige organische Säuren wie Acetat, Butyrat, 3-Methylbutyrat, Pyruvat, Fumarat und Succinat als Kohlenstoffquellen verwertet. Die zweiwertige Carbonsäure Glutarat wurde nur von den Stämmen 21Mol und 58Eu metabolisiert. Ein Wachstum auf Kohlenhydraten, zyklischen Alkoholen oder Kohlenwasserstoffen wurde nicht beobachtet.

Tab. 5. Anaerobes Wachstum der denitrifizierenden Stämme auf den getesteten Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die wäßrige Phase. (*Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan zugegeben; + gutes Wachstum $\Delta OD_{660} > 0,2$; o Wachstum $\Delta OD_{660} 0,1 - 0,2$; - kein Wachstum $\Delta OD_{660} < 0,1$)

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 47Lol	Stamm 21Mol	Stamm 58Eu
<i>Kohlenhydrate</i>				
D-Glucose	5	-	-	-
D-Fructose	5	-	-	-
D-Sorbitol	5	-	-	-
myo-Inositol	5	-	-	-
D-Ribose	5	-	-	-
D-Arabinose	5	-	-	-
D-Xylose	5	-	-	-
D-Saccharose	5	-	-	-
D-Trehalose	5	-	-	-
D-Cellobiose	5	-	-	-
<i>organische Säuren</i>				
Formiat	40	-	-	-
Acetat	10	+	+	+
Pyruvat	5	+	+	+
Propionat	5	+	+	+
Succinat	5	+	+	+
Fumarat	5	+	+	+
Butyrat	5	+	+	+
3-Methylbutyrat	5	+	+	+
Hexanoat	5	+	+	+
Heptanoat	5	o	+	+
Octanoat	5	-	+	o
Glutarat	5	-	+	+
Adipat	5	-	-	-
Pimelat	5	-	-	-
DL-Malat	5	+	+	+
D-Gluconat	5	-	-	-
...				

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 47Lol	Stamm 21Mol	Stamm 58Eu
<i>organische Säuren (Fortsetz.)</i>				
Benzoat	2	-	-	-
Ascorbat	5	-	-	-
<i>Aminosäuren</i>				
L-Alanin	5	+	-	-
L-Valin	5	-	+	+
L-Arginin	5	-	-	-
L-Glutamat	5	+	+	+
L-Phenylalanin	5	-	-	-
<i>Alkohole</i>				
Methanol	40	-	-	-
Ethanol	10	+	-	-
Cyclohexanol *	2	-	-	-
1,2-Cyclohexandiol *	2	-	-	-
1,4-Cyclohexandiol *	2	-	-	-
<i>Kohlenwasserstoffe</i>				
Heptamethylnonan *		-	-	-
<i>n</i> -Decan *	2	-	-	-
<i>n</i> -Hexadecan *	2	-	-	-
Cyclohexan *	2	-	-	-
Toluol *	2	-	-	-

3.1.5. Elektronenakzeptoren

Die monoterpenverwertenden Stämme 47Lol, 21Mol und 58Eu wurden mit den jeweiligen Monoterpensubstraten als einziger Kohlenstoffquelle in Gegenwart alternativer Elektronenakzeptoren kultiviert. Nitrat wurde routinemäßig als Elektronenakzeptor eingesetzt. Mit Nitrat, Nitrit oder Distickstoffoxid als Elektronenakzeptoren konnte ein vergleichbares Wachstum erzielt werden. In Kulturen, die mit einer He/CO₂-Gasatmosphäre (90/10, v/v) anstelle von N₂/CO₂ (90/10, v/v) inkubiert wurden, wurde gaschromatographisch elementarer Stickstoff als Produkt der Nitratreduktion nachgewiesen. Während des Wachstums bildeten die Stämme 21Mol und 58Eu nahezu stöchiometrische Mengen an Nitrit, das in Gegenwart einer Kohlenstoffquelle nach dem Verbrauch des zugesetzten Nitrats vollständig reduziert wurde. Stamm 47Lol wuchs hingegen mit Nitrat als Elektronenakzeptor, ohne daß meßbare Mengen an Nitrit gebildet wurden. In Kulturen der *Thauera* spp. Stämme, in denen sowohl Nitrat als auch Nitrit vollständig reduziert worden waren, konnte die Bildung von Distickstoffoxid als Endprodukt

der Denitrifikation nicht nachgewiesen werden, wie das für *Thauera selenatis* und *Thauera aromatica* beschrieben wurde (Anders et al., 1995). Das im Mineralmedium für denitrifizierende Bakterien enthaltene Ammonium wurde teilweise assimiliert, eine Ammonifikation fand nicht statt.

Schwefelverbindungen (Sulfat, Sulfit, Thiosulfat), Carbonat oder Fumarat wurden von keinem Stamm als alternative Elektronenakzeptoren genutzt. Molekularer Sauerstoff wurde als Elektronenakzeptor genutzt. Damit sind alle *Thauera* spp. Stämme fakultativ anaerob und besitzen einen strikt respiratorischen Metabolismus.

Tab. 6. Wachstum der monoterpenverwertenden Stämme mit den jeweiligen Monoterpen-substraten als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren (+ Wachstum; - kein Wachstum).

Elektronenakzeptor	Stamm 21 Mol	Stamm 47Lol	Stamm 58Eu
Sauerstoff	+	+	+
Nitrat (10 mM)	+	+	+
Nitrit (5; 20 mM)	+	+	+
N ₂ O (10 mM)	+	+	+
Sulfat (10 mM)	-	-	-
Thiosulfat (10 mM)	-	-	-
Sulfit (2; 10 mM)	-	-	-
Carbonat (50 mM)	-	-	-
Fumarat (25 mM)	-	-	-

3.2. *Alcaligenes* sp. 51Men, 65Phen, 62Car und 54Pin

3.2.1. Morphologie und Gram-Färbung

Zellen der Isolate 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen waren kleine, bewegliche, Gram-negative Stäbchen mit einer Größe von 1,3 - 1,8 μm x 0,5 - 0,8 μm (Abb. 16).

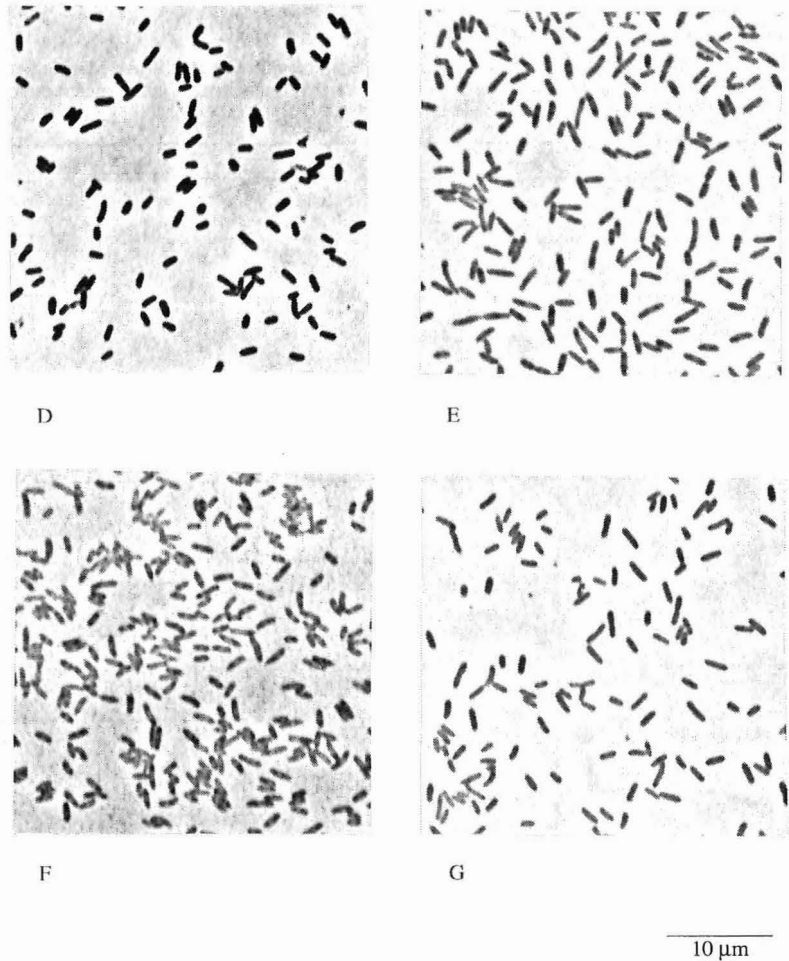


Abb. 16. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Reinkulturen der Stämme 51Men (D), 54Pin (E), 62Car (F) und 65Phen (G) anaerob gewachsen mit *p*-Menth-1-en, α -Pinen, 2-Caren bzw. α -Phellandren plus Nitrat. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 10 μm .

3.2.2. Temperatur- und pH-Optima

Das Optimum des Wachstums aller *Alcaligenes* sp. Stämme in Selektivmedien mit Monoterpenen und Nitrat lag im mesophilen Temperaturbereich und bei neutralen pH-Werten. Das Wachstum der Bakterienkulturen mit den jeweiligen Monoterpenen als einzige Kohlenstoffquelle wurde in einem Temperaturbereich von 15 - 40 °C (Stamm 54Pin) beobachtet, wobei bei Temperaturen oberhalb von 35 °C die beobachteten Wachstumsraten nur wenig geringer als bei 28 °C waren. Die Bakterien wuchsen jedoch nicht bei Temperaturen oberhalb von 42 °C.

Der pH-Bereich des Wachstums der *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen lag bei pH 5,9 - 8,4 mit einem Optimum bei pH 6,7 - 7,5.

3.2.3. Vitaminabhängigkeit

Das Vitaminbedürfnis der isolierten Stämme wurde unter selektiven Wachstumsbedingungen geprüft. Es zeigte sich, daß die Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen in vitaminfreiem Medium über sieben Folgepassagen (0,1 % (v/v), Transferinokulum) wuchsen, ohne daß eine Änderung der Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber Kontrollansätzen auf vitaminhaltigem Medium erkennbar war.

Tab. 7. Charakteristika der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden *Alcaligenes* sp. Stämme unter selektiven Wachstumsbedingungen mit den jeweiligen Monoterpenkohlenwasserstoffen als Kohlenstoffquellen.

<i>Alcaligenes</i> sp.	Stamm 51Men	Stamm 54Pin	Stamm 62 Car	Stamm 65Phen
Isolationssubstrat	<i>p</i> -Menth-1-en	α -Pinen	2-Caren	α -Phellandren
Zellform	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Zellgröße ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	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
Beweglichkeit	beweglich	beweglich	beweglich	beweglich
Temperatur - Bereich (°C)	nicht bestimmt	15 - 40	nicht bestimmt	nicht bestimmt
pH - Bereich	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
Verdopp- lungszeit (h)	62,6	56,1	62,5	54,8
Vitaminbedarf	kein	kein	kein	kein

3.2.4. Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren

Die untersuchten Kohlenhydrate wurden durch die *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen nicht metabolisiert, auch waren aromatischen Verbindungen oder Cycloalkane keine verwertbaren Kohlenstoffquellen. Organische Säuren wie Acetat, Butyrat, 3-Methylbutyrat, Hexanoat, Heptanoat, Octanoat, Pyruvat, Fumarat und Succinat dienen als Kohlenstoffquellen für das anaerobe Wachstum mit Nitrat.

Tab. 8. Anaerobes Wachstum der denitrifizierenden Stämme auf den getesteten Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die wäßrige Phase. (* Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan zugegeben; + gutes Wachstum $\Delta OD_{660} > 0,2$; o Wachstum $\Delta OD_{660} 0,1 - 0,2$; - kein Wachstum $\Delta OD_{660} < 0,1$; n.b.)

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 51Men	Stamm 65Phen	Stamm 54Pin	Stamm 62Car
<i>Kohlenhydrate</i>					
D-Glucose	5	-	-	-	-
D-Fructose	5	-	-	-	-
D-Sorbitol	5	-	-	-	-
myo-Inositol	5	-	-	-	-
D-Ribose	5	-	-	-	-
D-Arabinose	5	-	-	-	-
D-Xylose	5	-	-	-	-
D-Saccharose	5	-	-	-	-
D-Trehalose	5	-	-	-	-
D-Cellobiose	5	-	-	-	-
<i>organische Säuren</i>					
Formiat	40	-	-	-	-
Acetat	10	+	+	+	+
Pyruvat	5	+	+	+	+
Propionat	5	+	+	+	+
Succinat	5	+	+	+	+
Fumarat	5	+	+	+	+
Butyrat	5	+	+	+	+
3-Methylbutyrat	5	+	+	+	+
Hexanoat	5	+	+	+	+
Heptanoat	5	+	+	+	+
Octanoat	5	+	+	+	+
Glutarat	5	-	-	-	-
Adipat	5	-	-	-	-
Pimelat	5	-	-	-	-
...					

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 51Men	Stamm 65Phen	Stamm 54Pin	Stamm 62Car
<i>organische Säuren (Fortsetz.)</i>					
DL-Malat	5	+	+	+	+
D-Gluconat	5	+	+	+	-
Benzoat	2	-	-	-	-
Ascorbat	5	-	-	-	-
<i>Aminosäuren</i>					
L-Alanin	5	+	+	+	+
L-Valin	5	+	+	+	+
L-Arginin	5	+	+	+	-
L-Glutamat	5	+	+	+	+
L-Phenylalanin	5	-	-	-	-
<i>Alkohole</i>					
Methanol	40	-	-	-	-
Ethanol	10	+	+	+	+
Cyclohexanol *	2	-	-	-	-
1,2-Cyclohexandiol *	2	-	-	-	-
1,4-Cyclohexandiol *	2	-	-	-	-
<i>Kohlenwasserstoffe</i>					
Heptamethylnonan *		-	-	-	-
<i>n</i> -Decan *	2	-	-	-	-
<i>n</i> -Hexadecan *	2	-	-	-	-
Cyclohexan *	2	-	-	-	-
Toluol *	2	-	-	-	-

3.2.5. Elektronenakzeptoren

Bezüglich der Elektronenakzeptoren unterschieden sich die nitratreduzierenden Bakterienstämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen der Gattung *Alcaligenes* nicht von den *Thauera* spp. Stämmen. Die Bakterienstämme sind fakultativ anaerob und besitzen einen strikt respiratorischen Metabolismus, wobei mit Nitrat, Nitrit oder Distickstoffoxid als Elektronenakzeptoren ein vergleichbares Wachstum unter selektiven Bedingungen erzielt wurde. In Kulturen mit einer He/CO₂ (90/10, v/v) -Gasatmosphäre wurde elementarer Stickstoff als Produkt der Nitratreduktion gebildet. Die Entstehung von Distickstoffoxid konnte nicht nachgewiesen werden. Die *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen bildeten bei denitrifizierendem

Wachstum in Gegenwart von 10 mM Nitrat geringe Mengen an Nitrit (< 0,5 mM). Das im Medium enthaltene Ammonium wurde teilweise assimiliert, eine Ammonifikation fand nicht statt. Schwefelverbindungen (Sulfat, Sulfit, Thiosulfat), Carbonat oder Fumarat wurden nicht als alternative Elektronenakzeptoren genutzt.

Tab. 9. Wachstum der monoterpenerwertenden Stämme mit den jeweiligen Monoterpensubstraten als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren (+ Wachstum; - kein Wachstum).

Elektronenakzeptor	Stamm 51Men	Stamm 54Pin	Stamm 62 Car	Stamm 65Phen
Sauerstoff	+	+	+	+
Nitrat (10 mM)	+	+	+	+
Nitrit (5; 20 mM)	+	+	+	+
N ₂ O (10 mM)	+	+	+	+
Sulfat (10 mM)	-	-	-	-
S ₂ O ₃ (10 mM)	-	-	-	-
Sulfit (2; 10 mM)	-	-	-	-
Carbonat (50 mM)	-	-	-	-
Fumarat (25 mM)	-	-	-	-

Teil II - Monoterpene als Kohlenstoffquellen des mikrobiellen Wachstums nitratreduzierender Bakterien

1. Aerobes Wachstum mit Monoterpenen

Alle nitratreduzierenden Bakterienstämme wuchsen aerob in Mineralmedien mit den jeweiligen Monoterpenen (Isolationssubstrate) als Kohlenstoffquelle. Die aerob wachsenden Flüssigkulturen, die mit Bakterien aus einer anaerob gewachsenen Kultur beimpft wurden, zeigten eine deutlich verlängerte lag-Phase im Vergleich zu parallel inkubierten anaeroben Ansätzen. Die getesteten Stämme 47Lol und 58Eu sowie 51Men, 62Car und 65Phen bildeten bei aerober Inkubation auf Minimalmedium-Agarplatten mit den Selektivsubstraten nach ca. 3 - 6 Wochen kleine, runde, farblose Kolonien (\varnothing 0,2 - 0,3 cm).

2. Anaerobe Oxidation von Monoterpenen

Alle sieben monoterpenerwertenden Bakterienstämme wuchsen sowohl in Flüssigkulturen als auch auf Minimalmedium-Agarplatten in Gegenwart von Nitrat (10 mM) als Elektronenakzeptor mit den jeweiligen Monoterpensubstraten als Kohlenstoffquellen.

Anoxische Wachstumsbedingungen wurden durch die Zugabe von 1-2 mM FeS oder alternativ Ascorbat (4 mM) als Reduktionsmittel gewährleistet. Die Monoterpenverbindungen (Isolationssubstrate) waren einzige organische Kohlenstoffquelle für das Wachstum dieser Bakterienstämme, da Ascorbat keine Kohlenstoffquelle für das Wachstum der Isolate unter nitratreduzierenden Bedingungen war. Das Spektrum verwertbarer isoprenoider Substrate wurde eingehend untersucht, um Hinweise auf den anaeroben Metabolismus der monoterpenerwertenden Stämme zu erhalten.

2.1. *Thauera* spp.

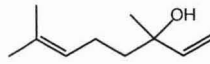
Von den getesteten azyklischen, monozyklischen und bityklischen Monoterpenen dienten nur wenige Verbindungen als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Nitrat als Elektronenakzeptor. So wuchs Isolat 47Lol nur auf den azyklischen Monoterpenalkoholen Linalool und Geraniol, Isolat 21Mol zeigte auf den monozyklischen Monoterpenalkoholen und -ketonen Menthol, Menthon, Isomenthol, (+)-Isopulegol und (+)-Pulegon sowie auf 3,7 Dimethyloctan-1-ol ein sichtbares Wachstum, und Isolat 58Eu konnte neben Eucalyptol die Monoterpenalkene (+)-Sabinen, (-)- β -Pinen, (-)- α -Phellandren, α -Terpinen, γ -Terpinen, Terpinolen, (+)- α -Terpineol und (+)-Terpinen-4-ol metabolisieren (siehe Tab. 10 und Abb. 17).

Tab. 10. Anaerobes Wachstum der denitrifizierenden Stämme auf den getesteten Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Alle Monoterpene wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan als organischer Trägerphase zugegeben (+ gutes Wachstum $\Delta OD_{660} > 0,2$; o Wachstum ΔOD_{660} 0,1 - 0,2; - kein Wachstum $\Delta OD_{660} < 0,1$). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die wäßrige Phase.

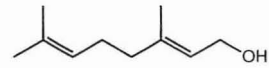
Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 47Lol	Stamm 21Mol	Stamm 58Eu
<i>azyklische Monoterpene</i>				
2,6-Dimethyloctan	4	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octen	4	-	-	-
(-)- β -Citronellen	4	-	-	-
Myrcen	4	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octanol	4	-	o	-
(-)- β -Citronellol	4	-	-	-
Geraniol	4	+	-	-
Nerol	4	-	-	-
(\pm)-Linalool	4	+	-	-
<i>monozyklische Monoterpene</i>				
(+)- <i>p</i> -Menth-1-en	4	-	-	-
(-)- α -Phellandren	4	-	-	+
α -Terpinen	4	-	-	+
γ -Terpinen	4	-	-	+
(+)-Limonen	4	-	-	+
(+)- <i>trans</i> -Isolimonen	4	-	-	-
Terpinolen	4	-	-	+
<i>p</i> -Cymol	4	-	-	-
(+)-Perillaalkohol	4	-	-	-
(-)-Carveol	4	-	-	-
(+)-Dihydrocarveol	4	-	-	-
Menthol	4	-	+	-
(+)-Isomenthol	4	-	+	-
(-)-Isopulegol	4	-	+	-
α -Terpineol	4	-	-	+
(+)-Terpinen-4-ol	4	-	-	o
(-)-Carvon	4	-	-	-
(+)-Dihydrocarvon	4	-	-	-
Menthon	4	-	+	-
(+)-Pulegon	4	-	+	-
<i>bizyklische Monoterpene</i>				
(-)- <i>trans</i> -Pinnan	4	-	-	-
(+)-2-Caren	4	-	-	-
(+)-3-Caren	4	-	-	-
(+)-Sabinen	4	-	-	+
...				

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 47Lol	Stamm 21Mol	Stamm 58Eu
<i>bizyklische Monoterpene (Fortsetz.)</i>				
(-)- α -Pinen	4	-	-	-
(-)- β -Pinen	4	-	-	+
Eucalyptol	4	-	-	+
(-)- <i>cis</i> -Myrtenol	4	-	-	-
(-)-Myrtenol	4	-	-	-
(+)-Isopinocampheol	4	-	-	-
(-)-Borneol	4	-	-	-
(+)-Fenchol	4	-	-	-
(+)- <i>trans</i> -Myrtenol	4	-	-	-
(α + β)-Thujon	4	-	-	-
(+)-Fenchol	4	-	-	-
(-)-Verbenol	4	-	-	-
(+)-Campher	4	-	-	-

Stamm 47Lol

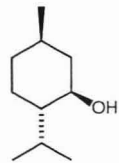


Linalool

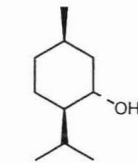


Geraniol

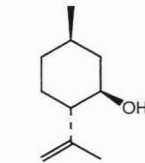
Stamm 21Mol



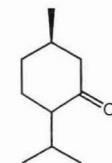
(-)-Menthhol



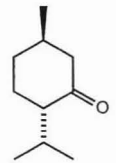
(+)-Isomenthol



(-)-Isopulegol

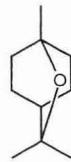


(+)-Pulegon

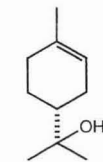


(-)-Menthon

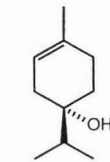
Stamm 58Eu



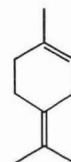
Eucalyptol



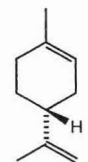
(+)- α -Terpineol



(+)-Terpinen-4-ol



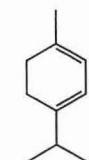
Terpinolen



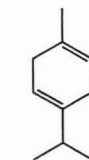
R(+)-Limonen



R(-)- α -Phellandren



α -Terpinen



γ -Terpinen



(+)-Sabinen



(-)- β -Pinen

Abb. 17. Wachstumssubstrate (Monoterpene) der *Thauera* spp.

2.2. *Alcaligenes* sp.

Die Isolate der Gattung *Alcaligenes* wiesen im Vergleich zu den *Thauera* spp. Stämmen ein relativ breites Spektrum verwertbarer Monoterpenverbindungen auf. Wachstumsansätze mit im Handel erhältlichen Monoterpenen ergaben, daß die monozyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffe (+)-*p*-Menth-1-en, (+)-Limonen, (-)- α -Phellandren, α -Terpinen, γ -Terpinen, die bicyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffe (+)-Sabinen, (+)-2-Caren, (+)-3-Caren, (-)- α -Pinen, (-)- β -Pinen, Terpinolen und die Monoterpenalkohole (+)- α -Terpineol und (+)-Terpinen-4-ol als Kohlenstoffquellen in Gegenwart von Nitrat von den *Alcaligenes* sp. Stämmen 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen metabolisiert wurden (siehe Tab. 11 und Abb. 18). Das Wachstum mit der azyklischen Verbindung Myrcen als Kohlenstoffquelle wurde nur mit Stamm 65Phen beobachtet.

Tab. 11. Anaerobes Wachstum der denitrifizierenden Stämme auf den getesteten Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. Alle Monoterpene wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan als organischer Trägerphase zugegeben (+ gutes Wachstum $\Delta OD_{660} > 0,2$; o Wachstum $\Delta OD_{660} 0,1 - 0,2$; - kein Wachstum $\Delta OD_{660} < 0,1$; n.b. nicht bestimmt). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die wäßrige Phase.

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 51Men	Stamm 65Phen	Stamm 54Pin	Stamm 62Car
<i>azyklische Monoterpene</i>					
2,6-Dimethyloctan	4	-	-	-	-
3,7-Dimethyl-1-octen	4	-	-	-	-
(-)- β -Citronellen	4	-	-	-	-
Myrcen	4	n.b.	+	-	n.b.
3,7-Dimethyl-1-octanol	4	-	-	-	-
(-)- β -Citronellol	4	-	-	-	-
Geraniol	4	-	-	-	-
Nerol	4	-	-	-	-
(\pm)-Linalool	4	-	-	-	-
<i>monozyklische Monoterpene</i>					
(+)- <i>p</i> -Menth-1-en	4	+	+	+	+
(-)- α -Phellandren	4	+	+	+	+
α -Terpinen	4	+	+	+	+
γ -Terpinen	4	+	+	+	+
(+)-Limonen	4	+	+	+	+
(+)- <i>trans</i> -Isolimonen	4	-	-	-	-
Terpinolen	4	+	+	+	+
<i>p</i> -Cymol	4	-	-	-	-
(+)-Perillylalkohol	4	-	-	-	-
...					

Kohlenstoffquelle	(mM)	Stamm 51Men	Stamm 65Phen	Stamm 54Pin	Stamm 62Car
<i>monozyklische Monoterpene (Fortsetz.)</i>					
(-)-Carveol	4	-	-	-	-
(+)-Dihydrocarveol	4	-	-	-	-
Menthol	4	-	-	-	-
(+)-Isomenthol	4	-	-	-	-
(-)-Isopulegol	4	-	-	-	-
α -Terpineol	4	n.b.	+	+	n.b.
(+)-Terpinen-4-ol	4	+	o	o	o
(-)-Carvon	4	-	-	-	-
(+)-Dihydrocarvon	4	-	-	-	-
Menthon	4	-	-	-	-
(+)-Pulegon	4	-	-	-	-
<i>bizyklische Monoterpene</i>					
(-)- <i>trans</i> -Pinan	4	-	-	-	-
(+)-2-Caren	4	o	o	o	+
(+)-3-Caren	4	o	o	o	+
(+)-Sabinen	4	+	+	+	+
(-)- α -Pinen	4	+	+	+	+
(-)- β -Pinen	4	+	+	+	+
Eucalyptol	4	-	-	-	-
(-)- <i>cis</i> -Myrtenol	4	-	-	-	-
(-)-Myrtenol	4	-	-	-	-
(+)-Isopinocampheol	4	-	-	-	-
(-)-Borneol	4	-	-	-	-
(+)-Fenchol	4	-	-	-	-
(+)- <i>trans</i> -Myrtenol	4	-	-	-	-
(α + β)-Thujon	4	-	-	-	-
(+)-Fenchol	4	-	-	-	-
(-)-Verbenol	4	-	-	-	-
(+)-Campher	4	-	-	-	-

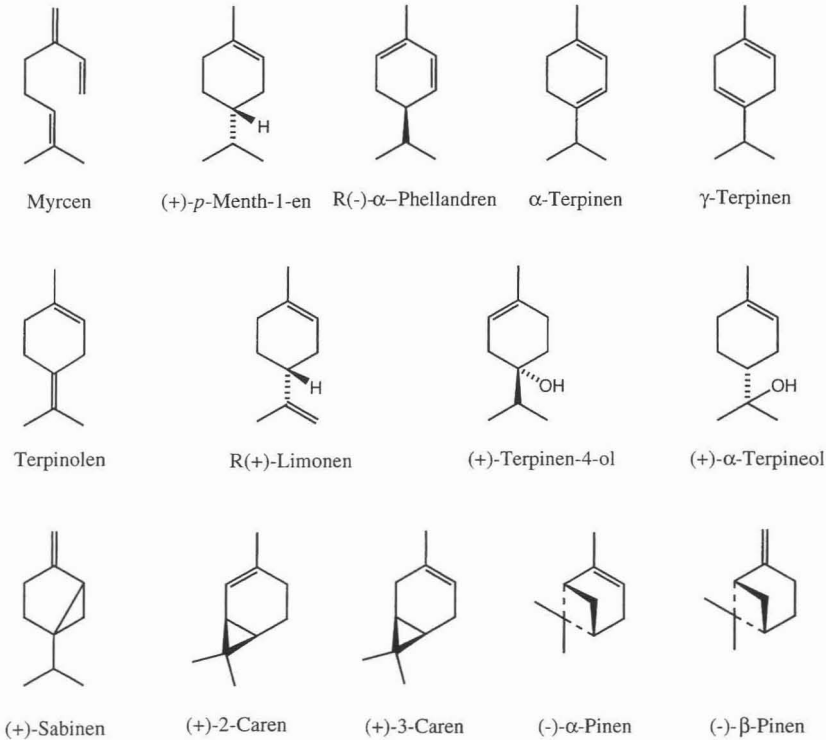


Abb. 18. Wachstumssubstrate (mono- und bicyklische Monoterpene) der *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 65Phen, 62Car und 54Pin.

3. Bilanzierung des anaeroben Monoterpenabbaus

Zur Quantifizierung des anaeroben Wachstums mit ausgewählten Monoterpenen (Isolations-substrate) wurde in Kulturen der Stämme 21Mol, 47Lol und 58Eu sowie 54Pin die metabolische Umsetzung dieser Verbindungen untersucht. Die Experimente wurden in 150 ml Serumflaschen mit einem Kulturvolumen von 120 ml durchgeführt, wobei im Verhältnis zur verfügbaren Menge des Elektronenakzeptors (10 mM Nitrat) bei angenommener vollständiger Oxidation eine limitierende und eine überschüssige Menge an Monoterpen eingesetzt wurde. Die Zunahme der optischen Dichte, die Abnahme des Nitrats, die intermediäre Bildung von Nitrit und die Abnahme des Monoterpens wurden während des Wachstums bestimmt.

Tab. 12. Quantifizierung des anaeroben Wachstums von Stamm 58Eu auf Eucalyptol und Nitrat. Stamm 58Eu wurde in 120 ml Ascorbat-reduziertem Medium mit Nitrat (10 mM) und Eucalyptol (in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase) kultiviert.

	Experiment		
	C-limitiert	“stöchiometrisch ausgeglichen”	NO ₃ -limitiert
Eucalyptol eingesetzt (μmol)	72	209	480
Eucalyptol verbraucht (μmol)	67	158	167
Nitrat verbraucht (μmol)	1151	1151	1157
Nitrit gebildet (μmol)	1063	0	0
Bakterienwachstum (Zunahme der optischen Dichte (Δ OD ₆₆₀))	0,145	0,327	0,373
theoretische Monoterpenoxidation zu CO ₂ (μmol Elektronen) ¹	3752	8848	9352
NO ₃ -Reduktion zu N ₂ (μmol Elektronen) ²	2566	5755	5785
Elektronenverhältnis (C-Oxidation : N-Reduktion)	1,46	1,54	1,62

¹ bei vollständiger Oxidation von Eucalyptol zu CO₂ werden entsprechend der Gleichung C₁₀H₁₈O + 19 H₂O → 10 CO₂ + 56 Elektronen + 56 H⁺ pro mol Eucalyptol 56 mol Elektronen erhalten

² bei Reduktion von NO₃⁻ zu N₂ werden unter Berücksichtigung des gebildeten Nitrits 5 · (NO₃⁻ verbraucht - NO₂⁻ gebildet) + 2 · (NO₂⁻ gebildet) Elektronen umgesetzt

In den NO₃-limitierten Kulturen des Stamms 58Eu wurden nur ein Drittel des angebotenen Monoterpens unter vollständiger Reduktion des Nitrats umgesetzt. In unbeimpften Kontrollen konnte über die gesamte Inkubationszeit weder ein Verlust an Monoterpenen festgestellt werden noch wurde Nitrat durch das als Reduktionsmittel eingesetzte Ascorbat chemisch reduziert.

Entsprechende Experimente zur quantitativen Bestimmung des Monoterpenverbrauchs bei gleichzeitiger Nitratreduktion wurden auch für die *Thauera*-Stämme 21Mol und 47Lol sowie für *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin durchgeführt. In Kulturen mit begrenztem Kohlenstoffangebot kam es bei den Stämmen 58Eu und 21Mol zur intermediären Anhäufung von Nitrit, jedoch nicht bei den Stämmen 47Lol bzw. 54Pin.

Die Bilanzierung des anaeroben Abbaus der Monoterpene Linalool, Menthol, Eucalyptol sowie α-Pinen in Gegenwart von Nitrat ergab, daß diese Verbindungen vollständig mineralisiert wurden. Das Verhältnis der Elektronen, die bei vollständiger Oxidation der Monoterpene zu CO₂ gebildet bzw. bei der Reduktion von NO₃ zu N₂ verbraucht wurden, lag zwischen 1,4 und 1,6.

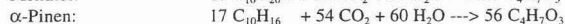
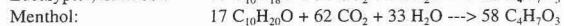
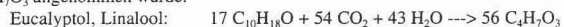
Tab. 13. Quantifizierung des Monoterpenverbrauchs und Nitratreduktion durch *Thauera* spp. und *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin

	<i>Thauera</i> sp. Stamm 58Eu*	<i>Thauera</i> sp. Stamm 21Mol	<i>Thauera</i> sp. Stamm 47Lol	<i>Alcaligenes</i> sp. Stamm 54Pin
Kohlenstoffquelle	Eucalyptol	Menthol	Linalool	α -Pinen
Monoterpen verbraucht (μ mol)	158	139	193	113
Nitrat verbraucht (μ mol)	1151	1183	1234	940
Biomasse gebildet (mg) ¹	24,3	14,2	18,0	10,1
Monoterpen dissimiliert (μ mol) ²	86	99	140	83
Elektronenverhältnis (C-Oxidation : N-Reduktion) ³	1,54	1,36	1,75	1,35
Elektronen-Bilanz ⁴	0,84	0,97	1,27	0,99

* Originaldaten aus Tab. 12.

¹ Die gebildete Biomasse wurde unter der Annahme berechnet, daß der Proteingehalt der Zellen ca. 50% der bakteriellen Trockenmasse entspricht und unter Einbeziehung der experimentell bestimmten OD₆₆₀-Protein-Korrelationsfaktoren. Eine optische Dichte Δ OD₆₆₀ von 1 entsprach 216, 374 bzw. 310 mg Protein/l für die Stämme 21Mol, 47Lol bzw. 58Eu sowie 321 mg Protein/l für Stamm 54Pin.

² Der Anteil der vollständig oxidierten Monoterpene ergab sich aus der Differenz der Gesamtmenge an verbrauchter Monoterpenen und des Anteils, der in die Bildung der Biomasse einging. Die Menge an assimilierten Monoterpenen wurde unter Annahme folgender Gleichungen errechnet, wobei die Zusammensetzung der Zellbiomasse mit C₄H₇O₃ angenommen wurde.



³ Das Verhältnis von Elektronendonator zu Elektronenakzeptor berechnet sich aus der Anzahl der Elektronen, die unter der Annahme der vollständigen Mineralisierung der Monoterpene freigesetzt werden, und der Anzahl der Elektronen, die während der Nitratreduktion verbraucht werden (s. Tab. 12).

⁴ Die Berechnung der Elektronenbilanz basiert auf dem Verhältnis der Elektronen aus der Dissimilation der Monoterpene zu CO₂ und der Elektronen aus der Nitratreduktion.

Für denitrifizierendes Bakterienwachstum können im allgemeinen für das Elektronenverhältnis Werte im Bereich von 130 - 150 % angenommen werden, um den Anteil der Zellbiosynthese zu decken. Auch die Elektronenbilanz, in der die Assimilation eines Teils der verbrauchten Monoterpenmenge berücksichtigt wurde, ergab Werte zwischen 0,8 und 1,3. Die Abweichung vom theoretischen Wert 1,0 ist durch die Bildung von Speicherstoffen (Poly- β -hydroxybutyrat) erklärbar, die für Organismen der Gattung *Thauera* beschrieben worden ist (Anders et al., 1995) und auch in Substrat-Überschuß-Kulturen lichtmikroskopisch beobachtet wurde.

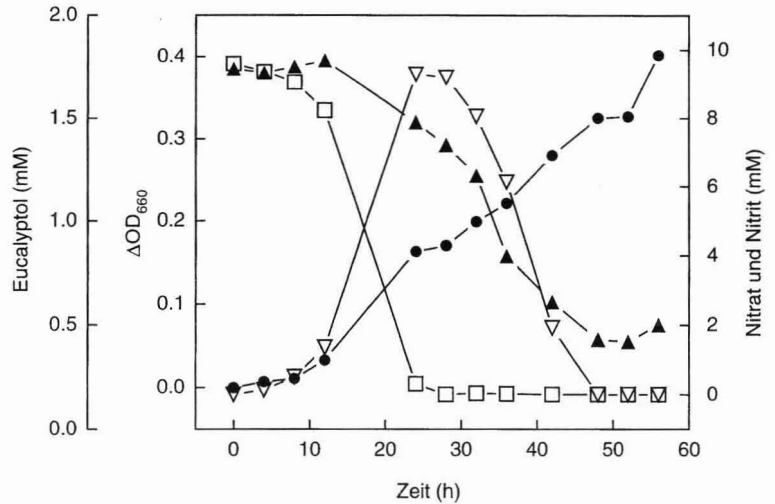


Abb. 19. Anaerobes Wachstum von Stamm 58Eu auf Eucalyptol und Nitrat. Der Stamm wurde in 150 ml Serumflaschen, die mit teflonisierten Butylsepten verschlossen waren, in 120 ml Ascorbat-reduziertem Medium, 210 μ mol Eucalyptol (in 10 ml Heptamethylnonan als inerte Trägerphase) und Nitrat (10 mM) kultiviert. Während des Wachstums wurden die optische Dichte bei 660 nm (●) und die Konzentrationen an Nitrat (□) und Nitrit (▽) sowie an Eucalyptol (▲) (bezogen auf die wässrige Phase) bestimmt.

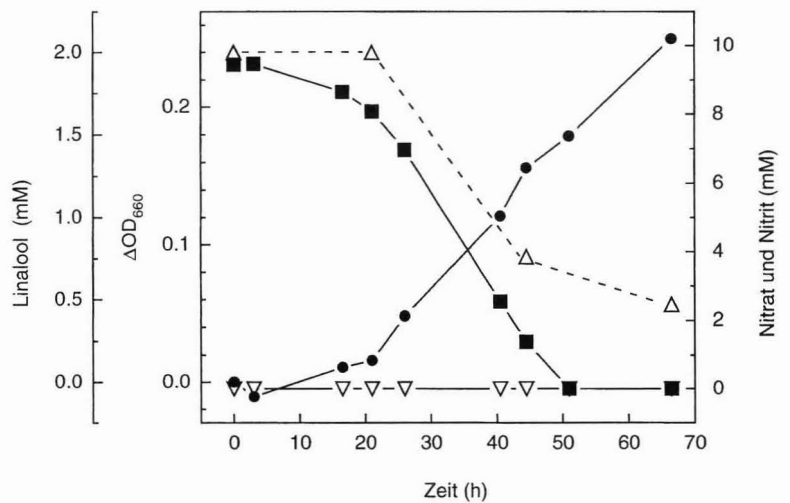


Abb. 20. Anaerobes Wachstum von Stamm 47Lol auf Linalool und Nitrat. Experimentelle Einzelheiten entsprechen den Angaben zu Abb. 19. Zunahme der optische Dichte bei 660 nm (●), Nitrat (□), Nitrit (▽) und Linalool (△).

Teil III - Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Monoterpenen

1. *Thauera* sp. 47Lol

1.1. Wachstum von Stamm 47Lol mit azyklischen Monoterpenen

Der Abbau azyklischer Kohlenwasserstoffe in wachsenden Kulturen von Stamm 47Lol wurde mit einem Gemisch azyklischer Monoterpenalkohole und -alkene (3,7-Dimethyl-1-octanol, 3,7-Dimethyloct-1-en, β -Citronellen, β -Citronellol, Geraniol, Nerol, Linalool) sowie dem Alkan 2,6-Dimethyloctan in Gegenwart von Nitrat (10 mM) untersucht. Die Endkonzentration der eingesetzten Verbindungen in den Versuchsansätzen betrug jeweils 0,2 mM bezogen auf die wäßrige Phase. 2,6-Dimethyloctan diente nicht als Kohlenstoffquelle für das denitrifizierende Wachstum des Bakterienstamms 47Lol und wurde als interner Standard verwendet. Als Inokulum für die Wachstumsansätze wurden 10 % (v/v) einer auf Linalool gewachsenen Kultur eingesetzt.

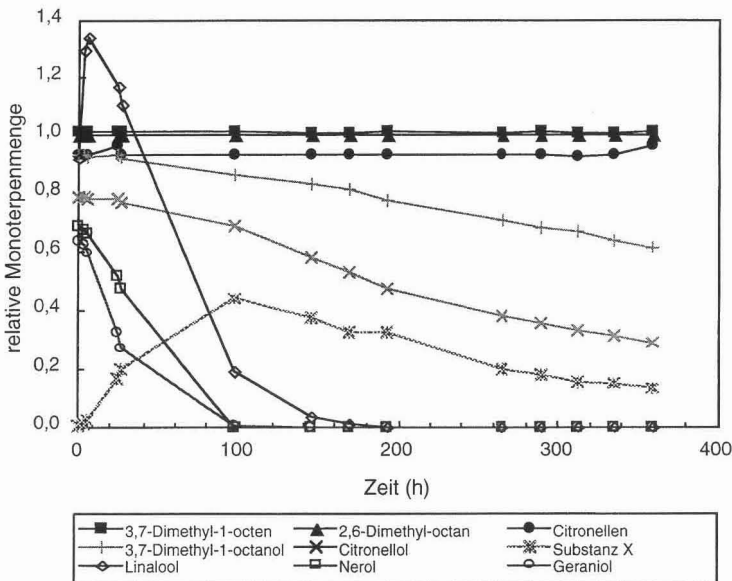


Abb. 21. Zeitlicher Verlauf der Kultivierung von Stamm 47Lol mit einem äquimolaren Gemisch azyklischer Monoterpenen unter Bildung einer unbekanntes Substanz X in den Ansätzen. Die angegebene relative Monoterpenmenge wurde experimentell in der organischen Trägerphase mit 2,6-Dimethyloctan als interner Standard bestimmt.

Die zu Beginn des Experiments (Analysen der organischen Trägerphase nach 3 h und 6 h) zu beobachtende Zunahme an Linalool war durch das Einbringen dieser Verbindung mit dem Inokulum und die anschließende Einstellung des Gleichgewichts in dem experimentellen 3-Phasen-System zu erklären. Der zeitliche Verlauf der Umsetzung der eingesetzten Kohlenwasserstoffe unter gleichzeitiger Reduktion von Nitrat zeigte, daß die Monoterpenalkohole Nerol, Geraniol und Linalool innerhalb von 100 h bzw. 200 h (Linalool) vollständig verwertet wurden. Die Abnahme der Verbindungen Citronellol und 3,7-Dimethyl-1-octanol war nicht mit einer weiteren Nitratreduktion verbunden ($T > 200$ h). Die aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen 2,6-Dimethyloctan, 3,7-Dimethyl-1-octen und Citronellen wurden nicht abgebaut. Zusätzlich wurde gaschromatographisch die Bildung einer Verbindung nachgewiesen, deren Konzentration nach ca. 100 h ein Maximum erreichte und im Verlauf der Kultivierung wieder abnahm (siehe Abb. 21). Die gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse ergab, daß 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal in den Wachstumsansätzen gebildet wurde (siehe Abb. 22).

Die eingesetzten Monoterpene und die gebildeten Metabolite wurden durch die gaschromatographische Trennung auf zwei verschiedenen Kapillarsäulen und den Vergleich mit authentischen Reinsubstanzen identifiziert (Retentionszeiten, Kovats-Indizes, Additionsanalysen). Die Aldehyde Geranial und Neral waren handelsüblich nur als Gemisch (Citral) erhältlich, deshalb wurde die Identifikation dieser Substanzen durch gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse von Proben der organischen Phase bestätigt.

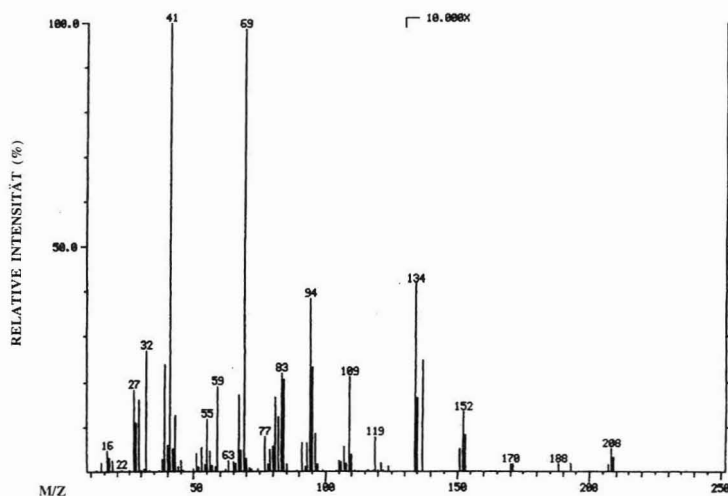


Abb. 22. Gaschromatographisch-massenspektroskopische Identifizierung der in wachsenden Kulturen von Stamm 47Lol (s. Abb. 21) gefundenen Substanz als 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal.

1.2. Anaerobe Oxidation von Linalool, Geraniol und Nerol durch Stamm 47Lol

Der Abbau der Monoterpenalkohole Linalool, Geraniol und Nerol während des Wachstums von Stamm 47Lol unter nitratreduzierenden Bedingungen wurde näher untersucht. Die Wachstumsansätze wurden mit 4 ml (3,3 %, v/v) einer Kohlenstoff-limitierten Kultur auf Linalool beimpft, um den Eintrag von Linalool durch das Inokulum zu vermeiden. Die Kulturansätze waren Nitrat-limitiert, um gegebenenfalls mikrobielle Transformationsreaktionen und die Bildung von Intermediaten in der stationären Wachstumsphase nach vollständiger Reduktion des Nitrats ebenfalls zu erfassen.

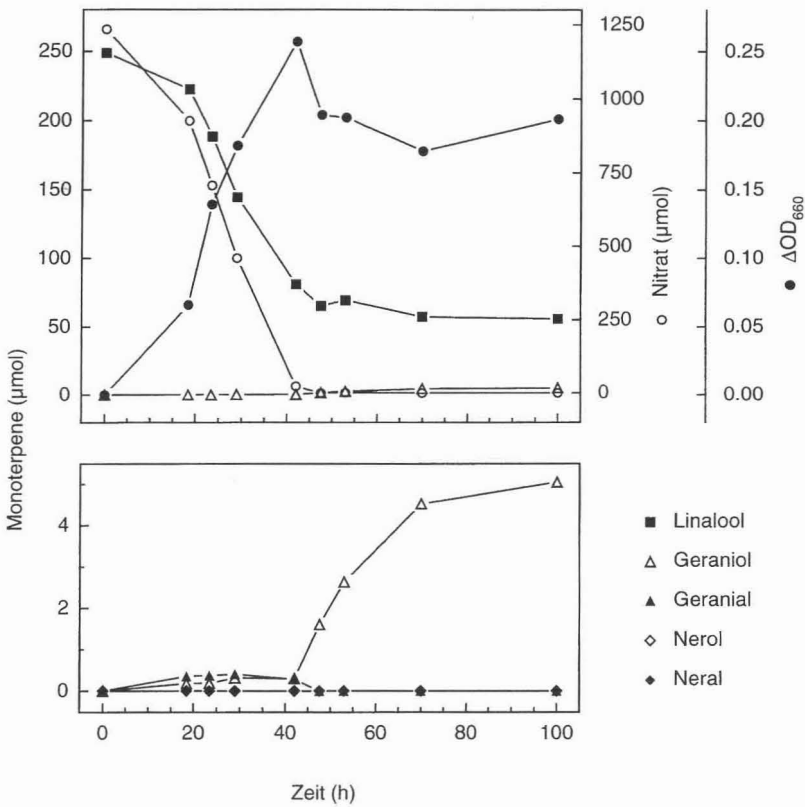


Abb. 23. Anaerobes Wachstum von Stamm 47Lol mit Linalool (2,1 mM) und Nitrat (10 mM). Die Kulturansätze enthielten Heptamethylnonan als organische Trägerphase.

In Gegenwart von Linalool und Nitrat erfolgte der Abbau von Linalool durch Stamm 47Lol unmittelbar (Abb. 23). Die transiente Bildung von Geraniol und Geranial konnte analytisch nachgewiesen werden. Ein Anstieg der gebildeten Menge an Geraniol (*trans*-3,7-Dimethyl-2,6-octanol) wurde beobachtet, nachdem das angebotene Nitrat vollständig reduziert war. Geraniol akkumulierte in den Kulturen bis zu einem Linalool : Geraniol-Verhältnis von 11:1. Das *cis*-Isomer Nerol wurde weder in der Wachstumsphase noch in der stationären Phase der Kulturen beobachtet. Die Nachweisgrenze der verwendeten Analyseverfahren lag bei 0,2 μmol Monoterpen pro Kultur.

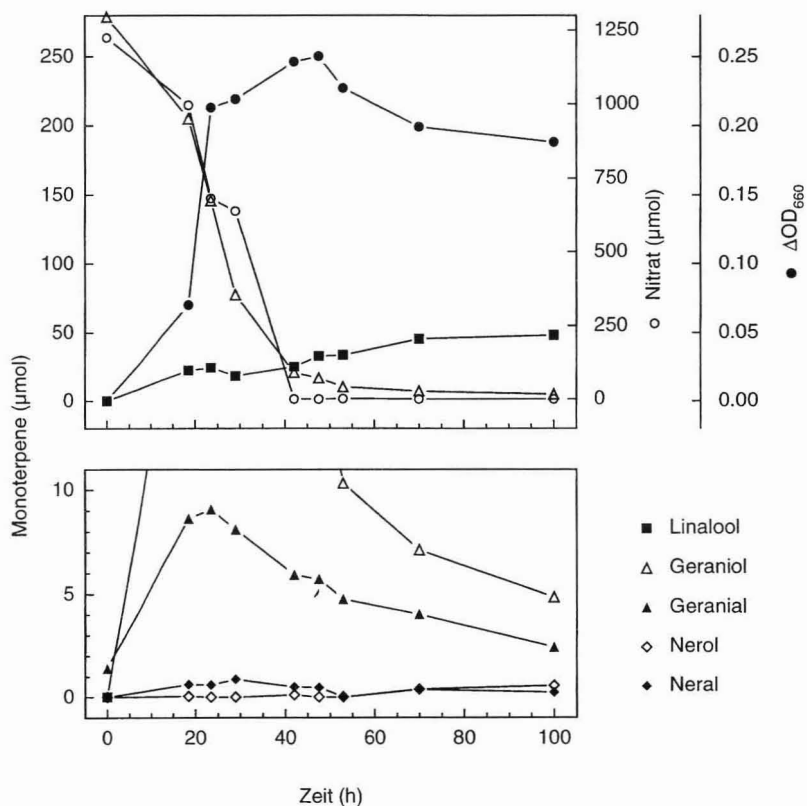


Abb. 24. Anaerobes Wachstum von Stamm 47Lol mit Geraniol (2,3 mM) und Nitrat (10 mM).

Bei Wachstum auf Geraniol und Nitrat bildete Stamm 47Lol bereits in der exponentiellen Wachstumsphase Linalool und Geraniol sowie Spuren an Neral (Abb. 24). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (nach 40 h) nahmen Geraniol und das gebildete Geraniol ab, dagegen nahm der Gehalt an Linalool weiter zu. Das Verhältnis von Linalool zu Geraniol lag am Ende bei 10:1.

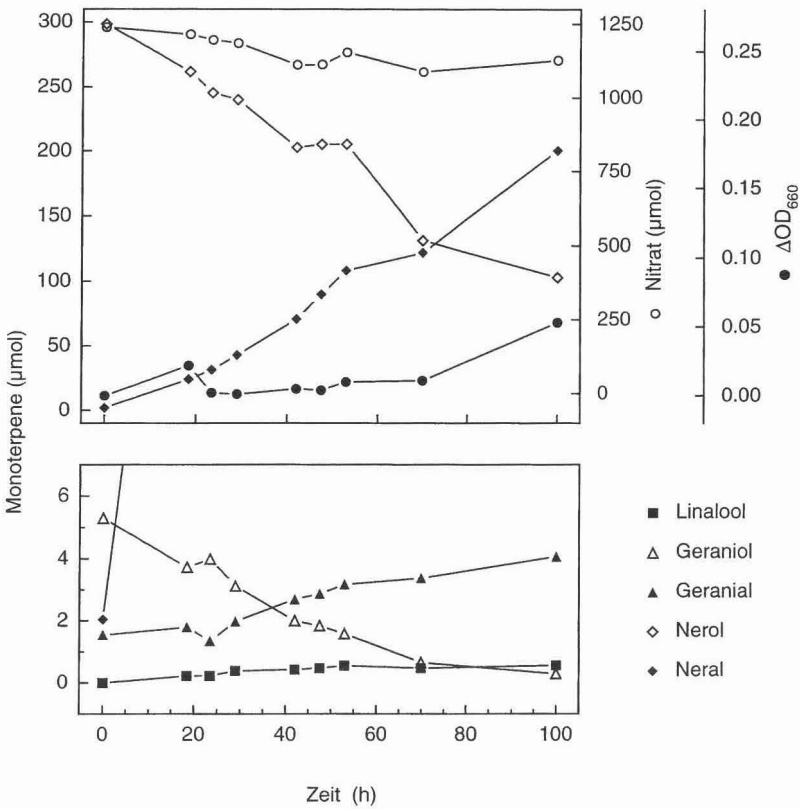


Abb. 25. Transformation von Nerol durch Stamm 47Lol. Die Anfangskonzentration an Nerol betrug 2,5 mM.

Im Gegensatz zu Linalool und Geraniol wurde Nerol durch Stamm 47Lol nicht mineralisiert. Parallel zur Abnahme an Nerol wurden nahezu stöchiometrische Mengen an Neral gebildet (Abb. 25). Gleichfalls wurde Geraniol, das in geringen Mengen als Nebenprodukt im Nerol

enthalten war, offenbar zu Geraniol oxidiert bzw. zu einem geringen Teil zu Linalool transformiert, jedoch wurde Geraniol nicht vollständig oxidiert. Die Reduktion von Nitrat bzw. ein signifikantes Bakterienwachstum wurden nicht festgestellt. Das gebildete Neral inhibiert anscheinend die Oxidation von Geraniol.

1.3. Regioselektive Umlagerung von Monoterpenalkoholen in cytosolischen Extrakten

Vorversuche zeigten, daß bereits 0,2 % (v/v) Linalool in Abwesenheit einer organischen Trägerphase das Wachstum der Bakterien hemmte, d.h. das Wachstum verlangsamt wurde. In Gegenwart von 1 % (v/v) Linalool konnte kein Wachstum erzielt werden. Eine organische Trägerphase war für die Kultivierung von Stamm 47Lol erforderlich, allerdings konnte anstelle des routinemäßig verwendeten Heptamethylnonans auch dickflüssiges Paraffin als organische Trägerphase verwendet werden, ohne daß das Wachstum von Stamm 47Lol negativ beeinflusst wurde. Ein Anstieg der optischen Dichte und damit der Bakterienzeldichte wurde proportional zur Erhöhung der Nitratmenge bei routinemäßiger Kultivierung mit 10 µmol Linalool in 0,5 ml Heptamethylnonan in einem Konzentrationsbereich von 10 - 50 mM erzielt. Bei dem Versuch, höhere Zelldichten in Kulturvolumen bis 500 ml zu erzielen, zeigte sich jedoch, daß eine Alkalisierung des carbonatgepufferten Mediums eintrat:



Als Folge davon ergab sich ein deutlich verlangsamtes, nicht exponentielles Wachstum, und insgesamt wurden geringere Zelldichten gebildet. Bei pH-Werten $\text{pH} > 8$ war kein bakterielles Wachstum zu beobachten, darüberhinaus kam es zur Lyse der Bakterienzellen in den Kulturen. Die Gewinnung von Bakterienzellmasse wurde deshalb in einem pH-regulierten Fermenter in einem Volumenmaßstab von 10 l etabliert (Biostat A; Braun Biotech, Melsungen). Die Kultivierung von *Thauera* sp. 47Lol erfolgte durch diskontinuierliche Zugabe des Kohlenstoffsubstrats Linalool. Problematisch war dabei, daß Kulturen, die bereits die spät-exponentielle (oder stationäre) Wachstumsphase erreicht hatten, nach Zugabe von Nitrat und Linalool kein exponentielles Wachstum mehr zeigten, d.h. eine entsprechende weitere Zunahme der Bakterienzeldichte nicht mehr erzielt wurde. In einer Fed-Batch-Kultur mit 70 mM Nitrat konnte nach 70 h eine optische Dichte OD_{660} von 1,3 erzielt werden (siehe Abb. G2 im Anhang).

Die enzymkatalysierte Isomerisierung von Linalool und Geraniol in Zellextrakten von *Thauera* sp. Stamm 47Lol konnte photometrisch nicht erfaßt werden, da die UV-VIS-Spektren von Linalool und Geraniol nahezu identisch waren (Tabelle der Absorptionsmaxima im Anhang,

Tab. G9). Die Reaktion wurde deshalb durch die gaschromatographische Analyse von wäßrigen Proben der enzymatischen Testansätze verfolgt.

Aufgrund des thermodynamischen Gleichgewichts der allylischen Transformation der Monoterpenalkohole Linalool und Geraniol (s. Abschnitt 1.2.) wurde experimentell die Reaktion mit dem Substrat Geraniol gestartet und die Bildung von Linalool bestimmt. Die stereoselektive Isomerisierung von Geraniol zu Linalool wurde sowohl mit zellfreiem Rohextrakt als auch mit cytosolischem Zellextrakt in Geraniol-gesättigtem HEPES-Puffer (100 mM, pH 7,0) bei Raumtemperatur (20 °C) unter aeroben Bedingungen beobachtet. Der Zusatz von 0,1 mM Dithiothreitol als Reduktionsmittel zu zellfreien Rohextrakten bzw. zu cytosolischen Zellextrakten hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die enzymkatalysierte Bildung von Linalool. Geraniol war in 100 mM HEPES, pH 7,0 stabil, eine abiotische Umlagerung fand nicht statt.

Die Isomerisierung von Geraniol zu Linalool mit cytosolischem Zellextrakt erfolgte jedoch nicht stöchiometrisch, und das gebildete Linalool sowie die Summe der analytisch erfaßten Monoterpene nahmen in den Reaktionsansätzen über die Zeit ab (Abb. 26). Es ist anzunehmen, daß durch den eingesetzten Zellextrakt unter aeroben Bedingungen gleichzeitig die Oxidation von Geraniol erfolgte, ohne daß Geranial als Oxidationsprodukt direkt in den Reaktionsansätzen gaschromatographisch nachweisbar war.

Um die konkurrierende Oxidation von Geraniol zu Geranial zu unterdrücken, wurde der Zellextrakt dialysiert. Mit dem dialysierten, cytosolischen Zellextrakt stellte sich ein Gleichgewicht der Isomerisierung von Geraniol zu Linalool ein, eine vollständig stöchiometrische Umsetzung wurde jedoch nicht erzielt, wie die Summierung der analytisch gefundenen Monoterpene (Geraniol, Linalool, Geranial, Neral) ergab (Abb. 26). Neben Geranial wurde auch Neral in den Reaktionsansätzen mit dem dialysierten, cytosolischen Zellextrakt gaschromatographisch nachgewiesen. Die beobachtete Abnahme der Gesamtmonoterpenmenge über die Zeit ist wahrscheinlich durch den diffusiven Verlust der Substanzen zu erklären.

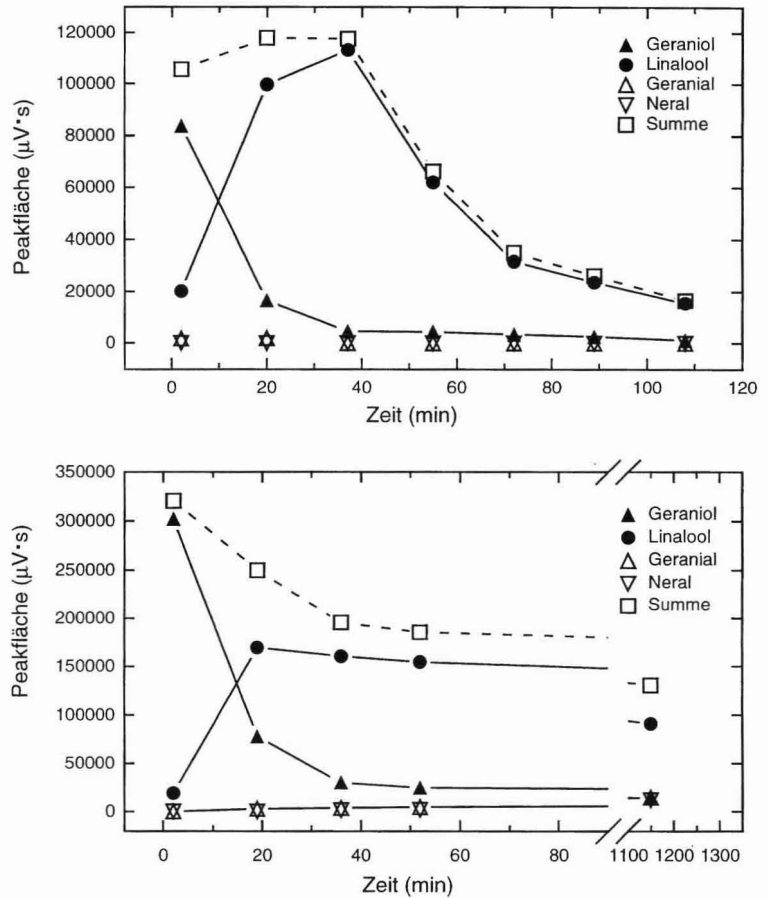


Abb. 26. Isomerisierung von Geraniol zu Linalool in cytosolischen Zellextrakten von Stamm 47Lol vor (oben) und nach der Dialyse mit einer Ausschlußgröße von 10 000 Dalton (unten). Eine Kalibrierung der Peakflächen für Linalool, Geranial und Neral erfolgte in diesem Experiment nicht. Eine Peakfläche von 100 000 entsprach einer Geraniolmenge von 1,0 μmol pro ml Reaktionsansatz (oben) bzw. eine Peakfläche von 250 000 entsprach 2,1 μmol Geraniol/ml Reaktionsansatz (unten).

2. *Thauera* sp. 21Mol

2.1. Wachstum von Stamm 21Mol auf Pfefferminzöl

In wachsenden Kulturen von *Thauera* sp. 21Mol auf racemischem Menthol und Nitrat konnten geringe Mengen an Transformationsmetaboliten in der Heptamethylnonan-Phase nachgewiesen werden. Bei den unbekanntenen Substanzen mit den berechneten KI-Werten von 1156,4 und 1167,7 könnte es sich um Menthon (KI = 1150) und Isomenthon (KI = 1160) handeln.

Als Kohlenstoffquelle des anaeroben Wachstums wurde ätherisches Pfefferminzöl (*Mentha piperita*, L.) getestet, das als Hauptkomponenten ca. 37,5 % Menthon, 32,1 % Menthofuran, 10,6 % 1,8-Cineol und 6,6 % Menthylacetat enthielt (s. Tab. 14). Die Nitrat-limitierte Kultivierung von *Thauera* sp. Stamm 21Mol auf Pfefferminzöl (1 % (v/v) in HMN) ergab eine Abnahme insbesondere der im Pfefferminzöl enthaltenen Monoterpenalkohole und -ketone L-Menthol, Iso- und Neomenthol, Isopulegol sowie Menthon und Pulegon unter gleichzeitiger Reduk-

Tab. 14. Wachstum von *Thauera* sp. Stamm 21Mol auf Pfefferminzöl (*Mentha piperita*, L.). Die Terpene sind entsprechend der Elutionsfolge auf der PVMS-Säule (5 % Phenyl - 95 % Methylsiloxan) aufgeführt. Angegeben ist die prozentuale Veränderung des Gehalts der identifizierten Inhaltstoffe im Pfefferminzöl nach 4 und 7 Tagen (im Verhältnis zur Peakfläche zum Zeitpunkt T = 0 d; Fehlerbereich der Messungen +/- 10 %).

Monoterpen- komponente	Anteil im äthe- rischen Öl (%)	Veränderung des Gehalts	
		T = 4 d	T = 7 d
α-Pinen	0,3	- 15,3	+ 52,6
Sabinen	0,1	+ 69,2	+ 196,2
β-Pinen	0,2	- 6,9	+ 48,5
Myrcen	0,2	+ 9,8	+ 83,2
2-Caren	0,3	+ 6,7	+ 38,9
p-Cymol	0,1	+ 14,2	+ 1795,3
Limonen	1,8	+ 43,6	+ 118,4
1,8-Cineol	4,9	- 7,6	+ 39,3
Isopulegol	0,9	- 100,0	- 100,0
Menthon	17,4	- 27,3	+ 4,4
Menthofuran/Neomenthol	14,9	- 41,9	- 7,5
L-Menthol	51,4	- 100,0	- 100,0
4-Terpineol	1,9	- 87,9	- 81,4
Isomenthol	0,8	- 98,2	- 100,0
α-Terpineol	0,1	+ 136,9	+ 416,4
Pulegon	1,1	- 100,0	- 100,0
Piperiton	0,6	- 100,0	- 100,0
Menthylacetat	3,1	- 9,9	- 10,5

tion von 10 mM Nitrat und einer Zunahme der optischen Dichte bei 660 nm um 0,37 (nach einer Inkubationszeit von vier Tagen). Neben der Abnahme der oben genannten und in Einzelsubstratansätzen als Wachstumssubstrate bestimmten monozyklischen Monoterpene war eine Abnahme von 4-Terpineol zu beobachten. Zusätzlich wurde die Bildung von Transformationsprodukten beobachtet, bei denen es sich nach den Retentionsanalysen (Retentionszeit, KI-Werte) um Limonen, α -Terpineol, Sabinen und *p*-Cymol handeln könnte. 4-Terpineol könnte das Edukt für ein Teil der beobachteten Produktbildung sein. Nach sieben Tagen nahmen die Transformationsprodukte Limonen, Sabinen, α -Terpineol und *p*-Cymol weiter zu, und es kam zur Bildung weiterer Transformationsprodukte, die vorläufig als Myrcen, 2-Caren und β -Pinen identifiziert wurden. Auch der Gehalt an 1,8-Cineol und Menthon stieg wieder an.

3. *Thauera* sp. 58Eu

3.1. Wachstum von Stamm 58Eu auf ätherischen Ölen

Die Kultivierung von *Thauera* sp. Stamm 58Eu auf Fichtennadel- und Pfefferminzöl, das in Heptamethylnonan gelöst war, verdeutlichte die selektive Umsetzung einzelner Monoterpene aus dem angebotenen Gemisch. Das verwendete Fichtennadelöl (*Abies* sp., *Picea* sp. u. a.) setzte sich aus ca. 26,4 % Limonen, 24,5 % α -Pinen, 17,8 % Camphen, 15,1 % Bornylacetat und 5,4 % β -Pinen zusammen. Beim denitrifizierenden Wachstum von Stamm 58Eu auf Fichtennadelöl nahmen innerhalb von 25 Tagen Limonen um 71 %, Terpinolen um 87 % und Sabinen um 100 % ab, auf Pfefferminzöl war nach vier Tagen 1,8-Cineol (Eucalyptol) vollständig abgebaut. Der Gehalt an *p*-Cymol stieg auf 208 % an. Andere Komponenten des Pfefferminzöls wurden nicht umgesetzt, auch nach 3 Monaten war keine weitere Nitratreduktion feststellbar.

3.2. Transformationsprodukte des Eucalyptolabbaus

In mit Eucalyptol wachsenden Kulturen von Stamm 58Eu wurden die Monoterpene α -Terpinen, γ -Terpinen und Terpinolen in geringen Mengen in der organischen Trägerphase gefunden. Die Verbindungen wurden gaschromatographisch direkt aus der organischen Heptamethylnonan-Phase nachgewiesen (Nachweisgrenze der Analyse: 10 μ M), und die Identifikation der Substanzen erfolgte mit zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität. Die detektierten Monoterpene waren nicht in der als Kohlenstoffquelle eingesetzten Reinsubstanz enthalten und Eucalyptol war unter den Versuchsbedingungen chemisch stabil, d.h. die Substanzen wurden in sterilen Kontrollansätzen unter anoxischen Bedingungen nicht abiotisch gebildet.

3.3. Anaerober Abbau mono- und bicyklischer Monoterpene durch Stamm 58Eu

Beim Wachstum von *Thauera* sp. Stamm 58Eu auf einem Gemisch mono- und bicyklischer Monoterpene (Mix 2), das *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, Limonen, α -Terpinen, γ -Terpinen, *p*-Cymol, Eucalyptol, Terpinen-4-ol, Sabinen, 2-Caren, 3-Caren und α -Pinen enthielt, wurde die Abnahme des Monoterpenalkohols Terpinen-4-ol und des Monoterpenethers Eucalyptol unter gleichzeitiger Nitratreduktion beobachtet. Eine Metabolisierung anderer mono- und bicyklischer Monoterpene war innerhalb von 17 Tagen analytisch nicht nachzuweisen. Dieses deutet darauf hin, daß die Umsetzung von α -Phellandren, α -Terpinen, γ -Terpinen, Limonen und Sabinen durch die Anwesenheit einer oder mehrerer der nicht-wachstumsfördernden Monoterpene *p*-Menth-1-en, *p*-Cymol, 2-Caren, 3-Caren und α -Pinen gehemmt wurde.

4. *Alcaligenes* sp.

4.1. Wachstum auf ätherischem Fichtennadelöl

Die *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 65Car und 65Phen wurden mit Fichtennadelöl (0,2 %, v/v in HMN) als Kohlenstoffquelle kultiviert. Als Inokulum wurden Kulturen verwendet, die auf dem jeweiligen Isolationssubstrat und Nitrat gewachsen waren. Im Verlauf der Inkubation zeigte sich, daß die im ätherischen Fichtennadelöl enthaltenen Monoterpenkohlenwasserstoffe von den *Alcaligenes* sp. Stämmen metabolisiert wurden. Ein Vergleich der prozentualen Abnahme der identifizierten Monoterpene ergab keinen Hinweis auf einen sequentiellen Abbau bi- und monozyklischer Monoterpene. Vielmehr blieb die relative Abnahme der einzel-

Tab. 15. Abbau (oder Transformation) der Monoterpene während des Wachstums von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin auf ätherischem Fichtennadelöl und Nitrat nach 4, 7, 11 und 14 Tagen (relative Ab-/Zunahme der Monoterpene bezogen auf die Peakfläche zum Zeitpunkt T = 0 d mit Camphen als internen Standard, prozentuale Zusammensetzung des Fichtennadelöls (s. Tab. G6, im Anhang).

Monoterpen	Struktur	T = 4 d	T = 7 d	T = 11 d	T = 14 d
Sabinen	C ₆ -C ₃ -Bicyklus	100	100	100	100
Terpinolen	C ₆ -Monozyklus	63,4	96,9	97,4	98,2
Limonen	C ₆ -Monozyklus	48,3	75,1	83,5	87,2
α -Pinen	C ₆ -C ₄ -Bicyklus	16,7	38,7	51,2	56,9
β -Pinen	C ₆ -C ₄ -Bicyklus	18,2	38,8	52,1	58,0
3-Caren	C ₆ -C ₃ -Bicyklus	7,0	18,5	28,4	32,7
Myrcen	azyklisch	4,9	5,1	3,6	2,0
<i>p</i> -Cymol	C ₆ -Monozyklus	+ 85,4	+ 118,8	+ 128,6	+ 128,3

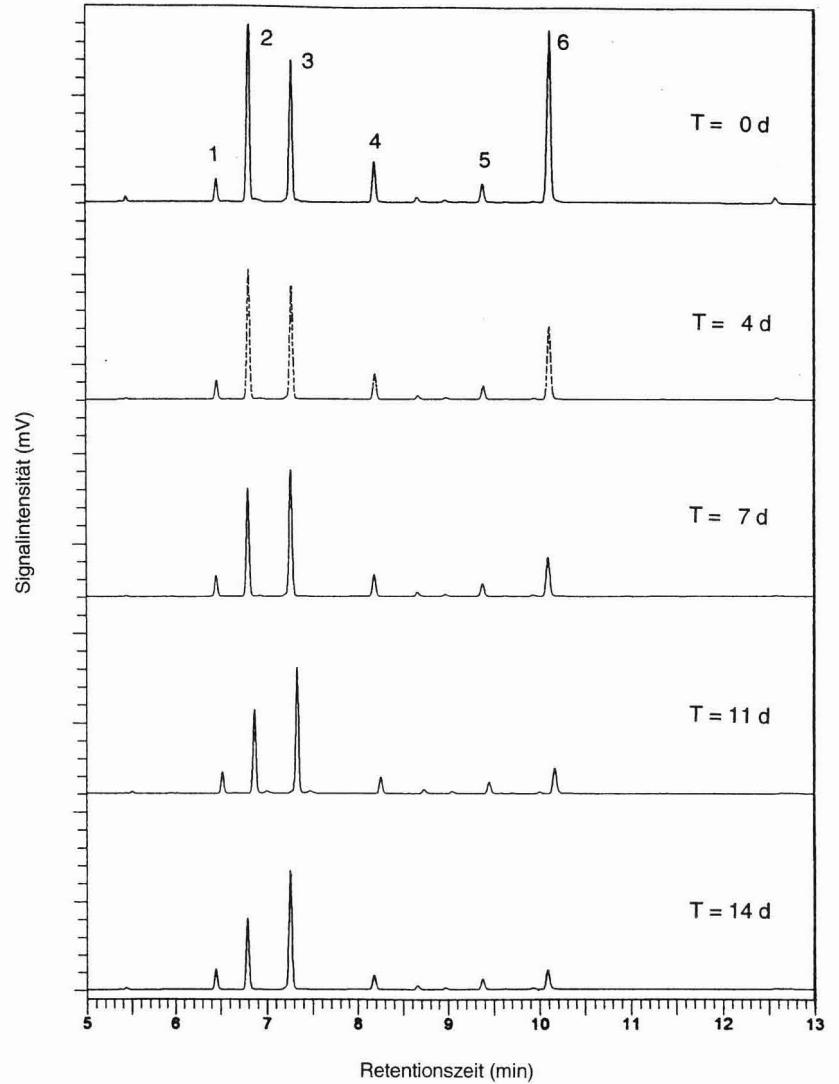


Abb. 27. Gaschromatographische Analysen der organischen Phase (Ausschnitt des Elutionsfensters der Monoterpene: 1, Tricyclen, 6.47 min; 2, α -Pinen, 6.82 min; 3, Camphen, 7.28 min; 4, β -Pinen, 8.22 min; 5, 3-Caren, 9.42 min; 6, Limonen, 10.14 min) während des Wachstums von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin auf Fichtennadelöl und Nitrat im Zeitraum von 14 Tagen. Camphen diente als interner Standard.

nen Monoterpene im Vergleich zueinander über den gesamten Versuchszeitraum gleich, d.h. die Bakterienstämme metabolisierten die im Fichtennadelöl enthaltenen mono- und bicyclische Monoterpene zeitlich parallel. Neben der Abnahme zyklischer Monoterpene konnte die Zunahme des aromatischen Kohlenwasserstoffs *p*-Cymol beobachtet werden. Tab. 15 gibt exemplarisch den Verlauf des Abbau der Monoterpene über 14 Tage (Analyse der organischen Phase nach 4, 7, 11 und 14 Tagen) in wachsenden Kulturen von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin wieder.

Der Vergleich des denitrifizierenden Wachstums aller vier *Alcaligenes* sp. Stämme (51Men, 54Pin, 65Car und 65Phen) auf Fichtennadelöl (0,2 %, v/v in HMN) ergab ein ähnliches Bild. Die im Fichtennadelöl enthaltenen Monoterpene wurden zeitlich parallel abgebaut. Die in Tab. 16 wiedergegebenen Umsetzung entsprach ungefähr 0,6 - 1,0 mM "Gesamt-Monoterpene" (bezogen auf die wässrige Phase). Unter der Annahme einer vollständigen Mineralisation der Kohlenstoffquellen (C₁₀H₁₆, mittlere Summenformel) entspricht dies ca. 46 % - 77 % des theoretischen Elektronenbedarfs für die vollständige Denitrifikation von 10 mM Nitrat. Eine entsprechende Nitrat- und Zunahme der optischen Dichte war in den Kulturen zu beobachten.

Tab. 16. Abbau (oder Transformation) der identifizierten Monoterpene während des Wachstums der *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen auf Fichtennadelöl (0,2 %, v/v in HMN) nach 25 bzw. 14 Tagen (Stamm 54Pin). Angabe der relativen Abnahme der Monoterpene bezogen auf die Peakfläche zum Zeitpunkt T = 0 d mit Camphen als internen Standard (ISTD)).

Zusammensetzung des Fichtennadelöls (Monoterpene, %)		<i>Alcaligenes</i> sp.			
		Stamm 51Men	Stamm 65Phen	Stamm 62Car	Stamm 54Pin
Sabinen	0,1	- 100	- 100	- 100	- 100
Terpinolen	1,0	- 100	- 100	- 98,0	- 98,2
Limonen	0,9	- 98,5	- 87,8	- 92,4	- 87,2
Myrcen	0,7	- 83,2	- 100	- 70,9	- 2,0
α-Pinen	24,7	- 43,0	- 11,4	- 34,7	- 56,9
β-Pinen	5,5	- 40,7	- 3,5	- 23,4	- 58,0
3-Caren	2,6	- 75,3	- 15,8	- 61,4	- 32,7
Tricyclen	2,6	- 2,4	- 0,0	- 3,3	- 8,9
Camphen	18,2	ISTD	ISTD	ISTD	ISTD
<i>p</i> -Cymol	26,6	+ 430,0	+ 306,4	+ 655,7	+ 128,3

Neben Sabinen, das nur zu ca. 0,06 % im ätherischen Öl enthalten war, wurden bevorzugt die monozyklischen Monoterpenalkene Limonen und Terpinolen von allen vier Stämmen abgebaut. Bei der mikrobiellen Umsetzung der bicyklischen Monoterpene 3-Caren (C_3 - C_6 -Bizyklus), α - und β -Pinen (C_4 - C_6 -Bizyklen) zeigten sich geringe Unterschiede zwischen den Bakterienstämmen. Beide Strukturisomere des Pinens (α - und β -Pinen) wurden zu jeweils gleichen prozentualen Anteilen umgesetzt, jedoch von Stamm 65Phen insgesamt zu einem geringeren Teil. Kulturen der Stämme 51Men und 62Car bauten im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen einen höheren Anteil an 3-Caren ab. Auffällig war die Bildung der aromatischen Verbindung *p*-Cymol. Das azyklische Monoterpen Myrcen war im Unterschied zu den anderen Stämmen kein Wachstumssubstrat für *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin.

4.2. Transformationsprodukte des anaeroben Abbaus mono- und bicyklischer Monoterpenkohlenwasserstoffe

Beim denitrifizierenden Wachstum der *Alcaligenes* sp. Stämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen auf ihren jeweiligen Isolationssubstraten konnten die in Tab. 17 aufgeführten Monoterpene gaschromatographisch in Konzentrationen von 20 - 50 μ M direkt in der organischen Heptamethylnonan-Phase nachgewiesen werden (Nachweisgrenze der Analyse: 10 μ M). Die Identifikation der Substanzen erfolgte mittels authentischer Reinsubstanzen und Dualsäulen-Chromatographie. Die als Kohlenstoffquellen eingesetzten Monoterpene besaßen einen Reinheitsgrad von 95 - 99% (GC), enthielten nicht die gebildeten Metabolite (nach eigener Analyse) und waren unter den Versuchsbedingungen chemisch stabil.

Tab. 17. Monoterpen-Metabolite, die während des denitrifizierenden Wachstums gebildet wurden und direkt in der organischen Heptamethylnonan-Phase nachweisbar waren.

	Kohlenstoffquelle	während des Wachstums gebildete Metabolite (Monoterpene)
<i>Alcaligenes</i> sp.		
Stamm 51Men	<i>p</i> -Menth-1-en	keine
Stamm 54Pin	α -Pinen	α -Terpinen, Limonen, γ -Terpinen, Terpinolen, <i>p</i> -Cymol
Stamm 62Car	2-Caren	<i>p</i> -Cymol, Limonen, Terpinolen
Stamm 65Phen	α -Phellandren	α -Terpinen, β -Phellandren, <i>p</i> -Cymol, γ -Terpinen

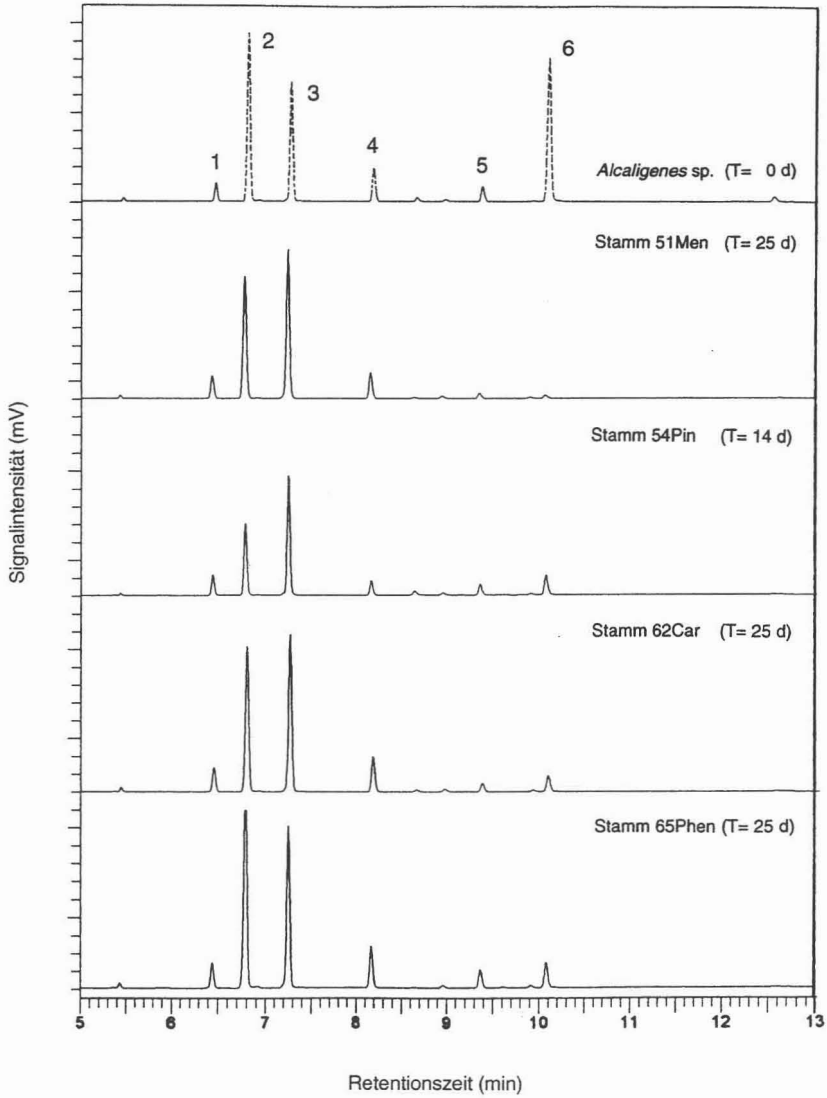


Abb. 28. Vergleichende Darstellung der Chromatogramme der gaschromatographischen Analysen der Heptamethylnonan-Phase aller vier *Alcaligenes* sp. Stämme nach Wachstum mit Fichtennadelöl und Nitrat nach 25 Tagen bzw. 14 Tagen (54Pin) (1, Tricyclen, 6.47 min; 2, α -Pinen, 6.82 min; 3, Camphen, 7.28 min; 4, β -Pinen, 8.22 min; 5, 3-Caren, 9.42 min; 6, Limonen, 10.14 min).

4.3. Anaerobe Oxidation mono- und bicyklischer Monoterpe durch Stamm 54Pin

Für die Untersuchung des Wachstums des Stamms 54Pin mit mono- und bicyklischen Monoterpenen wurde ein definiertes, äquimolares Gemisch verschiedener Monoterpe als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Monoterpe (*p*-Menth-1-en, α -Phellandren, Limonen, α -Terpinen, γ -Terpinen, *p*-Cymol, Eukalyptol, Terpinen-4-ol, Sabinen, 2-Caren, 3-Caren, α -Pinen) betrug jeweils 0,2 mM bezogen auf die wäßrige Phase. Die Wachstumsansätze wurden mit einer auf α -Pinen und Nitrat gewachsenen Kultur beimpft. Die Analyse der organischen Heptamethylnonan-Phase im Verlauf des denitrifizierenden Wachstums des Stamms 54Pin mit Mix 2 zeigte die Abnahme der angebotenen Mono- und Bicyklen unter gleichzeitiger Reduktion von Nitrat und Zunahme der optischen Dichte. Eucalyptol wurde nicht metabolisiert und deshalb als interner Standard verwendet. Der zeitliche Verlauf der Umsetzung der eingesetzten Monoterpe ist in Abb. 29 gezeigt.

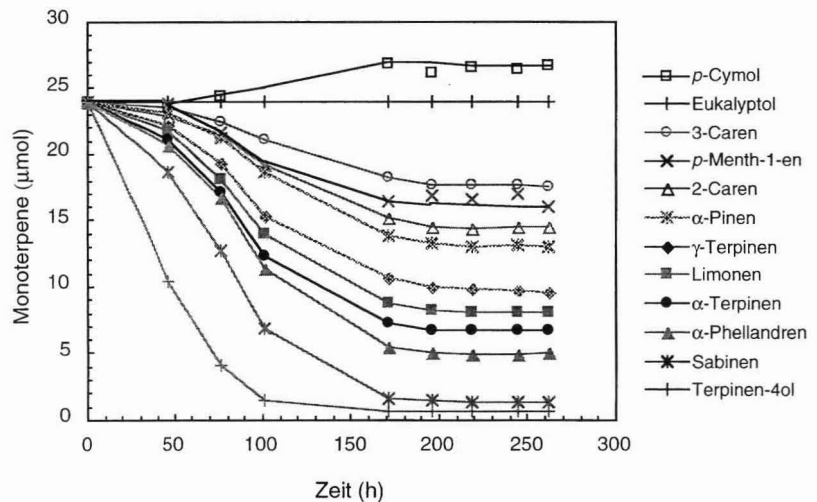


Abb. 29. Abnahme der Monoterpe beim anaeroben Wachstum von Stamm 54Pin auf äquimolaren Mengen verschiedener Monoterpenkohlenwasserstoffe (0,2 mM) und Nitrat (10 mM). Eucalyptol diente als interner Standard der Analysen.

Nach vollständiger Reduktion des Nitrats (nach 262 Stunden) ergab sich die in Tab. 18 dargestellte Abnahme der als Kohlenstoffquellen angebotenen Monoterpe (angegeben ist die relative Abnahme der eingesetzten Monoterpe im Verhältnis zur Ausgangskonzentration).

Tab. 18. Wachstum von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin mit äquimolaren Mengen verschiedener mono- und bicyklischer Monoterpene in Gegenwart von Nitrat

Monoterpen	Struktur	Abnahme bzw. Bildung der Monoterpene (%)
Terpinen-4-ol	C ₆ -Monozyklus	- 97,0
Sabinen	C ₆ -C ₃ -Bicyklus	- 94,2
α-Phellandren	C ₆ -Monozyklus	- 79,1
α-Terpinen	C ₆ -Monozyklus	- 72,1
Limonen	C ₆ -Monozyklus	- 66,5
γ-Terpinen	C ₆ -Monozyklus	- 60,2
α-Pinen	C ₆ -C ₄ -Bicyklus	- 45,6
2-Caren	C ₆ -C ₃ -Monozyklus	- 39,7
<i>p</i> -Menth-1-en	C ₆ -Monozyklus	- 33,1
3-Caren	C ₆ -C ₃ -Bicyklus	- 26,8
<i>p</i> -Cymol	C ₆ -Monozyklus	+ 11,3

Beim anaeroben Wachstum von Stamm 54Pin mit äquimolaren Mengen mono- und bicyklischer Monoterpene wurde die eingesetzten Monoterpene gleichzeitig abgebaut (siehe Abb. 29). Neben der scheinbar bevorzugten Umsetzung des monozyklischen Monoterpenalkohols Terpinen-4-ol (97,0 %) und der bicyklischen Verbindung Sabinen wurden insbesondere die angebotenen Monozyklen α-Phellandren, α-Terpinen, Limonen und γ-Terpinen, wobei sich diese Isomere in der Position der beiden Doppelbindungen unterscheiden, zu mehr als 60 % abgebaut. Im Gegensatz zu den *p*-Menthadienen wurde *p*-Menth-1-en hingegen nur zu 33,1 % umgesetzt. Der relative Abbau der bicyklischen Verbindung Sabinen (94,2%) lag im Vergleich zu den anderen C₆-C₃-Bicyklen 2-Caren (39,7 %) und 3-Caren (26,8 %) sowie zu α-Pinen (C₆-C₄-Bicyklus; 45,6 %) deutlich höher.

Welche Bedeutung die bessere Löslichkeit und damit Bioverfügbarkeit des einzigen Alkohols (Terpinen-4-ol) bei der erzielten Umsetzung von 97,0 % hat, konnte aus diesem Experiment nicht abgeleitet werden. Unter den Versuchsbedingungen fanden sich die übrigen Monoterpenkohlenwasserstoffe ca. 95 % der eingesetzten Substanzmenge in der organischen Trägerphase (Tab. G5, Anhang). Unterschiede in der Löslichkeit und damit Verfügbarkeit der einzelnen mono- und bicyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffe in den Kulturansätzen wurden aufgrund der Ergebnisse der Analysen der organischen Phase als vernachlässigbar angesehen. Die beobachteten Unterschiede in der mikrobiellen Umsetzung verschiedener Strukturisomere der terpenkohlenwasserstoffe ist möglicherweise auf die Reaktivität dieser Moleküle zurückzuführen. *p*-Cymol wurde nicht metabolisiert, vielmehr wurde diese aromatische Verbindung während des denitrifizierenden Wachstums von Stamm 54Pin gebildet.

4.4. Einfluß von Monoterpenalkoholen auf den anaeroben Abbau mono- und bizyklischer Monoterpene

Der Einfluß von strukturverwandten Monoterpenalkoholen auf das Wachstum der *Alcaligenes* sp. auf Monoterpenalkenen wurde untersucht, um Hinweise auf Kohlenstoffatome und -bindungen der Monoterpene zu erhalten, die möglicherweise an der Aktivierung oder an der Ringspaltung beteiligte sind. Monoterpenalkohole mit Ausnahme von Terpinen-4-ol und α -Terpineol waren keine Wachstumssubstrate für *Alcaligenes* sp. (siehe Abschnitt 2.2. in Teil II der Ergebnisse). Um zu klären, ob eine beobachtete Hemmung des anaeroben Wachstums auf Monoterpenkohlenwasserstoffen spezifisch für den Metabolismus des Monoterpens war, wurde in parallelen Experimenten Acetat (20 mM) anstelle der Monoterpenkohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle angeboten. In Gegenwart von äquimolaren Mengen an Monoterpenkohlenwasserstoffen und -alkoholen (je 2,4 mM) wurde die Inhibierung des Wachstums von Stamm 65PHe mit α -Phellandren und Nitrat (10 mM) durch die Monoterpenalkohole Myrtenol, Isopinocampheol, Perillylalkohol, Carveol und Isopulegol (*cis*-Verbenol wurde nicht getestet) beobachtet. Eine generelle Hemmung des Stoffwechsels war in Gegenwart der Monoterpenalkohole Perillylalkohol und Carveol mit Acetat (20 mM) als Kohlenstoffquelle zu beobachten. Analoge Ergebnisse wurden für das Wachstum von Stamm 54Pin mit α -Pinen in Gegenwart der Monoterpenalkohole erhalten. Zusätzlich wurde das Wachstum mit Acetat durch den Monoterpenalkohol Myrtenol inhibiert.

Alle getesteten Monoterpenalkohole hemmten das anaerobe Wachstum von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin auf α -Pinen; die Metabolisierung von α -Pinen wurde in Gegenwart der Monoterpenalkohole in Konzentrationen von 500 μ M und 1000 μ M inhibiert. Im Gegensatz dazu hatte die aromatische Verbindung *p*-Cymol keinen Einfluß auf die anaerobe Monoterpenoxidation (Tab. 19). Eine spezifische Inhibierung der katabolen Umsetzung von α -Pinen durch Stamm 54Pin erfolgt durch Myrtenol, Perillylalkohol und Carveol bereits in Gegenwart von 100 μ M dieser Monoterpenalkohole. Das Wachstum von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin war mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle (20 mM) und Nitrat (10 mM) auch in Gegenwart der Monoterpenalkohole (500 μ M) möglich, die Wachstumsraten waren jedoch insbesondere mit Isopinocampheol, Perillylalkohol und Carveol geringer als in Abwesenheit dieser Monoterpenalkohole. Dies deutet auf eine gleichzeitige unspezifische Hemmung des mikrobiellen Gesamtstoffwechsels in Gegenwart dieser Alkohole hin.

Tab. 19. Wachstumsraten (h^{-1}) des Stammes 54Pin auf α -Pinen (2 mM) und Nitrat (10 mM) in Gegenwart von Monoterpenalkoholen bzw. *p*-Cymol (Wachstum in 10 ml Selektivmedium und 0,5 ml Heptamethylnonan als Trägerphase) und auf Acetat (20 mM) in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Monoterpenalkoholen

Konzentration	Myrtenol	Isopino- campeol	<i>cis</i> - Verbenol	<i>p</i> -Cymol	Perillyl- alkohol	Carveol	Iso- pulegol
<i>Wachstumsraten (h^{-1}) mit α-Pinen (2 mM)</i>							
0 μ M	0,009	0,006	0,021	0,023	0,022	0,022	0,024
1 μ M	0,009	0,007	0,022	0,032	0,014	0,014	0,030
10 μ M	0,010	0,008	0,016	0,020	0,019	0,019	0,024
100 μ M	0	0,007	0,015	0,014	0	0	0,028
200 μ M	0	0,004	0,007	0,023	0	0	0,014
500 μ M	0	0	0	0,023	0	0	0
1000 μ M	0	0	0	0,012	0	0	0
<i>Wachstumsraten (h^{-1}) mit Acetat (20 mM)</i>							
0 μ M	0,096	0,167	0,181	0,190	0,149	0,140	0,140
500 μ M	0,108	0,053	0,180	0,266	0,095	0,076	0,117

Teil IV - Mikrobieller Abbau von Monoterpenen unter anoxischen Bedingungen

1. Populationsgröße monoterpenverwertender, nitratreduzierender Bakterien

Eine Abschätzung der Populationsgröße monoterpenverwertender Bakterien zweier mikrobieller Standorte (Belebtschlamm und Boden unter Fichten) wurde mittels serieller Verdünnungsreihen (Most Probable Number (MPN-Zellzahl)) verglichen. Als Kohlenstoffquellen wurden Fermentationsprodukte, ein Gemisch aus fünf Monoterpenen oder α -Terpinen angeboten. Mit den Produkten des fermentativen Abbaus organischer Polymere (Acetat, Lactat, Butyrat, Succinat und Ethanol) ergaben sich Zellzahlen von 10^8 Bakterien/ml für Belebtschlamm bzw. 10^7 Bakterien/ml für Proben, die aus Böden unter Nadelbäumen (Fichten) entnommen wurden. Mit Monoterpenen (im Gemisch oder als Einzelsubstanz) als Kohlenstoffquelle wurden Zellzahlen von 10^6 /ml bis 10^7 /ml für beide Standorte erreicht. Unter der Annahme, daß mit den angebotenen kurzkettigen Fettsäuren die Population der denitrifizierenden Mikroorganismen vollständig erfaßt wurde, waren ungefähr 1 % der Mikroorganismen in der Belebtschlammprobe fähig, Monoterpene unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von Nitrat zu verwerten. Dagegen konnte ein Großteil der Mikroorganismen der Bodenprobe Monoterpene abbauen (Tab. 20).

Tab. 20. Abschätzung der Bakterienzellzahlen denitrifizierender Bakterien unter anoxischen Wachstumsbedingungen mittels most probable number estimation (MPN-Zellzahl) (American Public Health Association, 1969)

Elektronendonator und Kohlenstoffquelle	Belebtschlamm (Bakterienzellen/ml)	Waldboden (Bakterienzellen/ml)
Fettsäure-Gemisch (Acetat, Lactat, Butyrat, Succinat, Ethanol)	$4,7 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$
Monoterpen-Gemisch (α -Terpinen, Eucalytol, Sabinen, 2-Caren, α -Pinen)	$3,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
Monoterpen (α -Terpinen)	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$

Die Bestimmung der Nitrat-Abnahme bestätigte das beobachtete Wachstum in den einzelnen Verdünnungsstufen. Die gaschromatographische Analyse der organischen Heptamethylnonan-Phase gewachsener MPN-Röhrchen der Ansätze mit Belebtschlamm und Waldboden ergab, daß die im Monoterpengemisch enthaltenen Monoterpene unter nitratreduzierenden Bedingungen abgebaut wurden.

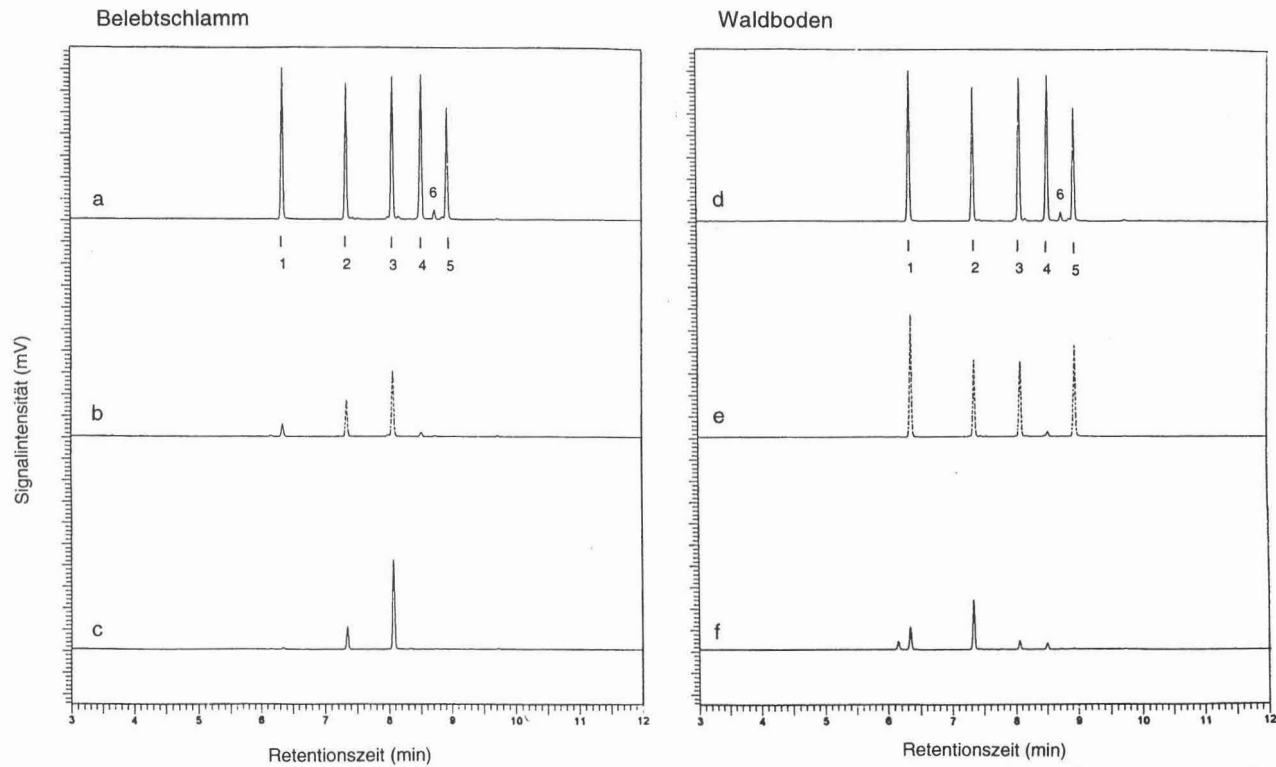


Abb. 30. Gaschromatographische Analyse der organischen Phase aus einzelnen Verdünnungsstufen (links: b, 10⁻⁶; c, 10⁻³ bzw. rechts: e, 10⁻⁷; f, 10⁻⁴) je einer seriellen Verdünnungsreihe zur Zellzahlbestimmung (MPN) nach 8-wöchiger Inkubation mit Proben aus Belebtschlamm (links) bzw. Waldboden (rechts). (a und d: Monoterpene vor Inkubation; 1, α-Pinen, 6.40 min; 2, Sabinen, 7.40 min; 3, 2-Caren, 8.13 min; 4, α-Terpinen, 8.58 min; 5, Eucalyptol, 9.00 min; 6, p-Cymol, 8.78 min).

2. Abbau von Monoterpenkohlenwasserstoffen und Bildung von *p*-Cymol unter methanogenen Bedingungen

Der anaerobe Abbau von mono- und bicyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen unter methanogenen Bedingungen wurde unter Verwendung von Belebtschlamm und mit α -Phellandren, Sabinen, 2-Caren und α -Pinen getestet. Die eingesetzten Monoterpene waren über einen Zeitraum von 70 Tagen in Anwesenheit von autoklaviertem Belebtschlamm chemisch stabil, d. h. ein abiotischer Abbau fand nicht statt. In den Ansätzen mit Belebtschlamm waren 2-Caren und α -Pinen auch nach 70 Tagen chemisch unverändert. Nach 19 Wochen jedoch waren α -Pinen und 2-Caren in den mit Belebtschlamm beimpften Anreicherungskulturen nicht mehr bzw. nur noch zu 30 % nachweisbar, ohne daß weitere Substanzen in der gaschromatographischen Analyse der organischen Phase erfaßt wurden.

Dagegen begann der Abbau der Monoterpene α -Phellandren und Sabinen in einem Zeitraum von 20 - 25 Tagen (Abb. 31 und 32). Parallel zu der Abnahme von α -Phellandren und Sabinen wurde die Bildung einer Substanz gaschromatographisch nachgewiesen, die durch gaschromatographisch-massenspektroskopische Analyse und durch eine Additionsanalyse mit der authentischen Reinsubstanz als *p*-Cymol identifiziert wurde. Einige in der GC-Analyse zusätzlich detektierbare Peaks konnten aufgrund der geringen Substanzmenge nicht mittels GC/MS identifiziert werden.

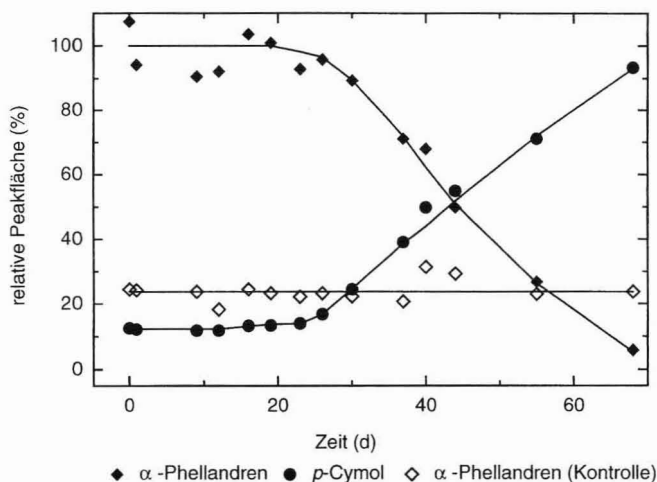


Abb. 31. Nahezu stöchiometrische Transformation von α -Phellandren zu *p*-Cymol in einer Anreicherungskultur (0. Passage) unter methanogenen Bedingungen. Die Zunahme des Transformationsprodukts *p*-Cymol wurde auf die relative Abnahme von α -Phellandren bezogen. Die eingesetzte Menge an Monoterpen (1,2 mmol α -Phellandren pro l Medium = 100 %) entsprach einer Peakfläche von 570.000 zu Beginn der Anreicherung (T = 0 d). Die Kontrolle enthielt ein Viertel der Monoterpenmenge des Wachstumsansatzes.

Um zu überprüfen, ob die Bildung von *p*-Cymol unter der Annahme, daß molekularer Wasserstoff freigesetzt wird, ein mikrobielles Wachstum ermöglicht, wurde die Anreicherungskulturen mit α -Phellandren und Sabinen auf ein Minimalmedium für methanogene Bakterien transferiert, das Acetat (2 mM) als Kohlenstoffquelle enthielt. Der anaerobe Abbau von Sabinen setzte ohne zeitliche Verzögerung ein (Abb. 32), innerhalb von 15 Wochen wurden 84,2 % des zugegebenen Sabinens umgesetzt. Allerdings wurde im Gegensatz zur 1. Anreicherungskultur *p*-Cymol nicht in stöchiometrischen Mengen gebildet, vielmehr wurde ein Teil des Sabinens in Form von Transformationsprodukten wie α -Terpinen, α -Thujen und γ -Terpinen gefunden (Tab. 21). Ein weiterer Teil des Sabinens (ca. 20 %) wurde zu Substanzen abgebaut, die mit der gaschromatographischen Analytik, die sich auf den Nachweis neutraler, unpolarer Substanzen beschränkte, nicht erfaßt wurden.

In einer pasteurisierten Folgepassage wurden insgesamt nur 0,5 % des umgesetzten Sabinens als *p*-Cymol nachgewiesen. In einer unbeimpften, chemischen Kontrolle lag der diffusionsbedingte Verlust an Sabinen nach 15 Wochen bei 9,5 %, ohne daß *p*-Cymol abiotisch gebildet wurde.

Tab. 21. Transformationsprodukte einer Anreicherungskultur (1. Passage) auf Sabinen unter methanogenen Bedingungen (nach 15 Wochen)

	beimpfter Ansatz	pasteurisierter Ansatz	unbeimpfter Ansatz
zugesezte Sabinenmenge	2,45 mmol	2,45 mmol	0,24 mmol
Sabinenabnahme	2,06 mmol	0,60 mmol	0,02 mmol
Transformationsprodukte ¹			
α -Thujen (KI= 929) ²	9,4 %	6,7 %	0,0 %
γ -Terpinen (KI= 1063)	25,4 %	20,9 %	0,0 %
α -Terpinen (KI= 1021)	2,3 %	8,5 %	0,0 %
<i>p</i> -Cymol (KI= 1028)	44,0 %	0,5 %	0,0 %

¹ Zunahme der Peakfläche der Transformationsprodukte bezogen auf die Abnahme der Peakfläche von Sabinen (100 %)

² Kovats-Indizes (KI) ermittelt auf einer SE-54-Kapillarsäule mit folgendem Temperaturprogramm 60 °C für 2 min, 5 °C/min, 120 °C für 0.1 min, 20 °C/min, 220 °C für 5 min

Folgepassagen der Anreicherungskulturen mit α -Phellandren unter methanogenen Bedingungen zeigten nach 15 Wochen keine *p*-Cymolbildung. Auch das Auftreten neuer Substanzpeaks in den gaschromatographischen Analysen der Kontrollansätze oder pasteurisierten Ansätze wurde nicht beobachtet.

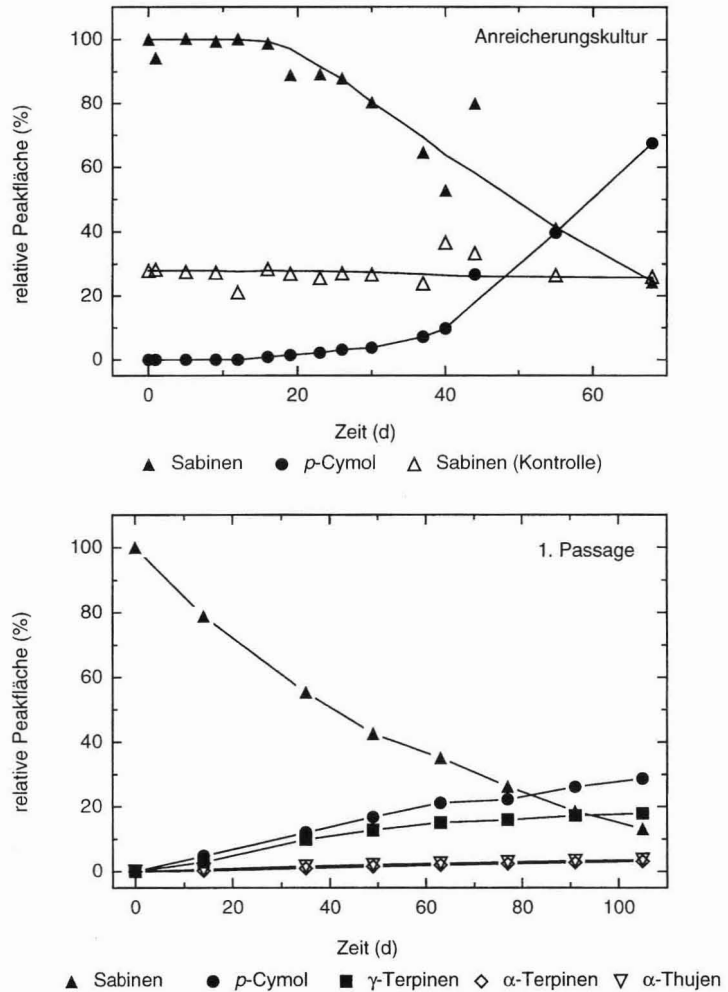


Abb. 32. Zeitlicher Verlauf der Oxidation von Sabinen zu *p*-Cymol in der Anreicherungskultur und der Bildung von Transformationsprodukten in der anschließenden 1. Passage (unten) unter anoxischen (methanogenen) Bedingungen. Die eingesetzte Menge an Sabinen (1.2 mmol pro l Medium) entsprach einer Peakfläche von 895.000 (= 100 %) zu Beginn der Anreicherung (0. Passage). Der Kontrollansatz enthielt nur ein Viertel der Monoterpenmenge. Die Zunahme der gebildeten Transformationsprodukte wurde in beiden Anreicherungskulturen auf die Abnahme von Sabinen bezogen. In der 1. Passage der Anreicherungskultur entsprachen 100 % Sabinen einer eingesetzten Monoterpenmenge von 16,3 mmol pro l Medium bei einer Peakfläche von 1.783.000.

3. Anaerobe Oxidation von α -Pinen unter methanogenen Bedingungen

Nach 19 Wochen war α -Pinen in der Anreicherungskultur (0. Passage) unter anoxischen Bedingungen gaschromatographisch nicht mehr nachweisbar (Abschnitt 2). Die Abnahme von α -Pinen war dabei gleichzeitig mit einer Gasbildung gekoppelt. Innerhalb von 17 Wochen nahm der Gehalt an α -Pinen in der 1. Passage um 90 % ab, im selben Zeitraum war in pasteurisierten oder unbeimpften Kontrollen keine Gasbildung zu beobachten, und der diffusive Verlust an Monoterpen lag unter 10 % (Tab. 22, Abb. 33). Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß ein anaerober Abbau von α -Pinen möglicherweise auch unter methanogenen Bedingungen erfolgen kann.

Tab. 22. Abbau von α -Pinen in der 1. Passage der Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen nach 17 Wochen.

	Ansatz 1	Ansatz 2	past. Ansatz
zugesetztes α -Pinen (mmol)	0,125	0,625	0,125
α -Pinen-Abnahme (mmol)	0,115	0,294	0,010
Gasbildung (ml)	16	37	1
theoretisch gebildetes Methan (ml) ¹	19	49	0

¹ unter der Annahme der Dissimilation von α -Pinen entsprechend der Gleichung: $1 C_{10}H_{16} + 7 HCO_3^- + 7 H^+ \rightarrow 10 CO_2 + 7 CH_4$ und dem Molvolumen eines Gases bei 25 °C von 24 l.

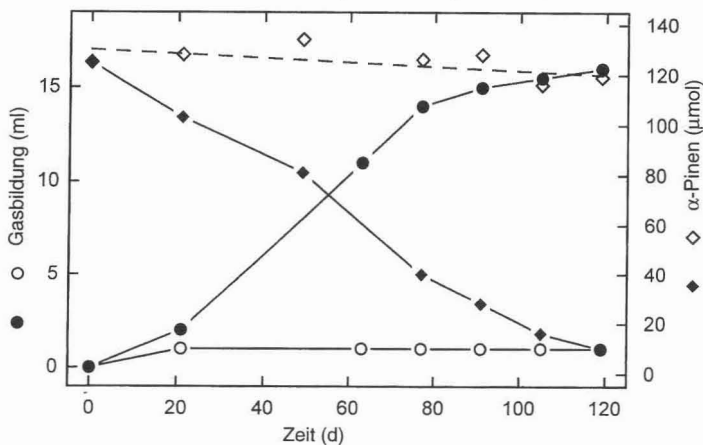


Abb. 33. Gasbildung und Abnahme von α -Pinen in beimpften (● und ◆) und pasteurisierten (○ und ◇) Ansätzen der 1. Passage einer Anreicherungskultur unter methanogenen Bedingungen.

D. DISKUSSION

1. Taxonomische Einordnung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme

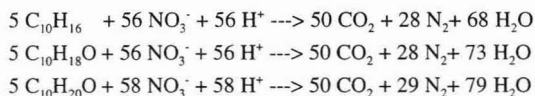
Die Anreicherungen auf den Monoterpenen Linalool, Menthol und Eucalyptol sowie *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, 2-Caren und α -Pinen führten zur Isolierung von nitratreduzierenden Bakterien (Harder und Probian, 1995). Die phylogenetische Einordnung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme 47Lol, 21Mol und 58Eu aufgrund der 16S rDNS-Sequenzdaten ergab, daß diese Stämme nahe mit Organismen der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria* verwandt sind. Die Erstellung des Stammbaums gruppierte die Stämme 47Lol, 58Eu und 21Mol zusammen mit *Thauera* spp. und separat von *Azoarcus* spp. Die Gattung *Thauera* innerhalb der β 2-Untergruppe der *Proteobacteria* (nach Woese, 1987) wurde erstmals für das Bakterium *T. selenatis* definiert, welches Selenat als terminalen Elektronakzeptor zu Selenit reduziert (Macy et al., 1993). Daneben sind mit *Thauera aromatica* (Anders et al., 1995; Gallus et al., 1998) und *Thauera* sp. Stamm mXyN1 (Rabus und Widdel, 1995a) weitere Bakterienstämme dieser Gattung beschrieben, die unter nitratreduzierenden Bedingungen aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen abbauen können. Stämme der Gattung *Azoarcus* (*A. evansii*, *A. toluolyticus*, *Azoarcus* sp. 22Lin) besitzen ebenfalls die Fähigkeit, anaerob auf Kohlenwasserstoffverbindungen zu wachsen (Anders et al., 1995; Zhou et al., 1995; Harder, 1997). Andere Spezies der Gattung *Azoarcus* wurden zuerst aus Rhizosphären-gemeinschaften des Kallargrasses (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) isoliert und sind strikt respiratorische, Stickstoff-fixierende Bakterien (Reinhold-Hurek et al., 1993; Hurek et al., 1997). Der G+C-Gehalt und die Bestimmung der Fettsäureprofile dieser drei Stämme bestätigten die Verwandtschaft mit *Thauera* spp. und *Azoarcus* spp. Aufgrund der Daten der 16S rDNS-Sequenzierung und der DNS-DNS-Hybridisierung der Stämme 47Lol, 21Mol und 58Eu wird vorgeschlagen, Stamm 47Lol als neue Spezies *T. linaloolentis* und die Stämme 21Mol und 58Eu als *T. terpenica* mit Stamm 58Eu als Typstamm innerhalb der Gattung *Thauera* zu definieren. Der DNS-DNS-Reassoziationswert der Stämme 21Mol und 58Eu läßt keine eindeutige Differenzierung in verschiedene Spezies zu, auch wenn die beiden Stämme sich physiologisch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, unterschiedliche Monoterpene zu metabolisieren, deutlich voneinander unterscheiden.

Die Untersuchungen der 16S rDNS-Sequenzen der monoterpenverwertenden, nitratreduzierenden Bakterienstämme 51Men, 54Pin, 62Car und 65Phen ergaben, daß diese neu isolierten Stämme nahe miteinander verwandt sind. Die 16S Sequenzen aller vier Stämme hatten den höchsten Ähnlichkeitsgrad mit 16S rDNS-Sequenzen von *Bordetella* spp. und *Alcaligenes* spp. Mitglieder der Gattungen *Bordetella* und *Alcaligenes*, die der Familie Alcaligenaceae angehören (De Ley et al., 1986), kommen in verschiedenen ökologischen Nischen vor. Während

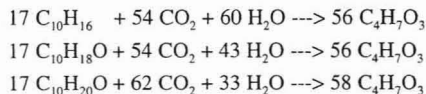
Bordetella Spezies (*B. pertussis*, *B. paratussis*, *B. bronchisepta*) als pathogene Organismen des Respirationstrakts von Menschen und Tieren isoliert wurden, stammten die beschriebenen *Alcaligenes* Spezies (*A. xylooxidans*, *A. denitrificans*, *A. faecalis* und *A. piechaudii*) aus der Umwelt oder humanem Probenmaterial, kommen jedoch nicht in den Atemwegen des Menschen vor. Die genannten *Alcaligenes* Spezies mit Ausnahme von *A. faecalis* sind zur Denitrifikation bzw. zur Bildung von Nitrit (aus Nitrat) fähig, jedoch nicht die untersuchten Bakterienstämme von *Bordetella paratussis* (Vandamme et al., 1996). Auch die Analyse der bakteriellen Fettsäuren bestätigten die Zuordnung der monoterpenverwertenden Bakterienstämme zur β -Gruppe der *Proteobacteria*, wobei diese Stämme sich von *Bordetella* Spezies auf der Basis der prozentualen Zusammensetzung der Bakterienzellfettsäuren unterschieden. Aufgrund der Ergebnisse der Analysen der Bakterienzellfettsäuren und der Unterschiede in den 16S rDNS-Sequenzen der monoterpenverwertenden Bakterienstämme von mindestens 3,3 % zu *B. paratussis*, *A. xylooxidans*, *A. denitrificans* und *A. faecalis* wird 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.

2. Nachweis des anaeroben Abbaus von Monoterpenen durch nitratreduzierende Bakterien

Die Bilanzierung des denitrifizierenden Abbaus der Monoterpene Linalool, Menthol und Eucalyptol sowie α -Pinen durch die Stämme 47Lol, 21Mol, 58Eu bzw. 54Pin ergab die vollständige Mineralisierung azyklischer, monozyklischer und bizyklischer Verbindungen: Unter Berücksichtigung der Assimilation eines Teils der Monoterpene zu Zellbiomasse konnte gezeigt werden, daß die durch Dissimilation des eingesetzten Monoterpens gebildeten Reduktionsäquivalente den für die Reduktion von Nitrat zu elementarem Stickstoff notwendigen Reduktionsäquivalente entsprachen (Tab. 13). Die anaerobe Oxidation der Monoterpene erfolgt entsprechend der nachfolgenden Gleichungen für die Dissimilation



unter der Annahme der Assimilation der Monoterpene entsprechend der Gleichungen



3. Hypothesen zur anaeroben Oxidation der Monoterpene in denitrifizierenden Bakterien

3.1. Linalool

Thauera sp. Stamm 47Lol, der mit Linalool in Gegenwart von Nitrat isoliert wurde, wuchs von allen untersuchten Monoterpenen alternativ nur mit Geraniol (*trans*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) als Kohlenstoffquelle. Andere methylverzweigte Alkohole wie Citronellol (3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol) und 3,7-Dimethyl-1-octanol oder Alkene bzw. Alkane wie 3,7-Dimethyl-1-octen oder 2,6-Dimethyloctan wurden nicht metabolisiert.

Der aerobe Abbau der azyklischen Monoterpenalkohole Citronellol, Geraniol und Linalool verläuft in *Pseudomonas putida* var. *incognita* über die Hydroxylierung der terminalen Methylgruppe (Madyastha et al., 1977; Ullah et al., 1990). Daneben wuchs *P. putida* var. *incognita* auch mit α -Terpineol, monozyklischen *p*-Menthadienen oder *p*-Cymol, wobei unter aeroben Bedingungen die Oxygenierung der C7-Methylgruppe zu den entsprechenden Säuren anzunehmen ist (Madyastha und Renganthan, 1984). Von Madyastha et al. (1977) wurde die Zyklisierung von Linalool zu α -Terpineol und der nachfolgende oxidative Abbau als zweiter alternativer Abbaupfad in *Pseudomonas putida* postuliert. Linalool unterliegt jedoch unter dem Einfluß von Säuren leicht der Isomerisierung zu Geraniol und Nerol und zu α -Terpineol (Bauer und Garbe, 1992). α -Terpineol oder andere zyklische Verbindungen (Limonen, α -Terpinen, γ -Terpinen oder *p*-Cymol) waren jedoch keine Kohlenstoffquellen für *Thauera* sp. Stamm 47Lol. Die Bildung zyklischer Intermediate beim anaeroben Wachstum von Stamm 47Lol auf Substratgemischen azyklischer Kohlenwasserstoffe wurde nicht beobachtet, insbesondere Hinweise auf die Zyklisierung von Linalool zu α -Terpineol wurden nicht gefunden.

In Gegenwart von verdünnten Säuren führt die chemische Reaktion, die säure-katalysierte Umlagerung der azyklischen Dimethyloctadienole, ausgehend von Geraniol über Carbokationen als Intermediate aufgrund der Stereochemie der Monoterpenalkohole hauptsächlich zur Bildung azyklischer Produkte, und ausgehend von Nerol entsteht neben Linalool das zyklische Produkt α -Terpineol. Das Gleichgewicht dieser Reaktionen liegt auf der Seite des Linalools (Cori et al., 1986).

Der mikrobielle Abbau des tertiären Monoterpenalkohols Linalool in *Thauera* sp. Stamm 47Lol erfolgte wahrscheinlich über Geraniol. Stamm 47Lol katalysierte die allylische Umlagerung von Linalool (3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol) und Geraniol (*trans*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) regioselektiv, ohne daß Nerol (*cis*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) gebildet wurde. Unter den Versuchsbedingungen war der tertiäre Monoterpenalkohol Linalool thermodynamisch stabiler als der primäre Alkohol Geraniol. Das Verhältnis der Monoterpenalkohole Linalool und Geraniol lag nach Erreichen des Gleichgewichts bei ca. 11:1 (Abb. 34). Nach vollständiger Reduktion des Nitrats wurden in den Linalool-gewachsenen Kulturen die Intermediate Geraniol und Geranial gefunden. Die Bildung von Geranial, für die eine Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion

anzunehmen ist, spricht dafür, daß der nachfolgende Abbau von Geraniol über Geranial zur Geranylensäure und weiter auf dem von Seubert et al. (1960) beschriebenen Abbauweg für Citronellol und Geraniol (siehe Abb. 10) verläuft. Nerol, *cis*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol, wurde durch *Thauera* sp. 47Lol unter nitratreduzierenden Bedingungen zum korrespondierenden Aldehyd Neral oxidiert, jedoch nicht weiter metabolisiert (Abb. 34). Eine *cis*-/*trans*-Isomerisierung von Nerol zu Geraniol wurde nicht beobachtet. Jedoch ist die Bildung von Neral in mit Geraniol gewachsenen Kulturen ein Hinweis auf eine Isomerisierung von Geranial und Neral. Citronellol (3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol) hat im Vergleich zu Geraniol eine Doppelbindung weniger. Denkbar ist, daß aufgrund des Fehlens der Doppelbindung am C2-Kohlenstoffatom die Hydratisierung zum entsprechenden 3-Hydroxy-Derivat nicht erfolgt und die Entfernung der β -ständigen Methylgruppe (nach der zu fordernden Carboxylierung in Form von Essigsäure) nicht möglich ist und somit der Abbau von Citronellol blockiert ist (Abb. 10).

Die Isomerisierung von Geraniol zu Linalool konnte in zellfreien Extrakten und cytosolischen Zellextrakten von Stamm 47Lol in aeroben Reaktionsansätzen gezeigt werden, wobei die Produktbildung gaschromatographisch in wäßrigen Proben nachgewiesen wurde. Die Bildung des Isomerisierungsprodukts Linalool erfolgte in den Reaktionsansätzen jedoch nicht stöchiometrisch. Anzunehmen ist, daß unter den Versuchsbedingungen Geraniol enzymatisch weiteroxidiert wurde.

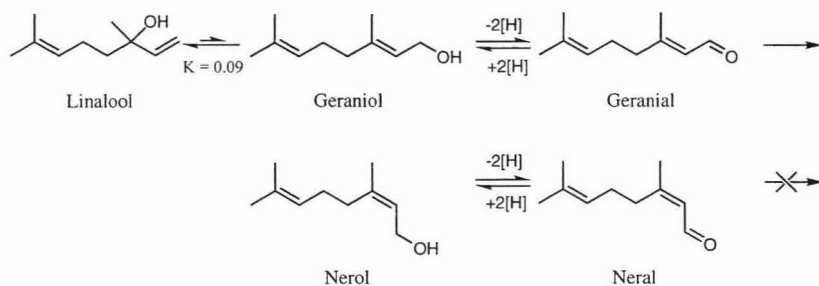


Abb. 34. Mikrobielle Transformationsreaktionen in Kulturen des Stammes 47Lol.

3.2. Menthol

Die ausgeprägte Selektivität des Substratspektrums, die Begrenzung auf wenige monozyklische Monoterpenalkohole und -ketone als verwertbare Kohlenstoffquellen, deutet daraufhin, daß die anaerobe Oxidation der Menthole in *Thauera* sp. Stamm 21Mol das Vorhandensein einer

Hydroxyl- oder Ketogruppe in *meta*-Position zur Methylgruppe des Cyclohexanrings erfordert. In wachsenden Kulturen von Stamm 21Mol wurde in geringen Mengen Menthon gefunden, und beim anaeroben Wachstum von Stamm 21Mol auf Pfefferminzöl wurde ebenfalls Menthon gebildet, was auf die Oxidation des Alkohols zum Keton schließen läßt. Der anaerobe Abbau von Menthol und der entsprechenden Strukturisomere ist in Analogie zu den für die Mineralisierung von Cyclohexanol postulierten Abbausequenzen über ein entsprechendes Cyclohexa-dion-Derivat (z.B. 2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexa-1,3-dion) und eine hydrolytische Ringspaltung denkbar (Abb. 35). Die Tatsache, daß Cyclohexanol keine Kohlenstoffquelle für Stamm 21Mol darstellt, deutet daraufhin, daß die Isopropyl- und die Methyl-Seitenkette für die Substraterkennung erforderlich sind.

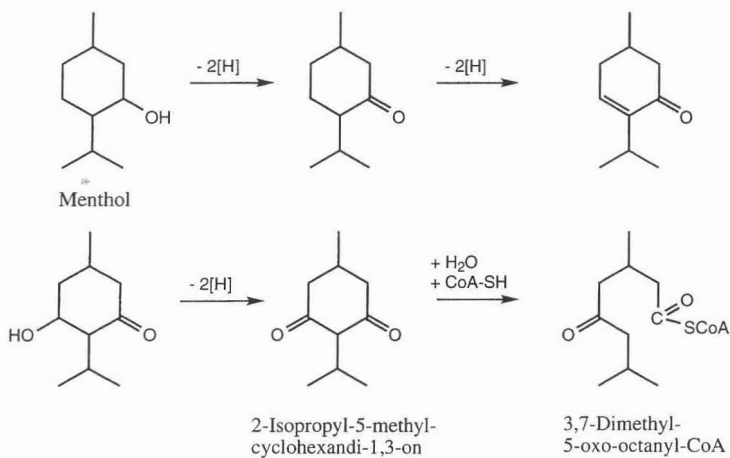


Abb. 35. Hypothetischer Abbauweg der anaeroben Oxidation von Menthol in *Thauera* sp. Stamm 21Mol.

3.3. Eucalyptol

Beim anaeroben Wachstum von *Thauera* sp. Stamm 58Eu auf Eucalyptol und Nitrat wurden Monoterpenkohlenwasserstoffe (α -Terpinen, γ -Terpinen, Terpinolen) in geringen Mengen gefunden. Andere monozyklische Monoterpene wie α -Phellandren und Limonen waren ebenfalls Kohlenstoffquellen dieses Bakterienstamms. Nimmt man als Initialreaktion eine intramolekulare Spaltung der Etherbindung von Eucalyptol an, so führt diese Reaktion direkt zur Bildung des Monoterpenalkohols α -Terpineol, der gleichfalls unter nitratreduzierenden Bedingungen metabolisiert wurde. Ein anaerober Abbau des Monoterpenethers 1,4-Cineol erscheint daher auch

dieser Verbindung durch die *Alcaligenes* sp. Stämme. Die Bindungen des Cyclopropanrings haben teilweise den Charakter von π -Orbitalen und sind daher ähnlich reaktiv wie π -Bindungen in Alkenen. Die Bindungswinkel in dem Cyclopropanring bedingen eine Ringspannung dieser Molekülstruktur, so daß die Ringöffnung und Umlagerung in eine Propylenfunktion thermodynamisch begünstigt ist (Suckling, 1988). Die Alkenbindungen in zahlreichen Monoterpenen sind überdies stärker polarisiert als in aliphatischen, unverzweigten Alkenen, wie z. B. ^{13}C -NMR-daten in der Literatur zeigen (Hesse et al., 1991), und weisen somit eine höhere Reaktivität im Vergleich zu aliphatischen Alkenen auf.

Aufgrund der übereinstimmenden Substratspektren der vier *Alcaligenes* sp. Stämme für mono- und bicyklische Monoterpene wird ein gemeinsamer Abbauweg für diese Monoterpenkohlenwasserstoffe postuliert. Aufgrund des Nachweises von monozyklischen Monoterpenen in den Kulturen der Stämme 62Car und 54Pin beim anaeroben Wachstum mit 2-Caren bzw. α -Pinen wird die Transformation von bicyklischen Monoterpenen in monozyklische Monoterpene angenommen. Säure-katalysierte Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts bicyklischer Monoterpene sind beschrieben (Erman, 1985; Abb.37) und werden zum Teil für die industrielle Synthese von Monoterpenen genutzt (Bauer und Garbe, 1992); ebenso erfolgt bei der Biosynthese mono- und bicyklischer Monoterpene die Zyklisierung unter Beteiligung eines α -Terpinyl-Kations (Abb. 5; McCaskill and Croteau, 1997). Eine abiotische Umlagerung der bicyklischen Monoterpene unter den Versuchsbedingungen in neutralen Mineralmedien (pH 7) kann ausgeschlossen werden, da in den Versuchszeiträumen keine derartigen Transformationen in unbeimpften Kontrollen beobachtet wurden. Eine entsprechende Umlagerung wurde für den aeroben Abbau von α -Pinen in *Pseudomonas* sp. Stamm PL postuliert (Shukla und Bhattacharyya, 1968b): die Bildung von Limonen aus α -Pinen (Abb. 11). Der gleichzeitige Abbau mono- und bicyklischer Monoterpene durch *Alcaligenes* sp. unter nitratreduzierenden Bedingungen, wobei monozyklische Monoterpene scheinbar bevorzugt abgebaut wurden, scheint die Hypothese der Umlagerung von bicyklischen zu monozyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen zu unterstützen (Abb. 37).

Als Initialreaktion des anaeroben Abbaus der nichtfunktionalisierten, aber im Vergleich zu aliphatischen Alkenen reaktiveren Monoterpenkohlenwasserstoffe wäre theoretisch die direkte Hydratisierung einer Doppelbindung denkbar. Die experimentellen Daten ergaben jedoch keine Hinweise auf eine solche Initialreaktion in den nitratreduzierenden *Alcaligenes* sp. Stämmen. So wurde z.B. ein anaerobes Wachstum von Stamm 54Pin mit Isopinocampheol nicht beobachtet. Auch die getesteten monozyklischen Monoterpenalkohole Menthol oder Isopulegol bzw. Carveol stellten keine verwertbaren Kohlenstoffquellen dar (Abb. 38). Andere Monoterpenalkohole wurden bei der Analyse der organischen Trägerphase gewachsener Kulturen nicht gefunden. Die direkte Hydratisierung einer endozyklischen Doppelbindung der *p*-Menthan-Derivate zu den korrespondierenden Alkoholen und die Entstehung freier Intermediate erscheint daher unwahr

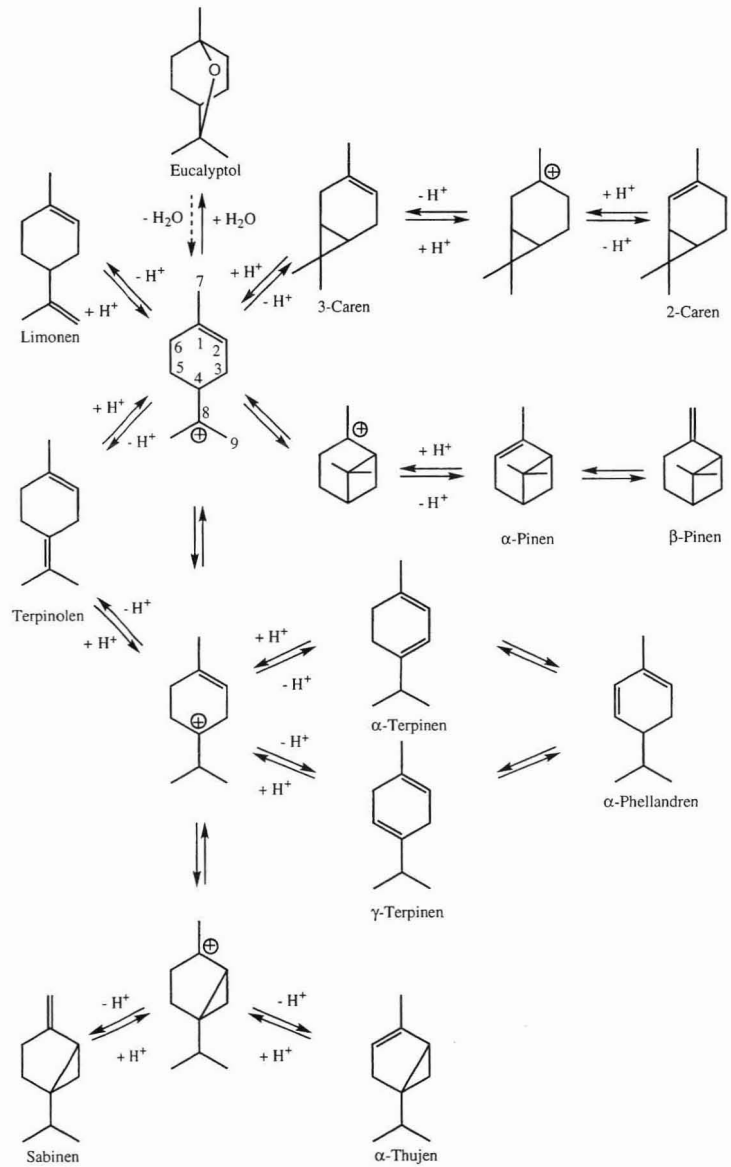


Abb. 37. Säure-katalysierte Umlagerungen der Kohlenstoffgerüste der Monoterpenkohlenwasserstoffe

scheinlich. Die Hydratisierung einer exozyklischen Doppelbindung könnte dagegen von den Bakterien katalysiert werden. Die möglichen Hydratisierungsprodukte z. B. von Terpinolen oder Limonen, Terpinen-4-ol und α -Terpineol, wurden von den *Alcaligenes* sp. Stämmen mineralisiert.

Die Säure-katalysierte Hydratisierung von α -Pinen führt unter Öffnung des Cyclobutanrings zu α -Terpineol und isomeren Verbindungen (Bauer und Garbe, 1992). Die Bildung von α -Terpineol wurde auch beim aeroben Wachstum von *Pseudomonas gladioli* auf Limonen beobachtet (Cadwallader et al., 1989); α -Terpineol wurde jedoch nicht weiter metabolisiert. Die Bildung von α -Terpineol als Intermediat des anaeroben Abbaus von Monoterpenkohlenwasserstoffen ist deshalb theoretisch denkbar, ein Nachweis dieser Verbindung in den Kulturen war jedoch nicht möglich.

Die von den *Alcaligenes* sp. Stämmen als Kohlenstoffquellen verwertbaren Monoterpene wiesen alle eine sp^2 -Hybridisierung des methylsubstituierten C1-Atoms auf. (z. B. monozyklische 4-Isopropyl-1-Methylcyclohexen-Verbindungen). Eine Ausnahme bilden dabei Sabinen (1-Isopropyl-4-methylen-bicyclo[3.1.0]hexan) und β -Pinen (6,6-Dimethyl-2-methylen-bicyclo[3.1.1]heptan), die eine exozyklische Doppelbindung besitzen. Ein Strukturisomer der *p*-Menthadiene, Isolimonen (3-Isopropenyl-6-methyl-cyclohexen) stellte dagegen kein Wachstumssubstrat der *Alcaligenes* sp. Stämme unter nitratreduzierenden Bedingungen dar. Vielmehr führte die cometabolische Transformation von Isolimonen zur Bildung von Isoterpinolen (6-Methyl-3-Isopropyliden-cyclohexen) als nicht mineralisierbares Dead-End-Produkt (U. Heyen, persönl. Mitteilung), wenn die Bakterienstämme in Gegenwart einer metabolisierbaren Monoterpenverbindung unter denitrifizierenden Bedingungen wuchsen. Die Bakterienstämme pCyN1 und pCyN2, die unter nitratreduzierenden Bedingungen mit der aromatischen Verbindung *p*-Cymol (1-Isopropyl-4-methyl-benzol) isoliert worden waren, waren ebenfalls in der Lage, neben einigen aromatischen Kohlenwasserstoffen auch mit den Monoterpenen α - und γ -Terpinen, α -Phellandren, Limonen und Isolimonen zu wachsen (Daten nicht gezeigt; Harms et al., 1996). Dies deutet auf die Beteiligung des sp^2 -hybridisierten C1-Atoms am anaeroben Abbau der Monoterpenkohlenwasserstoffe in den *Alcaligenes* sp. Stämmen hin.

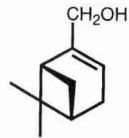
Die Hemmung des Gesamtstoffwechsels der *Alcaligenes* sp. Stämme durch höhere Konzentrationen [> 2 mM] einiger Monoterpenalkohole (Carveol, Perillylalkohol, Myrtenol) wurde gezeigt. Im Gegensatz zum denitrifizierenden Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle wurde das Wachstum von *Alcaligenes* sp. Stamm 54Pin mit α -Pinen bereits in Gegenwart der Monoterpenalkohole Myrtenol bzw. Perillylalkohol in einem Konzentrationsbereich von 10 - 100 μ M inhibiert, was auf eine spezifische Inhibierung des anaeroben Abbaus von α -Pinen hindeutet (Abb. 38). Entsprechende Beobachtungen zur inhibitorischen Wirkung von Benzylalkohol auf den anaeroben Abbau von Toluol in nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien wurden beschrieben (Altenschmidt und Fuchs, 1992; Rabus und Widdel, 1995b). Dies könnte für eine

Kohlenstoffquellen/Elektronendonatoren
für denitrifizierendes Wachstum von
Alcaligenes sp. Stamm 54Pin

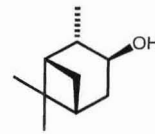
keine Wachstumssubstrate/Inhibitoren des
denitrifizierenden Wachstums auf α -Pinen



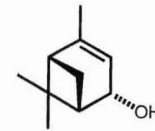
(-)- α -Pinen



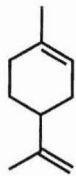
(-)-Myrtenol



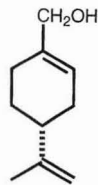
(+)-Isopinocampheol



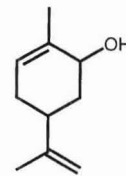
(-)-*cis*-Verbenol



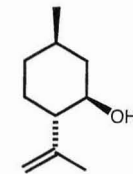
(+)-Limonen



(+)-Perillylalkohol



Carveol



(-)-Isopulegol

Abb. 38. Monoterpenalkohole, die das Wachstum von *Alcaligenes* sp. 54Pin mit α -Pinen und Nitrat inhibieren.

initiale Aktivierung der Monoterpene am C7-Atom, d.h. der Methylgruppe, sprechen, jedoch nicht in Form einer Methylhydroxylierung, die zu den genannten Monoterpenalkoholen Myrtenol bzw. Perillylalkohol führen würde. In Analogie zu der für den anaeroben Abbau von Toluol in nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien gefundenen Additionsreaktion von Fumarat an die Methylgruppe (Biegert et al., 1996; Beller und Spormann, 1997a, b) könnte auch die initiale Aktivierung der nicht funktionalisierten Monoterpenalkene erfolgen. Das resultierende Produkt einer Additionsreaktion mit einem polaren Stoffwechselintermediat würde zudem aufgrund seiner Ladung in den Zellen festgehalten (Abb. 39).

Nach der Aktivierung von zyklischen Kohlenwasserstoffe erfolgt in der Regel die Spaltung des Cyclohexanringsystems. Als Substrat einer enzym-katalysierten Ringöffnung von aktivierten, zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen ist ein *p*-Isopropyl-cyclohexadensäure-Derivat zu postulieren, das in die für den Abbau über Reaktionssequenzen der β -Oxidation erforderliche aktivierte Form eines Thioesters überführt werden könnte (Abb. 39). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen des anaeroben Abbaus von Monoterpenwasserstoffen in wachsenden Kulturen der *Alcaligenes* sp. Stämme und *Thauera* sp. Stamm 58Eu ist eine gültige Aussage über den Mechanismus der anaeroben Initialreaktion nicht möglich.

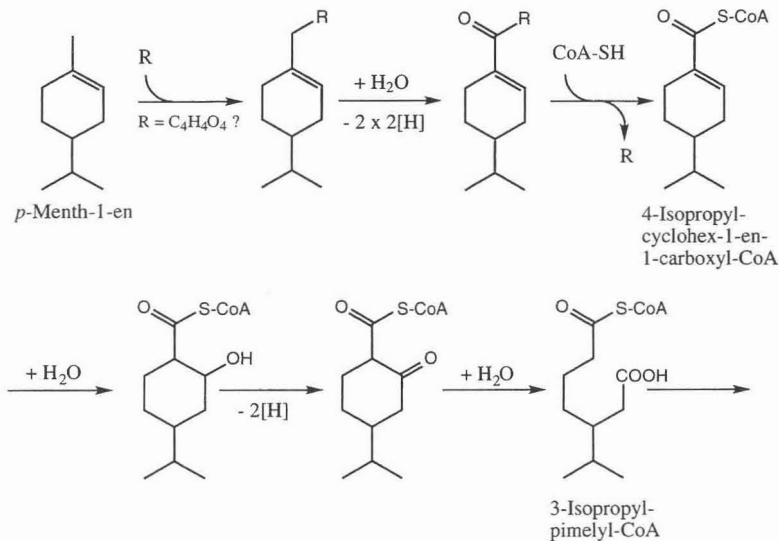


Abb. 39. Hypothetische Aktivierung monozyklischer Monoterpene beim anaeroben Abbau durch *Alcaligenes* sp. Stämme und *Thauera* sp. 58Eu.

4. Ökologische Aspekte des anaeroben Monoterpenabbaus

Terpenoide sind ubiquitär vorkommende, natürliche Kohlenwasserstoffverbindungen, die Kohlenstoff- und Energiequelle für Bakterien sein können. Der Abbau einiger, natürlich häufig vorkommender Monoterpen in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff konnte in Anreicherungskulturen unter nitratreduzierenden Bedingungen gezeigt werden (Harder und Probian, 1995). Exemplarische Abschätzungen der Bakterienzellzahlen monoterpenverwertender, denitrifizierender Mikroorganismen zweier Standorte (Belebtschlamm und Waldboden) zeigten, daß Mikroorganismen mit der Fähigkeit, diese Verbindungen als Kohlenstoffquellen zu nutzen, einen repräsentativen Anteil der Population bilden. Ätherische Öle, deren Hauptinhaltsstoffe Mono- und Sesquiterpene sind, boten modellhaft ein Spektrum natürlich vorkommender Monoterpen und waren in der Tat Kohlenstoff- und Energiequellen für das anaerobe Wachstum der neu isolierten, denitrifizierenden Bakterienstämme der Gattungen *Thauera* und *Alcaligenes*.

Auch wenn die Löslichkeit der Monoterpenkohlenwasserstoffe in Wasser mit 10 - 30 mg/l vergleichsweise gering ist (Weidenhamer et al., 1993), und diese Substanzen deshalb meist als wasserunlöslich angesehen werden, konnte eine Korrelation zwischen der prozentualen Abnahme des Monoterpengehalts in Blättern von *Umbellularia californica* und der Wasserlöslichkeit einzelner Verbindungen festgestellt werden (Wood et al., 1995). Für die Laubschicht von *Pinus monophylla* Torr. & Frem. wurde eine Abnahme des Monoterpengehalts um bis zu 98% beschrieben (Wilt et al., 1993). Dieses ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich nicht nur durch physikalische Prozesse (hohe Flüchtigkeit der Verbindungen, Diffusion in die Gasphase, abiotische Oxidation der Monoterpen) zu erklären, sondern zusätzlich auf aktiven mikrobiellen Abbau zurückzuführen. Daran beteiligt sind nicht nur aerobe Mikroorganismen, sondern in anoxischen Bereichen auch nitratreduzierende Bakterien.

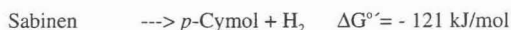
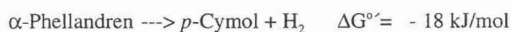
Auf der anderen Seite wurde eine toxische oder inhibitorische Wirkung von pflanzlichen Extrakten auf Mikroorganismen beschrieben (Howard und Howard, 1991). Die Auswaschung bzw. Auslaugung von Verbindungen aus Pflanzenmaterial (Blätter und Laub) beschränkt sich wahrscheinlich nicht nur auf phenolische Substanzen, sondern trifft auch auf die Monoterpen zu (Wood et al., 1995). In Gegenwart von Monoterpenen (α -Pinen, β -Pinen, Myrcen, Limonen und β -Phellandren) wurde unter in situ-Bedingungen eine Reduktion der Nettostickstoffmineralisation im Waldboden festgestellt. Eine vergleichbare Wirkung war mit Waldboden aus einem *Pinus ponderosa*-Gebiet beobachtet worden, was für das Vorhandensein von Monoterpenen, z.B. durch Kondensation an Bodenpartikel spricht (White, 1986). Die teilweise beobachtete Inhibition der Nitrifikation in Bodenökosystemen kann jedoch nicht nur als Folge unspezifischer Wechselwirkungen dieser Kohlenwasserstoffverbindungen mit bakteriellen Enzymen wie z. B. der Ammonium-Monooxygenase (Howard und Howard, 1991) oder den Einfluß auf die Zellmembranen der Mikroorganismen (Sikkema et al., 1995), sondern auch durch die Stimulation des Wachstums organotropher Mikroorganismen und die damit einhergehende Konkurrenz um verfügbare Stickstoffquellen wie z.B. Ammonium erklärt werden (White,

1994). Eine Inhibierung der Methanoxidation durch methanotrophe Bakterien insbesondere in Gegenwart von zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen wurde ebenfalls beschrieben (Amaral et al., 1998).

5. Entstehung von *p*-Cymol aus Monoterpenkohlenwasserstoffen unter anoxischen Bedingungen

Die Bildung aromatischer Kohlenwasserstoffe in natürlichen Systemen unter anoxischen Bedingungen wurde für Toluol in Seen beschrieben (Jüttner und Henatsch, 1986). Toluol wird allerdings in diesen Fällen durch mikrobielle Aktivität aus bereits aromatischen Vorläufermolekülen wie z. B. der Aminosäure Phenylalanin gebildet (Fischer-Romero et al., 1996). Bakterien des Intestinaltrakts von *Spodoptera litura* Fabricius transformierten das monozyklische *p*-Menthadien α -Terpinen bei anaerober Inkubation zu der aromatischen Verbindung *p*-Cymol, die zu den Produkten Cuminalkohol und Cuminsäure oxidiert wurde (Miyazawa et al., 1996). Bereits früher berichteten Harder und Probian (1995) über die Transformation mono- und bityklischer Monoterpenkohlenwasserstoffe zu *p*-Cymol in nitratreduzierenden Anreicherungskulturen. Auch in Reinkulturen der *Alcaligenes* sp. Stämme 65Phen, 62Car und 54Pin fand sich *p*-Cymol. Daher wurde in Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen die Bildung von *p*-Cymol untersucht. Nahezu stöchiometrische Mengen an *p*-Cymol wurden aus α -Phellandren oder Sabinen gebildet. Allerdings verlor die Bakterienpopulation die Fähigkeit zur stöchiometrischen *p*-Cymolbildung bereits in der 1. Passage und eine Reihe anderer Substanzen (u. a. γ -Terpineol) wurden gebildet.

Thermodynamisch ist die Oxidation von Cyclohexadien zu Benzol aufgrund der Mesomerieenergie des aromatischen Ringsystems eine exergone Reaktion. Die Gibbs'sche Reaktionsenergie $\Delta G^{\circ'}$ für diese Reaktion unter Freisetzung von molekularem Wasserstoff beträgt ca. - 55 kJ/mol (Schink et al., 1992). Analog kann angenommen werden, daß auch die Oxidation von *p*-Menthadienen eine exergone Reaktion darstellt, da die resultierende aromatische Verbindung, *p*-Cymol, gleichfalls mesomeriestabilisiert ist. Analoge Berechnungen der Standard-Gibbs-Energie $\Delta G^{\circ'}$ nach der Inkrement-Methode von Mavrovouniotis (1991) ergaben für die Oxidation der Monoterpene α -Phellandren und Sabinen zu *p*-Cymol unter Freisetzung von molekularem Wasserstoff Werte von - 18,0 kJ/mol für α -Phellandren bzw. - 121,0 kJ/mol für Sabinen.



Nimmt man eine Wasserstoffkonzentration von 10^{-4} atm an, so ändert sich der Wert der Gibbs-Energie um den Betrag von -22,8 kJ/mol, d.h. für die Oxidation von α -Phellandren ergibt sich

ein $\Delta G'$ -Wert von $-40,8$ kJ/mol. Der physiologisch notwendige Energiebetrag für die Translokation eines Protons über die Zellmembran für den Aufbau des elektrochemischen Membranpotentials liegt in der Größenordnung von -20 kJ/mol (Schink, 1997). Die Oxidation von *p*-Menthadienen wie z.B. α -Terpinen oder α -Phellandren zu *p*-Cymol könnte aus energetischer Sicht eine katabole Reaktion sein. Allerdings wurde die Bildung von *p*-Cymol in Folgepassagen der methanogenen Anreicherungskulturen mit α -Phellandren nicht mehr beobachtet.

Der für die Oxidation von Sabinen errechnete Wert der Gibbs-Energie ΔG° ermöglicht theoretisch die Bildung von 1 mol ATP pro mol Sabinen. Inwiefern die Ringspannung des intrazyklischen Cyclopropanrings von Sabinen eine mikrobielle Transformation begünstigt, kann nicht eindeutig beurteilt werden. Die Umsetzung von Sabinen zu *p*-Cymol in den methanogenen Anreicherungskulturen könnte entsprechend folgender Reaktionsfolge erfolgen:

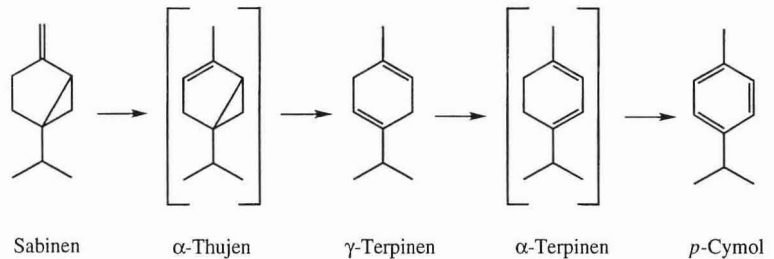


Abb. 40. Hypothetische Reaktionsfolge zur Entstehung von *p*-Cymol aus Sabinen unter methanogenen Bedingungen.

Die Ergebnisse der Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen auf α -Pinen deuten auf einen mikrobiellen Abbau dieser Verbindungen hin. Über den Abbau von Monoterpenen unter methanogenen Bedingungen und die an diesem Prozeß beteiligten Bakterien ist bis jetzt noch nichts bekannt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Sieben Bakterienstämme, die mit verschiedenen Monoterpenen als Kohlenstoffquelle und Nitrat als Elektronenakzeptor isoliert worden waren, wurden physiologisch und phylogenetisch charakterisiert. Die monoterpenverwertenden Bakterien waren Gram-negative, bewegliche Stäbchen und hatten einen strikt respiratorischen Metabolismus. Alternativ konnten Sauerstoff oder oxidierte Stickstoffverbindungen (Nitrat, Nitrit, Distickstoffoxid) als Elektronenakzeptor dienen. Die Bakterienstämme metabolisierten organische Säuren, einige Aminosäuren und einzelne Monoterpene, jedoch keine Zucker. Die reduzierten Kohlenstoffverbindungen wurden vollständig zu Kohlendioxid mineralisiert. Die Sequenzierung der 16S rDNS der sieben Stämme ergab die Zugehörigkeit der nitratreduzierenden Neuisolate zur β -Gruppe der Proteobakterien. Innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria* waren die Isolate 47Lol, 21Mol und 58Eu mit *Thauera* spp. und *Azoarcus* spp. verwandt, die Isolate 51Men, 65Phen, 62Car und 54Pin bildeten eine phylogenetische Gruppe mit *Alcaligenes* spp.

Stamm 47Lol wuchs mit dem Isolationssubstrat (\pm)-Linalool und mit Geraniol. Die 16S rDNS-Sequenzdaten und die Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung unterstützten den Vorschlag, Stamm 47Lol als eine neue Spezies, *Thauera linaloolentis* sp. nov., innerhalb der β -Gruppe der *Proteobacteria* einzuordnen. Die Identifizierung von Metaboliten in wachsenden Kulturen und Untersuchungen in cytosolischen Zellextrakten von Stamm 47Lol führten zum Nachweis folgender Reaktion: Linalool wurde regioselektiv zu Geraniol umgelagert, wobei das *cis*-Isomer Nerol nicht gebildet wurde.

Stamm 21Mol wuchs mit dem Isolationssubstrat Menthol und anderen *p*-Menthan-alkoholen und -ketonen, die in *meta*-Position zur Methylgruppe eine funktionelle Sauerstoffgruppe tragen. Als Metabolit der anaeroben Oxidation von Menthol wurde Menthon gefunden. Der anaerobe Abbau könnte deshalb in Analogie zur Oxidation von Cyclohexanol erfolgen. Die phylogenetische Einordnung des Stamms 21Mol ergab eine Ähnlichkeit von 68,5 % auf DNS-DNS-Ebene zu Stamm 58Eu. Stamm 58Eu wurde mit Eucalyptol isoliert und wuchs in Gegenwart von Nitrat mit einigen *p*-Menthadienen, jedoch nicht mit Menthol oder Menthon. Es wurde deshalb vorgeschlagen, eine neue Spezies, *Thauera terpenica* sp. nov., zu definieren, die Stamm 58Eu als Typstamm und Stamm 21Mol umfaßt.

Die Stämme 51Men, 65Phen, 62Car und 54Pin wurden mit mono- und bicyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen isoliert: *p*-Menth-1-en, α -Phellandren, 2-Caren und α -Pinen. Die physiologischen und phylogenetischen Untersuchungen ergaben eine große Ähnlichkeit der vier Stämme untereinander und führten zur vorgeschlagenen Definition der Spezies *Alcaligenes defragrans* sp. nov., mit Stamm 54Pin als Typstamm, innerhalb der Familie Alcaligenaceae.

Der anaerobe Abbau von mono- und bicyklischen Monoterpenen aus natürlichen und definierten Gemischen erfolgte durch die *Alcaligenes defragrans* Stämme zeitlich parallel und nicht nacheinander. Monozyklische Monoterpenkohlenwasserstoffe wurden gegenüber bicyklischen scheinbar bevorzugt. Dieses und die Bildung von monozyklischen *p*-Menthadienen beim Wachstum mit bicyklischen Verbindungen deutete auf eine Umwandlung der bicyklischen zu monozyklischen Monoterpenen hin. Alle metabolisierten Monoterpenen enthielten ein sp^2 -hybridisiertes, methylsubstituiertes Kohlenstoffatom (C1 der *p*-Menthan-Nomenklatur). Daher könnte in Analogie zum Abbau von Toluol durch nitratreduzierende Bakterien der initiale Angriff an der Methylgruppe erfolgen und zur Bildung einer ionischen Verbindung führen. Monoterpenalkohole als theoretisch denkbare Produkte einer Hydratisierung der Monoterpenkohlenwasserstoffe wurden nicht gefunden. Eine spezifische Inhibition des Wachstums mit Monoterpenkohlenwasserstoffen durch die Gegenwart von Monoterpenalkoholen war bereits bei niedrigen Konzentrationen (10-100 μ M) zu beobachten; eine weitere Analogie zur anaeroben Oxidation von Toluol.

Ätherische Öle als natürlich vorkommende Kohlenstoffquelle ermöglichten das Wachstum der nitratreduzierenden Stämme. Stamm 21Mol verwertete überwiegend die Mentholisomere des Pfefferminzöls. Stamm 58Eu metabolisierte Eucalyptol aus dem Pfefferminzöl und Limonen, Terpinolen und Sabinen aus dem Fichtennadelöl. Die *Alcaligenes defragrans* Stämme zeigten eine individuelle Bevorzugung einiger Monoterpenkohlenwasserstoffe des Fichtennadelöls.

Die Abschätzung der Zellzahlen monoterpenverwertender, nitratreduzierender Bakterien ergab, daß mehr als 10^6 Zellen/ml diese Fähigkeit hatten. Dieses entsprach einem Anteil von ca. 1 % der nitratreduzierenden Gesamtpopulation in Belebtschlamm und von nahezu 100 % der Bakterien in Fichtenwaldböden.

Die Bildung von *p*-Cymol wurde in zahlreichen nitratreduzierenden Kulturen in Gegenwart von zyklischen Monoterpenkohlenwasserstoffen beobachtet. Eine theoretische Analyse zeigte, daß die Oxidation (Aromatisierung) von *p*-Menthadienen zu *p*-Cymol unter Freisetzung von molekularem Wasserstoff eine exergone Reaktion darstellt. In Anreicherungskulturen unter methanogenen Bedingungen wurden Sabinen und α -Phellandren fast stöchiometrisch zu *p*-Cymol oxidiert, nicht jedoch 2-Caren und α -Pinen. Bereits in der 1. Passage dieser Anreicherungskulturen jedoch wurden aus Sabinen neben *p*-Cymol noch andere Monoterpenen gebildet. Die Bildung von *p*-Cymol durch anaerobe Mikroorganismen könnte eine Quelle für das Vorkommen dieser aromatischen Verbindung in anoxischen Habitaten sein. Erstmals wurde die Verwertung von α -Pinen unter methanogenen Bedingungen gezeigt, so daß der anaerobe Abbau von Monoterpenen sich nicht auf nitratreduzierende Bakterien beschränkt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Aeckersberg, F. (1994) Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation, Universität Bremen.
- 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.
- Altenschmidt, U., Fuchs, G. (1992) Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* 174: 4860-4862.
- Altenschmidt, U., Oswald, B., Fuchs, G. (1991) Purification and characterization of benzoate-coenzyme A ligase and 2-aminobenzoate-coenzyme A ligases from a denitrifying *Pseudomonas* sp., *J. Bacteriol.* 137: 5494-5501.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R., Knowles, R. (1998) Effects 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 waste water including bottom sediments and sludge.
- Anders, H.-J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 327-333.
- Bak, F., Widdel, F. (1986) Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 146: 177-180.
- Ball, H.A., Johnson, H.A., Reinhard, M., Spormann, A.M. (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* 178: 5755-5761.
- Bauer, K., Garbe, 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.
- 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., Altenschmidt, U., Eckerskorn, C., Fuchs, G. (1993) Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoate-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species, *Eur. J. Biochem.* 213: 555-561.
- 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.

- BioRad (1994) BioRad protein assay. Instruction manual. BioRad, München.
- 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.
- Boll, M., Fuchs, G. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* 234: 921-933.
- Boll, M., Albracht, S.S.P., Fuchs, G. (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic metabolism. A study of adenosinetriphosphate activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 244: 840-851.
- Boltz, D.F., Taras, M.J. (1978) Nitrogen, pp. 197-251. In: Boltz, D.F. and Howell, J.A. (eds.), *Colorimetric Determination of Nonmetals*, 2nd ed., Wiley, New York.
- Bonting, C.F.C., Schneider, S., Schmidtberg, G., Fuchs, G. (1995) Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 164: 63-69.
- Bossert, I.D., Whited, G., Gibson, D.T., Young, L.Y. (1989) Anaerobic oxidation of *p*-cresol mediated by a partially purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* 171: 2956-2962.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bregnard, T.P.-A., Häner, A., Höhener, P., Zeyer, P. (1997) Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2077-2081.
- Britton, L.N. (1984) Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: D.T. Gibson (ed.) *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 89-129, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Brune, A., Schink, B. (1992) Phloroglucin pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol.* 157: 417-424.
- Bryant, M.P. (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328.
- Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., Higgins, D.P. (1989) Bioconversion of dextro-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.
- 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.
- Cori, O., Chayet, L., Perez, L.M., Bunton, C.A., Hachey, D. (1986) Rearrangement of linalool, geraniol, and nerol and their derivatives. *J. Org. Chem.* 51: 1310-1316.

- Dagley, S. (1985) Microbial metabolism of aromatic compounds, pp. 483-505. In: Moo-Young, M. (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 1., Pergamon Press, Oxford.
- Dangel, W., Tschsch, A., Fuchs, G. (1988) Anaerobic metabolism of cyclohexanol by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 150: 358-362.
- Dangel, W., Tschsch, A., Fuchs, G. (1989) Enzyme reactions involved in anaerobic cyclohexanol metabolism by a denitrifying *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 152:273-279.
- DeLey, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 133-142.
- DeLey, 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.
- DeSoete, G. (1983) A least square algorithm for fitting additive trees to proximity data. *Psychometrika* 48: 621-626.
- Dev, S., Narula, A.P.S., Yadav, J.S. (1982) Monoterpenoids. In: S. Dev (ed.), *CRC Handbook of Terpenoids*, Vol. II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Dhavalikar, R.S., Bhattacharyya, P.K. (1966) Microbial transformations of terpenes. Part VIII - Fermentation of limonene by a soil *Pseudomonad*. *Indian J. Biochem.* 3: 144-157.
- Dhavalikar, R.S., Rangachari, P. N. (1966) Microbial transformations of terpenes. Part IX - Pathways of degradation of limonene in a soil *Pseudomonad*. *Indian J. Biochem.* 3: 158-164.
- Ehrenreich, P. (1996) Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf n-Alkanen und Erdöl. Dissertation. Universität Bremen.
- Egland, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J., Harwood, C.S. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6484-6489.
- Elder, D.J.E., Kelly, D.J. (1994) The bacterial degradation of benzoic acid and benzoic compounds under anaerobic conditions: Unifying trends and new perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 441-468.
- Erman, W.F. (1985) The *p*-menthane monoterpenes, pp. 601-724. In: Erman, W.F., *Chemistry of the monoterpenes: An encyclopedic handbook*, Part A (Studies in Organic Chemistry Series, Vol. 11). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Evans, W.C., Fuchs, G. (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds, *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 289-317.
- 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.
- Fischer-Romero, C., Tindall, B.J., Jüttner, F. (1996) *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 183-188.
- Formacek, V., Kubeczka, K.-H. (1982) *Essential Oil Analysis by Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, J. Wiley, Chichester, New York, Brisbane

- Fuchs, G., Mohamed, M., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C., Oswald, B. (1994) Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, p. 513-553. In: C. Ratledge (ed.), Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gallus, C., Gorny, N., Ludwig, W., Schink, B. (1997) Anaerobic degradation of α -resorcyate by a nitrate-reducing bacterium, *Thauera aromatica* strain AR-1. System. Appl. Microbiol. 20: 540-544.
- Geissler, J.F., Harwood, C.S., Gibson, J. (1988) Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodospseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. J. Bacteriol. 170: 1709-1714.
- Gibbon, G.H., Pirt, S.J. (1971) The degradation of α -pinene by *Pseudomonas* PX1. FEBS Lett. 18: 103-105.
- Gibson, K.J., Gibson, J. (1992) Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodospseudomonas palustris*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 696-698.
- Gibson, D.T., Subramanian V. (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: D.T. Gibson (ed.) Microbial Degradation of Organic Compounds, pp. 181-252, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 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.
- Graedel, T.E., Crutzen, P.J. (1994) Chemie der Atmosphäre. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 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.
- Guenther, A., Hewitt, C.N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W.A., Pierce, T., Scholes, 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.
- Haddock, J.D., Ferry, J.G. (1989) Purification and properties of phloroglucin reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. J. Biol. Chem. 264: 4423-4427.
- Härtel, U., Eckel, E., Koch, J., Fuchs, G., Linder, D., Buckel, W. (1993) Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. Arch. Microbiol. 159: 174-181.
- Hanert, H.H. (1981) The genus *Galionella*, pp. 509-515. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (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.
- Harms, G., Rabus, R., Widdel, F. (1996) Anaerobic degradation of *p*-isopropyltoluene by two new types of denitrifying bacteria. Frühjahrstagung der VAAM, Bayreuth. PE028, p. 104, Biospektrum (Sonderausgabe).
- 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.
- Hesse, M., Meier, H., Zech, B. (1991) Kernresonanz-Spektren, pp. 69-200. In: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- 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.
- Howard, P.J.A., Howard, D.M. (1991) Inhibition of nitrification by aqueous extracts of tree leaf litters. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 28: 255-264.
- Hungund, B.L., Bhattacharyya, P.K., Rangachari, P.N. (1970) Terminal oxidation pattern of a soil Pseudomonad (PL-strain). *Arch. Microbiol.* 71: 258-270.
- Hurek, T., Wagner, B., Reinhold-Hurek, B. (1997) Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4331-4339.
- Jüttner, J., Henatsch, J.J. (1986) Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature* 323: 797-798.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In: H. N. Munro, (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, London.
- 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., 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.
- Kluge, C., Tschuch, A., Fuchs, G. (1990) Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 155: 68-74.
- Koch, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G. (1993) Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* 211, 649-661.
- Kovats, E., Giddings, J.C., Keller, R.A. (1965) *Advances in Chromatography*, Vol. 1, Chapter 7. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lack, A., Fuchs, G. (1994) Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* 161: 132-139.

- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., Schwender, J. (1997a) 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. (1997b) Biosynthesis of isoprenoids in higher-plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400: 271-273.
- Lovley, D.R., Lonergan, D.J. (1990) Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1858-1864.
- 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.
- Macy, J.M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Sly, L.I. (1993) *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 135-142.
- 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 Letters* 29: 579-580.
- Madyastha, K.M., Renegathan, V. (1984) Metabolism of α -terpineol by *Pseudomonas incognita*. *Can. J. Microbiol.* 30: 1429-1436.
- Mavrovouniotis, M.L. (1991) Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *J. Biol. Chem.* 266: 14440-14445.
- McCaskill, D., Croteau, R. (1997) Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis, p. 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.
- Mesbah, M., Premachandran, 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.
- 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.
- Mohamed, M.E.S., Seyfried, B., Tschuch, A., Fuchs, G. (1993) Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. Evidence for an α -oxidation mechanism. *Arch. Microbiol.* 159: 563-573.
- Morikawa, M., Kanemoto, M., Imanaka, T. (1996) Biological oxidation of alkane to alkene under anaerobic conditions. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 309-311.
- 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.
- Peterson, D., Llana, J. (1974) Identification of a carbon-oxygen lyase activity cleaving the ether linkage in carboxymethylsuccinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 162: 135-146.

- Pfennig, N., Wagener, S. (1986) An improved method for preparing wet mounts for photomicrographs of microorganisms. *J. Microb.Meth.* 4: 303-306.
- Rabus, R., Widdel, F. (1995a) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 96-103.
- Rabus, R., Widdel, F. (1995b) Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* 164: 448-451.
- Rainey, F.A., Stackebrandt, E. (1993) 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 125-128.
- Rainey, F.A., Dorsch, M., Morgan, H.W., Stackebrandt, E. (1992) 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: position and implications for the systematics of the order Spirochaetales. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 224-226.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, K., Kersters, K., De Ley, J. (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen fixing *Proteobacteria* associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus commune* sp. nov. *Int. J. Bacteriol.* 43: 574-584.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H. (1993) Isoprenoidbiosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295: 517-524.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringermeyer, S., Sahm, H. (1996) Glycer-aldehyde-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.
- 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.
- Rudolphi, A., Tschek, A., Fuchs, G. (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155: 238-248.
- Rueter, P., Aeckersberg, F., Behrends, A., Harder, J., Widdel, F. (1996) Anaerobic degradation of saturated hydrocarbons by sulfate-reducing and denitrifying bacteria. Frühjahrstagung der VAAM, Bayreuth. PE029, p. 104, Biospektrum (Sonderausgabe).
- 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.
- Sasser, M. (1997) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI, Newark.
- Schink, B. (1985a) Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 69-77.
- Schink, B. (1985b) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 142: 295-301.

- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280.
- Schink, B., Brune, A., Schnell, S. (1992) Anaerobic degradation of aromatic compounds, p. 220-242. In: G. Winkelmann (ed.), *Microbial degradation of natural products*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Germany.
- Schneider, S., Mohamed, M.E.S., Fuchs, G. (1997) Anaerobic metabolism of L-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* 168: 310-320.
- 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 Letters* 414: 129-134.
- 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. (1964) 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. (1964) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. V. Der Mechanismus des Isoprenoidabbaues. *Biochem. Z.* 341: 35-44.
- Seubert, W., Remberger, U. (1963) Untersuchungen über den bakteriellen Abbau von Isoprenoiden. II. Die Rolle der Kohlensäure. *Biochem. Z.* 338, 245-264.
- 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.
- Shukla, O.P., Bartholomus, R.C., Gunsalus, I.C. (1987) Microbial transformation of menthol and menthane-3,4-diol. *Can. J. Microbiol.* 33: 489-497.
- Shukla, O.P., Bhattacharyya, P.K. (1968a) Microbial transformations of terpenes. Part X - Fermentation of α - und β - pinenes in a soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Indian. J. Biochem.* 5: 79-91.
- Shukla, O.P., Bhattacharyya, P.K. (1968b) Microbial transformations of terpenes. Part XI - Pathways of degradation of α - and β -pinenes by a soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Indian. J. Biochem.* 5: 92-101.
- Sikkema, J., de Bont, J.A., Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222.
- 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.
- Suckling, C.J. (1988) The cyclopropyl group in studies of enzyme mechanism and inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27: 537-552.
- 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. In: C. Ratledge (ed.) Biochemistry of microbial degradation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Tschech, A. (1989) Der anaerobe Abbau von aromatischen Verbindungen. Forum Mikrobiologie 5, 251-264.
- Tschech, A., Fuchs, G. (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. Arch. Microbiol. 148: 213-217.
- 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., Bhattacharyya, P.K., Wagner, G.C., Gunsalus, I.C.: (1990) Protein components of a cytochrome P-450 linalool 8-methyl hydroxylase. J. Biol. Chem. 265: 1345-1351.
- 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 den Dool, H., Kratz, P.D. (1963) J. Chromatogr. 11: 463-471.
- 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.K., Williamson, G.B. (1993) Just how insoluble are monoterpenes? J. Chem. Ecol. 19: 1799-1807.
- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F.M., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshavar, M.I., Moss, C.W., Brenner, D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 1-7.
- White, C.S. (1986) Volatile and water-soluble inhibitors of nitrogen mineralization in a ponderosa pine forest. Biol. Fert. Soils 2: 97-104.
- White, C.S. (1994) Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. J. Chem. Ecol. 20: 1381-1406.
- Widdel, F. (1980) Anaerober Abbau von Fettsuren und Benzoesure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation. Universität Göttingen.
- Widdel, F., Bak, F.: Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, pp. 3352-3378. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (eds.), The prokaryotes, 2nd edn. Springer, Berlin, 1992.
- 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 *Corynebacterium* sp. *Microbiology* 140: 611-616.
- Wilt, F.M., Miller, G.C., Everett, R.L., Hackett, M. (1993) Monoterpene concentrations in fresh, senescent, and decaying foliage of single-leaf pinyon (*Pinus monophylla* Torr. & Frem.: Pinaceae) from the western great basin. *J. Chem. Ecol.* 19: 185-194.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wood, S.E., Gaskin, J.F., Langenheim, J.H. (1995) Loss of monoterpenes from *Umbellularia californica* leaf litter. *Biochem. Syst. Ecol.* 23: 581-591.
- Young, L.Y. (1984) Anaerobic degradation of aromatic compounds, pp. 487-523. In: D.T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Yugari, Y. (1961) Metabolism of cyclohexane-diol-*trans*-1,2 by a soil bacterium. *Biken J.* 4: 197-207.
- 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.
- Zhou, J., Fries, M.R., Chee-Sanford, J.C., Tiedje, J.M. (1995) Phylogenetic analysis of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 500-506.

G. ANHANG

1. Trivialnamen und systematische Bezeichnung einiger Monoterpene

Tab. G1. Trivialnamen und systematische Bezeichnung einiger Monoterpene

Trivialnamen	chemische Nomenklatur	Summenformel
(-)-Borneol	<i>endo</i> -(1S)-1,7,7-Trimethyl-bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(-)-Camphen	(1S)-2,2-Dimethyl-3-methylen-bicyclo[2.2.1]heptan	C ₁₀ H ₁₆
(+)-2-Caren	(1S)-3,7,7-Trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-2-en	C ₁₀ H ₁₆
(+)-3-Caren	(1S)-3,7,7-Trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-3-en	C ₁₀ H ₁₆
(-)-Carveol	(R)-5-Isopropenyl-2-methyl-2-cyclohexanol	C ₁₀ H ₁₆ O
1,4-Cineol	1-Isopropyl-4-methyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan	C ₁₀ H ₁₈ O
(-)-β-Citronellen	R(-)-3,7-Dimethyl-1,6-octadien	C ₁₀ H ₁₈
(-)-β-Citronellol	(S)-3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol	C ₁₀ H ₂₀ O
<i>p</i> -Cymol	1-Isopropyl-4-methylbenzol	C ₁₀ H ₁₄
2,6-Dimethyl-octan		C ₁₀ H ₂₂
3,7-Dimethyl-1-octanol		C ₁₀ H ₂₂ O
3,7-Dimethyl-1-octen		C ₁₀ H ₂₀
Eucalyptol (1,8-Cineol)	1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octan	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)-Fenchol	(1R)-1,3,3-Trimethyl-bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
Geraniol	<i>trans</i> -3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)- <i>trans</i> -Isolimonen	(3R,6R)-3-Isopropenyl-6-methyl-cyclohexen	C ₁₀ H ₁₆
(+)-Isomenthol	(1S,2R,5R)-2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O
(+)-Isopinocampheol	(1S,2S,3S,5R)-2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(-)-Isopulegol	(1R,2S,5R)-2-Isopropenyl-5-methyl-cyclohexanol	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)-Limonen	4-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexen	C ₁₀ H ₁₆
(±)-Linalool	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)- <i>p</i> -Menth-1-en	R(+) 4-Isopropyl-1-methyl-cyclohexen	C ₁₀ H ₁₈
Menthol	2-Isopropyl-5-methylcyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O
Myrcen	7-Methyl-3-methylen-1,6-octadien	C ₁₀ H ₁₆
(+)- <i>trans</i> -Myrtenol	(1R,2R)-6,6-Dimethyl-bicyclo[3.1.1]heptan-2-methanol	C ₁₀ H ₁₈ O
(-)-Myrtenol	(1R)-6,6-Dimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-2-en-2-methanol	C ₁₀ H ₁₆ O
(+)-Neomenthol	(1S,2S,5R)-2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O
Nerol	<i>cis</i> -3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)-Perillaalkohol	(R)-4-Isopropyl-1-cyclohexenyl-methanol	C ₁₀ H ₁₆ O
(-)-α-Phellandren	(R)-5-Isopropyl-2-methyl-1,3-cyclohexadien	C ₁₀ H ₁₆
(-)- <i>trans</i> -Pinan	(1S,2S,5S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]heptan	C ₁₀ H ₁₈
(-)-α-Pinen	(1S,5S)-2,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-2-en	C ₁₀ H ₁₆
(-)-β-Pinen	(1S,5S)-6,6-Dimethyl-2-methylen-bicyclo[3.1.1]heptan	C ₁₀ H ₁₆
(+)-Pulegon	(R)-2-Isopropyliden-5-methyl-cyclohexanon	C ₁₀ H ₁₆ O
(+)-Sabinen	(1R,5R)-1-Isopropyl-4-methylen-bicyclo[3.1.0]hexan	C ₁₀ H ₁₆
α-Terpinen	1-Isopropyl-4-methyl-1,3-cyclohexadien	C ₁₀ H ₁₆
γ-Terpinen	1-Isopropyl-4-methyl-1,4-cyclohexadien	C ₁₀ H ₁₆
(+)-Terpinen-4-ol	(S)-1-Isopropyl-4-methyl-3-cyclohexen-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
(+)-α-Terpineol	(R)-2-(4-methyl-3-cyclohexenyl)-isopropanol	C ₁₀ H ₁₈ O
Terpinolen	4-Isopropyliden-1-methyl-cyclohexen	C ₁₀ H ₁₆
(α+β)-Thujon	1-Isopropyl-4-methyl-bicyclo[3.1.0]hexan-3-on (<i>cis+trans</i>)	C ₁₀ H ₁₆ O
<i>cis</i> -Verbenol	(1S,2S,5S)-4,6,6-Trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	C ₁₀ H ₁₆ O

2. Retentionszeiten und Kovats-Indizes (KI) incl. Literaturangaben einiger Monoterpene

Tab. G2. Elutionsfolge und Retentionszeiten der Einzelsubstanzen bei routinemäßiger Analyse von Monoterpenen (Temperaturprogramm: 60 °C für 2 min, 5 °C /min, 120 °C, für 0.1 min, 20 °C /min, 220 °C für 5 min; Trennsäulen: SE-54 (50 m x 0,32 mm; 0,5 µm Filmdicke) und CW20M (50 m x 0,32 mm; 0,5 µm Filmdicke))

Retentionszeiten		Retentionszeiten	
Monoterpene	SE-54 (min)	Monoterpene	CW20M (min)
3,7-Dimethylocten	8.19		
2,6-Dimethyloctan	8.80		
α-Pinen	8.93	α-Pinen	5.71
Citronellen	9.16	β-Pinen	7.73
Sabinen	10.15	Sabinen	8.01
β-Pinen	10.31	2-Caren	8.28
Isolimonen	10.39	3-Caren	8.77
Myrcen	10.58	Myrcen	8.99
2-Caren	11.02	α-Phellandren	9.20
α-Phellandren	11.13	α-Terpinen	9.60
3-Caren	11.34	Limonen	10.15
α-Terpinen	11.52	Eucalyptol	10.50
<i>p</i> -Menth-1-en	11.71	β-Phellandren	o
<i>p</i> -Cymol	11.77	γ-Terpinen	11.50
Limonen	11.93	<i>p</i> -Cymol	*
Eucalyptol	12.04	Terpinolen	*
β-Phellandren	o		
γ-Terpinen	12.90		
Terpinolen	13.90		
Linalool	14.17	Linalool	17.80
Menthol	16.04		
Terpinen-4-ol	16.16	α-Terpineol	18.72
α-Terpineol	16.16	Menthol	19.03
3,7-Dimethyloctanol	16.36	Terpinen-4-ol	n. b.
Citronellol	16.94	Nerol	n. b.
Nerol	16.98	Geraniol	21.06
Geraniol	17.37		

o nicht als Reinsubstanz vorliegend; * Coelution mit Heptamethylnonan (Trägerphase); n. b. nicht bestimmt

Tab. G3. Kovats-Indizes einiger Monoterpene (Temperaturprogramm: 60 °C für 2 min, 3 °C/min, 220 °C für 5 min; Trennsäulen: SE-54 (50 m x 0,32 mm, 0,5 µm Filmdicke) und CW20M (50 m x 0,32 mm, 0,5 µm). Die zum Vergleich angegebenen Kovats-Indizes (KI) sind der Terpen-Bibliothek (TR.DBF) der Firma Finnigan MAT, Bremen bzw. der Flavornet-Datenbank der Cornell University, Geneva, NY, USA (<http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet-index.html>) entnommen.

n-Alkane, Monoterpene	SE-54 (min)	Kovats- Index	KI _{Lit.} (DB5)	n-Alkane, Monoterpene	CW20M (min)	Kovats- Index	KI _{Lit.} (C20M)
n-Octan	5.46	800,0	800	n-Octan	2.74	800,0	800
n-Nonan	8.57	900,0	900	n-Nonan	3.59	900,0	900
α-Pinen	10.11	936,2	933	n-Decan	5.13	1000,0	1000
Sabinen	11.79	975,6	971	α-Pinen	5.97	1034,0	1032
β-Pinen	11.98	980,1	975	n-Undecan	7.60	1100,0	1100
Myrcen	12.47	991,6	989	β-Pinen	8.41	1123,6	1116
n-Decan	12.83	1000,0	1000	Sabinen	8.79	1134,7	1123
2-Caren	13.02	1003,9	1001	2-Caren	9.14	1144,9	
α-Phellandren	13.19	1007,4	1005	<i>p</i> -Menth-1-en			
3-Caren	13.49	1013,5	1009	3-Caren	9.76	1163,0	1148
α-Terpinen	13.77	1019,2	1015	Myrcen	10.14	1174,1	1145
<i>p</i> -Menth-1-en	14.09	1025,7		α-Phellandren	10.35	1180,2	1166
<i>p</i> -Cymol	14.12	1026,3	1022	α-Terpinen	10.89	1195,9	1178
Limonen	14.36	1031,2	1026	n-Dodecan	11.03	1200,0	1200
Eucalyptol	14.38	1031,6	1028	Limonen	11.64	1214,8	
γ-Terpinen	15.80	1060,6	1057	Eucalyptol	12.03	1224,3	1213
Terpinolen	17.30	1091,2	1086	γ-Terpinen	13.54	1261,1	1223
Linalool	17.67	1098,8	1098	<i>p</i> -Cymol	*		1245
n-Undecan	17.73	1100,0	1100	Terpinolen	*		1284
Neomenthol	21.51	1174,6	1170	n-Tridecan	15.14	1300,0	1300
Terpinen-4-ol				n-Tetradecan	19.57	1400,0	1400
α-Terpineol	21.85	1181,3	1174	n-Pentadecan	24.06	1500,0	1500
n-Dodecan	22.80	1200,0	1200	Linalool	26.65	1558,5	1537
n-Tridecan	27.77	1300,0	1300	n-Hexadecan	28.46	1600,0	1600
n-Tetradecan	32.54	1400,0	1400	Terpinen-4-ol			
n-Pentadecan	37.06	1500,0	1500	α-Terpineol	29.42	1622,8	1688
n-Hexadecan	41.35	1600,0	1600	Neomenthol	30.87	1657,2	
n-Heptadecan	45.42	1700,0	1700	n-Heptadecan	32.67	1700,0	1700
n-Octadecan	49.29	1800,0	1800	n-Octadecan	36.77	1800,0	1800

* Coelution mit Heptamethylnonan

3. Kalibrierung einiger Monoterpene

Tab. G4. Kalibrierung der Substratterpene in Hexan (Konzentrationsbereich: 0,05 - 5 mM). Angabe der Retentionszeiten (Ret.zeit) für folgende Trennbedingungen (Temperaturprogramm: 80 °C für 2 min, 3 °C/min, 140 °C, 10 °C/min, 220 °C für 10 min; Split ca. 1:40; Probevolumen 1 µl; Trennsäule A (unpolar): SE-54 (50 m x 0,32 mm; 0,5 µm Filmdicke); Trennsäule B (polar): CW20M (50 m x 0,32 mm; 0,5 µm Filmdicke).

Monoterpene	Konz. (mM)	Ret.zeit A (min)	Peak-fläche	Peak-höhe	Ret.zeit B (min)	Peak-fläche	Peak-höhe
α -Pinen	5,471	6.89	495960	211327	4.49	485310	164784
	0,547		44087	18512		42033	14215
	0,055		5401	2013		4550	1523
2-Caren	5,511	8.90	512193	196519	6.49	508389	146963
	0,551		46015	17518		44328	12845
	0,055		5030	1884		4960	1404
α -Phellandren	5,876	8.96	510981	197979	7.30	507510	143812
	0,588		45763	17382		44189	12479
	0,059		4925	1863		4623	1308
<i>p</i> -Menth-1-en	6,409	9.59	498735	182640	6.59	489944	145258
	0,641		43936	16066		42616	12565
	0,064		4708	1710		4567	1340
Eucalyptol	5,941	10.03	465370	160824	8.61	456934	109054
	0,594		40703	13871		39224	9323
	0,059		4393	1479		4132	996
Linalool	6,362	12.49	430293	142338	20.79	419260	92913
	0,632		37979	12431		35842	7864
	0,063		4070	1306		3761	857
L-Menthol	6,151	15.83	417718	125470	24.36	410830	116349
	0,615		36974	11106		35560	10113
	0,062		3847	1144		3230	1077

Tab. G5. Kalibrierung einiger Monoterpene in Hexan (Konzentrationsbereich: 0,01 - 50 mM) und Angabe der Wiederfindung in der Heptamethylnonan-Phase bei Verwendung eines 3-Phasensystems (Serumflasche (150 ml) mit 120 ml Mineralmedium und 10 ml HMN-Phase) unter folgenden Trennbedingungen: Trennsäule SE-54 (50 m x 0,32 mm; 0,5 µm Filmdicke), Temperaturprogramm: 60 °C für 2 min, 5 °C/min, 120 °C für 0,1 min, 20 °C/min, 220 °C für 5 min; Split ca. 1:20, Probevolumen 1 µl.

Monoterpen	Retentionszeit (min)	Kalibrationsfaktoren (10 ⁻⁶ mM/Peakarea)	Wiederfindung (%) 3-Phasen-System	Löslichkeit (µmol/l H ₂ O) ¹
α-Pinen	8.96	3,65	95,1	162
Sabinen	10.18	3,96	94,9	73
β-Pinen	10.34	3,38	n.b.	235
Myrcen	10.62	4,65	n.b.	73
2-Caren	11.05	3,77	95,4	-
α-Phellandren	11.15	3,74	95,5	-
3-Caren	11.38	3,65	95,7	-
p-Cymol	11.80	3,42	95,2	112
Limonen	11.98	3,69	95,6	95
Eucalyptol	12.09	4,10	89,2	2150
γ-Terpinen	12.93	3,58	95,9	-
Terpinolen	13.94	4,01	n.b.	-
Linalool	14.20	3,83	83,7	-
Neomenthol	15.91	4,25	n.b.	1170
Terpinen-4-ol	16.19	4,31	76,5	-
Geraniol	17.38	4,49	74,8	2620

¹ Angaben zur Löslichkeit der Monoterpene in Wasser sind Weidenhamer et al. (1993) entnommen.
n.b. nicht bestimmt; - keine Angaben

4. Zusammensetzung von Pfefferminz- und Fichtennadelöl

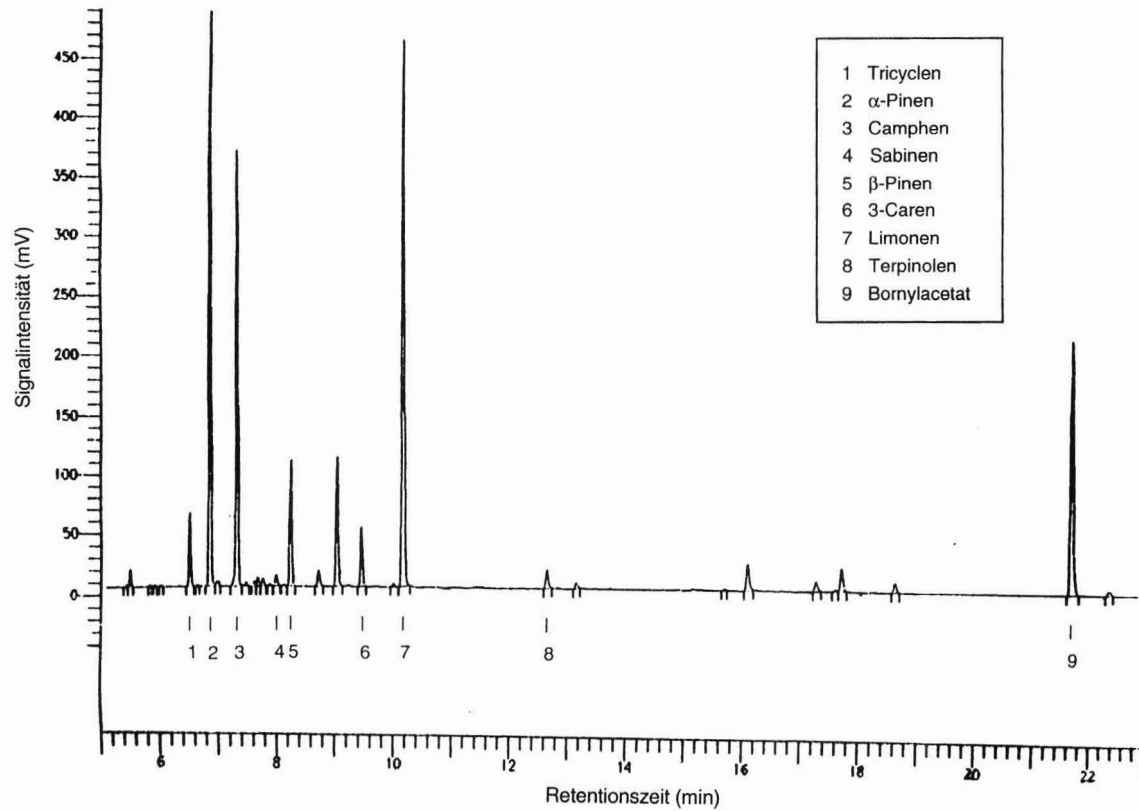


Abb. G1. GC-Chromatogramm des ätherischen Fichtennadelöls (0,1 % (v/v) in Hexan).

Zusammensetzung der verwendeten ätherischen Öle (Fichtennadelöl; Pfefferminzöl): Die berechneten Kovats-Indizes wurden mit der Trennsäule PVMS (50 m x 0,32 mm; 0,3 µm Film-
dicke) ermittelt, die aus der Literatur entnommenen KI-Werte gelten für eine DB5-Trennsäule
(Terpen-Bibliothek der Fa. Finnigan, Bremen), die prozentuale Zusammensetzung handels-
üblicher ätherischer Öle wurde Formacek und Kubeczka (1982) entnommen.

Tab. G6. Zusammensetzung des ätherischen Fichtennadelöls (Literaturangaben für Sibirian
Pine Needle Oil (*Abies sibirica*))

Komponente	KI (PVMS)	KI (DB-5)	Zusammensetzung (%)	
			gemessen	Literatur
Tricyclen	922,4	921	2,7	2,6
α-Pinen / α-Thujen	932,1	933	24,5	9,6
Camphen	947,7	946	17,8	30,0
Sabinen	971,1	971	0,1	0,0
β-Pinen	975,4	975	5,4	1,6
Myrcen	989,1	989	0,7	0,1
3-Caren	1010,0	1009	2,6	1,0
β-Phellandren			-	0,0
p-Cymol	1023,4	1022	0,2	0,5
Limonen	1027,6	1026	26,4	4,4
Campher			-	0,7
Linalool			-	0,0
Bornylacetat	1286,8	1284	15,1	35,4
β-Caryophyllen			-	0,0
α-Humulen			-	0,0
α-Terpineol			-	0,0

Tab. G7. Zusammensetzung des Pfefferminzöls; Literaturangaben für *Mentha piperita* L.-Öl.

Komponente	KI (PVMS)	K I (DB-5)	Zusammensetzung (%)	
			gemessen	Literatur
α -Pinen	932,1	933	0,3	1,6
Camphen				0,0
Sabinen	972,0	971	-	0,9
β -Pinen	975,4	975	0,0	2,0
Myrcen	989,1	989	-	0,4
2-Caren	1000,0	1001	0,9	-
<i>p</i> -Cymol	1022,4	1022	-	0,1
Limonen	1027,3	1026	1,6	2,6
1,8-Cineol	1029,8	1028	4,8	7,8
Isopulegol	1144,6	1142	0,7	0,8
Menthon	1152,5	1150	16,8	17,3
Menthofuran	1163,1	1160	13,9	7,4
Menthol	1172,1	1170	54,9	38,2
4-Terpineol	1175,8	1174	1,7	-
Isomenthon	1182,4	1180	0,5	2,5
α -Terpineol	1190,1	1187	0,4	0,1
Pulegon	1238,8	1235	0,7	1,6
Piperiton	1254,0	1250	0,1	0,4
Menthylacetat	1293,9	1293	2,7	3,8

5. Wachstumsansätze (Massenkulturen) von *Thauera* sp. Stamm 47Lol

Tab. G8. Massenkulturen von Stamm 47Lol.

Wachstumsansatz	1	2	3	4	5	6
Medium (ml)	400	400	400	500	10 000	10 000
HMN-Phase (ml)	16	16	15	15	300	300
NO ₃ (mmol)	8	16	8	20	700	700
Linalool (mmol)	1,4	4,3	2,1	2,1	6 x 15,0	5 x 19,0
erzielte OD ₆₆₀	0,325	1,80	0,634	1,03	1,08	1,30

1, 2: Wachstumsansätze in Achteckflaschen, Inkubation auf Rotationschüttler mit 70 upm

3, 4: Wachstumsansätze in Steilbrustflaschen, Inkubation auf Magnetrührer bei ca. 100 upm

5, 6: Wachstumsansätze in 10 l-Reaktor, Inkubation bei Rührerdrehzahl von 80 upm

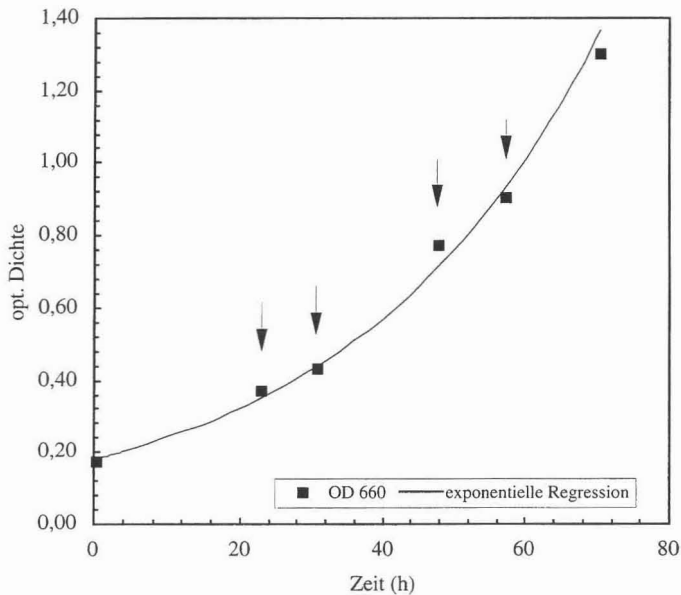


Abb. G2. Zunahme der optischen Dichte OD₆₆₀ beim anaeroben Wachstum von Stamm 47Lol mit Linalool und Nitrat in 10 l-Reaktor (Wachstumsansatz 6). Linalool wurde der wachsenden Kultur portionsweise zugegeben, der Zeitpunkt der Substratzugabe ist durch Pfeile gekennzeichnet.

6. Spektroskopische Daten der Monoterpenalkohole
Tab. G9. Absorptionsmaxima der Monoterpene (λ_{\max}) in Kaliumphosphat-Puffer (KPP) und Tris/HCl-Puffer (TRIS)

Monoterpene	100 mM KPP, pH 7,0	100 mM TRIS, pH 8,0	Literatur (Solvens) ^a
Linalool	209 nm	215 nm	---
Nerol	214 nm	218 nm	---
Geraniol	213 nm	217 nm	---
Citral (<i>cis+trans</i>)	207 nm	230 nm	---
<i>cis</i> -Citral (Neral)	n. b.	n. b.	234 nm (EtOH)
<i>trans</i> -Citral (Geranial)	n. b.	n. b.	236 nm (EtOH)
Geraniumsäure	n. b.	n. b.	220 nm (MeOH)

^aLiteraturangaben nach Dev et al. (1982)

7. Kurzbeschreibung der Neuisolate

Description of *Thauera linaloolentis* sp. nov. (suggested)

Thauera linaloolentis (li.na'lo.o.len.tis. Sp. n. *linaloe* wood of trees in Middle and South America (*Bursera* sp. mexican linaloa, *Aniba rosaedorea* linaloa from Guyana), from which an essential oil is derived that contains mainly linalool. L.adv. *olens* smelling M. L. *linaloolentis* linaloa smelling, referring to the degradation of linalool by the microorganism).

Gram-negative, motile, rod-shaped cells are 1.4-2.7 μm long by 0.5-0.8 μm wide with rounded ends, and occur as single units. The facultatively anaerobic, chemoorganotrophic metabolism is strictly oxidative. Oxygen, nitrate, nitrite, or dinitrogen oxide can serve as electron acceptor. Carbon and energy sources are linalool, geraniol, ethanol, and many volatile fatty acids. Sugar compounds, and hydrocarbons were not utilised under denitrifying conditions. No vitamins are required for growth. The micro-organisms grow at pH 7 to 8, and at 15 to 35 °C. 16:1, *cis*-9 and 16:0 are the predominant cellular fatty acids. The micro-organism belongs to the beta subclass of the *Proteobacteria* as determined by 16S rRNA gene sequence analysis.

The type strain 47Lol was isolated from activated sludge with freshwater mineral media containing linalool and nitrate.

Description of *Thauera terpenica* sp. nov. (suggested)

Thauera terpenica (ter.pe'ni.ca. M. L. adj. *terpenica* referring to terpene utilisation). Cells are Gram-negative, rod-shaped (1.3-2.2 μm long by 0.8-1.0 μm wide) with rounded ends. The micro-organisms occur as single units, in logarithmic growing cultures often as pairs, agglomerates of cells were observed in cultures of strain 58Eu. The facultatively anaerobic, chemoorganotrophic metabolism is strictly oxidative. Oxygen, nitrate, nitrite, or dinitrogen oxide can serve as electron acceptor. During growth with nitrate as electron acceptor nitrite is formed als an intermediate. Strain 58Eu, the type strain, grows on monoterpenes (carbon and energy sources include eucalyptol, sabinene, β -pinene, α -phellandrene, α -terpinene, γ -terpinene, terpinolene, (+)-limonene, α -terpineol, terpinen-4-ol), and many volatile fatty acids. Sugar compounds, alkanes, and aromatic hydrocarbons are not utilised under denitrifying conditions. Cyanocobalamin is required for growth of strain 58Eu in defined media. The micro-organism grow at pH 6 to 9, and at 15 to 35 °C. 16:1, *cis*-9 and 16:0 are the predominant cellular fatty acids. The G+C content of strain 58Eu is 64.2 mol%. The microorganism belongs to the beta subclass of the *Proteobacteria* as determined by 16S rRNA gene sequence analysis.

Strain 58Eu was selectively enriched from a ditch of a mixed forest in freshwater mineral medium containing eucalyptol and nitrate.

Description of *Thauera terpenica* strain 21Mol (differences to type strain 58Eu)

Grows on a few monoterpenes including menthol, menthone, isomenthol, isopulegol, and pulegone. No vitamins are required for growth. The G+C content of strain 21Mol is 63.9 mol%.

Strain 21Mol was isolated from a mixture of activated sludge and sediment samples from ditches in mixed forests (Bremen) with freshwater mineral media containing menthol and nitrate.

Description of *Alcaligenes defragrans* sp. nov. (suggested)

Alcaligenes defragrans (de.fra.grans. L. prep. *de* from, away; L. part. *fragrans* sweet-scented; M. L. *defragrans* to annihilate fragrance, referring to the capacity to degrade monoterpenes).

Gram-negative, rod-shaped cells are 1.3-1.8 μm long by 0.5-0.8 μm wide, and have rounded ends. Cells are motile, and occur as single unit when the organisms are grown anaerobically on monoterpenes. The facultatively anaerobic, chemoorganotrophic metabolism is strictly oxidative. Oxygen, nitrate, nitrite and dinitrogen oxide can serve as electron acceptor. Grows on monoterpenes (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. The monoterpenes are metabolised to CO_2 . Sugar compounds and aromatic hydrocarbons were not used under denitrifying conditions. No vitamins were required for growth. Grows at pH 6 to 8, and at 15 to 40°C. 16:0 and 17:0, *cyclo* are their predominant cellular fatty acids. The G+C content of strain 54Pin is 66.9 mol%. The microorganism belongs to the beta subclass of the *Proteobacteria* as determined by 16S rRNA gene sequence analysis.

The strains were isolated from a mixture of activated sludge and sediment samples from ditches in mixed forests (Bremen) with freshwater mineral media containing a individual monoterpene and nitrate. The type strain is strain 54Pin, which was isolated with α -pinene as sole carbon source.

Danksagung

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

Herrn Dr. J. Harder danke ich besonders für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, die tatkräftige Unterstützung und für die vielen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Insbesondere bei unserer technischen Assistentin Christina Probian möchte ich mich für die Vorarbeiten zur Isolierung der monoterpenverwertenden Stämme und für die zahlreichen Hilfen im täglichen Laboralltag bedanken.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Olaf Kniemeyer und Udo Heyen für die gute Zusammenarbeit im Projekt "Isoprenoide Naturstoffe" und wünsche Ihnen weiterhin viel Spaß und Erfolg mit Ihren Themen. Astrid Behrends und Udo Heyen danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

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

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie und des Max-Planck-Instituts in Bremen, die durch eine freundliche und konstruktive Zusammenarbeit Ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Foß
Geboren am 11. Juli 1968
in Pforzheim

Schulbesuch

1975 - 1979 Ulrich-von-Dürrenz-Grundschule in Mühlacker
1979 - 1988 Theodor-Heuss-Gymnasium in Mühlacker; Abitur

Studium

WS 1988 - SS 1994 Studium der Technischen Biologie an der Universität
Stuttgart; Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Biover-
fahrenstechnik;

Studienarbeit am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik, Abteilung Technische Mikrobiologie,
Stuttgart

Thema der Arbeit: "Untersuchungen zum Produktionsverhalten
von *Corynebacterium glutamicum* in einer kontinuierlichen,
zweistufigen Laboranlage"

Diplomarbeit am Institut für Siedlungswasserbau und am Institut
für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

Thema der Arbeit: "Tetrachlorethen-Dechlorierung in wachsen-
den Kulturen und Zellsuspensionen von *Dehalospirillum multi-
vorans*" (Prof. Dr. G. Diekert)

Studienabschluß als Diplom-Biologin (techn. orientiert)

12 / 94 - 2 / 98

Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-
Institut für marine Mikrobiologie in Bremen, Abteilung Mikro-
biologie (Prof. Dr. F. Widdel)

