

**Anaerober Abbau von *p*-Cymen und anderen
Dialkylbenzenen durch neu isolierte Bakterienarten**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/Chemie der

Universität Bremen

vorgelegt von

Gerda Harms

aus Aurich

August 1998

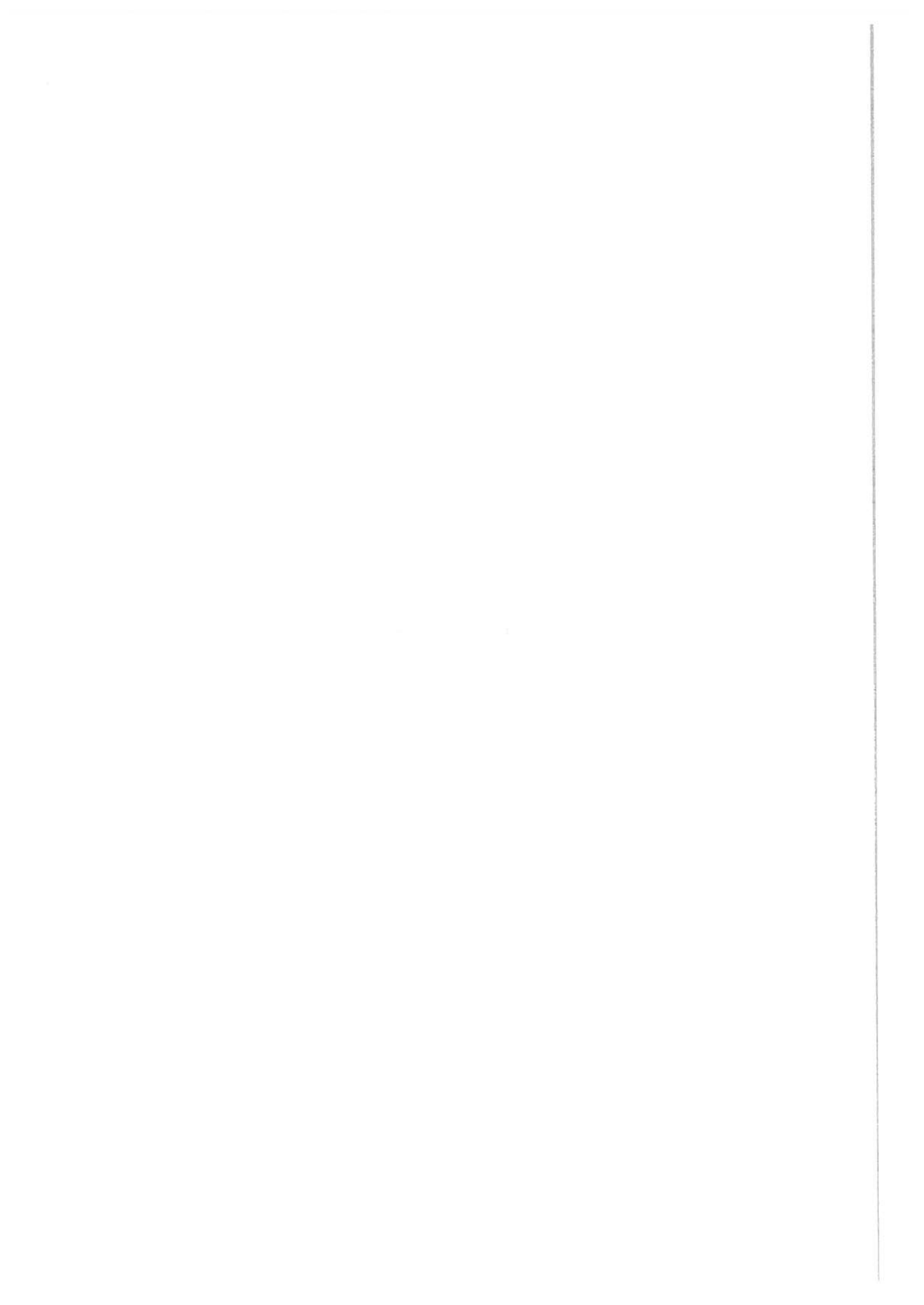
Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von März 1995 bis November 1997 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Fischer

Tag des Promotionskolloquiums: 06. August 1998

Meinen Eltern



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

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

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung	3
1. Aromatische Kohlenwasserstoffe in lebenden Organismen	3
2. Zusammensetzung, Bildung und Verwendung von Erdöl	4
3. Chemische Eigenschaften und häufige Reaktionstypen monoaromatischer Kohlenwasserstoffe	6
4. Mikrobieller Abbau monoaromatischer Kohlenwasserstoffe unter oxidischen und anoxischen Bedingungen	7
4.1. Aerober Abbau	7
4.2. Anaerober Abbau	8
4.2.1. Zum Aromatenabbau befähigte anaerobe Bakterien	8
4.2.2. Mechanismen des anaeroben Abbaus monoaromatischer Kohlenwasserstoffe	12
5. Rolle nitratreduzierender Bakterien beim anaeroben Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe an natürlichen Standorten	13
6. Bakterielle Sulfatreduktion in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen	14
6.1. Folgen der bakteriellen Sulfatreduktion für die Erdölindustrie	14
6.2. Vorkommen sulfatreduzierender Bakterien und anderer anaerober Mikroorganismen in Erdölreservoirs und Erdölförderanlagen	15
6.3. Organische Substrate für das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen	17
7. Toxikologische Bedeutung monoaromatischer Kohlenwasserstoffe	19

B	Ergebnisse und Diskussion	20
1.	Neue nitratreduzierende, <i>p</i> -Cymen verwertende Bakterienstämme	20
1.1.	Isolierung der Stämme pCyN1 und pCyN2	20
1.2.	Genetische Verwandtschaft der Stämme pCyN1 und pCyN2	21
1.3.	Morphologische und physiologische Charakterisierung der Stämme pCyN1 und pCyN2	21
1.4.	Erste Untersuchungen zum Abbauweg von <i>p</i> -Cymen unter anoxischen nitratreduzierenden Bedingungen	23
1.4.1.	Induktionsstudien mit Stamm pCyN1	23
1.4.2.	Produktion von Intermediaten und Dead-End Metaboliten in gewachsenen Kulturen der Stämme pCyN1 und pCyN2	23
2.	Neue sulfatreduzierende, Toluol bzw. <i>m</i> -Xylen verwertende Bakterienstämme	24
2.1.	Isolierung der Stämme Tol3 und mXyS1	24
2.2.	Genetische Verwandtschaft des Stammes mXyS1	25
2.3.	Morphologische und physiologische Charakterisierung der Stämme Tol3 und mXyS1	25
3.	Nitratreduzierende Anreicherungskulturen mit Erdöl als alleiniger Quelle für organische Wachstumssubstrate	27
3.1.	Wachstumsverlauf nitratreduzierender Anreicherungskulturen mit Erdöl als alleiniger Quelle für organische Wachstumssubstrate	27
3.2.	Zeitliche Korrelation des Abbaus der Aromaten- und der Alkanfraktion aus dem Erdöl mit der Zweiphasigkeit des Wachstums	28
3.3.	Analyse der Bakterienpopulation in einer Anreicherungskultur durch Sondenhybridisierung	29
C	Literaturverzeichnis	30

Teil II: Publikationen

A	Publikationsliste mit Erläuterungen	40
----------	--	----

B Publikationen

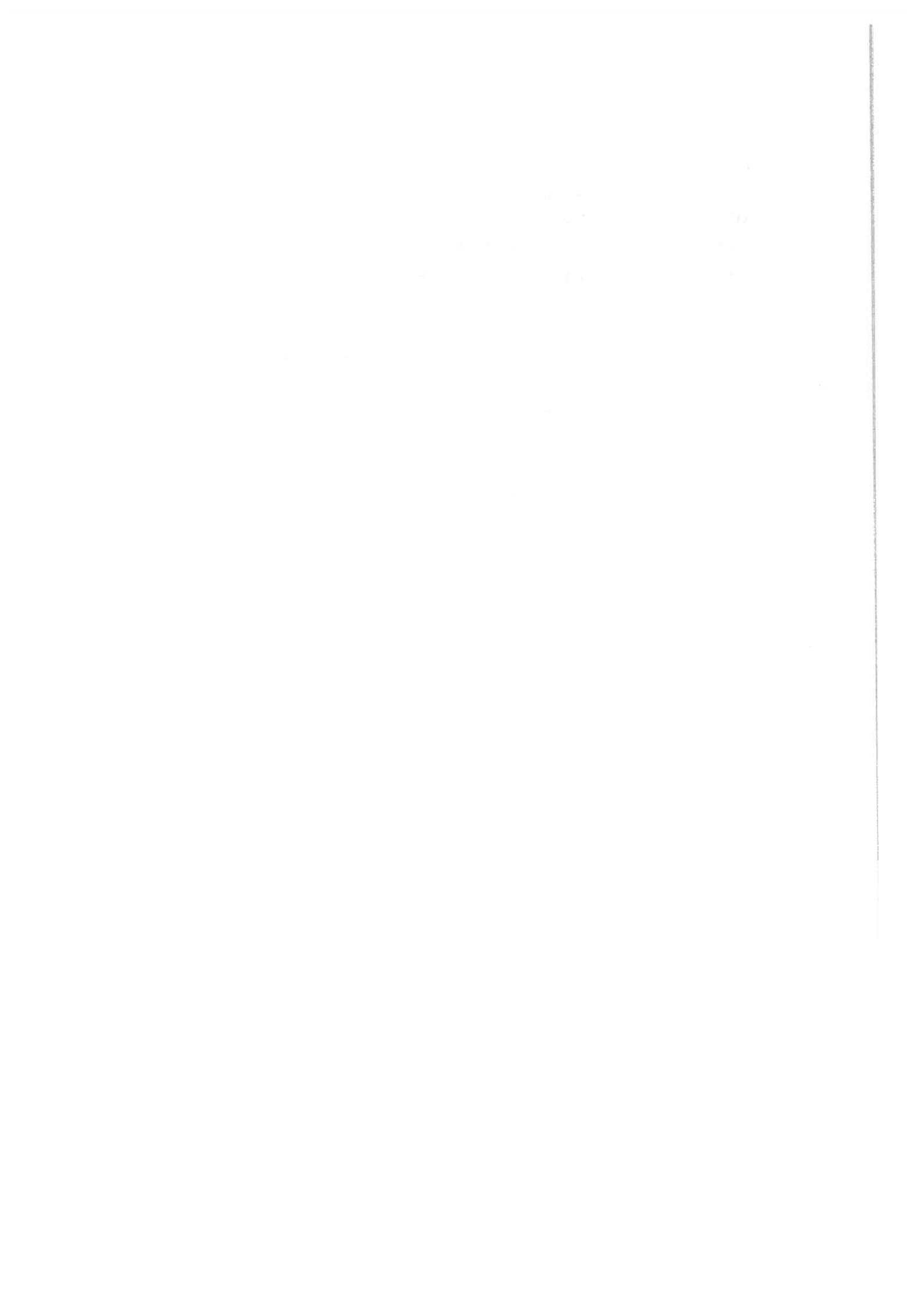
1. Anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon, *p*-isopropyltoluene (*p*-cymene) by two new types of denitrifying bacteria 41
2. Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria 64
3. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria* 80

C Weitere Publikationen in Vorbereitung 107

Abkürzungen

Ade441	Oligonukleotidsonde, spezifisch für <i>Alcaligenes defragrans</i>
ALF1b	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Alpha-Untergruppe der Proteobakterien
ARC915	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Archaeobakterien
AT1458	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien des <i>Azoarcus-Thauera</i> Clusters (Beta-Untergruppe der Proteobakterien)
ATCC	American Type Culture Collection
BET42a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Beta-Untergruppe der Proteobakterien
BTEX	Benzen, Toluol, Ethylbenzen, Xylene
CF319a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien des <i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides</i> Clusters
CoA	Coenzym A
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EUB338	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Eubakterien
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
GAM42a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Bakterien der Gamma-Untereinheit der Proteobakterien
GC	Gaschromatographie
G+C	Guanin und Cytosin
h	Stunde
HGC69a	Oligonukleotidsonde, spezifisch für Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HPLC	high performance liquid chromatography
k	kilo-
l	Liter
μ	mikro-
m	milli- oder Meter
min	Minute

mol	Mol
M	molar
MPa	Megapascal
MPN	most probable number
mXyS1	sulfatreduzierender Bakterienstamm, nutzt <i>m</i> -Xylen als Wachstumssubstrat
NAD(P)H	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat)
oXyS1	sulfatreduzierender Bakterienstamm, nutzt <i>o</i> -Xylen als Wachstumssubstrat
pCyN1, pCyN2	nitratreduzierende Bakterienstämme, nutzen <i>p</i> -Cymen als Wachstumssubstrat
ppm	parts per million
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tol3	sulfatreduzierender Bakterienstamm, nutzt Toluol als Wachstumssubstrat
(wt/wt)	Masse pro Masse
(vol/vol)	Volumen pro Volumen



Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden neuartige nitrat- und sulfatreduzierende Bakterien isoliert und charakterisiert, die anaerob monoaromatische Kohlenwasserstoffe vollständig zu CO₂ abbauen können. Die nitratreduzierenden Isolate, Stämme pCyN1 und pCyN2, wurden für Studien zum Metabolismus von *p*-Cymen verwendet. In nitratreduzierenden Anreicherungskulturen mit Rohöl wurde der Wachstumsverlauf, die Verwertung von Kohlenwasserstoffen aus dem Öl und die Gruppenzugehörigkeit der sich entwickelnden Bakterien untersucht.

1 In anaeroben Anreicherungskulturen, die mit Süßwasserschlämmen und *p*-Xylen, *p*-Ethyltoluen bzw. *p*-Cymen (*p*-Isopropyltoluen) in Gegenwart von Nitrat als Elektronenakzeptor gewonnen wurden, erfolgte der Abbau umso schneller, je größer der Alkylsubstituent in *p*-Stellung zur Methylgruppe war. Aus der Anreicherungskultur mit *p*-Cymen, dem besten Wachstumssubstrat, wurden zwei nitratreduzierende Bakterienstämme isoliert. Die Isolate, bezeichnet als Stamm pCyN1 und Stamm pCyN2, stellen die ersten Reinkulturen dar, die zur Nutzung eines Cymen-Isomers unter anoxischen Bedingungen befähigt sind. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens zeigte, daß beide Stämme zur β -Untergruppe der Proteobakterien gehören und in einem Cluster mit *Thauera selenatis* und *Azoarcus* Arten liegen.

2 In Experimenten mit lebenden Zellen von beiden denitrifizierenden Stämmen wurden erste Hinweise auf den anaeroben Abbauweg von *p*-Cymen gewonnen. Induktionsexperimente mit dichten Zellsuspensionen von Stamm pCyN1 lassen auf ein Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Enzymsystemen schließen, nämlich eines für den Abbau von Toluol und ein weiteres für den Abbau von *p*-Cymen und *p*-Ethyltoluen. In auf *p*-Cymen gewachsenen Kulturen der Stämme pCyN1 und pCyN2 wurde *p*-Isopropylbenzoat (*p*-Cumat) als Intermediat gefunden. Wurde Kulturen der Stämme *p*-Xylen oder *p*-Ethyltoluen im Gemisch mit *p*-Cymen zugesetzt, wurden *p*-Methylbenzoat bzw. *p*-Ethylbenzoat im Medium identifiziert. Nach Zugabe eines Gemisches von *p*-Cymen und *p*-*tert*-Butyltoluen zu Kulturen von Stamm pCyN1 wurde eine Ausscheidung von *p*-*tert*-Butylbenzoat in das Medium beobachtet. *p*-Methylbenzoat und *p*-*tert*-Butylbenzoat sind Dead-End Metabolite, die von den Stämmen nicht weiter verwertet werden können.

3 Zwei neue, Toluol bzw. *m*-Xylen verwertende sulfatreduzierende Bakterienstämme, genannt Tol3 und mXyS1, wurden aus einer Anreicherungskultur aus der Wasserphase eines Ölseparators einer Erdölraffinerie isoliert und charakterisiert. Stamm mXyS1 gehört einer neuen Gattung innerhalb der δ -Untergruppe der Proteobakterien an. Stamm Tol3 ist in der Lage, neben Toluol auch *o*-Xylen anaerob mit Sulfat als Elektronenakzeptor abzubauen. Mit Stamm

mXyS1 wurde erstmals ein Abbau von *m*-Xylen in einer Reinkultur sulfatreduzierender Bakterien nachgewiesen. Ferner kann Stamm mXyS1 neben *m*-Xylen auch Toluol, *m*-Ethyltoluol und *m*-Cymen anaerob abbauen. Ein anaerober Abbau von *m*-Ethyltoluol und *m*-Cymen war zuvor noch nicht mit Reinkulturen anaerober Bakterien nachgewiesen worden. Neben dem bereits früher in unserem Labor aus derselben Anreicherungskultur isolierten sulfatreduzierenden, *o*-Xylen verwertenden Stamm oXyS1 können die Stämme Tol3 und mXyS1 als die für den in der Anreicherungskultur erfolgenden selektiven Abbau von Toluol, *o*-Xylen, *m*-Xylen, *m*-Ethyltoluol und *m*-Cymen aus dem Erdöl verantwortlichen Bakterien angesehen werden. Tatsächlich wuchsen die sulfatreduzierenden Stämme Tol3 und mXyS1 anaerob mit Nordsee-Erdöl als alleiniger Quelle organischer Substrate für die Sulfatreduktion.

4 In nitratreduzierenden Anreicherungskulturen, die aus Grabensedimenten bzw. einer Altöldeponie mit Nordsee-Erdöl als einzige Quelle für organische Substrate und Nitrat als Elektronenakzeptor angezogen wurden, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ralf Rabus die Verwertung von Erdölbestandteilen nachgewiesen. Diese Anreicherungskulturen nutzten mehrere Alkylbenzene und *n*-Alkane anaerob als organische Kohlenstoffquellen und Elektronendonatoren direkt aus dem Erdöl. Über die Nitratreduktion und die Analyse der Erdölfraktionen (durchgeführt von Dr. Heinz Wilkes, Jülich) wurde ein zweiphasiges Wachstum festgestellt. In der ersten Wachstumsphase der Anreicherungskulturen wurden monoaromatische Kohlenwasserstoffe mit einer Seitenkettenlänge von C₁ bis C₃ verwertet, während in der zweiten Wachstumsphase unverzweigte Alkane mit einer Länge von C₅ bis C₁₂ aus dem Öl verschwanden.

Während des Wachstums reicherten sich in der wässrigen Phase diverse Alkylbenzoate an. Die während des anaeroben Abbaus vollständig oxidierbarer Alkylbenzene wie Toluol ausgeschiedenen Verbindungen konnten nur kurzzeitig in geringsten Mengen gemessen werden, da sie als Intermediate wahrscheinlich weiter abgebaut wurden. Die Alkylbenzoate hingegen, die vermutlich bei Transformationsreaktionen nicht als Wachstumssubstrat nutzbarer Alkylbenzene entstanden, häuften sich im Medium an (Analyse der wässrigen Fraktion durchgeführt von Dr. Heinz Wilkes, Jülich). Mit Hilfe einer neuen, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten, gegen 16S rRNA gerichteten Oligonukleotidsonde wurde gezeigt (durchgeführt von Andreas Schramm), daß die Mehrzahl der mit Erdöl und Nitrat angereicherten Bakterien zum *Azoarcus/Thauera* Cluster der β -Untergruppe der Proteobakterien gehörten.

Teil I: Darstellung der Ergebnisse im Gesamtzusammenhang

A Einleitung

Aromatische Kohlenwasserstoffe sind in der Umwelt weit verbreitet. Zwei Hauptquellen lassen sich unterscheiden. Einerseits werden aromatische Kohlenwasserstoffe von lebenden Organismen, vor allem Pflanzen, produziert. Andererseits gelangen aromatische Kohlenwasserstoffe über Erdöl und die daraus hergestellten Produkte in die Umwelt. Die monoaromatischen Kohlenwasserstoffe, insbesondere Benzen, Toluol, Ethylbenzen und Xylene (als BTEX bezeichnet), zählen neben den Alkanen zu den Hauptbestandteilen des Erdöls. Aufgrund der Verbreitung dieser Substanzklasse in der Natur ist es verständlich, daß Bakterien im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt haben, aromatische Kohlenwasserstoffe als organische Substrate zum Wachstum zu nutzen. Der bakterielle Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe sowie auch der vieler anderer aromatischer Verbindungen durch aerobe Bakterien wird seit Jahrzehnten intensiv erforscht. Erst in den letzten zwölf Jahren wurde auch der anaerobe Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Kulturen nitratreduzierender, Fe(III)-reduzierender, sulfatreduzierender und methanogener Bakterien nachgewiesen und untersucht.

1. Aromatische Kohlenwasserstoffe in lebenden Organismen

In der Natur sind aromatische Verbindungen als wichtige Bestandteile lebender Organismen weit verbreitet. Der Benzenring ist neben dem Glucosylrest die häufigste chemische Struktur (Smith 1994). Die pflanzliche Biomasseproduktion beträgt jährlich $1,3 \cdot 10^{17}$ g Kohlenstoff (Böger 1975). Rund 30 bis 40 % dieser Biomasse bestehen aus aromatischen Verbindungen, wobei polymeres Lignin den Hauptanteil ausmacht (Elder und Kelly 1994, Schink et al. 1992). Produkte des pflanzlichen und mikrobiellen Sekundärstoffwechsels sowie die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan besitzen ebenfalls einen aromatischen Ring. Aus Phenylalanin oder Ferulasäure, einem Zwischenprodukt der Ligninsynthese, können während anaerober Transformationsprozesse aromatische Kohlenwasserstoffe wie zum Beispiel Toluol gebildet werden (Grbić-Galić 1986, Jüttner und Henatsch 1986). Ein aus dem anoxischen Sediment eines Süßwassersees isolierter Bakterienstamm war fähig, aus Phenylalanin, Phenylpyruvat, Phenyllactat und Phenylacetat den Kohlenwasserstoff Toluol und aus Tyrosin Phenol zu produzieren (Fischer-Romero et al. 1996). Von den drei Cymen-Isomeren, *o*-, *m*- und *p*-Cymen, ist in der Umwelt das letztere das mengenmäßig relevanteste. *p*-Cymen kommt weltweit als Bestandteil in Pflanzen in ätherischen Ölen wie zum Beispiel Kümmel- und Eukalyptusöl vor (Gildemeister und Hoffmann 1960, Hegnauer 1966). *p*-Cymen ist mit vielen

natürlich vorkommenden alkenoiden Monoterpenen strukturverwandt. Eine bakterielle Produktion dieses Isomers wurde beim anaeroben Abbau der alkenoiden Monoterpene 3-Caren und α -Pinen durch nitratreduzierende Anreicherungskulturen beobachtet (Föß 1998, Harder und Probian 1995). Ferner wurde eine *p*-Cymen-Bildung bei der anaeroben Transformation von α -Terpinen durch Darmbakterien in Raupen der Mottenart *Spodoptera litura* gefunden. In der betreffenden Versuchsreihe konnte jedoch das für eine aerobe Transformation dieses Terpens typische 4-Isopropyl-1,3-cyclohexadienmethanol nachgewiesen werden, was die vermeintliche Abwesenheit von Sauerstoff während des Versuches anzweifeln läßt (Miyazawa et al. 1996).

2. Zusammensetzung, Bildung und Verwendung von Erdöl

Erdöl kann aus über 600 Einzelkomponenten bestehen und stellt ein komplexes Gemisch aus Kohlenwasserstoffen und Verbindungen dar, die Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff enthalten. Der Anteil der einzelnen Substanzklassen variiert je nach Herkunft der Rohöle. Die Hauptbestandteile des Erdöls lassen sich in vier Stoffklassen unterteilen. (1) Die erste Gruppe bilden die gesättigten Kohlenwasserstoffe, wozu die unverzweigten *n*-Alkane, die verzweigten Alkane und die Cycloalkane zählen. Die leicht flüchtigen *n*-Alkane mit einer Kettenlänge bis zehn Kohlenstoffatomen sind die wichtigsten Bestandteile des Erdöls. Bei 517 untersuchten Rohölen liegt der durchschnittliche Anteil an gesättigten Kohlenwasserstoffen bei 57 % (Tissot und Welte 1984). (2) Die zweite Gruppe besteht aus aromatischen Kohlenwasserstoffen. Zu dieser Gruppe zählen reine Aromaten und teilweise gesättigte polyzyklische Kohlenwasserstoffe mit mindestens einem aromatischen Ringsystem. Der Gehalt an aromatischen Kohlenwasserstoffen schwankt in den untersuchten Erdölen zwischen 20 und 45 %; der Durchschnitt liegt bei 29 %. Der Anteil der einzelnen monoaromatischen Kohlenwasserstoffe (wt/wt) im Rohöl kann im Extremfall Werte von 1,8 % für Toluol, 1,6 % für Ethylbenzol und 1,0 % für *m*-Xylen bzw. Benzen erreichen (Hunt 1979). (3) Der dritten Gruppe gehören Harze und Asphaltene an, wobei es sich um hochmolekulare polyzyklische Verbindungen handelt, die Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatome enthalten. Der Anteil dieser Substanzklasse in den Rohölen schwankt zwischen 0 und 60 % und ist stark abhängig von einer früheren mikrobiellen Abbauaktivität. Neben dem selektiven Abbau von Kohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen können sogenanntes „*water-washing*“ (Lösung und Auswaschung relativ wasserlöslicher Bestandteile wie Toluol, Benzen oder sehr kurzkettige Alkane) sowie unvollständige Oxidationsprozesse zur Vergrößerung des Anteils an Verbindungen der dritten Gruppe führen, da diese biologisch schwer angreifbar bzw. schwer löslich oder schwer flüchtig sind. (4) Zur vierten Gruppe gehören niedermolekulare Verbindungen, die Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff enthalten. Gesättigte Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkettenlänge von C₁ - C₂₀ sowie Cycloalkansäuren, die als Naphthensäuren zusammengefaßt werden, sind als wichtige sauerstoffhaltige Substanzen im Rohöl zu nennen,

wobei der Anteil an diesen Säuren in jungen Ölen bei 2,5 % liegen kann. Außerdem befinden sich sauerstoffhaltige aromatische Verbindungen wie Cresole, Phenol und Furanderivate in den Rohölen. Neben den genannten Verbindungen enthält Rohöl schwefelhaltige Substanzen sowie geringe Mengen an niedermolekularen stickstoffhaltigen Verbindungen. Zu den im Rohöl vorhandenen schwefelhaltigen Verbindungen zählen Thiole und Dialkylsulfide. Benzothiophene können in seltenen Fällen bis zu 23,4 % der aromatischen Substanzgruppe ausmachen (Tissot und Welte 1984). Beispiele für stickstoffhaltige Verbindungen sind Pyridin, Chinon und Carbazolderivate.

Erdöl ist biogenen Ursprungs, wobei große Mengen an abgelagerter organischer Materie in aquatischen Bereichen die Ausgangssubstanz bildeten. Hierbei kann es sich sowohl um Landpflanzen als auch um marines Plankton handeln. Aus der erstgenannten kontinentalen Quelle entstanden Öle mit einem hohen Gehalt an aliphatischen Kohlenwasserstoffen, während aus der zweiten, marinen Quelle Öle mit einem hohen Gehalt an zyklischen Kohlenwasserstoffen gebildet wurden (Tissot und Welte 1984). Das organische Material, das sich in tektonischen Gräben wie der Nordsee sammelte, wurde wahrscheinlich über langer Zeit unter Sedimenten begraben und gelangte somit in tiefe Erdschichten. Die daraufhin folgende Genese (Diagenese und Katagenese) von Erdöl erfolgte höchstwahrscheinlich durch die in den Lagerstätten vorherrschenden Extremverhältnisse wie hohe Temperatur bei hohem Druck unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff. In welchem Ausmaß Mikroorganismen bei der Reifung des Erdöls eine Rolle spielten, ist bis dato unbekannt.

In der Natur ist das Erdöl in anoxischen Lagerstätten zwischen Gesteinsschichten gelagert, wo extreme Temperatur- und Druckverhältnisse sowie hohe Salzkonzentrationen und anoxische Bedingungen vorherrschen. In vielen der in 2000 bis 4000 Meter Tiefe gelegenen Reservoirs herrschen Durchschnittstemperaturen von 60 - 120 °C, Drücke von 20 - 59 MPa sowie Salzkonzentrationen von über 100 g/l NaCl, welche sehr extreme Bedingungen für mikrobielles Wachstum darstellen (Donaldson et al. 1989). Sauerstoff gelangt erst während der sekundären Erdölförderung und nur in geringen Mengen mit dem benutzten Injektionswasser in die Reservoirs.

Weltweit werden immense Mengen an Rohöl gefördert, transportiert, gelagert und verarbeitet. Im Jahre 1989 wurden rund $1 \cdot 10^{12}$ US-Gallonen Erdöl (1 US-Gallone = 3,8 Liter) verbraucht (Prince 1992). Immer wieder gelangen Teile dieses Öls und daraus gewonnene Treibstoffe durch Unfälle auf den Ölplattformen, Tankerunfälle, Undichtigkeiten in Pipelines und Lagertanks, häusliche sowie industrielle Unfälle und normalen Schiffsverkehr in die Umwelt. In Gewässern kann dieses zum Sterben von Fischen, Vögeln und wirbellosen Tieren führen (Da Silva et al. 1997). Zu den betroffenen Standorten zählen neben Böden und Gewässern auch die trinkwasserspendenden Grundwasserleiter. In diesen stellen vor allem Benzen, Toluol, Ethylbenzen und Xylene, die man abgekürzt als BTEX zusammenfaßt, aufgrund ihrer relativ guten Löslichkeit in Wasser und des damit verbundenen Transports eine Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. BTEX zählen außerdem zu den 50 mengenmäßig

wichtigsten industriell produzierten Verbindungen. Die Produktion an derartigen Aromaten beträgt jährlich mehrere Millionen Tonnen (Fishbein 1985), wobei Kohle und Erdöl die wichtigsten organischen Rohstoffquellen bilden (Morrison und Boyd 1986). Sie werden in großem Maßstab als Lösungsmittel und, zusammen mit den polyzyklischen aromatischen Verbindungen, als Ausgangskemikalien für eine große Zahl von organischen Syntheseprodukten wie zum Beispiel Pharmazeutika, Agrochemikalien und Polymeren eingesetzt (Koch und Wagner 1989, Smith 1994). Aus den genannten Gründen hat die Erforschung des mikrobiellen Abbaus von Erdölbestandteilen sowohl unter oxidischen als auch anoxischen Bedingungen immer mehr an Bedeutung gewonnen.

3. Chemische Eigenschaften und häufige Reaktionstypen monoaromatischer Kohlenwasserstoffe

Aromatische Kohlenwasserstoffe sind reaktionsträge organische Verbindungen. Die Stabilität aromatischer Kohlenwasserstoffe beruht hauptsächlich auf dem stabilen Charakter des delokalisierten π -Elektronensystems (Sykes 1988).

Der häufigste Reaktionstyp aromatischer Kohlenwasserstoffe ist die elektrophile Substitution, wobei der Wasserstoff ersetzt wird und als Proton das Molekül verläßt. Mit steigender Ladungsdichte im Ring steigt die Reaktivität gegenüber elektrophilen Agenzien. Reaktionen am Ring werden durch erstsubstituierte Gruppen beeinflusst. Ein Ersts substituent kann eine Zweitsubstitution entweder in *o*- und *p*-Position oder in *m*-Position bewirken. Die Ersts substituenten werden entsprechend in Substituenten erster (*o/p*-dirigierend) und zweiter Ordnung (*m*-dirigierend) unterteilt; zu ersteren zählen beispielsweise die Halogene sowie $-C_nH_{2n+1}$, $-OR$, $-OH$, $-NH_2$ und $-NR_2$, während zu der zweiten die Nitrogruppe ($-NO_2$) sowie Aldehyd-, Keto- und Säuregruppen gehören. Die Wirkung der Ersts substituenten auf die Zweitsubstitution am aromatischen Ring kann durch Induktions- und Mesomerie-Effekte erklärt werden (Sykes 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Alkylbenzolen untersucht. Eine aliphatische Seitenkette bewirkt durch ihren induktiven Effekt über die σ -Elektronen ein Dipolmoment am Alkylbenzol, wobei die Elektronendichte im aromatischen Ring erhöht wird (Sykes 1988). So ist zum Beispiel der induktive Effekt der Methylgruppe des Toluens zwar wesentlich schwächer als der deprotonierten Hydroxylgruppe beim Phenolat-Anion, führt aber durch die erhöhte Ladungsdichte im Ring schon zu einer stärkeren Reaktivität des Toluens im Vergleich zum Benzen (March 1985). Substituenten wie zum Beispiel $-Cl$, $-OH$, $-OR$ oder $-NR_2$ üben hingegen einen negativen induktiven Effekt aus, d. h., sie ziehen σ -Elektronen aus dem Benzenring zu sich hin.

Sehr stark wird die Reaktivität aromatischer Verbindungen durch sogenannte Mesomerieeffekte (M-Effekte), die von den Wechselwirkungen freier Elektronen der Substituenten mit dem aromatischen π -Elektronensystem herrühren, beeinflusst. Auch hierbei

wird die Elektronendichte im Benzenkern beeinflusst, die Stärke des Einflusses ist hier jedoch aufgrund der leichteren Polarisierbarkeit und Verschiebbarkeit der π -Elektronen viel größer.

Die Reaktionen an der Seitenkette der Alkylbenzene verlaufen häufig über ein Radikal oder Kationen am Benzylkohlenstoffatom, d. h. dem zum Ring nächsten Kohlenstoffatom. Sowohl Radikal als auch Kation werden durch den mesomeren Effekt des aromatischen Systems stabilisiert (Morrison und Boyd 1986).

4. Mikrobieller Abbau monoaromatischer Kohlenwasserstoffe unter oxischen und anoxischen Bedingungen

4.1. Aerober Abbau

In den 50er und 60er Jahren wurde der aerobe Abbau aromatischer Verbindungen mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor von R. Stanier und S. Dagley beschrieben (Evans und Fuchs 1988, Schink et al. 1992, Smith 1994). Sowohl Monooxygenasen als auch Dioxygenasen katalysieren im aeroben Monoaromaten-Abbau die Initialreaktion. Die Mehrzahl monoaromatischer Verbindungen wird durch Mikroorganismen zu den zentralen Intermediaten Catechol (1,2-Dihydroxybenzen, Brenzkatechin) oder Protocatechuat (3,4-Dihydroxybenzoat) umgesetzt. Gentisat (2,5-Dihydroxybenzoat) oder Homogentisat (2,5-Dihydroxyphenylacetat) erscheinen häufig als Metabolite beim aeroben Abbau von Phenylalanin und Tyrosin. Nach erfolgter Ringspaltung mit Dioxygenasen zwischen den zwei OH-Gruppen (*ortho*-Spaltung, Intradiolspaltung) oder in Nachbarstellung außerhalb der zwei OH-Gruppen (*meta*-Spaltung, Extradiolspaltung) werden die resultierenden nichtaromatischen Verbindungen weiter zu zentralen Metaboliten des Intermediärstoffwechsels umgesetzt (Gottschalk 1986, Harayama et al. 1992).

Beim Einbau nur einer Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring der Substrate durch Monooxygenasen wird ein Atom des molekularen Sauerstoffs mit NAD(P)H zum H₂O-Molekül reduziert; das andere Sauerstoffatom wird zur Hydroxylgruppe am Aromaten. So wird zum Beispiel Phenylalanin während des bakteriellen Abbaus auf diese Weise zu Tyrosin umgesetzt. In folgenden Reaktionsabläufen (Transaminierung, Decarboxylierung, Hydroxylierung, Umlagerung) findet eine Umsetzung zu Homogentisat statt, das wiederum in mehreren Schritten in Fumarat und Acetoacetat überführt wird. Im Gegensatz hierzu werden in Reaktionen, die von Dioxygenasen katalysiert werden, beide Atome des molekularen Sauerstoffs in das aromatische Substrat eingebaut. Von den zwei Typen der Dioxygenasen inkorporiert der ringaktivierende Typus zwei Hydroxyl-Gruppen in den aromatischen Ring, wobei zur Reduktion des zuerst gebildeten Peroxides NADH benötigt wird. Nach Rearomatisierung des Ringes durch Dehydrogenierung mit NAD⁺ entstehen Catechol, Protocatechuat oder Gentisat. Im Anschluß öffnet der ringspaltende Dioxygenasetyp die aromatischen Ringe dieser zentralen Intermediate durch *ortho*- oder *meta*-Spaltung, ohne dabei

einen zusätzlichen Wasserstoffdonator wie NADH zu benötigen. Nach der erfolgten Intradriolspaltung werden die Produkte von Catechol und Protocatechuat über mehrere Reaktionsschritte in Acetyl-CoA und Succinat überführt, wohingegen nach einer Extradriolspaltung Pyruvat und Acetaldehyd bzw. 2 Moleküle Pyruvat entstehen (Gottschalk 1986, Harayama et al. 1992, Smith 1994).

Die Tatsache, daß die Aktivierung des aromatischen Kohlenwasserstoffs im Rahmen des aeroben Abbaus sowohl über eine Dioxygenase- als auch Monooxygenasereaktion laufen kann, zeigen folgende Beispiele. Die Startreaktion im aeroben Abbau von *n*-Alkylbenzenen mit einer Gesamtseitenkettenlänge von C₂ bis C₇ führt in *Pseudomonas* sp. NCIB 10643 über eine ringaktivierende Dioxygenaseaktivität zu den entsprechenden 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyalkylbenzenen (Smith und Ratledge 1989). Corkery und Mitarbeiter zeigten hingegen in *Pseudomonas fluorescens* Stamm CA-4 einen Abbauweg, in dem Ethylbenzen im ersten, Monooxygenase-katalysierten Schritt in 2-Phenylethanol überführt wird (Corkery et al. 1994). Im aeroben Abbauweg von Cumen (Isopropylbenzen) werden durch eine Dioxygenasereaktion zwei Hydroxylgruppen in den Ring inkorporiert. Nach einer darauffolgenden Dehydrogenierung und Rearomatisierung erfolgt durch eine weitere Dioxygenase die *meta*-Spaltung des entstandenen 3-Isopropylcatechols (Dabrock et al. 1992, Pflugmacher et al. 1996). Im Gegensatz zu Cumen wird *p*-Cymen (*p*-Isopropyltoluen) in *Pseudomonas putida* Stamm F1 am Methylrest durch eine Monooxygenasereaktion aktiviert. Der gebildete *p*-Isopropylbenzylalkohol wird in zwei Schritten zu *p*-Isopropylbenzoat (*p*-Cumat) oxidiert (Eaton 1997).

4.2. Anaerober Abbau

4.2.1. Zum Aromatenabbau befähigte anaerobe Bakterien. Aufgrund der chemischen Reaktionsträgheit aromatischer Verbindungen wurde die Möglichkeit des Abbaus dieser Substanzen unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff lange Zeit bezweifelt. Allerdings wurden schon vor vielen Jahren Hinweise auf eine anaerobe Oxidation von aromatischen Verbindungen gefunden (Tarvin und Buswell 1934). Es konnte unter Biomassenzuwachs eine Umsetzung von Benzoat zu Kohlendioxid und Methan im Klärschlamm gefunden werden. Erst Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre wurde dieser Arbeit Beachtung geschenkt, denn es wurden in dieser Zeit eine große Zahl phototropher, nitratreduzierender oder sulfatreduzierender Bakterien isoliert, die fähig waren, polare aromatische Verbindungen anaerob abzubauen. Folgende aromatische Substrate wurden unter anoxischen Bedingungen als Wachstumssubstrate genutzt: Benzoat (Cord-Ruwisch und Garcia 1985, Pfennig 1978, Pfennig und Widdel 1981, Ziegler et al. 1987), Phenol (Bak und Widdel 1986a, Li et al. 1996, Tschsch und Fuchs 1987), Anilin (Schnell et al. 1989), Catechol (Kuever et al. 1993, Szewzyk und Pfennig 1987), 2-Aminobenzoat (Braun und Gibson 1984, Lochmeyer et al. 1990, Ziegler et al. 1987), Indol (Bak und Widdel 1986b), 2-Hydroxybenzoat (Bonting und Fuchs 1996), 4-Hydroxybenzoat (Gibson et al. 1997), Resorcinol (Gorny et al.

1992), Cresole (Bisaillon et al. 1996, Bonting et al. 1995, Bossert et al. 1989, Londry et al. 1997, Rudolphi et al. 1991).

Aufgrund der chemischen Stabilität der nahezu unpolaren aromatischen Kohlenwasserstoffe wurde bis in die Mitte der 80er Jahre nicht an die Möglichkeit eines anaeroben Abbaus gedacht (Postgate 1984). Erste Hinweise auf den Abbau von Toluol und *m*-Xylen unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff unter methanogenen und nitratreduzierenden Bedingungen wurden wenige Jahre später in angereicherten Bakterienpopulationen erzielt (Vogel und Grbic-Galic 1986, Kuhn et al. 1988, Zeyer et al. 1986). Im Jahre 1986 wurde gezeigt, daß der Sauerstoff in Zwischenprodukten der anaeroben Oxidation von Kohlenwasserstoffen aus Wasser stammt (Vogel und Grbic-Galic 1986). Die ersten zum anaeroben Abbau von einem monoaromatischen Kohlenwasserstoff (Toluol) fähigen Reinkulturen wurden mit Nitrat (Dolfing et al. 1990), Sulfat (Rabus et al. 1993) oder Eisen als Elektronenakzeptor (Lovley et al. 1989) isoliert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über bisher bekannte anaerobe Anreicherungs- und Reinkulturen, die monoaromatische Kohlenwasserstoffe als Wachstumssubstrate verwerten.

Tabelle 1. Übersicht über Bakterienkulturen, die mit monoaromatischen Kohlenwasserstoffen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle unter strikt anoxischen Bedingungen wachsen

Literatur	Jahr	a) Sedimentproben, Mischkulturen	Umgesetztes Substrat	Elektronenakzeptor
Zeyer et al.	1986	Anreicherungskultur	Toluol, <i>m</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Kuhn et al.	1988	Aquifersand	Toluol, <i>m</i> -Xylen (<i>m</i> -Ethyltoluol z. T. eliminiert)	NO ₃ ⁻
Major et al.	1988	Aquifersand	Benzen	NO ₃ ⁻
Evans et al.	1991a	Anreicherungskultur	Toluol, <i>m</i> -Xylen (Transformation von <i>o</i> -Xylen)	NO ₃ ⁻
Jørgensen et al.	1995	Anreicherungskultur	Toluol (Transformation von <i>o</i> -Xylen)	NO ₃ ⁻
Arcangeli und Arvin	1995	Biofilm	Toluol (Transformation von <i>o</i> -Xylen)	NO ₃ ⁻
Häner et al.	1995	Anreicherungskultur	Toluol, <i>m</i> -Xylen, <i>p</i> -Xylen, <i>p</i> -Ethyltoluol	NO ₃ ⁻
Lovley et al.	1994	Sediment	Benzen, Toluol	Fe(III)
Lovley et al.	1996	Sediment	Benzen	Fe(III)
Beller et al.	1992	Anreicherungskultur	Toluol	SO ₄ ²⁻
Edwards et al.	1992	Anreicherungskultur	Toluol, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -Xylen	SO ₄ ²⁻

Tabelle 1, Fortsetzung

Literatur	Jahr	a) Sedimentproben, Mischkulturen	Umgesetztes Substrat	Elektro- nenakzep- tor
Edwards und Grbic-Galic	1992	Mikrokosmos	Benzen	SO ₄ ²⁻
Rueter et al.	1994	Anreicherungskultur	Toluen, <i>o</i> - und <i>m</i> -Xylen, <i>o</i> - und <i>m</i> -Ethyltoluen	SO ₄ ²⁻
Lovley et al.	1995	Sediment	Benzen	SO ₄ ²⁻
Phelps et al.	1996	Anreicherungskultur	Benzen	SO ₄ ²⁻
Rabus et al.	1996	Anreicherungskultur	Toluen, <i>o</i> - und <i>m</i> -Xylen, <i>o</i> - und <i>m</i> -Ethyltoluen, <i>m</i> -Propyltoluen, <i>m</i> -Isopropyltoluen	SO ₄ ²⁻
Chen und Taylor	1997	2 Konsortien	Benzen, Toluen, <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Xylen, Ethylbenzen	SO ₄ ²⁻
Vogel und Grbic-Galic	1986	Methanogene Mischkultur	Benzen, Toluen	CO ₂
Grbic-Galic und Vogel	1987	Methanogene Anreicherungskultur	Benzen, Toluen	CO ₂
Edwards und Grbic-Galic	1994	Methanogene Anreicherungskultur	Toluen, <i>o</i> -Xylen	CO ₂
Weiner und Lovley	1998b	Aquifersand, methanogen	Benzen	CO ₂
Langenhoff et al.	1996	Sediment	Toluen	CO ₂ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Fe(III), Mn(IV)
Kazumi et al.	1997	Sediment	Benzen	CO ₂ , SO ₄ ²⁻ , Fe(III)
Literatur	Jahr	b) Reinkulturen	Umgesetztes Substrat	Elektro- nenakzep- tor
Dolfing et al.	1990	Stamm T	Toluen, <i>m</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Altenschmidt und Fuchs	1991	K 172 (Tschech und Fuchs 1987; <i>Thauera aromatica</i>)	Toluen	NO ₃ ⁻
Evans et al.	1991b	Stamm T1	Toluen (Transformation von <i>o</i> -Xylen)	NO ₃ ⁻
Schocher et al.	1991	Stamm S100 (Tschech und Fuchs 1987) Stamm S2	Toluen	NO ₃ ⁻

Tabelle 1, Fortsetzung

Literatur	Jahr	b) Reinkulturen	Umgesetztes Substrat	Elektro- nenakzeptor
Fries et al.	1994	Stämme Td-1, Td-2, Td-3, Td-15, Td-17, Td-19, Td-21, Tol-4 (<i>Azoarcus toluolyticus</i>); Stamm Td-15	Toluen <i>m</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Su und Kafkewitz	1994	Stamm SU1 von <i>Pseudomonas maltophila</i>	Toluen, <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Rabus und Widdel	1995a	Stamm ToN1 Stamm EbN1 Stamm PbN1 Stamm mXyN1	Toluen Toluen, Ethylbenzen Ethylbenzen, Propylbenzen Toluen, <i>m</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Biegert und Fuchs	1995	Stamm K172 (<i>Thauera aromatica</i>)	Transformation von <i>o</i> -, <i>m</i> - und <i>p</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Ball et al.	1996	Stamm EB1	Ethylbenzen	NO ₃ ⁻
Beller und Spormann	1997a	Stamm T (Dolfing et al. 1990)	Transformation von <i>o</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Hess et al.	1997	Stämme T ₂ bis T ₄ , T ₆ , T ₁₀ ; Stämme M ₃ bis M ₇ , M ₉ bis M ₁₂	Toluen <i>m</i> -Xylen	NO ₃ ⁻
Lovley et al.	1989	GS-15 (<i>Geobacter metallireducens</i>)	Toluen	Fe(III)
Rabus et al.	1993	Stamm Tol2 (<i>Desulfobacula toluolica</i>)	Toluen	SO ₄ ²⁻
Rabus und Widdel	1995b	Stamm Tol2 (<i>Desulfobacula toluolica</i>)	Transformation von <i>p</i> -Xylen	SO ₄ ²⁻
Beller et al.	1996	PRTOL1	Toluen (Transformation von <i>o</i> - und <i>p</i> -Xylen)	SO ₄ ²⁻

Ein anaerober Abbau von *p*-Alkyltoluolen wie beispielsweise *p*-Xylen, *p*-Ethyltoluen und *p*-Cymen in Reinkulturen wurde bisher noch nicht beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals nitratreduzierende Stämme (pCyN1 und pCyN2) in Reinkultur isoliert, die unter anoxischen Bedingungen *p*-Cymen vollständig zu Kohlendioxid oxidieren; Stamm pCyN1 verwertet außerdem Toluen und *p*-Ethyltoluen (Harms et al. 1998a). Die ebenfalls während dieser Arbeit isolierten Sulfatreduzierer stellen ebenso eine Neuheit dar: Stamm Tol3

kann neben Toluol auch *o*-Xylen, Stamm mXyS1 Toluol, *m*-Xylen, *m*-Ethyltoluol und *m*-Cymen als jeweils einzige Kohlenstoffquelle und Elektronendonator anaerob abbauen (Harms et al. 1998b).

4.2.2. Mechanismen des anaeroben Abbaus monoaromatischer Kohlenwasserstoffe. Der anaerobe Abbau monoaromatischer Verbindungen verläuft in drei aufeinanderfolgenden Stufen (Evans und Fuchs 1988, Fuchs et al. 1994, Grbic-Galic 1990, Heider und Fuchs 1997, Schink et al. 1992).

Stufe 1. Die chemisch inerten aromatischen Verbindungen müssen, um abgebaut werden zu können, zunächst aktiviert werden. Wichtige Beispiele aktivierender enzymatischer Reaktionen, die unter anoxischen Bedingungen an Aromaten mit polaren Gruppen stattfinden, sind die Bildung von Coenzym A Thioestern bei Benzoat und substituierten Benzoaten (Altenschmid und Fuchs 1991), die anaerobe Methyl-Hydroxylierung bei *p*-Cresol (Bossert et al. 1989, Rudolphi et al. 1991, Smolenski und Suflita 1987) und *m*-Cresol (Bonting et al. 1995, Londry et al. 1997), sowie die Phosphorylierung und anschließende Carboxylierung des Phenols (Lack und Fuchs 1994, Tschsch und Fuchs 1989). Für den anaeroben Abbau des nahezu apolaren Toluols durch den denitrifizierenden Stamm T1 schlugen Evans und Mitarbeiter eine oxidative Kondensation der Methylgruppe mit Acetyl-CoA vor (Evans et al. 1992), wobei durch den nukleophilen Angriff des Acetyl-CoA an die Methylgruppe des Toluols Phenylpropionyl-CoA entstehen würde. Später wurde in der nitratreduzierenden Art *Thauera aromatica* hingegen eine Addition von Toluol an Fumarat als Initialreaktion nachgewiesen, wobei Benzylsuccinat entsteht (Biegert et al. 1996). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, die Benzylsuccinat-Synthase, wurde von Leuthner und Mitarbeitern aus *T. aromatica* isoliert und untersucht (Leuthner et al. 1998). Beller und Spormann fanden denselben Stoffwechselweg im Toluol verwertenden, sulfatreduzierenden Stamm PRTOL1 (Beller und Spormann 1997b) sowie im nitratreduzierenden Stamm T (Beller und Spormann 1997a). Im Ethylbenzol abbauenden, nitratreduzierenden Stamm EB1 wird der anaerobe Abbau von Ethylbenzol wahrscheinlich durch eine Hydroxylierung der Ethylseitenkette am Benzylkohlenstoffatom eingeleitet (Ball et al. 1996), wobei 1-Phenylethanol entsteht. Dieselbe Art der Aktivierung wurde für Ethylbenzol bzw. Propylbenzol bei den nitratreduzierenden Stämmen EbN1 bzw. PbN1 vorgeschlagen (Rabus und Widdel 1995a).

Durch die der Aktivierung folgenden enzymatisch katalysierten Transformationsreaktionen wird die Vielfalt an aromatischen Verbindungen in die zentralen Schlüsselintermediate Benzoyl-CoA, Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) oder Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) überführt. Dies kann durch reduktive Dehydroxylierungs-, Decarboxylierungs-, Transhydroxylierungs- und Oxidationsreaktionen geschehen.

Das während der Addition von Toluol mit Fumarat gebildete Benzylsuccinat wird wahrscheinlich in den Thioester Benzylsuccinyl-CoA überführt, welcher weiterhin in einer Dehydrogenierungsreaktion zu *E*-Phenylitaconyl-CoA reagiert. Dieser Thioester wird

wahrscheinlich mit Hilfe von Wasseranlagerung, weiterer Oxidation und thiolytischer Spaltung, analog zur β -Oxidation von Fettsäuren, in Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA überführt (Beller und Spormann 1997a, Biegert et al. 1996). Für das in Stamm EB1 gebildete 1-Phenylethanol wurde eine Oxidation zu Acetophenon, gefolgt von einer Carboxylierung zu Benzoylacetat vorgeschlagen (Ball et al. 1996). Im Anschluß wird Benzoylacetat wahrscheinlich zu Benzoylacetyl-CoA aktiviert, welches thiolytisch zu Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten wird. Ein entsprechender Abbauweg zu Benzoyl-CoA wurde für 1-Phenylethanol sowie 1-Phenylpropanol in den Stämmen EbN1 und PbN1 vorgeschlagen (Rabus und Widdel 1995a).

Stufe 2. Im zweiten Schritt werden die drei Schlüsselintermediate zu alkenoiden Verbindungen reduziert, welche daraufhin zu offenkettigen Verbindungen hydrolysiert werden. Da Benzoyl-CoA das für den anaeroben Abbau monoaromatischer Kohlenwasserstoffe wichtigste Intermediat darstellt, wird im Folgenden nur auf das Beispiel eingegangen. Benzoyl-CoA wird durch Benzoyl-CoA Reduktase in einem Zweielektronen-Schritt unter Verbrauch von ATP zu Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA reduziert (Koch et al. 1993). Im Anschluß daran wird Wasser im Ring von Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA inkorporiert, wobei 6-Hydroxycyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA entsteht. Eine weitere Addition von Wasser an die verbliebene Doppelbindung, die Oxidation einer der Hydroxylgruppen und eine thiolytische Spaltung führt zum 3-Hydroxypimelyl-CoA (Boll und Fuchs 1995). Im Fall von *Rhodopseudomonas palustris* wurde für den Abbau von Benzoyl-CoA ein zusätzlicher Weg vorgeschlagen, bei dem Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA durch Ringreduktion in 1-Cyclohex-1-en-1-carboxyl-CoA überführt wird. Durch Addition von Wasser und Oxidation entsteht 2-Ketocyclohexan-1-Carboxyl-CoA, das durch erneute Anlagerung von Wasser zu Pimelyl-CoA gespalten wird (Pelletier und Harwood 1998, Perrotta und Harwood 1994).

Stufe 3. Nach der Ringspaltung werden die nicht-zyklischen Intermediate durch β -Oxidationen und weitere Reaktionen zu zentralen Metaboliten wie zum Beispiel Acetyl-CoA umgesetzt. 3-Hydroxypimelyl-CoA wird durch β -Oxidation in Glutaryl-CoA und das erste Molekül Acetyl-CoA überführt. Nach einer durch eine Glutaryl-CoA-Dehydrogenase katalysierten Reaktion und einer darauf folgenden Decarboxylierung entstehen über Crotonyl-CoA als Zwischenprodukt zwei zusätzliche Moleküle Acetyl-CoA.

5. Rolle nitratreduzierender Bakterien beim anaeroben Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe an natürlichen Standorten

An marinen Standorten, wo Sulfat der häufigste verfügbare Elektronenakzeptor ist (28 mM), sind Nitratreduzierer zwar präsent, die Sulfatreduktion ist jedoch der bedeutendere anaerobe Atmungsprozeß in marinen Sedimenten (Canfield et al. 1993, Jørgensen 1982). In wassergesättigten Böden und im Süßwasser, die in der Regel weniger als 1 mM Sulfat enthalten, und in Kläranlagen hingegen ist Nitrat neben Eisen(III) ein wichtiger

Elektronenakzeptor für den anaeroben Abbau organischen Materials. Bakterien, die Nitrat dissimilatorisch reduzieren, sind an solchen Standorten in großer Anzahl vertreten. An Standorten mit großen Mengen an organischem Material wie zum Beispiel in eutrophierten Gewässern und stark mit organischem Material belasteten Böden bzw. Grundwasserleitern wird der eindringende Sauerstoff aufgrund des hohen biologischen Sauerstoffbedarfs schnell verbraucht. Sobald anoxische Bedingungen herrschen, setzt die dissimilatorische Nitratreduktion ein. Aber auch Nitrat ist in Gewässern und im wassergesättigten Bodenbereich selten in höheren Konzentrationen als 1 mM vorhanden, so daß normalerweise keine signifikanten Mengen organischer Verbindungen durch Denitrifizierer mineralisiert werden. Man hat deshalb in Erwägung gezogen, zur anaeroben Sanierung mit Erdöl oder BTEX kontaminierter, anoxischer Standorte Nitrat in die betreffenden Bereiche einzutragen (Bregnard et al. 1996, Kämpfer et al. 1993). In Feldstudien wurde der biologische Abbau von BTEX in anoxischen Grundwasserleitern u. a. unter nitratreduzierenden Bedingungen nachgewiesen (Cozzarelli et al. 1990, 1994, Schmitt et al. 1996). In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, welche Bestandteile und welcher Anteil des Erdöls anaerob mit Nitrat abbaubar sind. Erst vor kurzem konnte eine selektive Verwertung spezifischer BTEX-Bestandteile aus dem Erdöl durch die nitratreduzierenden Bakterienstämme ToN1, EbN1, PbN1 und mXyN1, die dem *Azoarcus/Thauera* Cluster angehören, gezeigt werden (Rabus und Widdel 1996).

6. Bakterielle Sulfatreduktion in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen

6.1. Folgen der bakteriellen Sulfatreduktion für die Erdölindustrie

Viele Probleme, die der Erdölindustrie zu schaffen machen, werden durch den in den Erdöllagerstätten mikrobiell gebildeten Schwefelwasserstoff verursacht. Durch anaerobe Korrosion von Eisen und Stahl entstehen beträchtliche Schäden an Pipelines und Lagertanks. Das zu einem großen Anteil von sulfatreduzierenden Bakterien produzierte Sulfid wirkt stark korrosiv auf Eisen (Bak et al. 1990, Cord-Ruwisch et al. 1986, Ganahl und Kleinitz 1983, Hamilton 1985, Hamilton et al. 1988). Mechanistische Einzelheiten der anaeroben Korrosion, bei dem die kathodische Depolarisation eine wichtige Rolle spielt, sind zum Teil noch unverstanden (Bak et al. 1990, Hamilton 1985, Widdel 1990).

Neben der Zerstörung von Erdöllagertanks und Pipelines werden durch das bakteriell produzierte leicht flüchtige Sulfid weitere Probleme verursacht. Zum einen ist dieses Gas aufgrund seiner giftigen Eigenschaften gesundheitsgefährdend für das in Ölförderbetrieben beschäftigte Personal (Falbe und Regitz 1992). Außerdem wird die Erdölförderung erschwert, indem die Porosität der rohölführenden Gesteine durch Ablagerung von Eisensulfid herabgesetzt wird (Ganahl und Kleinitz 1983). Die Erdölqualität wird durch Lösung des gebildeten Schwefelwasserstoffs im Öl herabgesetzt, ein Prozeß, der als „Souring“ bezeichnet

wird (Odom 1993, Scott und Davies 1993). Ebenso wird das Erdgas mit Schwefelwasserstoff kontaminiert.

Die Zusammensetzung der Rohöle wird maßgeblich von dem biologischen Abbau durch Mikroorganismen beeinflusst, wobei der ökonomische Wert sinkt. Sowohl der Anteil der *n*-Alkanfraktion als auch der Anteil der Aromatenfraktion werden deutlich verringert. Harze und Asphaltene gewinnen in diesen Ölen einen deutlich höheren Anteil (Petrov 1987).

Neben der bakteriell bedingten Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfat wird dieses Gas auch auf chemischem Wege gebildet. Man nimmt an, daß bei Temperaturen ab ca. 150 °C die Sulfidbildung aus Sulfat ein abiotischer Prozeß ist, wobei Sulfat und Sulfid zu Schwefel und Polysulfiden komproportionieren. In der folgenden Reaktion reagiert Schwefel vermutlich mit Kohlenwasserstoffen unter Bildung von Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff (Orr 1974). Schwefelwasserstoff reagiert wiederum mit Sulfat, so daß der Prozeß autokatalytisch stimuliert wird und solange abläuft, bis Sulfat verbraucht ist. Außerdem kann Schwefelwasserstoff bei der thermischen Spaltung schwefelhaltiger Komponenten des Öls entstehen. Zwischen bakteriell und chemisch gebildetem Sulfid kann mittels der Isotopenfraktionierung des Schwefels unterschieden werden. Bei der bakteriellen Sulfatreduktion findet eine deutliche Diskriminierung gegen das schwere Isotop des Schwefels (^{34}S) statt, wobei sich im Sulfid das leichtere Isotop ^{32}S anreichert. Im Gegensatz hierzu findet bei der chemischen Sulfidbildung kaum eine Isotopenfraktionierung statt (Schidlowski et al. 1983).

6.2. Vorkommen sulfatreduzierender Bakterien und anderer anaerober Mikroorganismen in Erdölreservoirs und Erdölförderanlagen

Die Verbreitung anaerober Bakterien in Erdöllagerstätten ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Hinweise auf eine bakterielle Methanbildung in verschiedenen Ölfeldern wurden von Ekzertsev (1960) und Nazina et al. (1985) erhalten. Eine bakterielle Sulfidbildung kommt eine größere Rolle in Erdölreservoirs zu (Cord-Ruwisch et al. 1986, Ganahl und Kleinitz 1983, Nazina et al. 1985, Rozanova und Nazina 1982).

Mit Hilfe von MPN-Zählungen konnten tatsächlich methanogene (Ekzertsev 1960, Nazina et al. 1985) und sulfatreduzierende Bakterien in Erdölreservoirs und Erdölförderanlagen nachgewiesen werden (Ganahl und Kleinitz 1983, Kleinitz und Bak 1991, Postgate 1984, Rosnes et al. 1991a, Rosnes et al. 1991b, Rozanova und Nazina 1982, Stetter et al. 1993). Voordouw zeigte über den Nachweis von Hydrogenasegenen mit spezifischen DNA-Sonden (Voordouw et al. 1990) und mit Hilfe des „Reverse Sample Genome Probing“ (Voordouw et al. 1991, 1992, 1993) das Vorhandensein von sulfatreduzierenden Bakterien in Erdölreservoirs. Während des „Reverse Sample Genome Probing“ wird im Gegensatz zu anderen Hybridisierungsmethoden die aus der Probe extrahierte und denaturierte DNA markiert. Diese wird auf Filter gegeben, auf der zuvor denaturierte DNA bekannter Bakterien in Form von Spots aufgetragen wurde. Außerdem wurden sulfatreduzierende, fermentative und

sulfidoxidierende Bakterien anhand der Sequenzen von mittels PCR amplifizierter und klonierter 16S rRNA-Gene nachgewiesen (Voordouw et al. 1996). Entsprechend der zum Teil extremen Temperaturen in Erdöllagerstätten konnten thermophile sulfatreduzierende (Beeder et al. 1994, Chen und Taylor 1997, Mueller und Nielsen 1996, Nilsen et al. 1996, Rosnes et al. 1991a, Rosnes et al. 1991b), methanogene (Mueller und Nielsen 1996) und fermentative Bakterien (Grassia et al. 1996) im Formationswasser aus Ölquellen gefunden werden. Zu den gefundenen Vertretern der Sulfatreduzierer gehören Sporenbildner der Gattung *Desulfotomaculum*, die aus norwegischen Ölreservoirs der Nordsee mit vorherrschenden Temperaturen von 60 bis 120 °C und Drücken von 20 bis 50 MPa isoliert wurden. Die gute Adaption der Mikroorganismen an die in Erdölreservoirs vorherrschenden Extrembedingungen wird durch deren Wachstumseigenschaften verdeutlicht: Stämme der Gattung *Desulfotomaculum* reduzierten Sulfat bei Temperaturen bis zu 78 °C (Rosnes et al. 1991a, Rosnes et al. 1991b). Ferner keimten die Sporen dieser Bakterien noch nach einer 20minütigen Inkubation bei 131 °C aus (Rosnes et al. 1991b). Aus Ölfeldern der Nordsee sowie in Alaska konnten Stetter und Mitarbeiter hyperthermophile Anreicherungskulturen und Isolate von Sulfatreduzierern gewinnen. Darunter befand sich u. a. das Archaeobakterium (Archaeum) *Archaeoglobus fulgidus*, das noch bei 102 °C wuchs (Stetter et al. 1993). Aus dem Formationswasser eines Ölfeldes der Nordsee, welches eine Temperatur von 75 °C aufwies, konnte ebenfalls *Archaeoglobus fulgidus* isoliert werden (Beeder et al. 1994). Sulfatreduzierende Bakterien der Gattungen *Archaeoglobus* und *Thermodesulforhabdus* konnten auch im Formationswasser von norwegischen Ölfeldern der Nordsee nachgewiesen werden (Beeder et al. 1995, Nilsen et al. 1996). Mueller und Nielsen zählten in einem Ölfeld in Alaska mit einer Lagerstättentemperatur von 60 °C $0,9 \cdot 10^3$ Zellen thermophiler methanogener Bakterien pro ml Formationswasser (Mueller und Nielsen 1996). In derselben Probe wurden $1,6 \cdot 10^3$ Zellen thermophiler Sulfatreduzierer pro ml Wasser gefunden. Die Zählung wurde mit Hilfe von MPN-Reihen durchgeführt. Vertreter der thermophilen Gattungen *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium* und *Thermococcus* sowie der Thermotogales-Klasse, die fermentativen Stoffwechsel besitzen, wurden in verschiedenen Öllagerstätten aus aller Welt nachgewiesen, in denen Temperaturen bis 130 °C vorherrschen (Grassia et al. 1996). Die Bakterien wuchsen in einem Temperaturbereich von 37 bis 91 °C.

Die Aktivität sulfatreduzierender Mikroorganismen in Erdölreservoirs und Ölfeldern der Nordsee wird oftmals durch Einleitung von Injektionswasser im Zuge der sekundären Erdölförderung stimuliert. Die an solchen Standorten zum Teil vorherrschende hohe Salzkonzentration wird soweit herabgesetzt, daß bakterielles Wachstum vieler Bakterien möglich wird. In einigen Reservoirs beispielsweise liegen die ursprünglichen Salzkonzentrationen bei bis zu 350.000 ppm, wodurch das Wachstum sehr vieler Bakterien völlig gehemmt wird. Ferner wird mit dem Injektionswasser, wozu Meerwasser verwendet wird, Sulfat in die oft sulfatlimitierten Lagerstätten eingetragen (Donaldson et al. 1989, Odom 1993, Postgate 1984, Rosnes et al. 1991a). In vielen Fällen wurden die zuvor vermutlich

sterilen Erdöllagerstätten wahrscheinlich durch die Einleitung von Injektionswasser, das sulfatreduzierende Bakterien enthält, mit diesen kontaminiert.

6.3. Organische Substrate für das Wachstum sulfatreduzierender Bakterien in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen

Lange Zeit blieb ungeklärt, welche Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen sulfatreduzierender Bakterien in Ölreservoirs das Wachstum ermöglichen. Als mögliche Substrate für das Wachstum der Mikroorganismen in Erdöllagerstätten kommen organische Säuren im Formationswasser, zugesetzte Ölfeldchemikalien, Produkte einer aeroben Erdöloxidation oder Bestandteile des Erdöls in Frage.

Organische Säuren. Die aus Nordsee-Ölfeldern isolierten *Desulfotomaculum*-Stämme verwerteten kurzkettige Fettsäuren, Alkohole, Lactat und H_2 (Rosnes et al. 1991a, Rosnes et al. 1991b). Die Fettsäuren dienen diesen Bakterienarten wahrscheinlich auch in den Erdölformationen als Wachstumssubstrate. Im Porenwasser von Erdöllagerstätten konnten aliphatische Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C_2 bis C_6 und geringe Mengen an Benzoat nachgewiesen werden (Barth 1991, Means und Hubbard 1987). Ebenso wurde bei Untersuchungen der Wasserphase eines Ölseparators eines norddeutschen Erdölfeldes eine Vielzahl von Typen sulfatreduzierender Bakterien gefunden, die Monocarbonsäuren zum Wachstum nutzen können. In besonders großer Zahl kamen ein Acetat-Verwerter und ein Benzoat-Verwerter mit mindestens $6 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml vor (Cord-Ruwisch et al. 1986).

Zugesetzte Ölfeldchemikalien. Chemikalien werden als Biozide, Korrosions- und Paraffinabscheidungsinhibitoren, Demulgatoren und zur Erhöhung der Viskosität von Injektionswasser bei der Erdölförderung eingesetzt. Auch wenn die sulfatreduzierenden Bakterien die abbaubaren Substanzen unter den Ölfeldchemikalien nicht direkt angreifen, kann ein Abbau über fermentierende Mikroorganismen zu Acetat, höheren Fettsäuren, Wasserstoff und anderen Gärprodukten führen, die von Sulfatreduzierern weiter oxidiert werden. Die als Chelatbildner eingesetzte Ascorbinsäure und das zur Erhöhung der Viskosität von Wasser genutzte Biopolymer Xanthan sind Beispiele für Substanzen, die über Gärungsprozesse zu Substraten für Sulfatreduzierer umgesetzt werden. Ascorbinsäure wurde unter anoxischen Bedingungen von gärenden Bakterien aus Wässern von Erdölaufbereitungsanlagen sehr schnell abgebaut, wobei als Gärprodukte einfache organische Säuren vermutet wurden (Kleinitz und Bak 1991). Xanthan kann von gärenden Bakterien anaerob zu Acetat, H_2 und CO_2 abgebaut werden (Pini 1992). Schink und Stieb (1983) konnten den fermentativen Umsatz von Polyethylenglykol, das als polare Seitenkette nichtionischer Tenside in den Ölfeldchemikalien vorkommt, zu Ethanol und Acetat nachweisen. Cord-Ruwisch und Mitarbeiter fanden in der Wasserphase eines Ölseparators gärende Bakterien, die Polyethylenglykol abbauten (Cord-Ruwisch et al. 1986). Methanol, welches häufig als Lösungsmittel für Chemikalien eingesetzt wird, kann von einigen sulfatreduzierenden Bakterienarten der Gattung *Desulfotomaculum*

abgebaut werden. Außerdem sind einige homoacetogene Gärer in der Lage, Methanol zusammen mit Kohlendioxid zu Acetat umzusetzen (Bache und Pfennig 1981), welches wiederum von vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern wie den weit verbreiteten *Desulfobacter*-Arten verwertet wird.

Produkte einer aeroben Erdöloxidation. Sauerstoff gelangt nur im Zuge der sekundären Erdölförderung mit dem oxischen Injektionswasser in die ursprünglich anoxischen Lagerstätten (Tissot und Welte 1984). Im Injektionsbereich der Reservoirs wurden aerobe kohlenwasserstoffoxidierende Bakterien gefunden (Nazina et al. 1985). Als Oxidationsprodukte des aeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen werden langkettige Fettsäuren, Ketone, Aldehyde und Alkohole freigesetzt, die unter anoxischen Bedingungen wiederum von den sulfatreduzierenden Bakterien weiter oxidiert werden (Cord-Ruwisch et al. 1986 und 1987, Jobson et al. 1979, Nazina et al. 1985, Rozanova und Nazina 1982, Shelton und Hunter 1975).

Bestandteile des Erdöls. Die Rolle der anaeroben Mikroorganismen beim Abbau von Kohlenwasserstoffen, den Hauptbestandteilen des Erdöls, wurde lange Zeit bezweifelt, obwohl schon vor etlichen Jahren Arbeiten veröffentlicht wurden, die auf diese Möglichkeit hinwiesen. So wurde zum Beispiel in anaeroben Anreicherungskulturen aus anoxischen Schlämmen bzw. aus Öltanks sowie Offshore-Ölfeldern mit Erdöl oder erdöhlhaltigen Harzen als Substrat eine Bildung von Methan (Ekzertsev 1960, Muller 1957) oder Sulfid (Cord-Ruwisch et al. 1986, 1987, ZoBell und Prokop 1966) gemessen. Anreicherungskulturen von hyperthermophilen Sulfatreduzierern wurden von Stetter und Mitarbeitern (Stetter et al. 1993) mit Rohöl als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle erhalten. Die Substanzen aus dem Rohöl, die diesen Bakterien als Wachstumssubstrat dienten, konnten jedoch in keiner der genannten Arbeiten bestimmt werden. Erst in den letzten Jahren wurden einige Arbeiten veröffentlicht, die den anaeroben Abbau spezifischer Bestandteile des Rohöls belegten. In einer sulfatreduzierenden Anreicherungskultur aus der Wasserphase von Erdöllagertanks in Wilhelmshaven mit Nordsee-Rohöl wurde der spezifische anaerobe Abbau von Toluol, *o*-Xylen, *m*-Xylen, *o*-Ethyltoluol, *m*-Ethyltoluol, *m*-Propyltoluol sowie *m*-Cymen nachgewiesen (Rabus 1995, Rabus et al. 1996). Mit dem aus einem Tiefseesediment isolierten, moderat thermophilen alkanverwertenden Stamm TD3 konnte nach Wachstum auf Rohöl ein selektiver Verbrauch von *n*-Alkanen mit einer Kettenlänge von C₆ bis C₁₆ mit Sulfat als Elektronenakzeptor gezeigt werden (Aeckersberg 1994, Ehrenreich 1996, Rueter et al. 1994). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Sulfatreduzierer, Stamm Tol3 und Stamm mXyS1, wuchsen ebenfalls anaerob mit Nordsee-Erdöl als einziger Quelle organischer Substrate, wobei selektiv Toluol und *o*-Xylen bzw. Toluol, *m*-Xylen, *m*-Ethyltoluol und *m*-Cymen oxidiert wurden (persönliche Mitteilung Dr. Heinz Wilkes).

7. Toxikologische Bedeutung monoaromatischer Kohlenwasserstoffe

Vertreter der BTEX-Substanzklasse sind von toxikologischer Bedeutung; sie können schon in niedrigen Konzentrationen chronische Vergiftungen hervorrufen, da sie sich aufgrund ihres lipophilen Charakters schnell in Lipiden und Fetten des Körpers anreichern. Die Aufnahme in das Körpergewebe kann über die Atemwege, die Haut und den Verdauungstrakt erfolgen.

Benzen ist als Verursacher von Krebs und als Schadstoff für das blutbildende System (insbesondere Knochenmark) und Kapillarsystem bekannt. Dieser Kohlenwasserstoff wird mit der Entstehung von Leukämie in Verbindung gebracht. Außerdem konnte gezeigt werden, daß Benzen mutagen wirkt. Im Körper wird Benzen durch die Monooxygenasereaktion von P450 in ein Epoxid überführt. Diese Verbindung kann weiter metabolisiert werden: Erstens kann es durch eine nicht-enzymatische Umlagerung in Phenol überführt werden, welches u. a. weiter zu Hydrochinon oxidiert werden kann, und zweitens kann durch Epoxidhydrolasen eine Reaktion zu Dihydrobrenzkatechin erfolgen. Drittens kann das Epoxid durch Anlagerung von Glutathion und anschließender enzymatischer Abspaltung von Glutaminsäure und Glycin sowie Acetylierung am Aminostickstoff des Cysteinrestes in Prämercaptursäure überführt werden. Alle genannten Metabolite können im Körper weiter zu anderen Verbindungen umgesetzt werden. Einige Metabolite werden teilweise mit dem Harn ausgeschieden. In Untersuchungen konnten *in vitro* und *in vivo* Wechselwirkungen von Metaboliten der Benzentransformation mit der DNA nachgewiesen werden (Dean 1985). Insbesondere im Falle des hoch reaktiven Epoxids wird, analog zu dem aus Benz(a)-pyren gebildeten stark karzinogenen Epoxid, eine Reaktion mit Nukleinbasen diskutiert.

Die Alkylbenzene, insbesondere Xylene, können das zentrale Nervensystem schädigen. Im Falle einer Vergiftung mit Toluol oder Xylenen konnten zusätzlich negative Einwirkungen auf das blutbildende System, die Leber und das Herz ausgemacht werden (Fishbein 1985). Nach Aufnahme in den Körper verteilt sich das Toluol sehr schnell und reichert sich im Fettgewebe an. Außer in Fettgeweben liegt die Konzentration des Toluols in den Organen 1 - 3 mal höher als im Blut. Im Fettgewebe reichert sich dieser Kohlenwasserstoff im Konzentrationen an, die rund 80 fach höher liegen als im Blut (Fishbein 1985, Koch und Wagner 1989). Obwohl eine Beeinträchtigung des Erbguts durch Toluol diskutiert wird, wurde bisher bei dieser Verbindung ebensowenig wie bei Ethylbenzen und Xylenen eine mutagene Wirkung nachgewiesen. Toluol wird im Körper auf ganz anderer Weise als Benzen metabolisiert. Der Hauptanteil von eingedrungenem Toluol wird am Alkylrest hydroxyliert. In Folgereaktionen wird der entstandene Benzylalkohol mit aktiviertem Sulfat und Glucuronat gekoppelt. Die entstehenden Metabolite werden rasch mit Harn und Galle ausgeschieden (Fishbein 1985, Forth et al. 1987).

B Ergebnisse und Diskussion

1. Neue nitratreduzierende, *p*-Cymen verwertende Bakterienstämme

Die Fähigkeit nitratreduzierender Bakterien, verschiedene aromatische Kohlenwasserstoffe abzubauen, wurde in anaeroben Anreicherungskulturen mit *o*-Xylen, *p*-Xylen, *o*-Ethyltoluen, *m*-Ethyltoluen, *p*-Ethyltoluen, *o*-Cymen, *m*-Cymen und *p*-Cymen untersucht. Neben diesen wurden zusätzlich die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe 1-Methyl-Naphthalin und 2-Methyl-Naphthalin auf ihre Verwertbarkeit geprüft. Ein Abbau von *m*-Xylen durch nitratreduzierende Bakterien war bereits zuvor nachgewiesen worden (I.A.4.2.1.). Die Anreicherungskulturen wurden aus Grabensedimenten in Bremen und den aromatischen Kohlenwasserstoffen als einziger neben dem Schlamm zugesetzter Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und mit Nitrat als Elektronenakzeptor angesetzt. In der Anreicherungskultur mit *p*-Cymen wurde nach 3 Wochen eine signifikante Zunahme der Nitratreduktion nachgewiesen. Von den anderen Ansätzen zeigten nur die *m*- und *p*-Ethyltoluen enthaltenden nach 2 bzw. 3 Monaten eine Zunahme der Denitrifikationsrate. Der *p*-Xylen enthaltende Ansatz zeigte erst nach etwa 9 Monaten Inkubation eine leichte Zunahme in der Denitrifikationsrate. Alle übrigen Ansätze zeigten im Vergleich zum Kontrollansatz (ohne Kohlenwasserstoff als Substrat) während einer Inkubationszeit von 12 Monaten keine erhöhte Denitrifikation. Die von Rabus und Mitarbeitern untersuchte Anreicherungskultur mit *m*-Xylen zeigte nach 6 Wochen Inkubation im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Denitrifikationsrate (Rabus und Widdel 1995a). Aus den Anreicherungsversuchen kann geschlossen werden, daß die Abbaubarkeit der *p*-Alkyltoluene unter den gegebenen anoxischen, nitratreduzierenden Bedingungen mit zunehmender Größe der Alkylseitenkette begünstigt wird und in der Reihenfolge *p*-Xylen < *p*-Ethyltoluen < *p*-Cymen zunimmt.

p-Cymen, das als Bestandteil in ätherischen Ölen vieler Pflanzen vorkommt (I.A.1.), wurde für detailliertere Studien zum anaeroben Abbau von *p*-substituierten Toluenen ausgewählt, da dieser aromatische Kohlenwasserstoff unter den getesteten aromatischen Kohlenwasserstoffen das beste Wachstumssubstrat darstellte. Nach unserem Kenntnisstand wurde noch kein anaerober Abbau von *p*-Cymen, weder in Anreicherungs- noch in Reinkultur, gezeigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten *p*-Cymen abbauende nitratreduzierende Bakterienstämme isoliert und physiologische Untersuchungen zum anaeroben Abbau dieses Aromaten durchgeführt werden (Harms et al. 1998a, II.B.1.).

1.1. Isolierung der Stämme pCyN1 und pCyN2

Zahlreiche nitratreduzierende, *p*-Cymen verwertende Isolate wurden über wiederholte anaerobe Agarverdünnungsreihen mit Nitrat als einzigem Elektronenakzeptor aus den

Anreicherungskulturen gewonnen (II.B.1.). Als organisches Substrat wurde in den Agarröhrchen *p*-Cymen, *p*-Isopropylbenzoat, Benzoat oder Acetat eingesetzt. In den Verdünnungsreihen wurden zwei verschiedene Kolonietypen gefunden. Der erste Typ bildete klar vom Agar abgegrenzte, weißliche Kolonien, wohingegen Typ zwei kontrastarme, durchscheinend rosa farbene Kolonien bildete. Eine starke Gasblasenbildung in den Agarröhrchen, die bereits innerhalb einer Woche Inkubation bei 28 °C einsetzte, deutete auf eine nicht vollständige Reduktion des Nitrats zu N₂ hin. Jeweils ein Stamm der am schnellsten und dichtesten wachsenden Isolate von jedem Kolonietyp wurde weiterführend untersucht. Die ausgewählten Stämme wurden als pCyN1 und pCyN2 bezeichnet. Für die Kultivierung wurde ein definiertes Süßwassermedium mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor und 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel verwendet. Das eingesetzte organische Substrat (*p*-Cymen) wurde den Kulturgefäßen in verschiedenen Konzentrationen in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase gelöst zugegeben. Stamm pCyN1 erreichte bei Wachstum mit *p*-Cymen eine höhere optische Dichte als Stamm pCyN2, wobei mit 2,5 % Inokulum ersterer ca. drei und letzterer ca. vier Tage benötigte.

1.2. Genetische Verwandtschaft der Stämme pCyN1 und pCyN2

Der Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen beider neuen Stämme mit bisher bekannten Sequenzen von Bakterien ergab eine Zugehörigkeit zu einem Cluster innerhalb der β -Untergruppe der Proteobakterien, zu dem auch *Thauera selenatis* (Macy et al. 1993), *Azoarcus* sp. (Reinhold-Hurek et al. 1993) sowie bereits bekannte Alkylbenzen verwertende Nitratreduzierer (Altenschmidt und Fuchs 1991, Anders et al. 1995, Fries et al. 1994, Rabus und Widdel 1995a) zählen (Abb. 2, II.B.1.). Stamm pCyN1 zeigte eine besonders enge Verwandtschaft zum Ethylbenzen abbauenden nitratreduzierenden Stamm EbN1 (Rabus und Widdel 1995a), wobei ihre 16S rRNA-Gensequenzen eine Ähnlichkeit von 100 % aufwiesen. Im Fall von Stamm pCyN2 wurde hingegen eine Verwandtschaft mit einer *Azoarcus*-Art nachgewiesen, jedoch nur mit 92 % Sequenzähnlichkeit.

1.3. Morphologische und physiologische Charakterisierung der Stämme pCyN1 und pCyN2

Morphologisch zeigten beide Neuisolate große Ähnlichkeit zueinander und zu den mit Toluol, Ethylbenzen und Propylbenzen isolierten Stämmen ToN1, EbN1 bzw. PbN1 (Rabus und Widdel 1995a). Die Zellen beider Isolate waren oval bis stäbchenförmig; die Abmessungen waren 0,8 - 1 · 1,2 - 2 μ m (Abb. 1, II.B.1.). Nur die Zellen von Stamm pCyN2 waren beweglich.

Die Temperaturoptima für das Wachstum beider Stämme lagen, ebenso wie die der Alkylbenzen verwertenden Stämme (Rabus und Widdel 1995a), bei 32 °C. Das pH-Optimum lag bei Stamm pCyN1 bei 7,4 und bei Stamm pCyN2 bei 8,0.

Viele Vertreter des *Azoarcus/Thauera* Clusters können unter anoxischen Bedingungen spezifisch monoaromatische Verbindungen, in einigen Fällen sogar aliphatische Kohlenwasserstoffe als Wachstumssubstrate mit Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen (Tabelle 1, I.A.4.2.1.). Die Fähigkeit zum anaeroben Abbau von *p*-Alkyltoluenen in Reinkultur wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Male bei den Neuisolaten pCyN1 und pCyN2 gezeigt. Beide nutzten *p*-Cymen als alleiniges Wachstumssubstrat. Stamm pCyN1 war außerdem noch zum anaeroben Abbau von Toluol, *p*-Ethyltoluol und Benzoat befähigt. Beide Stämme vermochten *p*-Isopropylbenzylalkohol, *p*-Isopropylbenzoat, *p*-Ethylbenzoat und diverse, dem *p*-Cymen strukturverwandte alkenoide Monoterpene wie α -Phellandren oder α -Terpinen abzubauen (Tabelle 1, II.B.1.).

Eine Bilanzierung des anaeroben Abbaus von *p*-Cymen wurde mit beiden Stämmen durchgeführt. In den Versuchsansätzen mit *p*-Cymen im Überschuß relativ zum vorhandenen Elektronenakzeptor (Nitrat) deuteten die nicht ganz ausgeglichenen Elektronenbilanzen auf die Ausscheidung noch nicht identifizierter organischer Intermediate hin. Das in anderen Versuchen in mit *p*-Cymen gewachsenen Kulturen beider Stämme identifizierte *p*-Isopropylbenzoat allein (I.B.1.4.2.) kann diese Ergebnisse aufgrund der geringen gefundenen Mengen nicht erklären; eine zusätzliche Ausscheidung von aliphatischen Intermediaten, die mit der erfolgten Meßtechnik nicht erfaßt wurden, wäre denkbar. In Bilanzierungsversuchen mit wenig *p*-Cymen im Verhältnis zum angebotenen Nitrat und anhand des Wachstums mit Acetat konnte für Stamm pCyN2 eine vollständige Oxidation des Wachstumssubstrats zu Kohlendioxid nachgewiesen werden, gemäß folgender Gleichung:



Genau wie die Alkylbenzen verwertenden Stämme ToN1, EbN1, PbN1 und mXyN1 (Rabus und Widdel 1995a) waren auch die beiden Neuisolate, die Stämme pCyN1 und pCyN2, zum anaeroben Wachstum mit Erdöl als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle und Nitrat als Elektronenakzeptor befähigt.

Beide Neuisolate erwiesen sich, wie andere Bakterienstämme des *Azoarcus/Thauera* Clusters, als fakultative Nitratreduzierer; sie konnten neben Nitrat, Nitrit und N_2O auch O_2 als Elektronenakzeptor nutzen. Mehrere zum selben Cluster gehörenden fakultativ nitrat-reduzierenden Stämme konnten Toluol und zum Teil auch Ethylbenzen und Benzen mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor abbauen (Fries et al. 1994). Die ebenfalls fakultativen Nitratreduzierer ToN1, EbN1, PbN1 und mXyN1 können zwar aromatische Säuren wie Benzoat aerob abbauen, jedoch keine aromatischen Kohlenwasserstoffe (Rabus und Widdel 1995a). Von den beiden neuen Stämmen war nur Stamm pCyN1 in der Lage, neben Benzoat auch den Kohlenwasserstoff *p*-Cymen aerob abzubauen. Acetat wurde von beiden Stämmen aerob verwertet. Möglicherweise wird der aerobe Abbauweg von *p*-Cymen in Stamm pCyN1, wie in *Pseudomonas putida* Stamm F1 (Eaton 1997, I.A.4.1.), über Hydroxylierung der Methylgruppe durch eine Monooxygenase eingeleitet. Der gebildete *p*-Isopropyl-

benzylalkohol würde danach über den Aldehyd zu *p*-Isopropylbenzoat oxidiert werden. Untersuchungen hierzu wurden jedoch nicht durchgeführt.

1.4. Erste Untersuchungen zum Abbauweg von *p*-Cymen unter anoxischen nitratreduzierenden Bedingungen

Stamm pCyN1 konnte im Gegensatz zu Stamm pCyN2 neben *p*-Cymen zwei weitere aromatische Kohlenwasserstoffe, Toluol und *p*-Ethyltoluol, anaerob abbauen. Mit Hilfe von Induktionsexperimenten mit dichten Zellsuspensionen von Stamm pCyN1 wurde untersucht, ob für den Abbau dieser drei Aromaten nur ein Enzymsystem verantwortlich ist, oder ob für jedes Substrat erst ein jeweils spezifisches Enzymsystem induziert werden muß.

Über die Identifikation von möglichen Intermediaten und Dead-End Metaboliten des *p*-Cymen Abbaus, die ins Medium ausgeschieden wurden, sollte geklärt werden, an welchem Kohlenstoffatom die Initialreaktion des Abbaus stattfindet.

1.4.1. Induktionsstudien mit Stamm pCyN1. Die Ergebnisse der Induktionsstudien mit dichten Zellsuspensionen von Stamm pCyN1, die entweder auf Toluol, *p*-Cymen oder *p*-Ethyltoluol angezogen worden waren, ließen sich nur durch das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Enzymsystemen für die einleitenden Reaktionen des anaeroben Abbaus dieser drei Aromaten erklären. Auf Toluol gewachsene Zellen von Stamm pCyN1 zeigten beim Wachstum auf *p*-Cymen und *p*-Ethyltoluol eine lag-Phase von >18 bzw. >155 h, in der offensichtlich die Neusynthese des für den Abbau beider Aromaten verantwortlichen Enzymsystems stattfand (Abb. 4C, II.B.1.). Hingegen setzten auf *p*-Cymen und *p*-Ethyltoluol gewachsene Zellen Toluol erst nach einer deutlichen lag-Phase von >35 bzw. >45 h um (Abb. 4A und B, II.B.1.). Das für die Zellanzucht jeweils verwendete Alkylbenzol wurde von resuspendierten Zellen immer sofort umgesetzt. Von den beiden Enzymsystemen würde demnach ein Enzymsystem für den Abbau von Toluol und ein anderes für den Abbau von *p*-Cymen und *p*-Ethyltoluol verantwortlich sein.

1.4.2. Produktion von Intermediaten und Dead-End Metaboliten in gewachsenen Kulturen der Stämme pCyN1 und pCyN2. Die Stämme pCyN1 und pCyN2 schieden beim Wachstum mit Nitrat und einem Überschuß an *p*-Cymen *p*-Isopropylbenzoat in geringen Konzentrationen (ca. 11 µM) aus. Entsprechend wurde in Kulturen beider Stämme *p*-Methylbenzoat oder *p*-Ethylbenzoat nachgewiesen, wenn *p*-Xylen oder *p*-Ethyltoluol im Gemisch mit *p*-Cymen zugesetzt worden war. Nach Zugabe eines Gemisches von *p*-Cymen und *p*-*tert*-Butyltoluol zu Kulturen von Stamm pCyN1 wurde *p*-*tert*-Butylbenzoat in das Medium ausgeschieden. *p*-Methylbenzoat und *p*-*tert*-Butylbenzoat sind Dead-End Metabolite, die von den Stämmen nicht weiter verwertet werden können (II.B.1.). Damit war gezeigt, daß die Methylgruppe als Angriffspunkt für die Initialreaktion dient. Bei der Intermediatsuche wurden keine alkenoiden Monoterpene in der Trägerphase von

Kulturen beider Stämme gefunden, was auf Dearomatisierungsreaktionen direkt am Ring hingewiesen hätte.

Als erster Schritt im anaeroben Abbauweg von *p*-Cymen ist analog zum Toluenaabbau (I.A.4.2.2.) eine Kondensation mit Fumarat an der Methylseitenkette wahrscheinlich, wobei *p*-Isopropylbenzylsuccinat entsteht. Im folgenden würde *p*-Isopropyl-Phenylitaconat (wahrscheinlich als CoA-Thioester) gebildet werden. Während einer darauffolgenden Spaltung würden *p*-Isopropylbenzoat (wahrscheinlich als CoA-Thioester) und Succinat entstehen. *p*-Isopropylbenzoat kann tatsächlich von beiden nitratreduzierenden Stämmen als Wachstumssubstrat verwendet werden.

2. Neue sulfatreduzierende, Toluol bzw. *m*-Xylen verwertende Bakterienstämme

Sulfatreduzierende Bakterien spielen eine große Rolle beim anaeroben Abbau organischer Verbindungen im anoxischen, marinen Bereich, wo Sulfat der mengenmäßig wichtigste Elektronenakzeptor ist (I.A.5.). Bei der Erdölförderung führt die bakterielle Sulfatreduktion zur unerwünschten Bildung von Schwefelwasserstoff (I.A.6.1.). Aus diesen Gründen wurde schon vor Jahren ein Forschungsschwerpunkt in unserem Labor auf den anaeroben Abbau monoaromatischer und aliphatischer Kohlenwasserstoffe durch sulfatreduzierende Bakterien gelegt. Unter anderem wurde eine anaerobe Anreicherungskultur aus der Wasserphase eines Erdöllagertanks der β -Raffinerie in Wilhelmshaven mit Erdöl als einziger Kohlenstoffquelle und Elektronendonator sowie Sulfat als Elektronenakzeptor gewonnen (Rueter et al. 1994, Rabus 1995). In Versuchen mit dieser Anreicherungskultur wurde ein selektiver Abbau von Toluol, *o*-Xylen, *m*-Xylen, *o*-Ethyltoluol, *m*-Ethyltoluol, *m*-Propyltoluol und *m*-Cymen aus dem Erdöl nachgewiesen (Rabus et al. 1996, Rabus 1995, Rueter et al. 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Bakterienarten aus der Anreicherungskultur isoliert werden, die für den Abbau dieser Kohlenwasserstoffe verantwortlich sind (Harms et al. 1998b, II.B.2.).

2.1. Isolierung der Stämme Tol3 und mXyS1

Die anaerobe sulfatreduzierende Anreicherungskultur mit Erdöl diente als Inokulum für Agarverdünnungsreihen. Als organisches Substrat in den Agarröhrchen diente Toluol bzw. *m*-Xylen (in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase), das über das verfestigte Agarmedium geschichtet wurde. Nach 6 bis 8 Wochen Inkubation bei 28 °C wuchsen mit Toluol hauptsächlich orangefarbene Kolonien mit klarer Abgrenzung zum Agar, im Fall von *m*-Xylen waren die Kolonien orange bis gelblich gefärbt. Die größten Kolonien und die höchste Koloniedichte waren in der Agarsäule nahe der Trägerphase zu finden. Aus einer zweiten Serie von Agarverdünnungsreihen wurden mehrere Kolonien Toluol bzw. *m*-Xylen verwertender Sulfatreduzierer isoliert und in Flüssigmedium (künstliches Meerwassermedium) übertragen.

Aufgrund der im Vergleich hohen Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Stämme Tol3 und mXyS1 für weitere Untersuchungen ausgewählt (II.B.2.). Für den Toluol verwertenden Stamm Tol3 war die Anheftung der Zellen an die Wände der Glasgefäße und damit verbundene Bildung eines Biofilms charakteristisch, wohingegen Zellen des *m*-Xylen verwertenden Stammes mXyS1 homogen im Medium verteilt wuchsen. Nach etwa zwei Wochen Inkubation bei 28 °C waren die Kulturen beider Stämme ausgewachsen (mit 3,5 % Inokulum).

2.2. Genetische Verwandtschaft des Stammes mXyS1

Anhand von 16S rRNA-Sequenzanalysen wurde Stamm mXyS1 als erster Vertreter einer neuen Abstammungslinie innerhalb der δ -Untergruppe der Proteobakterien erkannt (Abb. 2, II.B.2.). Der nächste Verwandte war *Desulfococcus multivorans* mit 89,6 % Sequenzähnlichkeit.

2.3. Morphologische und physiologische Charakterisierung der Stämme Tol3 und mXyS1

Die Zellen von Stamm Tol3 waren zitronen- bis stäbchenförmig (0,5 - 1,0 \cdot 1 - 3 μ m) und sehr beweglich. Stamm mXyS1 besaß ovale bis stäbchenförmige Zellen (0,6 - 1,0 \cdot 1 - 2 μ m), die nur geringe Mobilität zeigten (Abb. 1, II.B.2.). Die Temperaturen für optimales Wachstum lagen für die sulfatreduzierenden Neuisolate Tol3 und mXyS1 im mesophilen Bereich (32 bzw. 30 °C), die optimalen pH-Werte lagen im neutralen Bereich (7,0 bzw. 7,2).

Stamm Tol3 konnte neben Toluol auch *o*-Xylen oxidieren. Zu den außerdem noch als Wachstumssubstrate genutzten Verbindungen zählten beispielsweise Fumarat, Succinat, Benzoat und Benzylsuccinat. Die Verwertung von Benzylsuccinat kann als Hinweis auf den Abbau von Toluol durch Addition von Fumarat zu Benzylsuccinat (I.A.4.2.2.) angesehen werden. Aufgrund vieler Gemeinsamkeiten von Stamm Tol3 mit dem auf *o*-Xylen isolierten Sulfatreduzierer Stamm oXyS1 (Harms et al. 1998b) kam die Vermutung auf, daß es sich bei beiden Stämmen um denselben Typ handelte. Beide Stämme wurden aus derselben sulfatreduzierenden Anreicherungskultur isoliert und konnten Toluol, *o*-Xylen, Benzylsuccinat sowie die meisten anderen getesteten Substanzen anaerob abbauen. Stamm Tol3 konnte allerdings im Gegensatz zu Stamm oXyS1 auf Propionat wachsen. Zudem sprach die unterschiedliche Morphologie der Isolate gegen zwei Stämme ein und desselben Typs, denn die Zellen von Stamm oXyS1 waren lange, nichtbewegliche Stäbchen, wohingegen die Zellmorphologie bei Stamm Tol3 von zitronenförmig bis zu langen Stäbchen reichte und diese außerdem beweglich waren.

Die Fähigkeit zum anaeroben Abbau von *m*-Xylen, *m*-Ethyltoluol sowie *m*-Cymen unter sulfatreduzierenden Bedingungen zeigte nur Stamm mXyS1. Dieses stellt eine Besonderheit dar, da zuvor noch keine sulfatreduzierende Reinkultur existierte, die eines der Isomere von Xylen, Ethyltoluol oder Cymen abzubauen vermochte (Tabelle 1, I.A.4.2.1.). Edwards und Mitarbeiter berichteten von einer sulfatreduzierenden Anreicherungskultur, die Toluol, *o*-Xylen

und *m*-Xylen als jeweils einzige Wachstumssubstrate verwerten konnte (Edwards et al. 1992). Im Fall von thermophilen (50 - 70 °C) sulfatreduzierenden Konsortien wurde ein Abbau von Benzen, Toluol, *o*-Xylen, *m*-Xylen, *p*-Xylen und Ethylbenzen nachgewiesen (Chen und Taylor 1997). Alle von Stamm mXyS1 verwerteten aromatischen Kohlenwasserstoffe besitzen entweder nur eine Methylgruppe (Toluol) oder zusätzlich einen weiteren Alkylrest in *m*-Position zur Methylgruppe. Weder Benzen noch Ethylbenzen und Propylbenzen konnten von Stamm mXyS1 als Wachstumssubstrat genutzt werden. Sehr wahrscheinlich dient die Methylgruppe als erster Angriffspunkt für die anaerobe Umsetzung, wie beim Abbau von Toluol in nitrat- und sulfatreduzierenden Reinkulturen gezeigt wurde (I.A.4.2.2.). Analog zum Toluolabbau ist die Initialreaktion wahrscheinlich auch im Falle des Abbaus von *m*-Xylen eine Kondensation mit Fumarat. Das resultierende *m*-Methylbenzylsuccinat könnte (vermutlich nach Aktivierung) zunächst zu *m*-Methyl-Phenylitaconat (vermutlich als CoA-Thioester) überführt werden, welches im Anschluß zu *m*-Methylbenzoat (vermutlich als CoA-Thioester) und Succinat gespalten wird. Für diese Theorie spricht, daß Stamm mXyS1 mit *m*-Methylbenzoat als einzigem organischen Substrat anaerob wuchs, nicht jedoch mit *m*-Methylbenzylalkohol. Letzteres würde als Produkt einer Hydroxylierungsreaktion an einer Methylgruppe des *m*-Xylens entstehen, die jedoch heute angesichts der neuesten Ergebnisse zum anaeroben Toluolabbau als unwahrscheinlich angesehen werden muß.

Es scheint außerdem notwendig zu sein, daß bei dem Vorhandensein einer zweiten Alkylseitenkette sich diese in *m*-Position zur Methylgruppe befinden muß, damit der jeweilige Aromat von Stamm mXyS1 abgebaut werden kann.

Die Fähigkeit von Stamm mXyS1, *m*-Xylen anaerob vollständig zu Kohlendioxid abzubauen, wurde durch die Bilanzierung des anaeroben Abbaus von *m*-Xylen mit Sulfat als Elektronenakzeptor gezeigt (Tabelle 2, II.B.2.). Dieser Stamm konnte mit Acetat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle anaerob wachsen (Tabelle 1, II.B.2.), was ebenfalls die Fähigkeit zur vollständigen Oxidation zeigte.

Das Verschwinden diverser Alkylbenzene aus dem Erdöl beim Wachstum der eingangs erwähnten Anreicherungskultur kann zum Teil auf die Aktivität der daraus isolierten Typen sulfatreduzierender Bakterien, repräsentiert durch die Stämme oXyS1, mXyS1 und Tol3, zurückgeführt werden. Alle drei Stämme konnten auch mit Nordsee-Erdöl als einziger Quelle organischer Substrate und Sulfat als Elektronenakzeptor anaerob wachsen. Die nach erfolgtem Wachstum durchgeführte Analysen des Erdöls aus den Kulturen zeigten die selektive Nutzung derjenigen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die von den Stämmen auch als Reinsubstanzen abgebaut wurden (Dr. Heinz Wilkes, persönliche Mitteilung; Wilkes et al., in preparation).

Sowohl Stamm Tol3 als auch Stamm mXyS1 erwiesen sich beim Wachstum mit den jeweiligen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Toluol bzw. *m*-Xylen, als obligat anaerobe Sulfatreduzierer. Beide Stämme konnten neben Sulfat noch Sulfit als Elektronenakzeptor nutzen. Stamm Tol3 konnte außerdem Thiosulfat reduzieren.

3. Nitratreduzierende Anreicherungskulturen mit Erdöl als alleiniger Quelle für organische Wachstumssubstrate

In nitratreduzierenden Anreicherungskulturen mit Erdöl als alleiniger Quelle für organische Wachstumssubstrate sollte untersucht werden, welche Kohlenwasserstoffe aus dem Erdöl unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor abbaubar sind. Ferner war von Interesse, ob aufgrund von 16S rRNA Sequenzen ein Vorherrschen bestimmter Bakteriengruppen in solchen Anreicherungskulturen erkennbar ist. Es wurden nitratreduzierende Bakterien aus Gemischen verschiedener Grabensedimente und aus einer Deponie bei Lingen/Ems mit Erdöl als einziger Quelle für organischer Substrate unter anoxischen Bedingungen angereichert (Rabus et al. 1998, II.B.3.). Die Aktivität der denitrifizierenden Mikroorganismen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ralf Rabus täglich anhand der Gasproduktion während der etwa fünfwöchigen Versuchsdurchführung verfolgt. Außerdem wurden jeden Tag im Laufe der Inkubation Proben der wässrigen Phase für später durchgeführte quantitative Nitrit/Nitrat-Analysen genommen. Wenn der Elektronenakzeptor zur Neige ging, wurde bis zu 5 mM Nitrat nachgegeben. Während des Wachstums wurde eine Zweiphasigkeit der Gasbildung in allen Anreicherungskulturen beobachtet. Vor und während der ersten Gasbildungsphase, zwischen beiden Gasbildungsphasen, sowie während und nach der zweiten Gasbildungsphase wurden Proben aus dem Erdöl sowie den wässrigen Phasen der Anreicherungskulturen zwecks analytischer Untersuchungen entnommen. Die Analysen wurden von Dr. Heinz Wilkes in Jülich durchgeführt. Zusätzlich wurden zu den genannten Zeitpunkten zwecks Populationsanalysen mit gegen 16S rRNA gerichteten Oligonukleotidsonden Bakterienproben aus der schüttelnd inkubierten Anreicherungskultur aus Grabensedimenten gezogen und fixiert. Referenzstämme aus Stammkulturhaltungen wurden ebenfalls frisch kultiviert. Die molekularökologischen Populationsanalysen wurden von Andreas Schramm durchgeführt.

In einem zusätzlichen Experiment wurde geprüft, wie schnell Aliquots aus der Anreicherungskultur auf unterschiedlichen Alkylbenzenen als Reinsubstanzen zu einem Wachstum führten. Bei diesen Substrattests wurden insbesondere solche Verbindungen gewählt, die in dem Versuch mit Erdöl aus diesem verschwanden.

3.1. Wachstumsverlauf nitratreduzierender Anreicherungskulturen mit Erdöl als alleiniger Quelle für organische Wachstumssubstrate

Anhand der Nitrit/Nitrat-Analysen ebenso wie bei der Gasbildung war ein zweiphasiges Wachstum aller Anreicherungskulturen zu erkennen, wobei zwischen beiden Phasen eine Wachstumspause von wenigen Tagen lag (Abb. 1, II.B.3.). In den ersten zwei Wochen der Inkubation war eine starke Gasbildung sowie Nitratreduktion zu beobachten. Geschüttelt inkubierte Kulturen aus beiden Standorten zeigten eine längere Wachstumspause (wenige Tage) als die ruhig liegend inkubierten. In den letzten zwei Wochen der insgesamt 5 wöchigen

Inkubation wiederum zeigten alle Kulturen eine hohe Aktivität. Während die Bakterien in der ersten Wachstumsphase meist homogen im wässrigen Medium wuchsen, bildeten die in der zweiten Phase dominanten Bakterien Flocken, wuchsen vorwiegend an der Öl-Medium-Grenzschicht und emulgierten das Erdöl.

In allen vier Anreicherungskulturen wurde intermediär Nitrit produziert und angehäuft; eine Bildung von NH_4^+ und N_2O konnte nicht gezeigt werden.

3.2. Zeitliche Korrelation des Abbaus der Aromaten- und der Alkanfraktion aus dem Erdöl mit der Zweiphasigkeit des Wachstums

Der zweiphasige Wachstumsverlauf der Anreicherungskulturen spiegelte sich auch in einer Zweiphasigkeit der Verwertung von Kohlenwasserstoffen aus dem Erdöl wieder. In der ersten Phase, in der die Bakterien homogen im wässrigen Medium verteilt wuchsen, wurden Alkylbenzene, jedoch keine *n*-Alkane abgebaut (Abb. 2, II.B.3.). Diese Beobachtung stimmt mit dem Verhalten bislang in unserem Labor isolierter Alkylbenzen verwertender, nitrat- und sulfatreduzierender Reinkulturen überein, die ebenfalls homogen im Medium verteilt wuchsen (Harms et al. 1998a, Harms et al. 1998b, Rabus und Widdel 1995a, Rabus et al. 1993). Alkylbenzene sind, im Gegensatz zu den längerkettigen Alkanen, trotz ihrer hydrophoben Eigenschaft wasserlöslich genug, um in der wässrigen Phase ein dichtes Wachstum zu ermöglichen. In den Anreicherungskulturen wurden Alkylbenzene mit einer Seitenkettenlänge von C_1 - C_3 unter nitratreduzierenden Bedingungen anaerob abgebaut. Toluol, Ethylbenzen und *m*-Xylen verschwanden vollständig. *o*-Xylen, *o*-Ethyltoluol und 1,2,4-Trimethylbenzen wurden nur teilweise verbraucht (Abb. 2, II.B.3.).

Die in der zweiten Phase dominante Bakterienpopulation, die vornehmlich an der Öl-Medium-Grenzschicht und in Flocken wuchs, war vermutlich für die Verwertung der *n*-Alkane verantwortlich. Aromatische Kohlenwasserstoffe wurden in dieser Wachstumsphase nicht mehr abgebaut. Eine Anhaftung *n*-Alkan verwertender Bakterien an die hydrophobe Phase wurde auch bei sulfatreduzierenden Reinkulturen gezeigt (Aeckersberg et al. 1991, Rueter et al. 1994). Mit Ausnahme der sehr kurzkettigen und flüchtigen Vertreter sind *n*-Alkane nahezu unlöslich in Wasser, so daß die Bakterien zwecks einer ausreichenden Substratversorgung direkt an der Kohlenwasserstoffphase wachsen müssen. In den Anreicherungskulturen wurden *n*-Alkane mit kürzeren Ketten verwertet, als bislang in Reinkulturen oxidiert wurden (Aeckersberg et al. 1991, Rueter et al. 1994). Die verwertbaren *n*-Alkane reichten bei den Anreicherungskulturen von einer Kettenlänge von C_5 bis C_{12} (Abb. 2, II.B.3.), wohingegen in den Reinkulturen *n*-Alkane von C_6 bis C_{16} abgebaut wurden. In keiner der Anreicherungskulturen mit Öl und Nitrat wurden verzweigte Alkane verwertet.

Wurden Medien mit definierten Alkylbenzenen (in Heptamethylnonan) aus den Anreicherungskulturen beimpft, wuchsen innerhalb weniger Tage Folgekulturen auf Toluol, *n*-Ethylbenzen, *n*-Propylbenzen, *m*-Xylen und *m*-Ethyltoluol, nicht jedoch auf Benzen, *o*-Xylen, *p*-Xylen, *o*-Ethyltoluol, *p*-Ethyltoluol und 1,3,5-Trimethylbenzen. Deshalb wird

vermutet, daß die als Reinsubstanz nicht abgebauten Alkylbenzene wie zum Beispiel *p*-Xylen wahrscheinlich cometabolisch nur zu Dead-End Metaboliten transformiert wurden. Die Anhäufung verschiedener Alkylbenzoate wie *p*-Methylbenzoat in der wäßrigen Phase aller vier auf Erdöl gewachsenen Anreicherungskulturen zeigte tatsächlich, daß Alkylbenzene nicht nur unvollständig zu weiter verwertbaren Intermediaten, sondern auch zu Dead-End Metaboliten oxidiert wurden (Abb. 3, II.B.3.). Die Transformation bestimmter Xylen-Isomere zu Dead-End Metaboliten konnte bereits vorher in Reinkulturen nitrat- und sulfatreduzierender Bakterien gezeigt werden (Tabelle 1, I.A.4.2.1.; Beller und Spormann 1997a, Beller et al. 1996, Biegert und Fuchs 1995, Evans et al. 1991b, Seyfried et al. 1994, Rabus und Widdel 1995b).

Mit Hilfe der Mengen der während beider Wachstumsphasen oxidierten Reduktionsäquivalente (40 bzw. 56 mmol [H] in 400 ml Kulturen) wurde separat für jede Wachstumsphase die Menge der in den Anreicherungskulturen oxidierten Kohlenwasserstoffe berechnet. Für diese Berechnungen wurden Durchschnittssummenformeln für die verwerteten Alkylbenzene (C_8H_{10}) und *n*-Alkane (C_7H_{16}) sowie Durchschnittsdichten ($0,87 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$ bzw. $0,68 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) angenommen. Rund 3,1 % des Erdöls (Summe aus 1,2 % der Alkylbenzen-Fraktion + 1,9 % der *n*-Alkan-Fraktion; vol/vol) wurden insgesamt von den Anreicherungskulturen mit Nitrat als Elektronenakzeptor abgebaut.

3.3. Analyse der Bakterienpopulation in einer Anreicherungskultur durch Sondenhybridisierung

Mit der schüttelnd inkubierten Anreicherungskultur, die ursprünglich mit Sedimenten aus Bremer Gräben angeimpft worden war, wurden von Andreas Schramm *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Dazu wurden Gruppen-spezifische Oligonukleotidsonden verwendet. Dabei zeigte sich, daß während der gesamten Inkubationszeit der Anreicherungskultur Bakterien der β -Untergruppe der Proteobakterien dominierten, wobei ihr Anteil an der Gesamtpopulation im Laufe der Inkubation von mehr als 90 % der absoluten Zellzahl in der ersten Wachstumsphase bis ca. 75 % in der zweiten Wachstumsphase sank (Abb. 5, II.B.3.). Etwa 90 % der absoluten Zellzahl in der ersten Phase und 60 % in der zweiten Phase gehörten gemäß Sondenhybridisierung dem *Azoarcus/Thauera* Cluster an. Diese Dominanz ließ auf eine große Bedeutung der Vertreter des *Azoarcus/Thauera* Clusters für den anaeroben Abbau von sowohl aromatischen als auch aliphatischen Kohlenwasserstoffen schließen. Auch die bisher in unserem Labor auf Alkylbenzenen isolierten nitratreduzierenden Reinkulturen gehören zu diesem Cluster (Harms et al. 1998a, Rabus und Widdel 1995a). Die Abnahme dieser Bakteriengruppe in der zweiten Phase könnte damit erklärt werden, daß *n*-Alkan verwertende Nitratreduzierer auch zu anderen Gruppen als der *Azoarcus/Thauera*-Gruppe gehören können. Als Beispiel kann hier der nitratreduzierende, Hexadecan abbauende Stamm HdN1 angeführt werden, welcher verwandtschaftlich in die γ -Untergruppe der Proteobakterien fällt (Ehrenreich 1996).

C Literaturverzeichnis

- Aeckersberg, F.** 1994. Anaerobier Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, Bremen.
- Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel.** 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**:5-14.
- Altenschmidt, U., and G. Fuchs.** 1991. Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**:152-158.
- Anders, H. J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig, and G. Fuchs.** 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:327-333.
- Arcangeli, J.-P., and E. Arvin.** 1995. Cometabolic transformation of *o*-xylene in a biofilm system under nitrate reducing conditions. *Biodegradation.* **6**:19-27.
- Bache, R., and N. Pfennig.** 1981. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **130**:255-261.
- Bak, F., and F. Widdel.** 1986a. Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**:177-180.
- Bak, F., and F. Widdel.** 1986b. Anaerobic degradation of indolic compounds by sulfate-reducing enrichment cultures, and description of *Desulfobacterium indolicum* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**:170-176.
- Bak, F., H.-G. Behrendt, and W. Kleinitz.** 1990. Bakterielle Korrosion in einer Reinölleitung. *Erdöl Erdgas Kohle.* **106**:109-113.
- Ball, H. A., H. A. Johnson, M. Reinhard, and A. M. Spormann.** 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**:5755-5761.
- Barth, T.** 1991. Organic acids and inorganic ions in waters from petroleum reservoirs; Norwegian continental shelf: a multivariate statistical analysis and comparison with American reservoir formation waters. *Appl. Geochem.* **6**:1-15.
- Beeder, J., R. K. Nilsen, J. T. Rosnes, T. Torsvik, and T. Lien.** 1994. *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1227-1231.
- Beeder, J., T. Torsvik, and T. Lien.** 1995. *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. *Arch. Microbiol.* **164**:331-336.
- Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard.** 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188-1196.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann.** 1997a. Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**:670-676.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann.** 1997b. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3729-3731.
- Beller, H. R., D. Grbic-Galic, and M. Reinhard.** 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:786-793.

- Biegert, T., and G. Fuchs.** 1995. Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **163**:407-417.
- Biegert, T., G. Fuchs, and J. Heider.** 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**:661-668.
- Bisailon, J.-G., F. Lépine, R. Beaudet, and M. Sylvestre.** 1996. Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2131-2134.
- Böger, P.** 1975. Photosynthese in globaler Sicht. *Naturwissenschaftliche Rundschau.* **12**:429-435.
- Boll, M., and G. Fuchs.** 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.
- Bonting, C. F. C., and G. Fuchs.** 1996. Anaerobic metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**:402-408.
- Bonting, C. F. C., S. Schneider, G. Schmidtberg, and G. Fuchs.** 1995. Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **164**:63-69.
- Bossert, I. D., G. Whited, D. T. Gibson, and L. Y. Young.** 1989. Anaerobic oxidation of *p*-cresol mediated by a partially purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **171**:2956-2962.
- Braun, K., and D. T. Gibson.** 1984. Anaerobic degradation of 2-aminobenzoate (anthranilic acid) by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:102-107.
- Bregnard, T. P.-A., P. Höhener, A. Häner and J. Zeyer.** 1996. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**:299-307.
- Canfield, D. E., B. B. Jørgensen, H. Fossing, R. Glud, J. Gundersen, N. B. Ramsing, B. Thamdrup, J. W. Hansen, L. P. Nielsen, and P. O. J. Hall.** 1993. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Marine Geol.* **113**:27-40.
- Chen, C.-I., and R. T. Taylor.** 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:121-128.
- Cord-Ruwisch, R., and J. L. Garcia.** 1985. Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading spore-forming sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**:325-330.
- Cord-Ruwisch, R., W. Kleinitz, and F. Widdel.** 1986. Sulfatreduzierende Bakterien in einem Erdölfeld - Arten und Wachstumsbedingungen. *Erdöl Erdgas Kohle.* **102**:281-289.
- Cord-Ruwisch, R., W. Kleinitz, and F. Widdel.** 1987. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* **January 1987**:97-106.
- Corkery, D. M., K. E. O'Connor, C. M. Buckley, and A. D. W. Dobson.** 1994. Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**:23-28.
- Cozzarelli, I. M., M. J. Baedecker, R. P. Eganhouse, and D. F. Goerlitz.** 1994. The geochemical evolution of low-molecular-weight organic acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* **58**:863-877.
- Cozzarelli, I. M., R. P. Eganhouse, and M. J. Baedecker.** 1990. Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic acids in anoxic groundwater environment. *Environmental Geology and Water Science.* **16**:135-141.

- Da Silva, E. M., M. C. Peso-Aguiar, M. D. F. T. Navarro, and C. D. B. E. A. Chastinet.** 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**:112-118.
- Dabrock, B., J. Riedel, J. Bertram, and G. Gottschalk.** 1992. Isopropylbenzene (cumene) - a new substrate for the isolation of trichloroethene-degrading bacteria. *Arch. Microbiol.* **158**:9-13.
- Dean, B. J.** 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mut. Res.* **154**:153-181.
- Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**:336-341.
- Donaldson, E. C., R. M. Knapp, T. F. Yen, and G. V. Chilingarian.** 1989. The subsurface environment, p. 15-36. *In* E. C. Donaldson, and G. V. Chilingarian (ed.), *Microbial enhanced oil recovery*. Elsevier, New York.
- Eaton, R. W.** 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol.* **179**:3171-3180.
- Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1992. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2663-2666.
- Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1994. Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:313-322.
- Edwards, E. A., L. E. Wills, M. Reinhard, and D. Grbic-Galic.** 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:794-800.
- Ehrenreich, P.** 1996. Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf *n*-Alkanen und Erdöl. Dissertation. Universität Bremen, Bremen.
- Ekzertsev, V. A.** 1960. Production of methane by microorganisms in petroleum deposits. *Geochemistry*. **4**:432-442.
- Elder, D. J. E., and D. J. Kelly.** 1994. The bacterial degradation of benzoic acid and benzenoid compounds under anaerobic conditions: Unifying trends and new perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**:441-468.
- Evans, P. J., D. T. Mang, and L. Y. Young.** 1991a. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:450-454.
- Evans, P. J., D. T. Mang, K. S. Kim, and L. Y. Young.** 1991b. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1139-1145.
- Evans, P. J., W. Ling, B. Goldschmidt, E. R. Ritter, and L. Y. Young.** 1992. Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:496-501.
- Evans, W. C., and G. Fuchs.** 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:289-317.
- Falbe, J., and M. Regitz.** 1992. *Römpf Chemie Lexikon*, 9 ed, vol. 5. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Fischer-Romero, C., B. J. Tindall, and F. Jüttner.** 1996. *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:183-188.
- Fishbein, L.** 1985. An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*. **42**:267-288.

- Forth, W., D. Henschler, and W. Rummel (Ed.).** 1987. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5 ed. B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- Foß, S.** 1998. Mikrobieller Abbau isoprenoider Naturstoffe: Anaerobe Oxidation von Monoterpenen durch nitratreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, Bremen.
- Fries, M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje.** 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2802-2810.
- Fuchs, G., M. E. S. Magdy, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer, and B. Oswald.** 1994. Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, p. 513-553. *In* C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Ganahl, P., and W. Kleinitz.** 1983. Sulfatreduzierende Bakterien in der Rohölförderung - Auswirkung und betriebliche Maßnahmen. *Erdoel-Erdgas.* **99**:241-251.
- Gibson, J., M. Dispensa, and C. S. Harwood.** 1997. 4-Hydroxybenzoyl Coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. *J. Bacteriol.* **179**:634-642.
- Gildemeister, E., and F. Hoffmann.** 1960. Aromatische Kohlenwasserstoffe: (a) Benzoiden Aromaten, *p*-Cymol, p. 402-411. *In* Die ätherischen Öle, vol. IIIa. Akademischer Verlag, Berlin.
- Gorny, N., G. Wahl, A. Brune, and B. Schink.** 1992. A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **158**:48-53.
- Gottschalk, G.** 1986. *Bacterial metabolism*, 2 ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Grassia, G. S., K. M. McLean, P. Glénat, J. Bauld, and A. J. Sheehy.** 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**:47-58.
- Grbic-Galic, D.** 1986. Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferulic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**:161-169.
- Grbic-Galic, D.** 1990. Anaerobic microbial transformation of nonoxygenated aromatic and alicyclic compounds in soil, subsurface, and freshwater sediments, p. 117-189. *In* J. M. Bollag, and G. Stotzky (ed.), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York.
- Grbic-Galic, D., and T. M. Vogel.** 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:254-260.
- Hamilton, W. A.** 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**:195-217.
- Hamilton, W. A., A. N. Moosavi, and R. N. Pirrie.** 1988. Mechanism of anaerobic corrosion in the marine environment, p. 13-19. *In* C. A. C. Sequeira, and A. K. Tiller (ed.), *Microbial Corrosion - 1*. Elsevier Science Publishers LTD, London.
- Häner, A., P. Höhener, and J. Zeyer.** 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3185-3188.
- Harayama, S., M. Kok, and E. L. Neidle.** 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:565-601.
- Harder, J., and C. Probian.** 1995. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3804-3808.
- Harms, G., R. Rabus, and F. Widdel.** 1998a. Anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon, *p*-isopropyltoluene (*p*-cymene) by two new types of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* Submitted.

- Harms, G., K. Zengler, F. Aeckersberg, D. Minz, R. Rosselló-Mora, R. Rabus, and F. Widdel.** 1998b. Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Submitted.
- Hegnauer, R.** 1966. *Chemotaxonomie der Pflanzen, eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe.* Birkhäuser Verlag, Basel.
- Heider, J., and G. Fuchs.** 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**:577-596.
- Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stax, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.
- Hunt, J. M.** 1979. *Petroleum geochemistry and geology.* W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Jørgensen, B. B.** 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature.* **296**:643-645.
- Jørgensen, C., B. Nielsen, B. K. Jensen, and E. Mortensen.** 1995. Transformation of *o*-xylene to *o*-methyl benzoic acid by a denitrifying enrichment culture using toluene as the primary substrate. *Biodegradation.* **6**:141-146.
- Jobson, A. M., F. D. Cook, and D. W. S. Westlake.** 1979. Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chemical Geology.* **24**:355-365.
- Jüttner, F., and J. J. Henatsch.** 1986. Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature.* **323**:797-798.
- Kämpfer, P., M. Steiof, P. M. Becker, and W. Dott.** 1993. Characterization of chemoheterotrophic bacteria associated with the in situ bioremediation of a waste-oil contaminated site. *Microb. Ecol.* **26**:161-188.
- Kazumi, J., M. E. Caldwell, J. M. Suflita, D. R. Lovley, and L. Y. Young.** 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* **31**:813-818.
- Kleinitz, W., and F. Bak.** 1991. Sulfatreduzierende Bakterien in Erdölförderbetrieben. *Erdöl Erdgas Kohle.* **107**:507-511.
- Koch, J., W. Eisenreich, A. Bacher, and G. Fuchs.** 1993. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **211**:649-661.
- Koch, R., and B. O. Wagner.** 1989. *Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten.* VCH, Weinheim.
- Kuever, J., J. Kulmer, S. Jannsen, U. Fischer, and K.-H. Blotevogel.** 1993. Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol. *Arch. Microbiol.* **159**:282-288.
- Kuhn, E. P., J. Zeyer, P. Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:490-496.
- Lack, A., and G. Fuchs.** 1994. Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* **161**:132-139.
- Langenhoff, A. A. M., A. J. B. Zehnder, and G. Schraa.** 1996. Behavior of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment columns. *Biodegradation.* **7**:267-274.
- Leuthner, B., C. Leutwein, H. Schulz, P. Hörth, W. Haehnel, E. Schilzt, H. Schägger, and J. Heider.** 1998. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* **28**:615-628.

- Li, T., J.-G. Bisailon, R. Villemur, L. Létourneau, K. Bernard, F. Lépine, and R. Beaudet.** 1996. Isolation and Characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **178**:2551-2558.
- Lochmeyer, C., J. Koch, and G. Fuchs.** 1990. Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **174**:3621-3628.
- Londry, K. L., P. M. Fedorak, and J. M. Suflita.** 1997. Anaerobic degradation of *m*-cresol by a sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3170-3175.
- Lovley, D. R., J. C. Woodward, and F. H. Chapelle.** 1994. Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature.* **370**:128-131.
- Lovley, D. R., J. C. Woodward, and F. H. Chapelle.** 1996. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:288-291.
- Lovley, D. R., J. D. Coates, J. C. Woodward, and E. J. P. Phillips.** 1995. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:953-958.
- Lovley, D. R., M. J. Baedeker, D. J. Lonergan, I. M. Cozzarelli, E. J. P. Phillips, and D. I. Siegel.** 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature.* **339**:297-300.
- Macy, J. M., S. Rech, G. Auling, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and L. I. Sly.** 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.
- March, J.** 1985. *Advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms, and structure*, 3 ed. John Wiley & Sons, New York.
- Major, D. W., C. I. Mayfield, and J. F. Barker.** 1988. Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand. *Ground Water.* **26**:8-14.
- Means, J. L., and N. Hubbard.** 1987. Short-chain aliphatic acid anions in deep subsurface brines: A review of their origin, occurrence, properties, and importance and new data on their distribution and geochemical implications in the Palo Duro Basin, Texas. *Org. Geochem.* **11**:177-191.
- Miyazawa, M., T. Wada, and H. Kameoka.** 1996. Biotransformation of α -terpinene in common cutworm larvae (*Spodoptera litura* Fabricius). *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2889-2893.
- Morrison, R. T., and R. N. Boyd.** 1986. *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 3 ed. VCH, Weinheim.
- Mueller, R. F., and P. H. Nielsen.** 1996. Characterization of thermophilic consortia from two souring oil fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3083-3087.
- Muller, F. M.** 1957. On methane fermentation of higher alkanes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **23**:369-384.
- Nazina, T. N., E. P. Rozanova, and S. I. Kuznetsov.** 1985. Microbial oil transformation processes accompanied by methane and hydrogen-sulfide formation. *Geomicrobiology Journal.* **4**:103-130.
- Nilsen, R. K., J. Beeder, T. Thorstenson, and T. Torsvik.** 1996. Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field waters and oil reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1793-1798.
- Odom, J. M.** 1993. Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria, p. 189-210. *In* J. M. Odom, and R. J. Singleton (ed.), *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York.
- Orr, W. L.** 1974. Changes in sulfur content and isotopic ration of sulfur during petroleum maturation - study of Big Horn basin Paleozoic oils. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* **58**:2295-2318.

Pelletier, D. A., and C. S. Harwood. 1998. 2-Ketocyclohexanecarboxyl coenzyme A hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* **180**:2330-2336

Perrotta, J. A., and C. S. Harwood. 1994. Anaerobic metabolism of cyclohex-1-ene-1-carboxylate, a proposed intermediate of benzoate degradation, by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1775-1782.

Petrov, A. A. 1987. Petroleum hydrocarbons. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Pfennig, N. 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B₁₂-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**:283-288.

Pfennig, N., and F. Widdel. 1981. Ecology and physiology of some anaerobic bacteria from the microbial sulfur cycle, p. 169-177. In H. Bothe, and A. Trebst (ed.), *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. Springer-Verlag, Berlin.

Pflugmacher, U., B. Averhoff, and G. Gottschalk. 1996. Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: Identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3967-3977.

Phelps, C. D., J. Kazumi, and L. Y. Young. 1996. Anaerobic degradation of benzene in BTX mixtures dependent on sulfate reduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:433-437.

Pini, A. 1992. Bakterieller Abbau von Xanthan unter strikt anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität München, München.

Postgate, J. R. 1984. The sulfate-reducing bacteria. Cambridge University Press, Cambridge.

Prince, R. C. 1992. Bioremediation of oil spills, with particular reference to the spill from the Exxon Valdez, p. 21-34. In J. C. Fry, G. M. Gadd, R. A. Herbert, C. W. Jones, and I. A. Watson-Craik (ed.), *Microbial control of pollution*. Cambridge University Press, Cambridge.

Rabus, R. 1995. Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, Bremen.

Rabus, R., and F. Widdel. 1995a. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.

Rabus, R., and F. Widdel. 1995b. Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* **164**:448-451.

Rabus, R., and F. Widdel. 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1238-1241.

Rabus, R., H. Wilkes, A. Schramm, G. Harms, A. Behrends, R. I. Amann, and F. Widdel. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. In Vorbereitung.

Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdel. 1996. Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605-3613.

Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel. 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.

Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters, and J. de Ley. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:574-584.

- Rosnes, J. T., A. Graue, and T. Lien.** 1991a. Activity of sulfate-reducing bacteria under simulated reservoir conditions. *SPE Production Engineering*. Mai 1991:217-220.
- Rosnes, J. T., T. Torsvik, and T. Lien.** 1991b. Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2302-2307.
- Rozanova, E. P., and T. N. Nazina.** 1982. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil pools. Translated from *Mikrobiologiya*. **51**:342-348.
- Rudolphi, A., A. Tschech, and G. Fuchs.** 1991. Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**:238-248.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch, and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature*. **372**:455-458.
- Schidlowski, M., J. M. Hayes, and I. R. Kaplan.** 1983. Isotopic inferences of ancient biochemistries: carbon, sulfur, hydrogen and nitrogen, p. 149-186. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*. Princeton University Press, Princeton.
- Schink, B., A. Brune, and S. Schnell.** 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds, p. 219-242. *In* G. Winkelmann (ed.), *Microbial degradation of natural products*. VCH, Weinheim.
- Schink, B., and M. Stieb.** 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1905-1913.
- Schmitt, R., H.-R. Langguth, W. Püttmann, H. P. Rohns, P. Eckert, and J. Schubert.** 1996. Biodegradation of aromatic hydrocarbons under anoxic conditions in a shallow sand and gravel aquifer of the Lower Rhine Valley, Germany. *Org. Geochem.* **25**:41-50.
- Schnell, S., F. Bak, and N. Pfennig.** 1989. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **152**:556-563.
- Schocher, R. J., B. Seyfried, F. Vazquez, and J. Zeyer.** 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**:7-12.
- Scott, P. J. B., and M. Davies.** 1993. Souring of new Irian Jaya wells traced to indigenous bacteria. *Oil and Gas Journal*. **June 14**:47-50.
- Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschech, A., and J. Zeyer.** 1994. Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4047-4052.
- Shelton, T. B., and J. V. Hunter.** 1975. Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. *Journal Water Pollution Control Federation*. **47**:2256-2270.
- Smith, M. R.** 1994. The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria, p. 347-378. *In* C. Ratledge (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Smith, M. R., and C. Ratledge.** 1989. Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:68-75.
- Smolenski, W. J., and J. M. Suflita** 1987. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:710-716.
- Stetter, K. O., R. Huber, E. Blöchl, M. Kurr, R. D. Eden, M. Fielder, H. Cash, and I. Vance.** 1993. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*. **365**:743-745.
- Su, J.-J., and D. Kafkewitz.** 1994. Utilization of toluene and xylenes by a nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophila* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**:249-258.

- Sykes, P.** 1988. Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie, 9 ed. VCH Weinheim.
- Szewzyk, R., and N. Pfennig.** 1987. Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. Arch. Microbiol. **147**:163-168.
- Tarvin, D., and A. M. Buswell.** 1934. The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. J. Am. Chem. Soc. **56**:1751-1755.
- Tissot, B. P., and D. H. Welte.** 1984. Petroleum formation and occurrence, 2 ed. Springer-Verlag, New York.
- Tschech, A., and G. Fuchs.** 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. Arch. Microbiol. **148**:213-217.
- Tschech, A., and G. Fuchs.** 1989. Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. Arch. Microbiol. **152**:594-599.
- Vogel, T. M., and D. Grbic-Galic.** 1986. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. Appl. Environ. Microbiol. **52**:200-202.
- Voordouw, G., J. K. Voordouw, R. R. Karkhoff-Schweitzer, and P. M. Fedorak.** 1991. Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3070-3078.
- Voordouw, G., J. K. Voordouw, T. R. Jack, J. Foght, P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake.** 1992. Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3542-3552.
- Voordouw, G., S. M. Armstrong, M. F. Reimer, B. Fouts, A. J. Telang, Y. Shen, and D. Gevertz.** 1996. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1623-1629.
- Voordouw, G., V. Niviere, F. G. Ferris, P. M. Fedorak, and D. W. S. Westlake.** 1990. Distribution of hydrogenase genes in *Desulfovibrio* spp. and their use in identification of species from the oil field environment. Appl. Environ. Microbiol. **56**:3748-3754.
- Voordouw, G., Y. Shen, C. S. Harrington, A. J. Telang, T. R. Jack, and D. W. S. Westlake.** 1993. Quantitative reverse sample genome probing of microbial communities and its application to oil field production waters. Appl. Environ. Microbiol. **59**:4101-4114.
- Weiner, J. M., and D. R. Lovley.** 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1937-1939.
- Widdel, F.** 1990. Microbial corrosion, p. 277-318. In P. Pr ave, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer, and F. Wagner (ed.), Jahrbuch Biotechnologie, vol. 3. Carl Hanser Verlag, M unchen.
- Widdel, F., and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. In A. Balows, H. G. Tr uper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed), The prokaryotes, 2 ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York.
- Wilkes, H., C. Borhem, R. Rabus, G. Harms, K. Zengler, and F. Widdel.** Anaerobic degradation of alkylbenzenes and C-isotope fractionation by sulfate-reducing bacteria. In preparation.
- Zeyer, J., E. P. Kuhn, and R. P. Schwarzenbach.** 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. **52**:944-947.
- Ziegler, K., K. Braun, A. B ockler, and G. Fuchs.** 1987. Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. Arch. Microbiol. **149**:62-69.

ZoBell, C. E., and J. F. Prokop. 1966. Microbial oxidation of mineral oils in Barataria Bay bottom deposits. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie*. 6:143-162.

Teil II: Publikationen

A Publikationsliste mit Erläuterungen

Die folgenden drei Publikationen sind aus der experimentellen Doktorarbeit hervorgegangen. In den hinzugefügten Erläuterungen wird mein Beitrag zu den jeweiligen Arbeiten aufgezeigt.

1 Anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon, *p*-isopropyltoluene (*p*-cymene) by two new types of denitrifying bacteria

G. Harms, R. Rabus, and F. Widdel. Arch. Microbiol. *eingereicht*

Vorgabe des Themas durch F. Widdel. Gemeinsame Entwicklung des Konzepts mit R. Rabus und F. Widdel. Durchführung aller mikrobiologischen Versuche. Erstellung des Manuskripts unter der redaktionellen Mitwirkung von F. Widdel.

2 Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria

G. Harms, K. Zengler, F. Aeckersberg, D. Minz, R. Rosselló-Mora, R. Rabus, and F. Widdel. Appl. Environ. Microbiol. *eingereicht*

Gemeinsame Entwicklung des Konzepts mit K. Zengler. Durchführung aller mikrobiologischen Versuche mit Stamm mXyS1. Gemeinsame Erstellung des Manuskripts mit K. Zengler unter der redaktionellen Mitwirkung von F. Widdel.

3 Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*

R. Rabus, H. Wilkes, A. Schramm, G. Harms, A. Behrends, R. Amann, and F. Widdel. Environ. Microbiol. *eingereicht*

Gemeinsame Entwicklung des Konzepts und Zusammenarbeit mit R. Rabus, H. Wilkes und A. Schramm. Durchführung aller mikrobiologischen Wachstumsversuche. Redaktionelle Mitarbeit am Manuskript.

B Publikationen

1

Anaerobic oxidation of the aromatic hydrocarbon, *p*-isopropyltoluene (*p*-cymene) by two new types of denitrifying bacteria

Gerda Harms, Ralf Rabus, and Friedrich Widdel*

Arch. Microbiol., *submitted*

*Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany. Phone: 49-421-2028-702. Fax: 49-421-2028-790. E-mail: fwiddel@mpi-bremen.de.

Abstract

The capability of nitrate-reducing bacteria to degrade various alkyltoluenes (alkylmethylbenzenes) in the absence of molecular oxygen was investigated with the three isomers of xylene, ethyltoluene and isopropyltoluene (cymene) in enrichment cultures inoculated with freshwater mud. Denitrifying enrichment cultures developed most readily (within 4 weeks) with *p*-cymene, a natural aromatic hydrocarbon occurring in plants, and with *m*-xylene (within 6 weeks). Enrichment of denitrifiers that utilized *m*-ethyltoluene and *p*-ethyltoluene was slow (within 8 and 12 weeks, respectively); no enrichment cultures were obtained with the other alkylbenzenes within 6 months. Anaerobic degradation of *p*-cymene, which has not reported before to serve as an anaerobic growth substrate, was studied in more detail. From the enrichment culture, two new types of denitrifying bacteria with oval cells, strains pCyN1 and pCyN2, were isolated that grew on *p*-cymene (diluted in an inert carrier phase) and nitrate with doubling times of 12 and 16 h, respectively. 16S rRNA gene sequence analyses revealed a close relationship to members of the *Thauera-Azoarcus* cluster within the β -subgroup of the Proteobacteria. This cluster encompasses several described denitrifiers that oxidize toluene and other alkylbenzenes. Strain pCyN1, but not strain pCyN2, utilized also *p*-ethyltoluene and toluene. Both strains grew with some alkenoic monoterpenes structurally related to *p*-cymene, such as α -terpinene. In addition, the isolates utilized *p*-isopropylbenzoate, as well as mono- and dicarboxylic aliphatic acids. Determination of the degradation balance of *p*-cymene and growth with acetate and nitrate indicated the capacity for complete oxidation of organic substrates under anoxic conditions. Adaptation studies with cells of strain pCyN1 suggest the existence of at least two enzyme systems for anaerobic alkylbenzene utilization, one metabolizing *p*-cymene and *p*-ethyltoluene, and the other metabolizing toluene. Excretion of *p*-isopropylbenzoate during growth on *p*-cymene suggested that the methyl group is the site of initial enzymatic attack. Even though both strains were facultatively aerobic, as revealed by growth on acetate under air, growth on *p*-cymene under oxic conditions was only observed with strain pCyN1.

Introduction

Studies on the anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons have mainly focused on toluene. Several pure cultures of toluene-degrading denitrifying (Altenschmidt and Fuchs 1991, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Schocher et al. 1991, Seyfried et al. 1994), iron(III)-reducing (Lovley et al. 1989) or sulfate-reducing bacteria (Beller et al. 1996, Rabus et al. 1993) have been isolated and characterized. It was demonstrated recently that the initial enzymatic reaction of anaerobic toluene degradation in strains of denitrifying bacteria (Beller and Spormann 1997a, Biegert et al. 1996, Leuthner et al. 1998) and sulfate-reducing bacteria (Beller and Spormann 1997b, Rabus and Heider 1998) occurs at the methyl group by condensation with fumarate. Of the higher homologues of toluene, ethylbenzene and *n*-propylbenzene were shown to be degraded by pure cultures of denitrifying bacteria (Ball et al. 1996, Rabus and Widdel 1995a). Initial biochemical studies with ethylbenzene indicated formation of 1-phenylethanol as product of the anaerobic activation (Ball et al. 1996, Rabus and Heider 1998). Of the dialkylbenzenes, only *m*-xylene was shown to be degraded by pure cultures of denitrifying bacteria (Dolfing et al. 1990, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Seyfried et al. 1994). Anaerobic degradation of *o*-xylene (Chen and Taylor 1997, Edwards and Grbic-Galic 1994, Edwards et al. 1992, Rueter et al. 1994) and *p*-xylene (Chen and Taylor 1997, Edwards et al. 1992, Häner et al. 1995) was demonstrated in enriched bacterial communities, but not in defined cultures of isolated strains. In pure cultures studied so far, *o*- and *p*-xylene were converted to dead-end metabolites (Beller et al. 1996, Beller and Spormann 1997a, Biegert and Fuchs 1995, Evans et al. 1991, Rabus and Widdel 1995b). Relatively little is known about the anaerobic degradation of higher homologues of xylenes. *o*-Ethyltoluene, *m*-ethyltoluene, *m*-propyltoluene and *m*-cymene were slowly utilized from crude oil by a sulfate-reducing enrichment culture (Rabus et al. 1996). Slow utilization of *p*-ethyltoluene was observed upon addition to an enrichment culture obtained with *p*-xylene (Häner et al. 1995). The reported slow anaerobic utilization of xylenes other than the *m*-isomer and the limited information about degradability of the higher homologues of xylenes prompted us to carry out comparative enrichment studies with alkyltoluenes of varying chain sizes under conditions of denitrification. Among the compounds investigated, *p*-cymene turned out to be the most readily degradable compound. *p*-Cymene is a natural aromatic hydrocarbon occurring in oils of many gymnospermic and angiospermic plants (Gildemeister and Hoffmann 1960, Hegnauer 1966); furthermore, formation of *p*-cymene from certain non-aromatic monoterpenes has been observed in anoxic enrichment cultures (Harder and Probian 1995). To our knowledge, microbial degradation of *p*-cymene has been demonstrated with aerobic (e.g. Eaton 1997) but not so far with anaerobic bacteria. The present study focuses on the anaerobic degradation of

p-cymene by the two pure cultures of newly isolated denitrifying bacteria, strains pCyN1 and pCyN2. Strain pCyN1 could also utilize *p*-ethyltoluene for growth.

Materials and Methods

Sources of bacteria. Enrichment of denitrifiers was attempted with a homogenized mixture of freshwater mud samples from ditches and the Weser river in Bremen, Germany. The alkylbenzene-degrading denitrifying strains ToN1, mXyN1, EbN1 and PbN1 were maintained in the laboratory since their isolation on toluene, *m*-xylene, ethylbenzene and propylbenzene, respectively (Rabus and Widdel 1995a).

Media, routine cultivation, and quantitative growth experiments. Techniques for preparation of media and cultivation of bacteria under anoxic conditions have been described elsewhere (Widdel and Bak 1992). The defined mineral medium with vitamins and trace metals had essentially the same composition as that used for cultivation of other alkylbenzene-degrading denitrifiers (Rabus and Widdel 1995a). Unless otherwise indicated, the medium contained 10 mM NaNO₃. Only pure cultures were grown in the presence of sodium ascorbate (4 mM) as a reductant (Rabus and Widdel 1995a), which did not serve as a growth substrate for the isolated strains.

Anaerobic cultures were routinely grown in volumes of 15 ml in glass tubes (20 ml), which were anoxically sealed with butyl rubber stoppers. The head space was N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]). Filter-sterilized hydrocarbons, aromatic alcohols, aldehydes and ketones were diluted (0.5 - 5 %, vol/vol) in a carrier phase (0.5 or 1 ml per tube) of deaerated 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane or mineral oil (high viscosity, pharmaceutical-grade; Lamotte, Bremen) to avoid toxic effects of the pure substances (Rabus et al. 1993). Cultures with a carrier phase were incubated nearly horizontally on a rotary shaker at low speed (65 rpm). The stopper-sealed orifices were always kept below the surface level of the medium to avoid contact between stoppers and carrier phase. Anoxic, sterile crude oil was prepared and added as previously described (Rabus and Widdel 1996). Soluble substrates were added from separately sterilized, aqueous stock solutions (Widdel and Bak 1992).

Utilization of oxygen as electron acceptor was tested in reductant-free medium in closed bottles under a head-space of air with 10 % (vol/vol) CO₂ as described (Rabus and Widdel 1995a).

Quantitative growth experiments to measure consumption of *p*-cymene and nitrate, and formation of nitrite, nitrous oxide and cell dry mass were carried out in flat bottles (500 ml) containing 400 ml medium, 10 ml inoculum and 10 ml heptamethylnonane as carrier phase for *p*-cymene under an atmosphere of N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]) as described (Rabus and Widdel 1995a).

Enrichment procedure, isolation, purity control and maintenance. Initial enrichments were carried out in 500 ml glass bottles containing 150 ml mud, 250 ml medium without reductant and 12 ml heptamethylnonane with 2 % (vol/vol) of the concerning alkyltoluene under a gas phase of N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]). Nitrate was added only at a concentration of 5 mM. Bottles were incubated nearly horizontally while long-term contact of the hydrocarbon phase with the stoppers was avoided. Bottles were only shaken twice per day for a few seconds. Before formed overpressure from denitrification could be released, bottles had to be placed first for several minutes in an upright position. After settling of the mud the closed bottle was slightly and briefly tilted such that mud particles adhering to the inner side of the stopper were rinsed off with the formed supernatant. In this way, plugging of needles subsequently punctured through the stopper was avoided. Formed gas was released by means of a hypodermic needle connected via an adapter and a flexible tubing to a calibrated syringe barrel. The syringe barrel had been submerged into water and filled completely to allow capturing and measurement of the gas volume. When gas production was no longer detectable, 5 mM nitrate was injected again from an anoxic, concentrated stock solution. Thereafter, bottles were shaken and again incubated nearly horizontally, as before.

Strains were isolated via repeated dilution in agar tubes (Widdel and Bak 1992) under conditions of denitrification in the presence of ascorbate (2.7 mM) as a reductant. *p*-Isopropylbenzoate (0.7 mM) and acetate (7 mM) were used as soluble organic substrates instead of *p*-cymene.

Homogeneity of cells in cultures on various substrates (Table 1) was routinely checked by phase-contrast microscopy. In addition, cultures were supplied with yeast extract (0.5 g/l) and glucose (5 mM) and examined microscopically.

For maintenance, strains were grown on *p*-cymene (2 % in heptamethylnonane), stored at 4 °C and transferred every 4 weeks.

16S rRNA gene sequence analysis. Sequence analyses were carried out by Fred A. Rainey and Cathrin Spröer (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) as described previously (Rabus and Widdel 1995a, Rainey et al. 1992). Sequence data are deposited under EMBL accession numbers Y17284 (strain pCyN1) and Y17285 (strain pCyN2).

Study of the expression of degradative capacities. The expression of degradative capacities was studied with freshly grown, resuspended cells of strain pCyN1. Cells were first grown in flat 500 ml bottles with 400 ml medium and 5 ml carrier phase containing *p*-cymene (5 % [vol/vol]), *p*-ethyltoluene or toluene (each 2 %). Cell suspensions were prepared in an anoxic chamber. The aqueous culture medium was separated from the carrier phase by means of a separatory funnel. Cells were harvested by centrifugation (25 min, 12,000 × g) in anoxically sealed, gas-tight beakers and resuspended in ascorbate-reduced

medium containing 10 mM nitrate to yield the twofold optical density of the grown culture. Aliquots of 50 ml were distributed to cylindrical serum bottles (70 ml) and overlaid with 2 ml heptamethylnonane. Bottles were sealed with butyl rubber stoppers. The gas phase captured from the anoxic chamber was replaced by N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]) by means of two hypodermic needles, one of which was connected to a gassing device. Aromatic hydrocarbons to be tested were added via microliter syringes through the stoppers. Serum bottles were fixed in a tilted position on a rotary shaker such that orifices pointed downwards. Bottles were shaken with 90 rpm at 28 °C. Samples for nitrate determination were taken with N₂-flushed syringes.

Chemical and other analyses. *p*-Cymene in the heptamethylnonane phase was determined by means of an Autosystem gas chromatograph (Perkin Elmer, Überlingen, Germany) equipped with a PVMS 54 column (50 m; internal diameter, 0.32 mm) and a flame ionization detector. The flow rate of the carrier gas, N₂, was 1.7 ml·min⁻¹. The temperature of the injection port was 150 °C; the temperature gradient for the column was run from 60 °C (2 min isotherm) to 240 °C at a heating rate of 15 °C·min⁻¹; the temperature of the detector was 280 °C. *p*-Cymene in the aqueous phase was quantified with a high-performance liquid chromatography system (Sykam, Gilching/Munich, Germany) on a Spherisorb OD S2 reverse-phase column (250 by 5 mm) with 80 % acetonitrile in distilled water as eluent. The flow rate was 1 ml·min⁻¹ and the temperature of the column was 25 °C (Rabus and Widdel 1995a). *p*-Cymene was detected by UV absorption at 265 nm (fast scanning detector; Linear Instruments Corp., Nevada, USA). The detection limit in the aqueous phase was around 5 μM. Search for aromatic metabolites in the aqueous phase was carried out with the same system, but with 50 % acetonitrile and 0.75 mM H₃PO₄ in distilled water as eluent. For identification, retention times and absorption spectra between 195 and 360 nm were compared to those of standards. Samples and standards were prepared with acetonitrile and aqueous H₃PO₄ to obtain the composition of the eluent. To further prove identity, a mixture of the sample with the standard solution was injected. If no additional peak occurred and the absorption spectrum remained unchanged, the detected metabolite was assumed to be identical with the standard compound.

Nitrate and nitrite were quantified by high-performance liquid chromatography according to Rabus and Widdel (1995a).

Nitrous oxide (N₂O) in the gas phase of cultures was measured by gas chromatography according to Rabus and Widdel (1995a). Nitrous oxide dissolved in the aqueous phase was calculated from the partial pressure in the gas phase by using a solubility coefficient (at 20 °C) of 0.279 mmol·l⁻¹·kPa⁻¹ (calculated from Dean, 1992).

Measurement of ammonium was carried out using the indophenol formation reaction (so called Berthelot reaction) according to Marr et al. (1988).

Dinitrogen formed by nitrate reduction was exactly quantified by release of the overpressure into a syringe barrel as described for the enrichment procedure; water was replaced by 0.2 M NaOH to absorb CO₂.

The G+C content of the DNA was determined by Fred A. Rainey (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) as described elsewhere (Rabus and Widdel 1995a).

Results

Enrichment and isolation. The capacity of nitrate-reducing bacteria to degrade various alkyltoluenes (alkylmethylbenzenes) was examined in anaerobic enrichment cultures in volumes of 400 ml with the *ortho*-, *meta*- and *para*-isomers of xylene, ethyltoluene and cymene; each hydrocarbon was dissolved (2 %, vol/vol) in 12 ml heptamethylnonane. A control contained heptamethylnonane without any alkylbenzene. All enrichment cultures contained the same amount of homogenized mud. Gas production began within 12 h in each bottle including the control, indicating denitrification with compounds from the mud. New nitrate was added in portions of 5 mM whenever gas production ceased. Denitrification during the first few days was vigorous, yielding about 25 ml gas per day and bottle. Thereafter, gas production in the bottles containing alkylbenzenes other than *p*-cymene or *m*-xylene decreased gradually, reaching a value of approximately 2 ml per day after 16 weeks. In the bottles with *p*-cymene and *m*-xylene, denitrification became significantly faster after 4 and 6 weeks, respectively. When denitrification in these bottles slowed down again, new *p*-cymene and *m*-xylene, respectively, were added. This caused a new increase of gas production (approximately 25 ml per day) in the presence of nitrate indicating that these alkylbenzenes served indeed as organic substrates for denitrification. After 8 and 12 weeks, also bottles containing *m*- and *p*-ethyltoluene, respectively, showed a slight increase of denitrification. Denitrification became faster (18 ml gas per day) upon addition of new alkyltoluene. No increase of gas production was observed in the other bottles during an incubation period of 6 months.

Further studies were focused on *p*-cymene, because anaerobic degradation of this hydrocarbon, in contrast to that of *m*-xylene (Dolfing et al. 1990, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Seyfried et al. 1994), has to our knowledge not been reported before. Furthermore, *p*-cymene as a component of many plant oils is expected to be the most wide-spread and naturally most significant of the nine alkyltoluenes tested. In subcultures, morphologically rather homogeneous, oval cells developed with *p*-cymene and nitrate. In contrast to the first enrichment culture, subcultures exhibited fast nitrate reduction only if slightly agitated. Probably, the high content of mud in the original enrichment culture stabilized emulsions of the carrier phase in the medium thus allowing good *p*-cymene supply to bacteria even without shaking. With the gradual disappearance of mud, the carrier phase turned into a coherent layer such that molecular diffusion of *p*-cymene into non-agitated medium probably became strongly growth-limiting.

When mud particles had disappeared after subsequent transfers of the enrichment culture with *p*-cymene, isolation of denitrifiers was attempted in agar dilution series. When *p*-cymene was provided as substrate in an overlying carrier phase, colonies developed only in the upper few millimeters below the carrier phase. Under the dissecting microscope, two types of

colonies were detectable at approximately equal abundance. One type was whitish and opaque, the other type was slightly pinkish and somewhat transparent. However, isolation by means of drawn Pasteur pipettes (Widdel and Bak 1992) was problematic because colonies were very small (diameter, <0.1 mm). Alternative dilutions were therefore carried out in agar with *p*-isopropylbenzoate, the free form of an assumed intermediate of *p*-cymene degradation, and subsequently with acetate. These substrates yielded bigger colonies (diameter ≥ 0.2 mm) of the previous observed types. All isolated strains continued to grow in liquid medium with *p*-cymene in a carrier phase. For further studies, one strain from a whitish colony and one from a pinkish colony was chosen; strains are designated as pCyN1 and pCyN2, respectively.

Morphological, physiological and other characteristics. Both isolates had the same cell-shape and cell-size (Fig. 1), with dimensions of 0.8-1 \cdot 1.2-2 μ m. Motility was only observed with strain pCyN2. The G + C content of the DNA of strains pCyN1 and pCyN1 was 61 and 59.8 mol%, respectively.

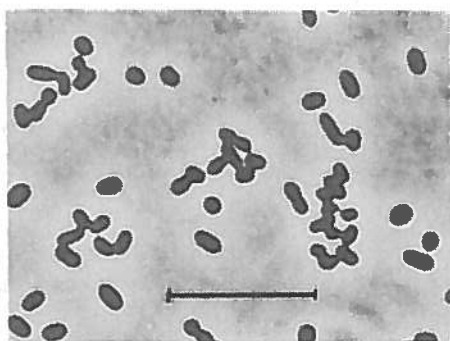


FIG. 1. Phase contrast photomicrograph of denitrifying strain pCyN1 grown on *p*-cymene. Bar represents 10 μ m.

Strain pCyN1 showed a temperature range for growth of 5 to 34 $^{\circ}$ C, with an optimum around 32 $^{\circ}$ C. The temperature range for growth of strain pCyN2 was between 15 and 35 $^{\circ}$ C, with an optimum around 32 $^{\circ}$ C. The pH range for growth of strain pCyN1 was between 6.1 and 9.0, with an optimum around 7.4. Strain pCyN2 had a pH range between 6.6 and 9.0, with an optimum around 8.0.

Growth of strains pCyN1 and pCyN2 occurred with *p*-cymene concentrations of up to 10 % (vol/vol) in the carrier phase. Higher concentrations inhibited growth. Optimal growth was observed with 5 % *p*-cymene. Doubling times determined from the initial exponential part of the growth curves at this concentration were 12 and 16 h, respectively.

Nutritionally, strain pCyN1 was more versatile than strain pCyN2. Whereas the latter utilized only *p*-cymene in growth tests with various aromatic hydrocarbons, strain pCyN1 grew also on toluene and *p*-ethyltoluene. Growth on these two compounds was somewhat slower than on *p*-cymene. Strain pCyN2 did not use benzoate, which to our knowledge is a common

substrate of all alkylbenzene-degrading denitrifiers described so far (Altenschmidt and Fuchs 1991, Ball et al. 1996, Beller and Spormann 1997a, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Rabus and Widdel 1995a, Schocher et al. 1991). Both strains were able to utilize a number of non-aromatic monoterpene hydrocarbons containing double bonds (Table 1). Strain pCyN1 grew anaerobically on crude oil; with 1.5 ml oil per 15 ml medium containing 10 mM nitrate, the strain reached an optical density (at 660 nm) of approximately 0.3 within 3 days. Strain pCyN2 grew only poorly on crude oil. The higher cell densities reached by strain pCyN1 on oil are probably due to its capacity for utilization of toluene (Table 1), a major aromatic oil constituent.

Strain pCyN1 grew equally fast with nitrate concentrations of 5 and 10 mM. When 10 mM nitrate was added to cultures of strain pCyN2, proliferation during the late growth phase was somewhat impeded. This effect was probably due to higher nitrite concentrations formed by strain pCyN2 in comparison to strain pCyN1 (6 versus 3 mM, respectively, from 10 mM nitrate). In separate growth tests with potential electron acceptors, both strains utilized nitrite (5 mM) and nitrous oxide (7 ml injected into 20 ml tubes containing 10 ml headspace) besides nitrate, but no sulfate (6 mM), sulfite (2 mM), thiosulfate (6 mM) or fumarate (25 mM). Even though both strains were facultatively aerobic, as shown by growth on acetate and butyrate under air, only strain pCyN1 was able to grow aerobically with *p*-cymene.

TABLE 1. Anaerobic growth tests of denitrifying strains pCyN1 and pCyN2 on aromatic and non-aromatic compounds. Each compound was tested twice at the concentrations given in parentheses. Unless otherwise noted concentrations are given in mM. Concentrations in % (vol/vol) refer to dilutions of hydrophobic compounds in heptamethylnonane as an inert carrier phase. Test media were inoculated with 5 % (vol/vol) of their volume from fresh cultures grown with *p*-cymene. Symbols: ++ good growth within about 4 days or less; + growth time longer than 4 days; - no growth

Compound tested ^{a,b}	Strain	
	pCyN1	pCyN2
Aromatic hydrocarbons		
Toluene (2 %)	++	-
<i>p</i> -Xylene (2, 5 %)	-	-
<i>p</i> -Ethyltoluene (0.5, 2 %)	++	-
<i>p</i> -Cymene (2, 5 %)	++	++
<i>p-tert</i> -Butyltoluene (2, 5 %)	-	-
Aromatic compounds with functional groups		
<i>p</i> -Cresol (0.5, 2)	+	-
Benzyl alcohol (0.5, 2)	++	-
3-Phenyl-1-propanol (0.5, 2)	++	-
<i>p</i> -Methylbenzyl alcohol (0.5, 2)	-	-
<i>p</i> -Ethylbenzyl alcohol (0.5, 1 %)	-	-
<i>p</i> -Isopropylbenzyl alcohol (0.5, 1 %)	+	+

For footnote, see TABLE 1, continued

TABLE 1, continued

Benzaldehyde (0.5, 2)	+	-
<i>p</i> -Ethylbenzaldehyde (0.5, 1 %)	+	+
<i>p</i> -Isopropylbenzaldehyde (0.5, 1 %)	++	++
Benzoate (1, 4)	++	-
Phenylacetate (1, 4)	++	-
3-Phenylpropionate (1, 4)	++	-
<i>p</i> -Methylbenzoate (1, 4)	-	-
<i>p</i> -Ethylbenzoate (0.5, 2)	++	+
<i>p</i> -Propylbenzoate (0.5, 2)	+	-
<i>p</i> -Isopropylbenzoate (0.5, 2)	++	++
<i>p</i> - <i>tert</i> -Butylbenzoate (0.5, 2)	-	-
Mandelate (0.5, 2)	+	-
Phenylalanine (0.5, 2)	+	-
Tyrosine (0.5, 2)	+	-
Tryptophan (0.5, 2)	+	-
Further compounds		
Ethanol (1, 5)	++	-
1-Propanol (1, 5)	+	-
Isopropanol (5, 10)	++	-
1-Butanol (1, 5)	+	-
2-Butanol (1, 5)	+	-
Acetone (0.5, 2)	+	-
2-Butanone (0.5, 2)	++	-
Acetate (5, 10)	++	++
Propionate (5, 10)	++	++
Butyrate (5, 10)	++	++
Pyruvate (1, 5)	+	+
Cyclohexanecarboxylate (0.5, 2)	+	-
Serine (1, 5)	-	+

^a Further substrates utilized by both strains:

α -phellandrene (1, 2 %), α -terpinene (1, 2 %), γ -terpinene (1, 2 %), limonene (1, 2 %), isolimonene (1, 2 %), sabinene (1, 2 %), α -pinene (1, 2 %), *p*-menth-1-ene (1, 2 %), valerate (1, 5), caproate (1, 5), caprylate (1, 2), palmitate (0.5, 1), succinate (1, 5), fumarate (1, 4), malate (1, 5), glutarate (1, 4), lactate (5, 10), glutamate (1, 5)

^b Further compounds tested but not utilized by both strains:

benzene (2 %), ethylbenzene (2, 5%), *n*-propylbenzene (2, 5 %), *n*-butylbenzene (2, 5 %), isopropylbenzene (2, 5 %), *o*-xylene (2, 5 %), *m*-xylene (2, 5 %), *o*-ethyltoluene (0.5, 2 %), *m*-ethyltoluene (0.5, 2 %), *o*-cymene (2, 5 %), *m*-cymene (2, 5 %), 1,3,5-mesitylene (2, 5 %), naphthalene (20 mg/ml heptamethylnonane), 2-carene (1, 2 %), 3-carene (1, 2 %), *n*-hexane (2, 5 %), *n*-decane (5, 10 %), *n*-hexadecane (undiluted), cyclohexane (2 %), methylcyclohexane (2 %), phenol (0.5, 2), *o*-cresol (0.5, 2), *m*-cresol (0.5, 2), acetophenone (1 %), *o*-methylbenzoate (1, 4), *m*-methylbenzoate (1, 4), 4-phenylbutyrate (1, 4), benzyl succinate (0.5, 2), methanol (5, 10), formate (10, 20), citrate (1, 5), glucose (1, 5), fructose (1, 5), mannose (1, 5), glycine (1, 5), alanine (1, 5), aspartate (1, 5), H₂

Growth tests with described alkylbenzene-degrading denitrifiers. Growth of denitrifying strains ToN1, mXyN1, EbN1 and PbN1, that had previously been isolated with toluene, *m*-xylene, ethylbenzene and propylbenzene, respectively (Rabus and Widdel 1995a), was also tested in the presence of *p*-cymene as sole organic substrate. However, none of these strains grew with *p*-cymene.

Genealogic relationships. Sequencing of 16S rRNA genes of the two new isolates revealed affiliation with the *Thauera/Azoarcus* cluster within the β -subgroup of the Proteobacteria (Fig. 2). Strains pCyN1 and pCyN2 were related to each other with a sequence similarity of 93.9 %. The closest relatives of strains pCyN1 and pCyN2 were the ethylbenzene-degrading denitrifier, strain EbN1, and the *m*-xylene-degrading denitrifier, strain mXyN1, respectively. The respective sequence similarity values were 100 % (pCyN1 - EbN1) and 95.5 % (pCyN2 - mXyN1). Hence, on the basis of 16S rRNA sequences, strains pCyN1 and EbN1 were not distinguishable, despite of certain nutritional differences.

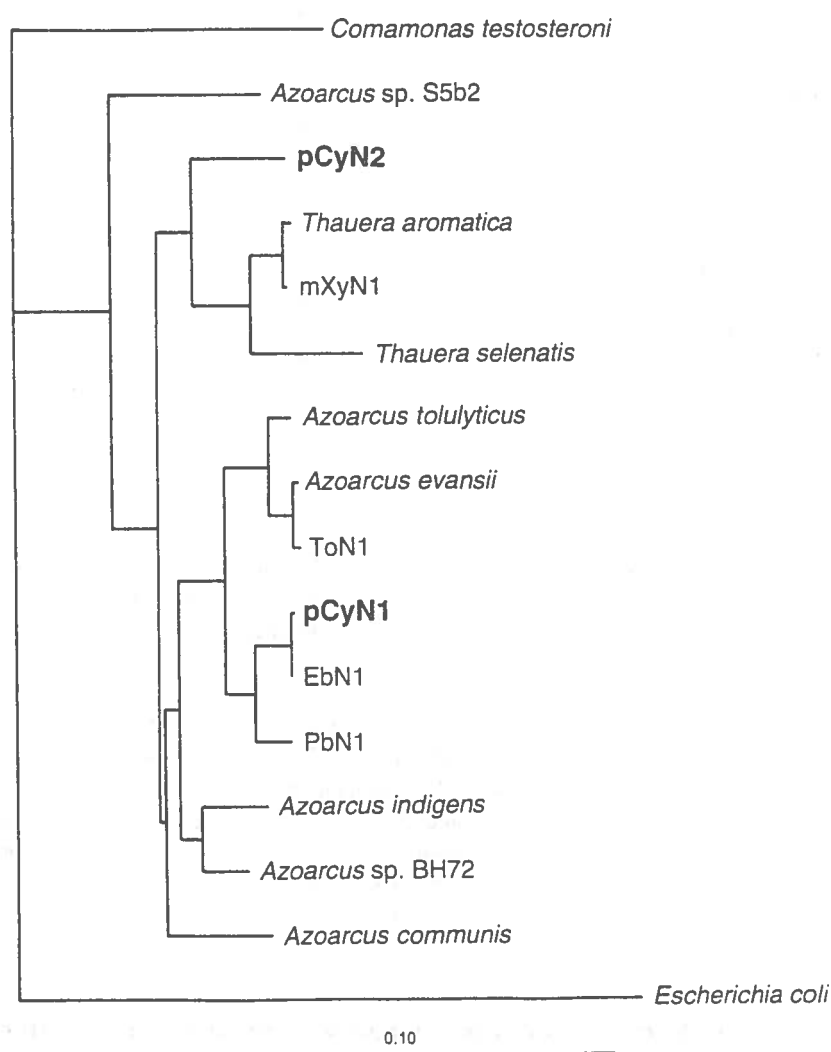


FIG. 2. Relationships based on 16S rRNA gene sequences of the newly isolated denitrifying *p*-cymene-degrading strains pCyN1 and pCyN2. The shown cluster of the β -subgroup of the Proteobacteria includes various alkylbenzene-degrading denitrifying bacteria. Strains ToN1, EbN1, PbN1 and mXyN1 are so far unnamed strains previously isolated with nitrate and toluene, ethylbenzene, propylbenzene and *m*-xylene, respectively (Rabus and Widdel 1995a). Bar represents 10 inferred nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

Degradation balance and growth yield. The balance of anaerobic *p*-cymene degradation by strain pCyN1 was determined in two separate experiments with a small and a large amount of *p*-cymene (in the carrier phase) in the presence of the same nitrate concentration (nearly 10 mM). In the experiment with the large amount of *p*-cymene, the disappearance of nitrate, formation and consumption of nitrite, and increase of the cell density (optical density) over time were also monitored (Fig. 3).

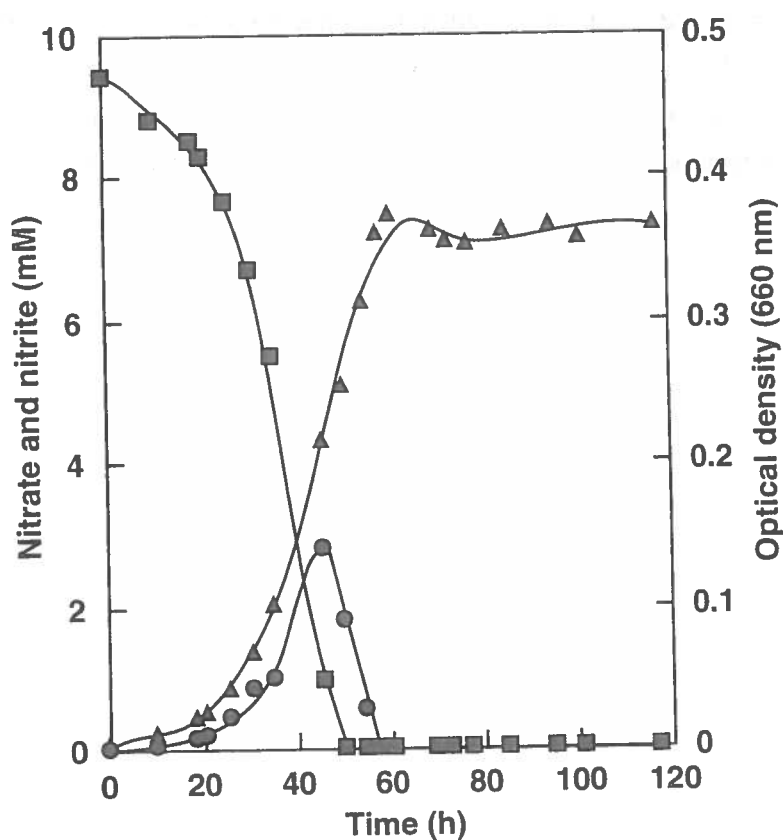


FIG. 3. Anaerobic growth of strain pCyN1 with *p*-cymene and nitrate. The experiment was carried out in a butyl rubber-sealed, horizontally incubated 500 ml bottle containing 410 ml (400 ml, plus 10 ml inoculum) ascorbate-reduced medium and 0.2 ml (1.28 mmol) *p*-cymene in 10 ml anoxic heptamethylnonane as inert carrier phase. Optical density (▲), nitrate (■) and nitrite (●) were measured in samples taken by means of N₂-flushed syringes. The initial concentration of nitrate was 9.76 mM when calculated from the added amount, and 9.5 mM when subsequently measured.

At the end of growth, remaining *p*-cymene and formed cell dry mass were determined in both experiments, and the electron balance was calculated. Results are shown in Table 2. The amount of electrons that can be theoretically derived from the measured *p*-cymene consumption was somewhat higher than the amount of electrons consumed by nitrate reduction. Similar

results were obtained with strain pCyN2 (data not shown in Table). Growth of the latter with 0.77 mmol *p*-cymene and 2.4 mmol nitrate (in 410 ml of medium) yielded consumption of 0.37 mmol of the organic substrate and complete disappearance of the electron acceptor; hence, 16.7 mmol electrons can be derived from the consumed *p*-cymene while only 12.0 mmol electrons were required for nitrate reduction to dinitrogen. The molar growth yields of strains pCyN1 and pCyN2 were 71.5 and 75 g cell dry mass, respectively, per mol of *p*-cymene oxidized. Reduction of nitrate to the level of dinitrogen, as already concluded from the observed gas formation in the enrichment culture, was confirmed analytically. Measurement of the volume of produced gas (after CO₂ absorption with NaOH solution) after complete consumption of the electron acceptor in two experiments yielded 11.8 and 13.3 ml (at 28 °C) per mmol nitrate reduced, which is 0.48 and 0.54 mmol gas per mmol nitrate. Formation of ammonium ions was never observed; rather, the ammonium concentration in the medium decreased, due to assimilation. These results are in good agreement with the formation of N₂ as the final product of nitrate reduction.

TABLE 2. Quantification of *p*-cymene consumption, nitrate reduction and formation of cell mass by strain pCyN1. Experiments were carried out in anoxic flat bottles with a culture volume of 410 ml. The total amount of nitrate added to each bottle was 4.0 mmol (concentration, 9.76 mM). The medium was overlaid with 10 ml of heptamethylnonane as carrier phase for *p*-cymene

Experiment	<i>p</i> -Cymene added (mmol)	<i>p</i> -Cymene disappeared ^a (mmol)	NO ₃ ⁻ remaining after growth (mmol)	NO ₂ ⁻ remaining after growth (mmol)	N ₂ O remaining after growth ^b (mmol)	Cell dry mass formed ^c (mg)	<i>p</i> -Cymene dissimilated ^d (mmol)	Electrons from <i>p</i> -cymene dissimilated ^e (mmol)	Electrons consumed by NO ₃ ⁻ reduction ^f (mmol)
Cells with small amount of <i>p</i> -cymene	0.26	0.23	1.93	0.38	0.2	13	0.19	10.3	8.8
Cells with large amount of <i>p</i> -cymene	1.28	0.68	0.00	0.00	0.0	41	0.55	29.7	20.0
Cells without <i>p</i> -cymene (control)	0.00	0.00	4.00	0.00	0.0	0			0.0
Sterile medium without cells (control)	1.28	0.00	4.00	0.00	0.0				0.0

^a Difference between *p*-cymene added and *p*-cymene recovered at the end of incubation in the carrier and aqueous phase; the latter contained less than 4 μM *p*-cymene (1.6 μmol total)

^b Sum of N₂O in gas phase and aqueous phase

^c Amount of cell dry mass added with the inoculum has been subtracted

^d Difference between *p*-cymene disappeared and *p*-cymene assimilated. The assimilated amount of *p*-cymene was calculated assuming the equation

$17 C_{10}H_{14} + 46 HCO_3^- + 46 H^+ + 24 H_2O \rightarrow 54 C_4H_7O_3$; thus, 1 mg of cell dry mass requires 0.00305 mmol of *p*-cymene

^e 54 mol of electrons are derived from 1 mol of *p*-cymene if oxidized to CO₂

^f Electrons consumed = 5 · (NO₃⁻ added - NO₃⁻ remaining - NO₂⁻ remaining - 2 N₂O remaining) + 2 NO₂⁻ remaining + 8 N₂O remaining (modified from Rabus and Widdel 1995a).

Nitrate reduction to ammonium was not observed.

Expression of capacities for degradation of alkylbenzenes. Strain pCyN1 was able to degrade anaerobically three different alkylbenzenes. We therefore tested whether expression of the capacities for degrading these compounds occurred concomitantly, or differentially on each alkylbenzene. Cells harvested from cultures on *p*-cymene and *p*-ethyltoluene were resuspended and incubated with each hydrocarbon while consumption of nitrate was followed. Cells from each of these cultures oxidized *p*-cymene and *p*-ethyltoluene without any lag phase, as obvious from the time course of nitrate reduction with and without organic substrate (Fig. 4A and B). Toluene was only utilized after a pronounced lag phase of >35 h. Vice versa, cells pregrown on toluene exhibited a lag phase of >18 h when incubated with *p*-cymene. When toluene-pregrown cells were supplied with *p*-ethyltoluene, nitrate reduction did not significantly deviate from that in the substrate-free control within 155 h (Fig. 4C).

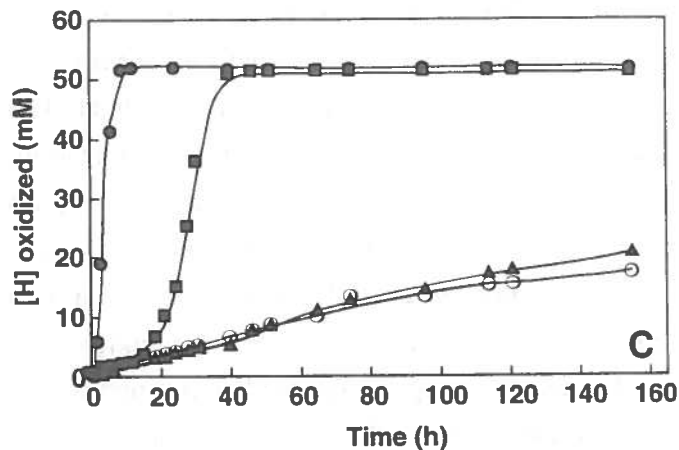
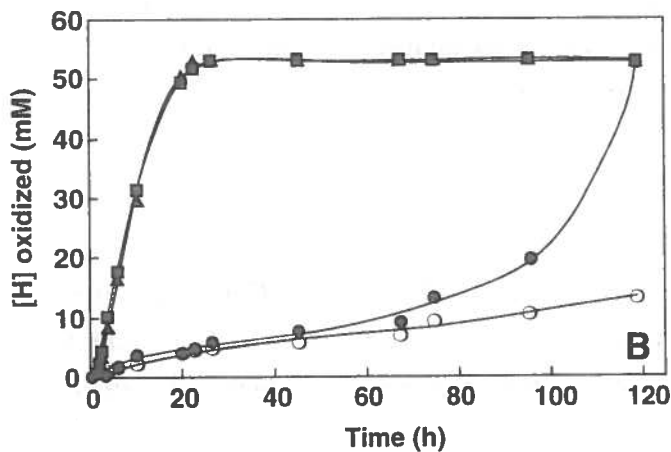
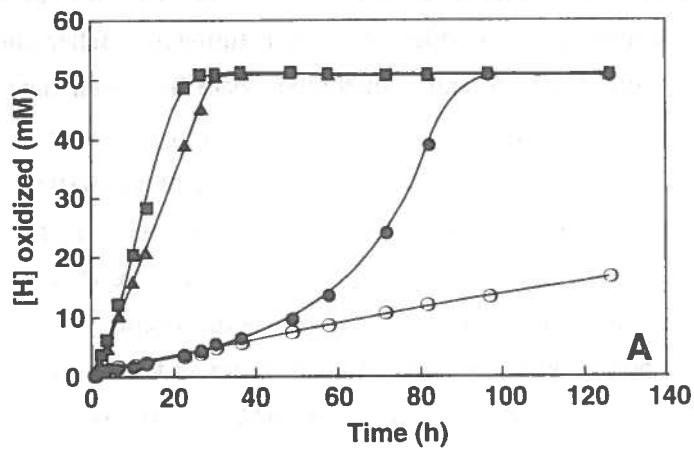


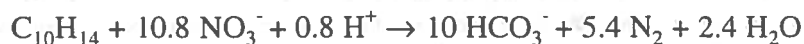
FIG. 4. Anaerobic oxidation of alkylbenzenes by resuspended cells of strain pCyN1 pregrown on *p*-cymene (A), *p*-ethyltoluene (B) or toluene (C). For comparison of alkylbenzene-degrading activities, oxidized reducing equivalents (calculation given in footnote of Table 2) are shown rather than consumption of nitrate and formation of nitrite. Cells were first incubated without organic substrate in the presence of nitrate. After 1.5 h, *p*-cymene (■), *p*-ethyltoluene (▲) or toluene (●) were added to the overlying carrier phase (heptamethylnonane), and incubation vials were slightly shaken. Controls (○) did not contain an organic substrate.

Search for possible intermediates and dead-end metabolites. Before the recognition of toluene activation as a condensation with fumarate (Beller and Spormann 1997a and b, Biegert et al. 1996), benzoate and *p*-methylbenzoate had been detected as metabolites formed from toluene or as dead-end metabolites formed from *p*-xylene, respectively (Biegert and Fuchs 1995, Rabus and Widdel 1995b, Schocher et al. 1991, Seyfried et al. 1994). These findings had supported the hypothesis of an initial attack at the methyl group rather than at the ring. We therefore searched metabolites in cultures of strains pCyN1 and pCyN2. During growth with *p*-cymene as sole organic substrate, both strains excreted up to 11 μM *p*-isopropylbenzoate. When *p*-xylene or *p*-ethyltoluene were added in a mixture with *p*-cymene (each 1 % [vol/vol] in carrier phase), up to 40 μM *p*-methylbenzoate or up to 5 μM *p*-ethylbenzoate, respectively, were excreted. Strain pCyN1, but not strain pCyN2 produced up to 30 μM *p*-*tert*-butylbenzoate during growth on *p*-cymene mixed with *p*-*tert*-butyltoluene (each 1 % [vol/vol] in carrier phase). *p*-Methylbenzoate and *p*-*tert*-butylbenzoate were not further degradable and hence present dead-end metabolites.

Discussion

The newly isolated denitrifying strains pCyN1 and pCyN2 are, to our knowledge, the first bacteria shown to grow anaerobically in pure culture with a *p*-alkyltoluene as sole electron donor and carbon source. Anaerobic utilization of *p*-xylene and *p*-ethyltoluene has been shown in an enrichment culture (Häner et al. 1995), but not so far in pure cultures. Disappearance of *m*-cymene was observed in an anaerobic enrichment culture of sulfate-reducing bacteria on crude oil (Rabus et al. 1996). Besides *p*-cymene, strains pCyN1 and pCyN2 utilized alkenic monoterpenes. Anaerobic utilization of such compounds by denitrifying bacteria has been demonstrated previously (Foß et al. 1998, Harder and Probian 1995). However, the denitrifying strains isolated from enrichment cultures with non-aromatic monoterpenes did not oxidize *p*-cymene. Some of the enrichment cultures on monoterpenes formed *p*-cymene as an obvious dead-end metabolite from the more reduced monoterpenes (Harder and Probian 1995).

Measurement of the degradation balance of *p*-cymene by strains pCyN1 and pCyN2 revealed a certain surplus of electrons if calculated from consumption of the organic substrate and compared to nitrate reduction. This may be explained by incomplete oxidation of *p*-cymene to currently unknown organic intermediates that were not detectable by the applied HPLC analysis. The concentration of excreted *p*-isopropylbenzoate (range of 10 μM) is too low to account for the missing electrons. Nevertheless, the balance measured with the small amount of *p*-cymene added is close to the following equation for complete oxidation:



The capacity for complete substrate oxidation is also obvious from growth on acetate.

Adaptation studies with cell suspensions of strain pCyN1 pregrown on different alkylbenzenes suggest that there is one enzyme system for the initial metabolism of toluene and at least one other enzyme system for the initial metabolism of *p*-cymene and *p*-ethyltoluene. The present results do not allow to further differentiate whether *p*-ethyltoluene and *p*-cymene are metabolized by the same enzyme system, or by two different, simultaneously synthesized enzyme systems. Similarly, two inducible enzyme systems for the initial reactions of toluene and ethylbenzene could be distinguished in a denitrifying bacterium, strain EbN1 (Rabus and Heider 1998). From the inability of toluene-grown cells to adapt to *p*-ethyltoluene during 155 h one may conclude that this substrate is a poor inducer of the capacity for its own degradation. Identification of *p*-alkylbenzoates formed as metabolites or dead-end metabolites during growth in the presence of the corresponding *p*-alkyltoluenes suggest an initial enzymatic attack at the methyl group, analogous to toluene utilization (Beller and Spormann 1997a, Biegert et al. 1996, Leuthner et al. 1998). However, it is presently unknown whether the co-substrate for methyl group activation is always fumarate. The present study points at marked differences in the anaerobic degradability of *p*-alkyltoluenes. Attempts to obtain enrichment cultures with *p*-xylene either failed within a certain period of time (e.g., in the present study), or yielded weakly and slowly growing enrichment cultures (Häner et al. 1995). The present study revealed reasonable growth on *p*-ethyltoluene and even faster growth on *p*-cymene. These findings suggest that the feasibility of anaerobic degradation increases in the order *p*-xylene < *p*-ethyltoluene < *p*-isopropyltoluene. From chemical point of view, the second alkyl group would facilitate formation of a radical or ion in an analogous order (methyl < ethyl < isopropyl). One may speculate that such a radical (different from that of initial methyl group activation, Leuthner et al. 1998) or ion is required for processing of a product from *p*-alkyltoluene degradation to a central aliphatic metabolite. In accordance with this, *p*-isopropylbenzoate added to enrichment cultures was consumed much faster than *p*-methylbenzoate (F. Widdel, unpublished results).

Both strains isolated with *p*-cymene were members of the *Thauera/Azoarcus* cluster of the β -subgroup of Proteobacteria. Due to presently known rRNA sequence data, also all other alkylbenzene-degrading denitrifiers described so far belong to this cluster (Anders et al. 1995, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Zhou et al. 1995). Strain pCyN1 is very closely related to the denitrifying strain EbN1 isolated on ethylbenzene (Rabus and Widdel 1995a), according to 16S rRNA gene sequence analysis and the G+C contents of the DNA (61 versus 65 mol % in strain pCyN1 and EbN1, respectively). A more refined and definite resolution of the relationship would require DNA-DNA hybridization. The strains differ mainly in their capacities for degradation of some aromatic compounds. Ethylbenzene, 1-phenylethanol and acetophenone, which are substrates of strain EbN1, are not utilized by

strain pCyN1. Vice versa, *p*-cymene, *p*-ethyltoluene and *p*-isopropylbenzoate are not utilized by strain EbN1. Both strains share the capacity for utilization of fatty and dicarboxylic acids (Table 1; Rabus and Widdel 1995a).

Acknowledgements. We thank Sabine Foß and Jens Harder, Bremen, for instrumental help. We are indebted to Fred A. Rainey and Cathrin Spröer, DSMZ, Braunschweig, for sequence analyses. The study was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and Fonds der Chemischen Industrie.

References

- Altenschmidt, U., and G. Fuchs.** 1991. Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**:152-158.
- Anders, H.-J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig, and G. Fuchs.** 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:327-333.
- Ball, H. A., H. A. Johnson, M. Reinhard, and A. M. Spormann.** 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**:5755-5761.
- Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard.** 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188-1196.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann.** 1997a. Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**:670-676.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann.** 1997b. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3729-3731.
- Biegert, T., and G. Fuchs.** 1995. Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **163**:407-417.
- Biegert, T., G. Fuchs, and J. Heider.** 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**:661-668.
- Chen, C.-I., and R. T. Taylor.** 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:121-128.
- Dean, J. A.** 1992. *Lange's handbook of chemistry*, 14 ed. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**:336-341.
- Eaton, R. W.** 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol.* **179**:3171-3180.
- Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1994. Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:313-322.
- Edwards, E. A., L. E. Wills, M. Reinhard, and D. Grbic-Galic.** 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:794-800.
- Evans, P. J., D. T. Mang, K. S. Kim, and L. Y. Young.** 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1139-1145.
- Foß, S., U. Heyen, and J. Harder.** 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 press.

- Fries, M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje.** 1994. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2802-2810.
- Gildemeister, E., and F. Hoffmann.** 1960. Die ätherischen Öle, Band IIIa. Akademie-Verlag, Berlin.
- Häner, A., P. Höhener, and J. Zeyer.** 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3185-3188.
- Harder, J., and C. Probian.** 1995. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3804-3808.
- Hegnauer, R.** 1966. Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 4. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stax, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.
- Leuthner B, C. Leutwein, H. Schulz, P. Hörth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schägger, and J. Heider.** 1998. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalyzing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* **28**:615-628.
- Lovley, D. R., M. J. Baedeker, D. J. Lonergan, I. M. Cozzarelli, E. J. P. Phillips, and D. I. Siegel.** 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature.* **339**:297-300.
- Marr, I. L., M. S. Cresser, and L. J. Ottendorfer.** 1988. Umweltanalytik. Eine allgemeine Einführung. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdel.** 1996. Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605-3613.
- Rabus, R., and J. Heider.** 1998. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, in press.
- Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995a. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995b. Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* **164**:448-451.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1238-1241.
- Rainey, F. A., M. Dorsch, H. W. Morgan, E. Stackebrandt.** 1992. 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: position and implications for the systematics of the order *Spirochaetales*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:224-226.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F.A. Rainey, H.W. Jannasch and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature.* **372**:455-458.

Schocher, R. J., B. Seyfried, F. Vazquez, and J. Zeyer. 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**:7-12.

Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschech, A., and J. Zeyer. 1994. Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4047-4052.

Widdel, F., and F. Bak. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2 ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York, Berlin.

Zhou, J., M. Fries, J. C. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje. 1995. Phylogenetic analyses 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.

Anaerobic Oxidation of *o*-Xylene, *m*-Xylene, and Homologous Alkylbenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria

Gerda Harms¹, Karsten Zengler¹, Frank Aeckersberg², Dror Minz³, Ramón Rosselló-Mora¹, Ralf Rabus⁴, and Friedrich Widdel^{1*}

Appl. Environ. Microbiol., *submitted*

*Corresponding author. Mailing address: Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany. Phone: 49-421-2028-702. Fax: 49-421-2028-790. E-mail: fwiddel@mpi-bremen.de.

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

² Present address: Kewalo Marine Laboratory, 41 Ahui St., Honolulu, Hawaii 96813.

³ Present address: The Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel.

⁴ Present address: Department of Biology, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0116.

Abstract

Various alkylbenzenes were depleted during growth of an anaerobic, sulfate-reducing enrichment culture with crude oil as the only source of organic substrates. From this culture, two new types of mesophilic, rod-shaped sulfate-reducing bacteria, strains oXyS1 and mXyS1, were isolated with *o*-xylene and *m*-xylene, respectively, as organic substrates. Sequence analyses of 16S rRNA genes revealed that the isolates affiliated with known completely-oxidizing sulfate-reducing bacteria of the δ -subclass of Proteobacteria. Strain oXyS1 showed the highest similarities with *Desulfobacterium cetonicum* and *Desulfosarcina variabilis* (similarity values, 98.4 and 98.7 %, respectively). Strain mXyS1 was less related to known species, the closest relative being *Desulfococcus multivorans* (similarity value, 89.6 %). Complete oxidation of *o*-xylene and *m*-xylene was demonstrated in quantitative growth experiments. Strain oXyS1 was able to utilize toluene, *o*-ethyltoluene, benzoate and *o*-methylbenzoate in addition to *o*-xylene. Strain mXyS1 oxidized toluene, *m*-ethyltoluene, *m*-isopropyltoluene, benzoate and *m*-methylbenzoate in addition to *m*-xylene. Like the enrichment culture, both isolates grew on crude oil as the only source of organic substrates.

Introduction

Sulfate-reducing bacteria are an important group of anaerobes in the global carbon and sulfur cycle. Oxidation of organic compounds coupled to sulfate reduction to sulfide may account for more than 50 % of carbon mineralization in marine sediments (Jørgensen 1982). In oil field waters, however, the activity of sulfate-reducing bacteria may be detrimental. Their product, hydrogen sulfide, is toxic and corrosive, increases the sulfur content of oil and gas, and leads to the precipitation of ferrous sulfide that plugs oil-bearing strata and stabilizes undesirable oil-water emulsions (Cord-Ruwisch et al. 1987, Herbert 1987, Odom 1993). Recently it was demonstrated in a mesophilic (around 30 °C) enrichment culture that sulfate-reducing bacteria can utilize various alkylbenzenes directly from crude oil (Rabus et al. 1996, Rueter et al. 1994). A moderately thermophilic (≤ 65 °C) sulfate-reducing isolate grew by consumption of *n*-alkanes from oil (Rueter et al. 1994). Hence, oil hydrocarbons were supposed to serve as growth substrates for sulfate-reducing bacteria also under *in situ* conditions in oil reservoirs, at least at temperatures not higher than the optima of the respective cultures. More recent measurements with enrichment cultures under sulfate-reducing conditions at 50-70 °C with added aromatic hydrocarbons revealed partial consumption especially of xylenes and ethylbenzene (Chen and Taylor 1997). This suggested that anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons coupled to sulfate reduction in oil reservoirs is in principle possible also under thermophilic conditions. Also, extremely thermophilic (85 °C) sulfate-reducing Archaea have been detected in oil reservoirs (L'Haridon et al. 1995, Stetter et al. 1993); however, utilization of hydrocarbons by these Archaea has not been demonstrated.

16S rRNA-targeted oligonucleotide probing of the mesophilic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil revealed that the major part of the bacterial population belonged to a cluster (suggested family, *Desulfobacteriaceae*; Widdel and Bak 1992) that comprises known species of completely oxidizing sulfate-reducing bacteria within δ -subdivision of *Proteobacteria* (Rabus et al. 1996). Besides toluene, the enrichment culture also consumed *o*-xylene and *m*-xylene (Rabus et al. 1996, Rueter et al. 1994). The present paper reports on the isolation of two new types of sulfate-reducing bacteria from the enrichment culture that are able to grow on *o*-xylene or *m*-xylene. This metabolic capacity has not been observed so far in pure cultures of sulfate-reducing bacteria. Among aromatic hydrocarbons, only toluene was shown before to serve as growth substrate for isolated strains of sulfate-reducing bacteria (Beller et al. 1996, Rabus et al. 1993). Anaerobic growth of pure cultures on *m*-xylene has been shown with denitrifying bacteria (Dolfing et al. 1990, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Seyfried et al. 1994). However, to our knowledge, no strain of any type of anaerobic bacterium has been isolated to date that grows on *o*-xylene or *p*-xylene. In some instances, pure cultures converted these xylenes cometabolically to aromatic dead-end metabolites (Beller et al.

1996, Biegert and Fuchs 1995, Evans et al. 1991b, Rabus and Widdel 1995b). In contrast, enriched bacterial populations (microcosms, consortia) have been repeatedly shown to utilize the isomers of xylene (Chen and Taylor 1997, Edwards et al. 1992, Edwards and Grbic-Galic 1994, Evans et al. 1991a, Häner et al. 1995, Zeyer et al. 1986).

Materials and Methods

Sources of bacteria. The new types of sulfate-reducing bacteria were isolated from a previously described mesophilic enrichment culture growing anaerobically with crude oil and sulfate in seawater medium (Rabus et al. 1996, Rueter et al. 1994). The enrichment culture originated from the water phase of a North Sea oil tank in Wilhelmhaven, Germany. *Desulfobacterium cetonicum* (DSM 7267) was from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

Media, cultivation techniques, and quantitative growth experiments. Techniques for preparation of media and for cultivation of sulfate-reducing bacteria under anoxic conditions were as described (Widdel and Bak 1992). Cultures were grown in defined, bicarbonate-buffered, sulfide-reduced mineral medium, essentially having the same composition of sodium, magnesium, potassium, calcium, chloride and sulfate ions as natural seawater (Widdel and Bak 1992). Butyl-rubber sealed tubes (20 ml) with 15 ml medium under a head space of N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]) were used for routine cultivation. Filter-sterilized (via solvent-resistant cellulose filters, pore size 0.2 µm) hydrocarbons, and aromatic alcohols, aldehydes and ketones were diluted (0.5 - 5 % [vol/vol]) in a carrier phase (0.5 per tube) of deaerated 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane to avoid toxic effects of the pure substances (Rabus et al. 1993). Crude oil (0.5 ml per tube) was added without dilution in a carrier phase. Tubes with the overlaid, insoluble hydrocarbon phases were incubated nearly horizontally to facilitate diffusion of substances into the aqueous medium. The orifices sealed with black rubber stoppers were kept somewhat below the surface level of the medium to avoid adsorption of hydrophobic compounds from the overlying phase by the rubber (Aeckersberg et al. 1991, Rabus et al. 1993). Heptamethylnonane and crude oil were gently deaerated and stored in a special flask under N₂ as described (Rabus and Widdel 1996). Water-soluble substrates were added from concentrated, separately sterilized stock solutions in water to yield the indicated concentrations.

Quantitative growth experiments with xylenes dissolved in a carrier phase (concentration indicated in experiments) were carried out in flat glass bottles (250 and 500 ml) containing defined medium (190 and 450 ml, respectively) and heptamethylnonane (5 and 15 ml, respectively) under a head space of N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]). Bottles were incubated

horizontally on a rotary shaker (65 rpm) while contact of the carrier phase with the stoppers was avoided, as described for cultivation tubes.

All used chemicals were of analytical grade.

Isolation, purity control and maintenance. Strains were isolated via repeated dilution in agar tubes. The salinity of the medium for preparation of the dilution series was increased by a factor of 1.5, such that mixing with the aqueous agar (6 ml medium added to 3 ml molten aqueous agar) yielded the same salt concentration as in the original liquid medium (Widdel and Bak 1992).

Purity of isolates was routinely checked by examination by phase-contrast microscopy. In addition, cultures were supplied with yeast extract (0.5 g/l) and glucose or fructose (both 5 mM) and examined microscopically.

For maintenance, strains oXyS1 and mXyS1 were grown on *o*-xylene and *m*-xylene, respectively, stored at 4 °C and transferred every 6 - 8 weeks.

Sequence analyses of 16S rRNA genes. Genomic DNA of strain oXyS1 was extracted and a 16S rRNA gene sequence was amplified as described by Rainey et al. (1992). The PCR products were sequenced directly. Analysis was carried out by Fred A. Rainey at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. Genomic DNA of strain mXyS1 was extracted as described by Tsai and Olson (1991). The 16S rRNA gene sequence was amplified using the bacterial primers GM3F and GM4R (Muyzer et al. 1995). The amplified fragment was cloned into the pGM-T vector (Promega, Madison, Wisc.). Plasmids were purified using the Wizard plasmid purification kit (Promega). Sequencing reactions were performed using the *Taq* Dye-Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Sequences were determined using an ABI 373S DNA sequencer according to manufacturer's instructions. Data are deposited under EMBL accession numbers Y17286 (strain oXyS1) and AJ006853 (strain mXyS1).

New sequences were added to an alignment of about 5300 homologous primary structures of bacterial 16S rRNA genes by using the alignment tool of the ARB program package (Strunk and Ludwig). Similarity and distance matrices were calculated with the program ARB-PHYL of the same package. Phylogenetic trees were constructed using subsets of data that included representative sequences of members of the δ -subclass of *Proteobacteria* (Maidak et al. 1997). We used distance matrix, maximum likelihood and maximum parsimony methods as implemented in the programs PHYLIP (Felsenstein 1992), ARB and fastDNAmI (Maidak et al. 1997).

Chemical analyses. Sulfide was determined colorimetrically by the methylene blue formation reaction as described (Aeckersberg et al. 1991, Cline 1969). In addition, a sulfide test with Cu^{2+} ions yielding CuS was applied (Cord-Ruwisch 1985).

Xylenes dissolved in heptamethylnonane were measured by means of an Auto System gas chromatograph (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) equipped with a PVMS 54 column (50 m; inner diameter, 0.32 mm) and a flame ionization detector. The flow rate of N₂ was 1.7 ml·min⁻¹. The temperature program was run from 80 °C (2 min isotherm) to 120 °C at 20 °C·min⁻¹, and then from 120 °C (0.1 min isotherm) to 300 °C at 40 °C·min⁻¹. The temperatures at the injection port and the detector were 250 and 350 °C, respectively. Defined, freshly prepared solutions of xylenes in heptamethylnonane were used for calibration.

Xylenes in the aqueous phase were determined by a high-performance liquid chromatography system (Sykam, Gilching/Munich, Germany) equipped with a Spherisorb OD S2 reverse-phase column (250 by 5 mm); the eluent was an acetonitrile-water mixture (80:20 [vol/vol]) in distilled water. The flow rate was 1 ml·min⁻¹ and the temperature of the column 25 °C (Rabus and Widdel 1995a). Detection was by UV absorption at 265 nm. Defined, freshly prepared solutions of xylenes in acetonitrile-water (80:20 [vol/vol]) were used as standards.

The G+C content of the DNA was determined by high-performance liquid chromatography as described (Mesbah et al. 1989). The analysis was carried out by Fred A. Rainey at the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany.

Enzymatic tests. Anoxic preparation of cell-free extracts and enzyme assays were carried out as described (Aeckersberg et al. 1991, Rabus et al. 1993). Protein was quantified according to Bradford (1976).

Results and Discussion

Isolation. An anaerobic enrichment culture with crude oil as the only source of organic substrates and sulfate as electron acceptor consumed toluene, *o*-xylene, *m*-xylene, *o*-ethyltoluene, *m*-ethyltoluene, *m*-propyltoluene and *m*-isopropyltoluene (Rabus et al. 1996, Rueter et al. 1994). In counting series using agar dilutions with benzoate, or overlaid with crude oil or toluene (in carrier phase), high numbers of colonies of sulfate-reducing bacteria were formerly obtained that were also able to grow with these substrates also when transferred back to liquid medium (Rabus et al. 1996). Counting and isolation of bacteria with defined alkylbenzenes other than toluene was not carried out during the initial study, and colonies were not preserved. In the present study we therefore attempted to isolate and to characterize sulfate-reducing bacteria responsible for utilization of *o*-xylene and *m*-xylene in the enrichment culture with oil. These two compounds were chosen because they were consumed most rapidly, next to toluene. Furthermore, strains of sulfate-reducing bacteria utilizing *o*-xylene and *m*-xylene would present novel metabolic types; their study would add to our knowledge of the nutritional and genetic diversity of sulfate-reducing bacteria that degrade hydrocarbons. Dilution series

from the enrichment culture were carried out in agar overlaid with *o*-xylene and *m*-xylene in a carrier phase. Largest colonies developed next to the overlying hydrocarbon phase. Pure cultures were isolated via second agar dilution series. One strain isolated with *o*-xylene and one strain isolated with *m*-xylene were chosen for further investigations. These strains were designated as oXyS1 and mXyS1, respectively.

Morphological and other characteristics. Cells of both new isolates were rod-shaped. Cells of strain oXyS1 were more elongated than those of strain mXyS1 (Fig. 1). The dimensions were 0.8-1.0 x 2.5-4.0 μm for strain oXyS1 and 0.6-1.0 x 1-2 μm for strain mXyS1.

Growth of strain oXyS1 was observed within a temperature range of 15 - 35 °C, with an optimum around 32 °C, and within a pH range of 6.2 - 7.9, with an optimum around 7.5. Growth of strain mXyS1 occurred within a temperature range of 16 - 35 °C, with an optimum around 30 °C, and within a pH range of 5.8 - 8, with an optimum around 7.2.

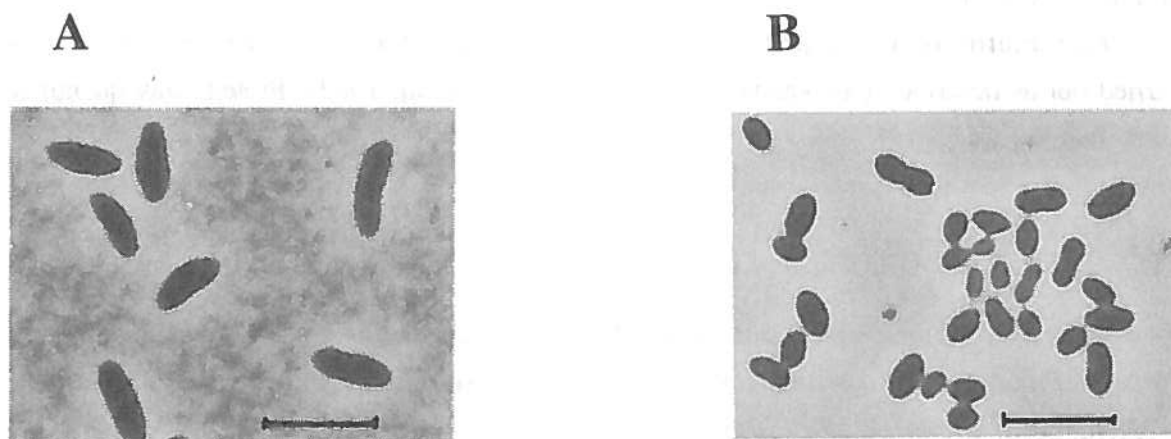


FIG. 1. Phase contrast photomicrographs of newly isolated sulfate-reducing bacteria utilizing xylenes. (A) Strain oXyS1 isolated with *o*-xylene; (B) strain mXyS1 isolated with *m*-xylene. Bar, 5 μm .

Relationships based on 16S rRNA gene sequences, and G+C content of DNA. Analyses of sequences derived from the 16S rRNA genes revealed that both strains affiliated with the δ -subclass of *Proteobacteria* and branch within a group for which the family designation *Desulfobacteriaceae* has been proposed (Widdel and Bak 1992). This group of mesophilic sulfate-reducing bacteria comprises, among some incompletely oxidizing species, the described completely oxidizing species. Many of these are, like the presently obtained isolates, nutritionally rather versatile, and several have been reported to grow with aromatic compounds, most commonly with benzoate (Widdel and Bak 1992). The closest relatives of

strain oXyS1 among described species were *Desulfobacterium cetonicum* and *Desulfosarcina variabilis*, the similarity values being as high as 98.4 and 98.7 %, respectively. As shown in Fig. 2, the branching of strain oXyS1 and its closest relatives is drawn as a multifurcation because the topology could not be resolved unambiguously by the different treeing approaches. Due to the high similarity values between the sequences from these three organisms they may be even regarded as members of one species (Goodfellow et al. 1997, Stackebrandt and Goebel 1994). For definite classification in the future, however, additional characteristics, especially DNA-DNA hybridization data, should be taken into consideration. Strain mXyS1 did not show a specific relationship to a known species. The closest relative was *Desulfococcus multivorans* with a similarity value of 89.6 % (Fig. 2). According to this relatively deep branching, strain mXyS1 may be regarded as the first representative of a so far unknown, distinct line of descent within the δ -subclass of *Proteobacteria*.

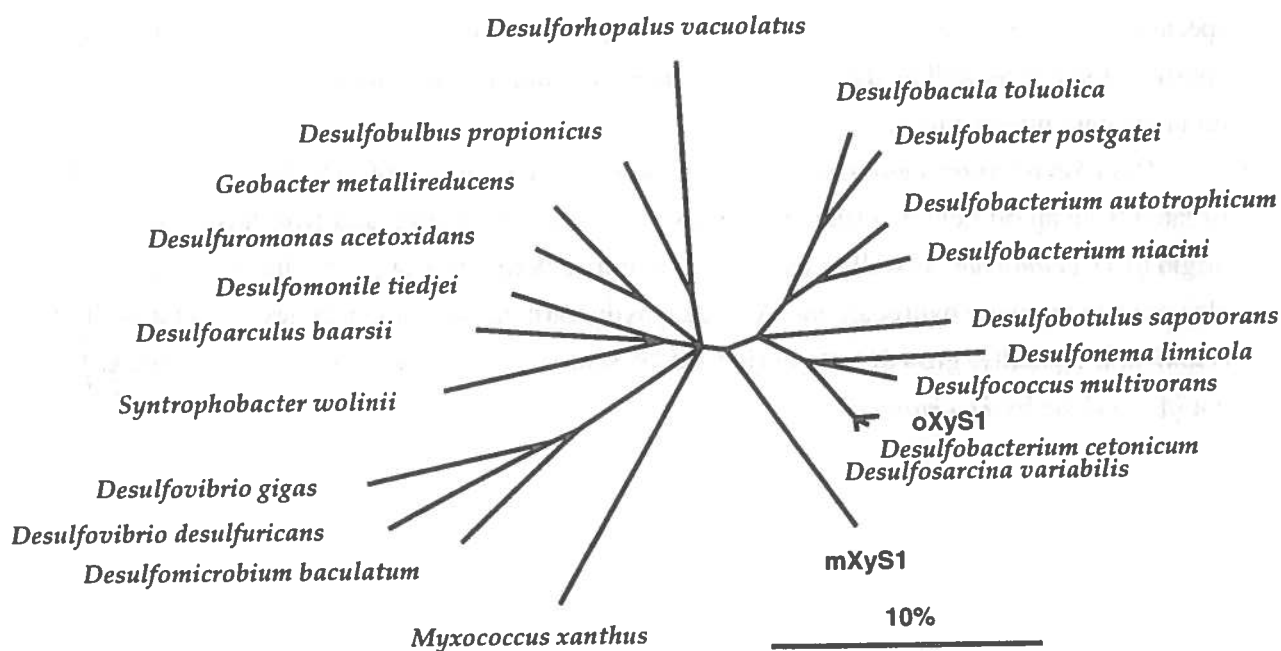


FIG. 2. 16S rRNA-based tree reflecting the relationships of strains oXyS1 and mXyS1 to a selected number of *Proteobacteria* from the δ -subclass. The tree is based on maximum parsimony analysis; this includes only sequence positions that share identical residues in at least 50% of all available complete or almost complete 16S rRNA sequences from representative bacteria of this subgroup (Maidak et al. 1997). For most species shown in the tree, sequences were those of the type strains. The sequence of *Desulfomicrobium baculatum* was from strain 9974 (DSM 1743), which is not the type strain. *Desulfoarculus baarsii*, *Desulfobotulus sapovorans* and *Desulfomicrobium baculatum* are the newly suggested names of the former *Desulfovibrio baarsii*, *Desulfovibrio sapovorans* and *Desulfovibrio baculatus*, respectively (for discussion see Widdel and Bak 1992). The topology of the tree was evaluated and corrected according to the results of distance matrix, maximum parsimony and maximum likelihood analyses of various data sets. Phylogenetic positions of strains oXyS1 and mXyS1 did not differ in all treeing approaches. Multifurcations indicate topologies that could not be resolved unambiguously. Bar indicates 10% sequence divergence.

The G + C content of the DNA of strain oXyS1 determined via HPLC analysis was 51 mol %. (Not determined for strain mXyS1.) Reported G + C values of *Desulfobacterium cetonicum* and *Desulfosarcina variabilis* were 59 and 51 mol % (Galushko and Rozanova 1995, Widdel and Bak 1992). Even though these two values were determined by thermal denaturation, viz. a method different from the presently applied HPLC analysis, the latter value is in good agreement with the close relationship between strain oXyS1 and *D. variabilis* revealed by sequence analysis of 16S rRNA genes.

Study of substrate utilization. Strains oXyS1 and mXyS1 were able to grow on a variety of aromatic and aliphatic compounds (Table 1). Growth on toluene was observed with both strains, whereas utilization of other alkylbenzenes was strain-specific. Strain oXyS1 used only one higher homologue of *o*-xylene, *o*-ethyltoluene, but no *meta*-substituted alkyltoluenes. In contrast, strain mXyS1 used two homologues of *m*-xylene, *m*-ethyltoluene and *m*-isopropyltoluene, but no *ortho*-substituted alkylbenzenes. *p*-Alkylbenzenes did not allow growth of any strain. Both strains were able to grow with crude oil. One may, therefore, speculate that sulfate-reducing bacteria of the types represented by strains oXyS1 and mXyS1 consume toluene as well as the respective xylenes and higher homologues also from the crude oil in the enrichment culture.

Desulfobacterium cetonicum, a very close relative of strain oXyS1, was originally isolated from an oil field by using butyrate as a substrate (Galushko and Rozanova 1995). The origin of *D. cetonicum* as well as its capacity to utilize benzoate suggested that this species can also oxidize aromatic hydrocarbons. Aromatic hydrocarbons have not been tested so far with *D. cetonicum*. Actually, growth tests during the present study revealed utilization of toluene but not of *o*-xylene by *D. cetonicum*.

TABLE 1. Anaerobic growth tests of sulfate-reducing strains oXyS1 and mXyS1 on aromatic and non-aromatic compounds. Each compound was tested twice at concentrations given in parentheses. Unless otherwise noted, concentrations are given in mM. Concentrations in % (vol/vol) refer to dilutions of hydrophobic compounds in heptamethylnonane as an inert carrier phase. Symbols: +, growth observed; -, no growth observed

Compound tested ^a	Strain	
	oXyS1	mXyS1
Aromatic hydrocarbons		
Toluene (2 %)	+	+
<i>o</i> -Xylene (2 %)	+	-
<i>m</i> -Xylene (2 %)	-	+
<i>o</i> -Ethyltoluene (2 %)	+	-
<i>m</i> -Ethyltoluene (2 %)	-	+
<i>m</i> -Isopropyltoluene (2 %)	-	+
Aromatic compounds with functional groups		
<i>o</i> -Methyl benzyl alcohol (0.5, 2)	+	-
<i>m</i> -Methyl benzyl alcohol (0.5, 2)	-	-
Benzoate (1, 4)	+	+
<i>o</i> -Methylbenzoate (1, 2)	+	-
<i>m</i> -Methylbenzoate (1, 2)	-	+
Benzylsuccinate (1, 4)	+	-
Further compounds		
Ethanol (1, 5)	+	-
Formate (10, 20)	+	+
Acetate (5, 10)	+	+
Propionate (5, 10)	-	+
<i>n</i> -Butyrate (5, 10)	+	+
Lactate (5, 10)	+	-
Pyruvate (1, 5)	+	+
Succinate (1, 5)	+	-
D,L-Malate (1, 5)	+	-

^a Further compounds tested but utilized by neither strain:

Benzene (2 %), ethylbenzene (2 %), *p*-xylene (2 %), *p*-ethyltoluene (2 %), *o*-isopropyltoluene (2 %), *p*-isopropyltoluene (2 %), *n*-hexane (2, 5 %), *n*-decane (5, 10 %), cyclohexane (2 %), methylcyclohexane (2 %), phenol (0.5, 2), *o*-cresol (0.5, 2), *m*-cresol (0.5, 2), *p*-cresol (0.5, 2), acetophenone (1 %), *p*-methylbenzoate (0.5, 2), methanol (5, 10), glucose (1, 5), fructose (1, 5).

Quantitative growth experiments. Growth of the new isolates was slower than that of described toluene-degrading sulfate-reducing bacteria (Beller et al. 1996, Rabus et al. 1993). The growth curve of strain oXyS1 on *o*-xylene is shown in Fig. 3. The exponential growth phase was rather short, as could be seen in a semilogarithmic plot of the sulfide concentration or the optical density versus time (not shown). Exponential growth soon turned into pronounced linear growth, viz. the growth rate decreased steadily. Linear growth may be explained by a limiting factor, as for instance the rate of substrate diffusion from the carrier phase into the medium, or poor availability of trace metals due to precipitation as sulfides. The

relatively short exponential phase allowed only an estimate of the doubling time, which was around 75 h for strain oXyS1 and around 55 h for strain mXyS1. The sulfate-reducing strains PROTL1 and Tol2 exhibited shortest doubling times on toluene of 36 h (Beller et al. 1996) and 27 h (Rabus et al. 1993), respectively.

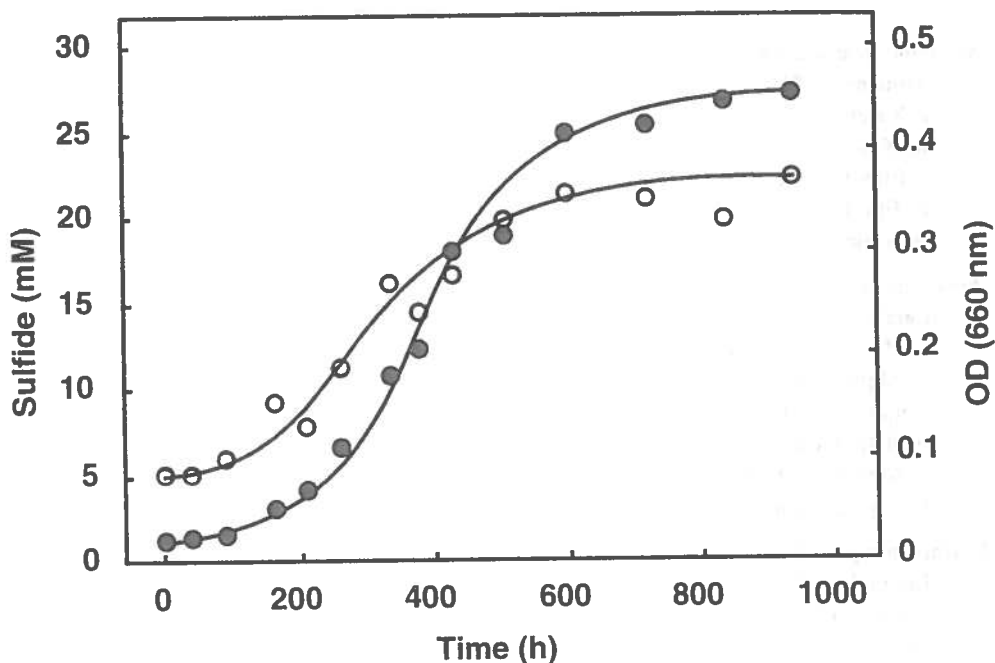
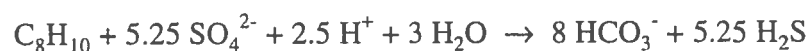


FIG. 3. Sulfide production (●) and increase of cell turbidity (○) in a culture of strain oXyS1 growing in defined medium on *o*-xylene. The growth experiment was carried out in a flat bottle (500 ml) with 450 ml medium and 0.3 ml *o*-xylene dissolved in 15 ml heptamethylnonane. The bottle was horizontally incubated and slightly shaken.

Substrate consumption and sulfide formation were quantitatively determined in growth experiments with strains oXyS1 and mXyS1 with two different initial concentrations of *o*-xylene and *m*-xylene, respectively, in the presence of sulfate (28 mM). Results obtained with strain mXyS1 are shown in Table 2. The amount of electrons that can be theoretically derived from the amount of disappeared *m*-xylene is only approximately 10 % higher than the amount of electrons required for sulfide production from sulfate. This deviation can be explained by partial utilization of the substrate for cell synthesis. Various sulfate-reducing bacteria were shown to assimilate approximately 10-15 % of the organic substrate (Rabus et al. 1993, Schnell et al. 1989, Widdel and Pfennig 1981). In conclusion, the result is in good agreement with a complete oxidation of *m*-xylene to CO₂. Essentially the same result was obtained with strain oXyS1 (data not shown). The ability of both strains for complete oxidation is also obvious

from their growth on acetate which according to our present biochemical knowledge necessarily leads to CO₂ as the end product. The equation for complete oxidation of xylenes is as follows:



To our knowledge, this is the first demonstration of the utilization of *o*-xylene and *m*-xylene in pure cultures of sulfate-reducing bacteria.

TABLE 2. Quantification of *m*-xylene consumption and sulfide formation by strain mXyS1. Experiments were carried out in anoxic flat bottles (250 ml) with a culture volume of 190 ml. The total amount of sulfate added to each bottle was 5.23 mmol (27.5 mM). The medium was overlaid with 5 ml of heptamethylnonane as carrier phase for *m*-xylene. The required volume of *m*-xylene to be added was calculated from the density (0.866 g cm⁻³, at 20 °C) and molecular mass (106.2 g · mol⁻¹)

Experiment	<i>m</i> -Xylene added (mmol)	<i>m</i> -Xylene disappeared ^a (mmol)	Sulfide produced ^b (mmol)	Electrons from <i>m</i> -xylene disappeared ^c (mmol)	Electrons consumed by SO ₄ ²⁻ reduction ^d (mmol)
Strain mXyS1 with small amount of <i>m</i> -xylene	0.242	0.231	1.07	9.7	8.58
Strain mXyS1 with large amount of <i>m</i> -xylene	1.21	1.11	5.0	46.6	40.0
Strain mXyS1 without <i>m</i> -xylene (control)	0.0	0.0	0.067	0.0	0.54
Sterile medium without cells (control)	1.21	0.0	0.0	0.0	0.0

^a Difference between *m*-xylene added and *m*-xylene recovered in the carrier and aqueous phase at the end of the growth experiment.

^b The amount of sulfide produced in the control with cells without substrate was subtracted from the sulfide produced in experiments with cells and *m*-xylene.

^c Stoichiometrically, 42 mmol of electrons are derived from 1 mmol of *m*-xylene oxidized to CO₂.

^d Stoichiometrically, 8 mmol of electrons are required for complete reduction of 1 mmol SO₄²⁻ to 1 mmol H₂S.

Key enzymes of acetyl-CoA oxidation. Enzyme tests for detection of key enzymes for acetyl-CoA oxidation were carried out with cell-free extracts of strain oXyS1. Carbon monoxide dehydrogenase and formate dehydrogenase were measured at specific activities (referred to protein) of 0.12 and 0.23 μmol min⁻¹ · mg⁻¹, respectively. No activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase was detectable. Results suggest that terminal oxidation occurs via the carbon monoxide dehydrogenase pathway (reverse Wood pathway, or C₁ pathway), as

present in most species of completely oxidizing sulfate-reducing bacteria (Widdel and Hansen 1992).

Acknowledgements. We are indebted to Fred A. Rainey, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, for sequence analysis and providing unpublished sequence data. We wish to thank Jens Harder, Bremen, for instrumental help.

G. Harms and K. Zengler contributed equally to the present study.

This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

- Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel.** 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**:5-14.
- Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard.** 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188-1196.
- Biegert, T., and G. Fuchs.** 1995. Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **163**:407-417.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Chen, C.-I., and R. T. Taylor.** 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:121-128.
- Cline, J. D.** 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**:454-458.
- Cord-Ruwisch, R.** 1985. A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **4**:33-36.
- Cord-Ruwisch, R., W. Kleinitz, and F. Widdel.** 1987. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* **January**:97-106.
- Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R.P. Schwarzenbach.** 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**:336-341.
- Edwards, E. A., L.E. Wills, M. Reinhard, and D. Grbic-Galic.** 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:794-800.
- Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1994. Anaerobic degradation of toluene and *o*-xylene by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:313-322.
- Evans, P. J., D. T. Mang, and L. Y. Young.** 1991a. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:450-454.
- Evans, P. J., D. T. Mang, K. S. Kim, and L. Y. Young.** 1991b. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1139-1145.
- Felsenstein, J.** 1992. Numerical methods for inferring phylogenetic trees. *Q. Rev. Biol.* **57**:379-404.
- Fries, M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje.** 1994. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2802-2810.
- Galushko, A. S., and E. P. Rozanova.** 1995. *Desulfobacterium cetonicum* sp. nov.: A sulfate-reducing bacterium which oxidizes fatty acids and ketones. *Microbiology.* **60**:742-746.
- Goodfellow, M., G. P. Manfio, and J. Chun.** 1997. Towards a practical species concept for cultivable bacteria, p. 25-59. *In* M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson (ed.), *The units of biodiversity*. Chapman & Hall, London.

- Häner, A., P. Höhener, and J. Zeyer.** 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3185-3188.
- Herbert, B. N.** 1987. Reservoir souring, p. 63-71. *In* E. C. Hill, J. L. Shennan, and R. J. Walkinson (ed.), *Microbial problems in the offshore oil industry*. John Wiley & Sons, London.
- Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stax, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.
- Jørgensen, B. B.** 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature.* **296**:643-645.
- L'Haridon, S., A.-L. Reysenbach, P. Glénat, D. Prieur, and C. Jeanthon.** 1995. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature.* **377**:223-224.
- Maidak B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, and C. R. Woese.** 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **25**:109-111.
- Mesbah M., U. Premachandran, and W. B. Whitman.** 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:159-167.
- Muyzer, G., A. Teske, C. O. Wirsén, and H. W. Jannasch.** 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**:165-172.
- Odom, J. M.** 1993. Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria, p. 189-210. *In* J. M. Odom, and R. Singleton, Jr. (ed.), *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995a. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995b. Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* **164**:448-451.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1238-1241.
- Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdel.** 1996. Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605-3613.
- Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.
- Rainey, F. A., M. Dorsch, H. W. Morgan, E. Stackebrandt.** 1992. 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: position and implications for the systematics of the order *Spirochaetales*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:224-226.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate-reducing bacteria. *Nature (London)* **372**:455-458.
- Schnell, S., F. Bak, and N. Pfennig.** 1989. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **152**:556-563.

- Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschech, A., and J. Zeyer.** 1994. Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4047-4052.
- Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: A place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846-849.
- Stetter, K. O., R. Huber, E. Blöchl, M. Kurr, R. D. Eden, M. Fielder, H. Cash, and I. Vance.** 1993. Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature (London)* **365**:743-745.
- Strunk, O., and W. Ludwig.** ARB: a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>. Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich, Germany.
- Tsai, Y. L., and B. H. Olson.** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1070-1074.
- Widdel, F., and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2 ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York, Berlin.
- Widdel, F., and T. A. Hansen.** 1992. The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria, p. 583-624. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2 ed., vol. 1. Springer-Verlag, New York.
- Widdel, F., and N. Pfennig.** 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov. sp. nov. *Arch. Microbiol.* **129**:395-400.
- Zeyer, J., E. P. Kuhn, and R. P. Schwarzenbach.** 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:944-947.

3

Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*

Ralf Rabus^{1*}, Heinz Wilkes², Andreas Schramm³, Gerda Harms³,
Astrid Behrends³, Rudolf Amann³ and Friedrich Widdel³

Environ. Microbiol., *submitted*

^{1*} Corresponding author. Mailing address: University of California at San Diego, Department of Biology, 9500 Gilman Drive, La Jolla, California 92093-0116, USA Phone: +1-619-534-2457. FAX: +1-619-534-7108. EMail: rrabus@biomail.ucsd.edu

² Institut für Erdöl und Organische Geochemie (ICG-4), Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52428 Jülich, Germany

³ Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, D-28359 Bremen, Germany

Abstract

Denitrifying bacteria were enriched from freshwater sediment with added nitrate as electron acceptor and crude oil as the only source of organic substrates. The enrichment cultures were used as laboratory model systems to study the degradative potential of denitrifying bacteria with respect to crude oil constituents, and the phylogenetic affiliation of denitrifiers that are selectively enriched with crude oil. The enrichment culture exhibited two distinct growth phases. During the first phase, bacteria developed homogeneously in the aqueous phase, while various C₁-C₃-alkylbenzenes, but no alkanes were utilized from the crude oil. During the second phase bacteria developed in addition that formed aggregates, adhered to the crude oil layer and emulsified the oil, while utilization of *n*-alkanes (C₅ to C₁₂) from the crude oil was observed. During growth, several alkylbenzoates accumulated in the aqueous phase, which were presumably formed from alkylbenzenes. Application of a newly designed, fluorescently labeled 16S rRNA targeted oligonucleotide probe specific for the *Azoarcus/Thauera* group within the β -subclass of *Proteobacteria* allowed an affiliation of the vast majority of the enriched denitrifiers with this phylogenetic group.

Introduction

Crude oil is the most important source of fuel and gasoline and of hydrocarbons for industrial chemical synthesis. The two major classes of oil constituents are aromatic and aliphatic hydrocarbons. Interest in the biodegradation of oil hydrocarbons arises from their environmental impact. Due to spills and leakages from oil pipelines (Vanlooek et al. 1975) and underground storage tanks (US EPA 1986), soil and deeper strata may be contaminated with oil hydrocarbons. Since groundwater aquifers are frequently anoxic, knowledge of bacterial capacities to degrade oil hydrocarbons in the absence of molecular oxygen is important to predict the effectivity of bioremediation efforts under such conditions. Addition of nitrate to oil-contaminated sites, e.g. groundwater aquifers (Gersberg et al. 1993, Hunkeler et al. 1995), has been regarded as a potential means of enhancing bioremediation efforts on site

Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) are regarded as groundwater contaminants of major concern, because they exhibit a considerable water solubility (Dunn et al. 1986) and toxic properties (Dean 1985, Koch and Wagner 1989). Therefore anaerobic degradation of oil hydrocarbons has been most intensively studied with BTEX, in particular with toluene. Anaerobic degradation of toluene has been studied in microbial communities (Edwards and Grbic-Galic 1992, Grbic-Galic and Vogel 1987, Kuhn et al. 1988) and pure cultures of denitrifying (Altenschmidt and Fuchs 1991, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Schocher et al. 1991), ferric iron-reducing (Lovley and Lonergan 1990) and sulfate-reducing (Beller et al. 1996, Rabus et al. 1993) bacteria. The mechanism of anaerobic toluene activation has been recently elucidated (Beller and Spormann 1997; Biegert et al. 1996; Leuthner et al. 1998, Rabus and Heider 1998). Other alkylbenzenes shown to be anaerobically degradable by pure cultures of denitrifying bacteria are ethylbenzene (Ball et al. 1996, Rabus and Widdel 1995a), propylbenzene (Rabus and Widdel 1995a) and *m*-xylene (Dolfing et al. 1990, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a). Anaerobic degradation of benzene (Edwards and Grbic-Galic 1992, Lovley et al. 1995) and *o*-xylene (Rueter et al. 1994) under sulfate-reducing conditions and of *p*-xylene (Häner et al. 1995) under nitrate-reducing conditions was observed in enrichment cultures or sediments. Anaerobic degradation of *n*-alkanes has also been demonstrated. Pure cultures of new types of sulfate-reducing bacteria (Aeckersberg et al. 1991, Rueter et al. 1994) and denitrifying bacteria (Ehrenreich 1996; A. Behrends, J. Harder, F. Rainey, F. Widdel, unpublished) completely oxidized various *n*-alkanes under strictly anoxic conditions. The isoprenoid alkane pristane has recently been shown to be degradable under nitrate-reducing conditions in microcosms and enrichment cultures (Bregnard et al. 1997). All known denitrifying bacteria with the capacity to utilize alkylbenzenes (Anders et al. 1995, Fries et al. 1994, Rabus and Widdel 1995a) affiliate with the *Azoarcus/Thauera* group within the

β -subclass of *Proteobacteria*. Denitrifying bacteria with the capacity to utilize *n*-alkanes do not only occur in the β -subclass, but also in the γ -subclass of *Proteobacteria* (Ehrenreich 1996; A. Behrends, J. Harder, F. Rainey, F. Widdel, unpublished).

In addition to individual hydrocarbons degraded in the aforementioned studies, crude oil as a natural, complex mixture of hydrocarbons was also tested as growth substrate for anaerobic bacteria. A moderately thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated on *n*-decane and a mesophilic enrichment culture from an oil tank have been shown to utilize *n*-alkanes and alkylbenzenes from crude oil (Rueter et al. 1994). Furthermore, an enrichment culture exhibited sulfate-dependent consumption of alkanes from oil (Caldwell et al. 1998). Denitrifying bacteria which had been originally enriched and isolated on individual alkylbenzenes could also grow on crude oil (Rabus and Widdel 1996). It has not been studied so far, which types of bacteria develop if crude oil is directly used as the substrate for enrichment cultures under nitrate-reducing conditions. In the present study we used this approach to elucidate which range of crude oil constituents is in principle degradable by denitrifying bacteria. In addition to this metabolic aspect, we studied which phylogenetic types of denitrifiers were selected by crude oil. This was done by 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization, a proven tool to examine, on the phylogenetic level, the composition of microbial communities in natural habitats (Amann et al. 1997, Amann et al. 1995, Zarda et al. 1997), in diesel fuel contaminated laboratory columns (Hess et al. 1997) and in a sulfate-reducing enrichment culture growing on crude oil (Rabus et al. 1996).

Experimental procedures

Sources of organisms. The mesophilic enrichment cultures of denitrifying bacteria growing on crude oil as the only source of organic substrates were obtained from sediments of ditches in Bremen, and from a waste disposal site near Lingen (Germany). The alkylbenzene-degrading strains EbN1, ToN1, mXyN1 and PbN1 (Rabus and Widdel 1995a), the *n*-alkane degrading strains HxN1 and OcN1 (A. Behrends, F. Rainey, F. Widdel, unpublished; Ehrenreich 1996) and the monoterpene-degrading *Alcaligenes defragrans* strain 54Pin (Foß et al. 1998), which are all denitrifying bacteria, have been subcultured in our laboratory since their isolation. *A. defragrans* was kindly provided by J. Harder. Denitrifying and other bacteria used as reference strains for whole-cell hybridization were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville (Maryland, USA), and the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig (Germany). The type strain of *Azoarcus indigenus* was kindly provided by B. Reinhold-Hurek (Marburg, Germany).

Media and conditions of cultivation. Anoxic techniques for preparation of medium and cultivation of bacteria were applied as described before (Widdel and Bak 1992).

Enrichment cultures of denitrifying bacteria on crude oil were grown in the same bicarbonate-buffered mineral medium as described for the cultivation of alkylbenzene-degrading denitrifying bacteria (Rabus and Widdel 1995a, Rabus and Widdel 1996). Anoxic crude oil was prepared and stored in a special flask provided with a side arm for supply of N₂ and an orifice sealed with Teflon-coated rubber (Rabus et al. 1996). North Sea crude oil was kindly provided by J. Fischer, Wilhelmshaven (Germany).

Denitrifiers were enriched in 500 ml flat glass bottles containing 200 ml of a mixture of homogenized mud samples, 200 ml of mineral medium and 10 ml of anoxic crude oil, under a head space of N₂-CO₂ (90:10 [vol/vol]). The bottles were incubated nearly horizontally to facilitate diffusion of organic substrates by maximizing the contact area between crude oil and medium. The stopper-sealed orifices of the bottles were always kept below the surface of the medium to avoid adsorption of the oil by the rubber (Aeckersberg et al. 1991, Rabus et al. 1993, Rabus and Widdel 1995a). Unless otherwise indicated, cultures were shaken twice per day for a few seconds. Nitrogen gas formed by denitrification was released from the bottles and quantified. Before the overpressure could be released, bottles had to be placed first for several minutes in an upright position. After settling of the mud, the closed bottles were briefly tilted such that mud particles adhering to the inner side of the stopper were rinsed off with the supernatant. In this way, plugging of a hypodermic needle subsequently punctured through the stoppers was avoided. The hypodermic needle was connected via an adapter and a flexible tubing to a calibrated syringe barrel. The syringe barrel was submerged in and filled with water to allow measurement of the gas volume. The dead volume of the adapter with the needle and the tubing was flushed with N₂ to avoid introduction of air into the enrichment cultures. The overpressure was then allowed to escape via the inserted needle and to replace the water in the syringe barrel. For exact determination of the nitrogen content in the gas, a small sample (0.8 ml) was withdrawn from the head space of the enrichment culture by means of a 1 ml syringe with a scale. Subsequently, some 1 M NaOH solution (0.2 ml) was sucked into the syringe. The needle was kept in the alkaline solution which ascended further due to CO₂ absorption. The final meniscus in the syringe allowed calculation of the N₂ content. Portions of new nitrate (5 mM) were added to the enrichment cultures from an anoxic 5 M NaNO₃ solution by means of N₂-flushed syringes.

For maintenance, the enrichment cultures were grown at 28 °C for 4 weeks and stored at 4 °C for no longer than 6 weeks before further subcultivation. No organic substrate other than crude oil was used for maintenance.

Reference strains for comparative whole-cell hybridization were cultivated as follows. Strains ToN1, EbN1, PbN1, mXyN1, HxN1, OcN1 and *Alcaligenes defragrans* strain 54Pin were grown in chemically defined, ascorbate-reduced media with toluene, ethylbenzene, propylbenzene, *m*-xylene, *n*-hexane, *n*-octane and α -pinene, respectively, in the presence of 10

mM nitrate (Ehrenreich 1996, Foß et al. 1998, Rabus and Widdel 1995a). These hydrocarbons were dissolved in 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane as the inert carrier phase. *Iodobacter fluviatilis*, *Spirillum volutans* and *Zoogloea ramigera* were grown as recommended by the culture collections (American Type Culture Collection 1992, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 1993). *Thauera aromatica* was grown in ascorbate-reduced (4 mM) minimal medium with 4 mM benzoate and 10 mM nitrate. *Azoarcus indigenus* was grown in ascorbate-reduced (4 mM) medium with 4 mM succinate and 10 mM nitrate. *Aeromonas enteropelogenes* was grown in medium with yeast extract and glucose (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 1998) at 30 °C. Paraformaldehyde-fixed cells of *Nitrosolobus multiformis* were kindly provided by G. Timmermann (Plön, Germany).

Chemical analysis. For analysis of nitrate, nitrite, ammonium and water soluble organic metabolites, samples were withdrawn from the aqueous phase of the inverted bottles through the rubber stoppers with N₂-flushed syringes. For oil analyses, samples were taken during growth from the oil phases of the enrichment cultures through the stoppered orifice by means of N₂-flushed syringes with long (60 mm) hypodermic needles. For gas analysis, samples were withdrawn from the gas phase through the rubber stoppers with N₂-flushed, air-tight syringes.

Nitrate and nitrite were measured by high-performance liquid chromatography as previously described (Rabus and Widdel 1995a). N₂O was determined using gas chromatography coupled to conductivity detection as previously described (Rabus and Widdel 1995a). Ammonium was measured using the indophenol formation reaction according to Marr et al. (1988).

For analysis of total hydrocarbons, a GC 8000 gas chromatograph (Fisons, Mainz-Kastel, Germany) was used which was coupled to a MD 800 mass spectrometer (Fisons). A volume of 0.5 µl of undiluted oil was injected for each run. Helium was used as the carrier gas. The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector and a HP-1 fused silica capillary column (Hewlett Packard) of 50 m length, 0.31 mm inner diameter and 0.52 µm film thickness. The oven temperature was programmed from 40 to 300 °C at a heating rate of 5 °C/min with a final hold time of 25 min. The mass spectrometer was operated in EI mode at an electron energy of 70 eV and a source temperature of 240 °C. Full scan mass spectra were recorded over a mass range from 10 to 420 amu at a scan rate of 0.073 s per 100 amu and a scan cycle time of 0.4 s. Separation of *m*- and *p*-xylene was performed as described previously (Rabus et al. 1996).

For the analysis of metabolites, samples from the aqueous growth medium were acidified with HCl to yield pH 1.5, and successively extracted with dichloromethane. The extracts were evaporated to dryness and methylated using a solution of diazomethane in ether. Derivatized extracts were analyzed with a MAT 95SQ mass spectrometer (Finnigan, Bremen, Germany)

coupled to a 5890B gas chromatograph (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany). The mass spectrometer was operated in EI mode at an electron energy of 70 eV and a source temperature of 240 °C. Full scan mass spectra were recorded over a mass range of 35 to 600 amu at a scan rate of 1 s per decade and a scan cycle time of 1.23 s. The gas chromatograph was equipped with a KAS 3 injection system with programmable temperature (Gerstel, Mülheim, Germany), which was used as an on-column injector, and an Ultra 2 fused silica capillary column (Hewlett Packard) of 50 m length, 0.22 mm inner diameter and 0.33 μm film thickness. Helium was used as the carrier gas. The oven temperature was programmed from 120 to 310 °C at a heating rate of 5 °C/min with an initial hold time of 5 min and a final hold time of 30 min. Compound identification was based on relative retention times, mass spectra and comparison to those of standards.

Whole cell hybridization. Samples from the enrichment cultures were taken at the end of the first and again at the end of the second growth phase. Due to the presence of bacterial flocks in the second growth phase, ultrasonic treatment was applied (15 s, 4 kHz) to obtain an even distribution of bacterial cells required for quantitative microscopic analysis. For whole-cell hybridization, samples of the enrichment cultures and reference cells harvested during the exponential growth phase were fixed in paraformaldehyde (4 % [vol/vol]), washed in phosphate buffered saline, and immobilized on gelatin-coated slides as described previously (Amann et al. 1990). After dehydration by an ethanol series, slides were stored at room temperature.

The 16S rRNA sequences of known hydrocarbon-degrading denitrifiers (Anders et al. 1995, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Zhou et al. 1995) were added to the 16S rRNA database ARB (Strunk and Ludwig 1998). The tool PROBE_FUNCTIONS was then used to design the new oligonucleotide probe AT1458 and to check its potential suitability for specific detection of members of the entire *Azoarcus/Thauera* group (within β -subclass of *Proteobacteria*). The optimum hybridization stringency was determined by quantifying the fluorescence conferred by probe AT1458 to cells with and without mismatches in the target region at different formamide concentrations in the hybridization buffer. The applied image analysis equipment and procedure has been described in detail by Trebesius et al. (1994), and Wagner et al. (1995). Finally, probe specificity was experimentally evaluated by whole-cell hybridization at optimized stringency with the reference strains listed in Table 1. A second probe for specific detection of *Alcaligenes defragrans* strain 54Pin (Foß et al. 1998), Ade441, was designed and experimentally tested as described for probe AT1458.

Table 1. Bacteria including alkylbenzene- and alkane-utilizing denitrifiers used for comparison of target sequences on 16S rRNA and hybridization experiments with the newly designed specific probe AT1458 and the general probe EUB338 (for most eubacteria). The full target sequence is indicated in the first line of the listed species (*Azoarcus indigenus*)

Bacterium ^a	Source ^b and deposition number	Anaerobic utilization of hydrocarbons ^c	Differential alignment of target sequence (5' - 3') on 16S rRNA ^d	Signal ^e with probe	
				AT1458	EUB338
β-Subclass, affiliation with <i>Azoarcus</i> or <i>Thauera</i>					
<i>Azoarcus indigenus</i>	LMG 9092	n.d.	GCGCUTACCACTGGUGAGAUTC	+	+
<i>Thauera aromatica</i>	DSM 6984	To	+	+
Strain EbN1	MPI	Eb	+	+
Strain PbN1	MPI	Pb, Eb	+	+
Strain ToN1	MPI	To	+	+
Strain mXyN1	MPI	To, mXy	+	+
Strain HxN1	MPI	Hx	+	+
β-Subclass, other affiliation					
<i>Alcaligenes defragrans</i>	DSM 12141	Pi	+	+
<i>Iodobacter fluviatilis</i>	DSM 3764	n.d.	C.....g.....	-	+
<i>Nitrosolobus multififormis</i>	ATCC 25196	n.d.C.g.....	-	+
<i>Spirillum volutans</i>	ATCC 19554	n.d.a.....N.....	+	+
<i>Zoogloea ramigera</i>	ATCC 19544	n.d.C.....C.....	-	+
Strain OcN1	MPI	OcC.G.G.....	-	+
γ-Subclass					
<i>Aeromonas enteropelogenes</i>	ATCC 49803	n.d.u.....U.....	-	+
<i>Methylococcus capsulatus</i>	ATCC 19069	n.d.U.....	n.d.	n.d.
Strain HdN1	MPI	Hd	N....CGU.....U.GCCG	n.d.	n.d.

^a Strains without genus and species designation have not been named thus far. These strains are denitrifying bacteria isolated anaerobically with ethylbenzene, propylbenzene, toluene, *m*-xylene (EbN1, PbN1, ToN1, mXyN1, respectively; Rabus and Widdel 1995a), hexane (HxN1; A. Behrends, F. Rainey, F. Widdel, unpublished), octane and hexadecane (OcN1 and HdN1, respectively; Ehrenreich 1996; P. Ehrenreich, J. Harder, F. Widdel, unpublished).
^b ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. LMG, Culture Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Ghent, Belgium; MPI, cultures (so far without deposition number) isolated and maintained at the Max-Planck-Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany.

^c Hydrocarbons utilized anaerobically with nitrate as electron acceptor: Eb, ethylbenzene; Hd, *n*-hexadecane and other alkanes; Hx, *n*-hexane and other alkanes; Oc, *n*-octane and other alkanes; Pi, α -pinene and other alkenoic monoterpenes; Pb, *n*-propylbenzene; To, toluene; mXy, *m*-xylene; n.d., not determined, unknown.

^d Only mismatch positions in the target site are displayed; strong and weak mismatches (Stahl and Amann 1991) are indicated by capital and lower case letters, respectively. N = base unknown.

^e +, Distinct fluorescence signal during whole-cell hybridization at appropriate stringency; - no signal; n.d. not determined.

Oligonucleotides were synthesized and fluorescently labeled with the hydrophilic sulphoindocyanine dye CY3 at the 5'-end by Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm, Germany). All probe sequences, their hybridization conditions, and references are given in Table 2.

Hybridization was performed as described by Manz et al. (1992) at 46 °C for 90 min in hybridization buffer containing 0.9 M NaCl, the formamide concentration shown in Table 2, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), and 0.01 % sodium dodecyl sulfate (SDS). Probe concentrations were 5 ng/ μ l. Hybridization was followed by a stringent washing step at 48 °C for 10 min in washing buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), NaCl at the concentrations listed in Table 2, 5 mM EDTA and 0.01% SDS. Washing buffer was removed by rinsing the slides with distilled water. Slides were air-dried, stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 μ g/ml) for 10 min in the dark on ice, and finally rinsed again with distilled water.

Slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) to avoid bleaching, and examined with a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with filter set CY3-HQ (Chroma Technology, Brattleboro, Vermont, USA) for oligonucleotide probing, and filter set 01 (Zeiss, Jena, Germany) for DAPI-stained cells. Enumeration of cells detected by probes relative to DAPI-stained cells was done in samples from the enrichment cultures by using an ocular (10x) with counting grid and a Plan-NEO-FLUAR objective (100x). At least 10 counting fields were enumerated independently by two individual observers after simultaneous staining of the samples with CY3-labeled probes and DAPI. Mean values of the two independent probe-specific cell counts were calculated.

Results

Enrichment of denitrifying bacteria on crude oil. Anoxic mineral media with 5 mM nitrate in bottles were inoculated with samples from ditch sediments and from a waste deposit, overlaid with crude oil, and incubated under an anoxic head space at 28 °C. In addition, inoculated control bottles without oil were incubated. The culture volume in all bottles was always 400 ml, the total bottle volume was 500 ml. Gas production began within 12 h in each bottle including the controls, indicating denitrification with compounds from the mud. New nitrate was added in portions of 5 mM always after gas production had ceased. Controls exhibited vigorous gas production during the first few days (approx. 25 ml per day and bottle) which decreased gradually (after 3 weeks approx. 8 ml per day and bottle). Gas production in bottles with oil was initially slower than in the control bottles, probably because crude oil was somewhat inhibitory to the autochthonous denitrifying population. However, after 3 weeks, gas production in the presence of oil increased (to approx. 14 ml per day and bottle), exceeding gas production in the controls. Gas production declined until a new increase was observed after 6 weeks of incubation. After 12 weeks of incubation, when gas production had drastically declined (1-2 ml per day and bottle), aliquots (3 % of cultivation volume) were transferred to new media. The biphasic gas production from nitrate observed in the initial enrichment culture was also observed in subcultures. However, the second denitrification phase started already after 12 days. When most of the sediment particles had disappeared after consecutive transfer, distinct growth behaviours of bacterial cells could be observed during the two phases of denitrification. During the first phase, bacterial cells grew homogeneously in the aqueous phase. In contrast, during the second phase of denitrification, bacterial cells tended to form fluffy aggregates and to adhere to the oil layer, causing emulsification upon shaking. When subcultures were inoculated, care was taken that aggregates were transferred in addition to the free cells from the turbid medium.

Formation of bacterial flocks adhering to the oil layer during the second growth phase did not allow reliable monitoring of growth by determination of the optical density. In addition to gas production, denitrification was studied in the enrichment cultures by determining the consumption of nitrate. Parallel cultures of each origin (ditch sediment and waste deposit) were incubated with occasional (two times per day for a few seconds) and with continuous shaking (rotary shaker, 60 rpm); controls without nitrate or without cells were incubated in the same way. Like measurement of gas production, also monitoring of nitrate reduction revealed biphasic denitrification. This was most pronounced in the continuously shaken parallels of both enrichment cultures. The time course of nitrate reduction in a shaken bottle is shown in Fig. 1. In all enrichment cultures nitrite appeared as an intermediate during nitrate reduction, whereas formation of NH_4^+ or N_2O could not be detected. Samples for analysis of the oil phases and the

growth media were taken during the first and second growth phase and at the end of incubation.

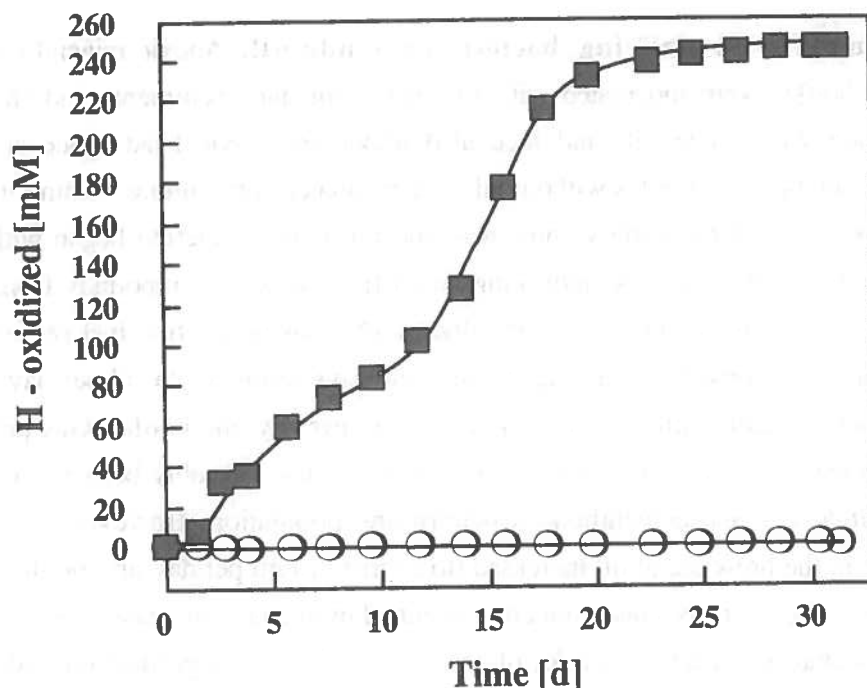


FIG. 1. Nitrate reduction in an enrichment culture from ditch sediment on crude oil (shaken culture). Symbols: ■, Inoculated culture; ○, cell-free control. Oxidation of oil constituents is expressed as oxidized reducing equivalents ([H]) calculated from consumed nitrate; when nitrite was still present as an intermediate at a given sampling time, this was taken into consideration according to the following equation (Rabus and Widdel 1995a): $[H] \text{ oxidized} = 5 \cdot (\text{nitrate added} - \text{nitrate remaining} - \text{nitrite formed}) + 2 \cdot \text{nitrite formed}$.

Selective utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes. Growth of all denitrifying enrichment cultures resulted in a specific change of the hydrocarbon composition of the oil in comparison with the original oil, or with oil from additional control experiments without nitrate or bacterial inoculum. Comparison of the original oil with that from the control experiments did not reveal detectable abiotic loss of hydrocarbons due to nonspecific adsorption by the stoppers. Analyses of oil samples taken at different time during incubation revealed that alkylbenzenes were only utilized during the first growth phase and *n*-alkanes only during the second growth phase. In the agitated enrichment cultures, toluene, ethylbenzene and *m*-xylene disappeared completely during the first growth phase within 10 days, while *o*-xylene, *o*-ethyltoluene and 1,2,4-trimethylbenzene were only partially consumed (Fig. 2). During the second growth phase, partial consumption of *n*-Alkanes in the range of C₅-C₈, in particular of *n*-hexane, was observed (Fig. 2). Disappearance of isoalkanes was not detectable. After seven transfers, subcultures started to consume partially also C₉-C₁₂ *n*-alkanes in addition to C₅-C₈ *n*-alkanes.

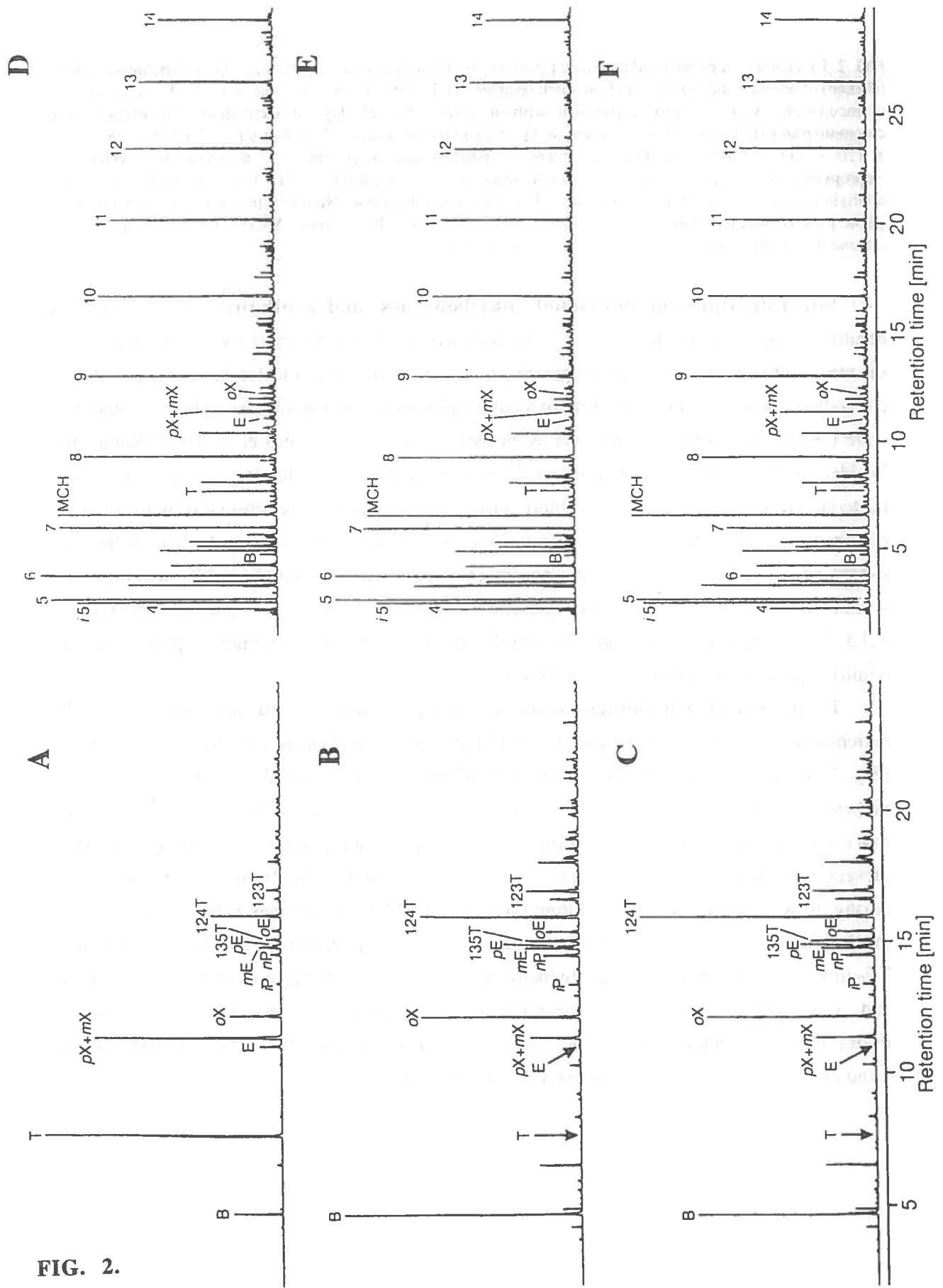


FIG. 2.

FIG. 2. Extracted (left panels) and total (right panels) gas chromatograms of crude oil from an enrichment culture (shaken) of nitrate-reducing bacteria from ditch sediment. B, E. After 10 days of incubation. C, F. After 21 days of incubation. A, D. Control experiment without nitrate after 21 days of incubation. The extracted ion chromatograms (left panels) show benzene and C₁-C₄ alkylbenzenes (m/z 77 + 78 + 91 + 92 + 105 + 106 + 119 + 120 + 133 + 134); 1, benzene; 2, toluene; 3, ethylbenzene; 4, *p*-xylene; 5, *m*-xylene; 6, *o*-xylene; 7, isopropylbenzene; 8, propylbenzene; 9, *m*-ethyltoluene; 10, *p*-ethyltoluene; 11, 1,3,5-trimethylbenzene; 12, *o*-ethyltoluene; 13, 1,2,4-trimethylbenzene; 14, 1,2,3-trimethylbenzene. Numbers in total ion chromatograms (right panels) indicate chain length of *n*-alkanes; *i*5, *i*-pentane; B, benzene; MCH, methylcyclohexane; T, toluene; E, ethylbenzene; *p*X, *p*-xylene; *m*X, *m*-xylene; *o*X, *o*-xylene.

Subcultivation on individual alkylbenzenes and *n*-alkanes. The presence of denitrifying bacteria able to grow on various hydrocarbons in the enrichment culture on crude oil was confirmed by rapid development of such bacteria after transfer of inocula (5 % of cultivation volume) to media with individual alkylbenzenes and *n*-alkanes. These compounds were dissolved in heptamethylnonane as an inert carrier phase (Rabus et al. 1993, Rabus and Widdel 1995a) at the concentrations (vol/vol) indicated in the following. Within one week, bacterial growth and reduction of more than 5 mM nitrate were observed with toluene, ethylbenzene, propylbenzene, *m*-xylene, *m*-ethyltoluene (each 2 and 5 %), *n*-hexane, *n*-heptane, *n*-octane (each 2 %) and *n*-nonane (5 %). Growth on *n*-decane (10 %) was observed within 2.5 weeks. In contrast benzene, *o*- and *p*-xylene, *o*- and *p*-ethyltoluene, 1,3,5-trimethylbenzene (all 2 and 5 %) and *n*-undecane (5 and 10 %) did not support growth of denitrifying bacteria in subcultures within 4 weeks.

Formation of metabolites. Analysis of samples taken from the aqueous phase of the enrichment cultures revealed nearly identical patterns of metabolites excreted during growth (Fig. 3). Bicyclic aromatic hydrocarbons such as naphthalene, 1- and 2-methylnaphthalene and biphenyl were present in the analyzed extract due to their partial dissolution in the water phase. Since the concentration of these compounds remained unchanged in all experiments, they present suitable reference substances to demonstrate convincingly formation of metabolites during growth of the enrichment culture on crude oil. Most metabolites were alkylbenzoates, the dominating ones being 4-methylbenzoate and 3,4-dimethylbenzoate. 2,4-dimethylbenzoate, 2,5-dimethylbenzoate and 3,5-dimethylbenzoate were found at lower concentrations. Benzoate and 3-methylbenzoate were only detected in some samples at very low concentrations. Furthermore, naphthalenecarboxylic acids, methylacetophenones, dimethylphenylacetate, 1-indanone and 1-tetralone were formed at low concentrations.

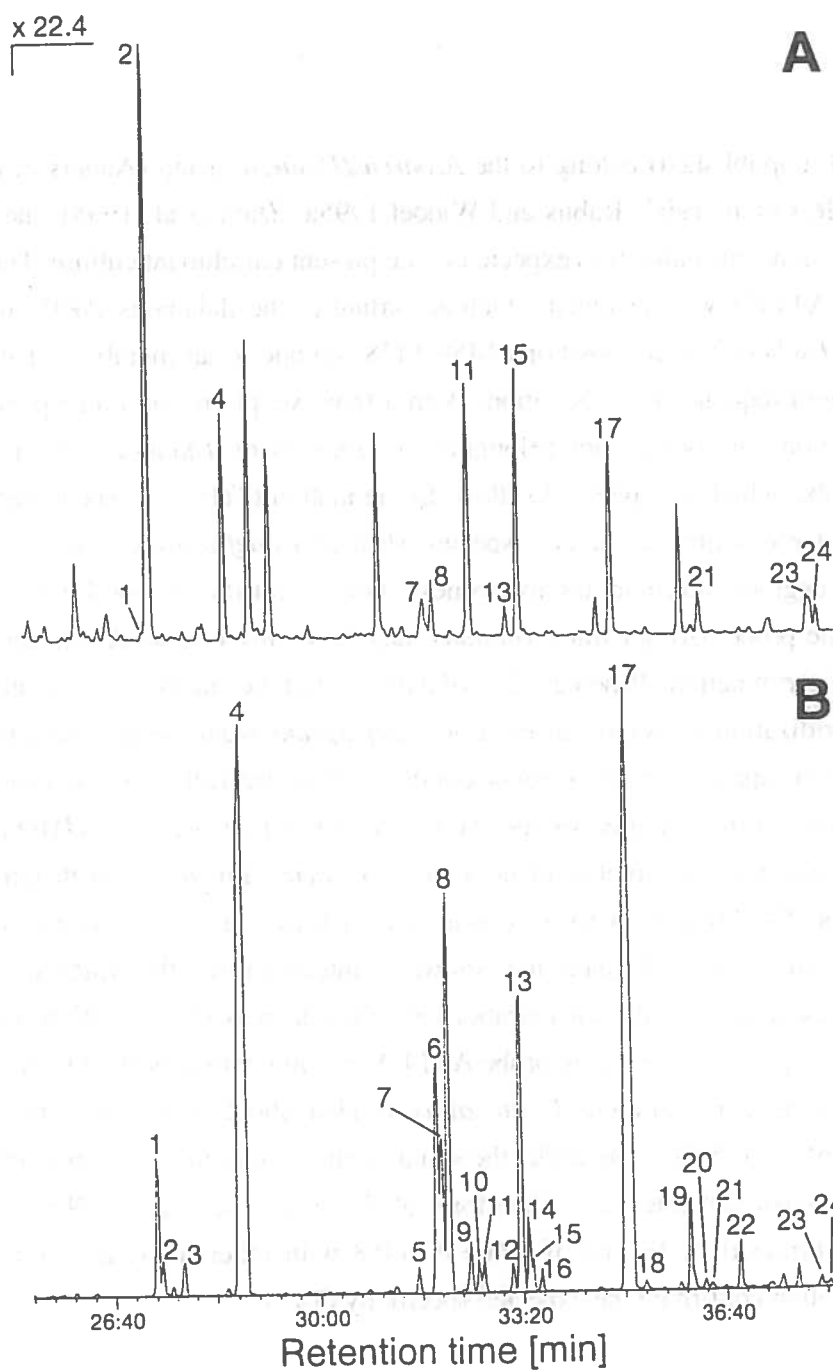


FIG. 3. Gas chromatograms of oxidation products of crude oil components in the aqueous phase of a denitrifying enrichment culture (shaken) from a waste disposal after 10 days of incubation. A. Incubation in the absence of nitrate. B. Incubation in the presence of nitrate. Compound assignment: 1, 4-methylacetophenone; 2, naphthalene; 3, *n*-dodecane; 4, methyl-4-methylbenzoate; 5, methyl-(2- or 3-methylphenyl)acetate; 6, methyl-(4-methylphenyl)acetate; 7, 2-indanone; 8, methyl-2,5-dimethylbenzoate; 9, *n*-tridecane; 10, methyl-2,4-dimethylbenzoate; 11, 2-methylnaphthalene; 12, methyl-1-indanone; 13, methyl-3,5-dimethylbenzoate; 14, methyl- C_3 -benzenecarboxylic acid; 15, 1-methylnaphthalene; 16, C_2 -acetophenone; 17, methyl-3,4-dimethylbenzoate; 18, C_3 -benzenecarboxylic acid; 19, C_3 -benzenecarboxylic acid; 20, 1-tetralone; 21, biphenyl; 22, *n*-tetradecane; 23, C_2 -naphthalene; 24, C_2 -naphthalene. Note high attenuation of gas chromatogram from experiment with nitrate, as obvious from the naphthalene peak.

Probe design and whole-cell hybridization. Since all known alkylbenzene-degrading denitrifiers and even an alkane-degrading denitrifier (strain HxN1; A. Behrends, F.

Rainey, F. Widdel, unpublished) belong to the *Azoarcus/Thauera* group (Anders et al. 1995, Fries et al. 1994, Hess et al. 1997, Rabus and Widdel 1995a, Zhou et al. 1995), the presence of bacteria with the same affiliation was expected in the present enrichment culture. Therefore, a new probe termed AT1458 was designed which according to the databases ARB and EMBL targets a sequence (*Escherichia coli* positions 1458-1478) unique to all members of the genera *Azoarcus* and *Thauera* sequenced in this region. With a few exceptions, all corresponding 16S rRNA sequence regions of bacteria not belonging to *Azoarcus* or *Thauera* have at least one mismatch to the probe, which is expected to allow differentiation (Table 1). The exceptions are as follows: (i) The target region in the new species *Alcaligenes defragrans* (Föß et al. 1998), which is able to degrade alkenoic monoterpenes under denitrifying conditions, is fully complementary to the probe; (ii) *Spirillum volutans* may have only one weak mismatch which would not allow discrimination. Whereas *S. volutans* would be easily recognizable by its morphology in hybridization assays, occurrence of *A. defragrans* would lead to false positives.

For experimental application of oligonucleotide probes, hybridization conditions were first optimized to assure differentiation between target and non-target organisms. Hybridization of strain EbN1 (no mismatch in target sequence) and *Iodobacter fluviatilis* (mismatch in target sequence) with probe AT1458 were performed at increasing formamide concentrations, and the signal intensities were quantified (data not shown). Interestingly, the fluorescence first increased with increasing formamide concentrations and then decreased again. With 0 and 10% formamide, the fluorescence conferred by probe AT1458 was lower than with 20% formamide. At the latter formamide concentration, *I. fluviatilis* yielded about half of the fluorescence intensity of strain EbN1. At 50% formamide, the signal with *I. fluviatilis* was negligible, while EbN1 still showed maximum intensity. Therefore, 50% formamide was chosen as optimal concentration for hybridization. Testing of probe AT1458 with other reference strains at this formamide concentration confirmed the expected specificity (Table 1).

Table 2. Oligonucleotide probes

Probe	Specificity	Sequence (5' - 3') of probe	Target site (type of rRNA; positions ^a)	Form- amide ^b (%)	NaCl ^c (mM)	Reference
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAAATTCCT	16S; 915-934	0	900	Stahl and Amann, 1991
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	16S; 338-355	20	225	Stahl and Amann, 1991
ALF1b	α -Subclass of <i>Proteobacteria</i> ; several members of δ -subclass of <i>Proteobacteria</i> , genus <i>Nitrospira</i> ; most spirochaetes	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S; 19-35	20	225	Manz et al. 1996
BET42a	β -Subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACCTTCGTTT	23S; 1027-1043	35 ^d	80	Manz et al. 1996
GAM42a	γ -Subclass of <i>Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	23S; 1027-1043	35 ^e	80	Manz et al. 1996
CF319a	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i> cluster of <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> - <i>Bacteroides</i> phylum	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S; 319-336	35	80	Manz et al. 1992
HGC69a	Gram-positive bacteria with high G+C content of DNA	TATAGTTACCACCGCCGT	23S; 1901-1918	35	80	Roller et al. 1994
AT1458	Species affiliating with <i>Azoarcus</i> and <i>Thauera</i>	GAATCTCACCGTGGTAAGCGC	16S; 1458-1478	50	28	This study
Ade441	<i>Alcaligenes defragans</i>	GCGCCGTTTCTTCCCTGC	16S; 441-458	35	80	This study

^a *Escherichia coli* numbering (Brosius et al. 1981)^b Formamide concentration (vol/vol) in whole-cell hybridization buffer^c NaCl concentration in washing buffer^d For probe used together with an equimolar concentration of probe GAM42a as competitor oligonucleotide^e For probe used together with an equimolar concentration of probe BET42a as competitor oligonucleotide

Monitoring of growth by whole-cell hybridization with group-specific oligonucleotide probes (Table 2) revealed members of the β -subclass of *Proteobacteria* as dominating bacteria in all enrichment cultures (Fig. 4 and 5), as obvious from hybridization with probe BET42a. During the first growth phase, bacteria of the β -subclass accounted for more than 90% of all detectable cells and only slightly decreased during the second growth phase to about 75%. Most of the cells hybridizing with probe BET42a also hybridized with probe AT1458, which has been specifically designed for the genera *Azoarcus* and *Thauera*. The relative abundance of cells hybridizing with probe AT1458 in comparison to total cells stained by DAPI cells was about 90% in the first growth phase, and about 60% in the second growth phase. The relative abundance of detectable members of the α -subclass of *Proteobacteria* (revealed by probe ALF), of the *Cytophaga-Flavobacterium* cluster (probe CF), or of Gram-positive bacteria with high DNA G+C (probe HGC) content was below 1% with each probe during the first growth phase and increased to values about 4% each at the end of the second growth phase. *Proteobacteria* of the γ -subclass as well as members of the domain *Archaea* did not exceed 0.1% of DAPI-stained cells at any time. Cells of these groups were almost exclusively detected within the flocks formed by members of the genera *Azoarcus* or *Thauera*, but not in free suspension. When the enrichment culture approached the stationary phase (after approx. 20 days), cells hybridizing with probe EUB338, which detects all Eubacteria, dropped to 75% of DAPI-stained cells. Simultaneously, positive cell counts with probes BET42a and AT1458 decreased to 52 and 40%, respectively. In contrast, the relative abundance of cells hybridizing with probes ALF, CF, and HGC remained constant or even increased to about 4% of DAPI-stained cells; however, they were still restricted to aggregates formed by probe AT1458-positive and non-hybridizing cells. Probe AT1458 also yielded a hybridization signal with the monoterpene-degrading denitrifier *Alcaligenes defragrans* (FöB et al. 1998), which is distantly related to the *Azoarcus/Thauera* cluster. Therefore, a second probe, Ade441, specifically targeting *Alcaligenes defragrans* was designed. However, no cells were detected in the enrichment culture that hybridized with this probe.

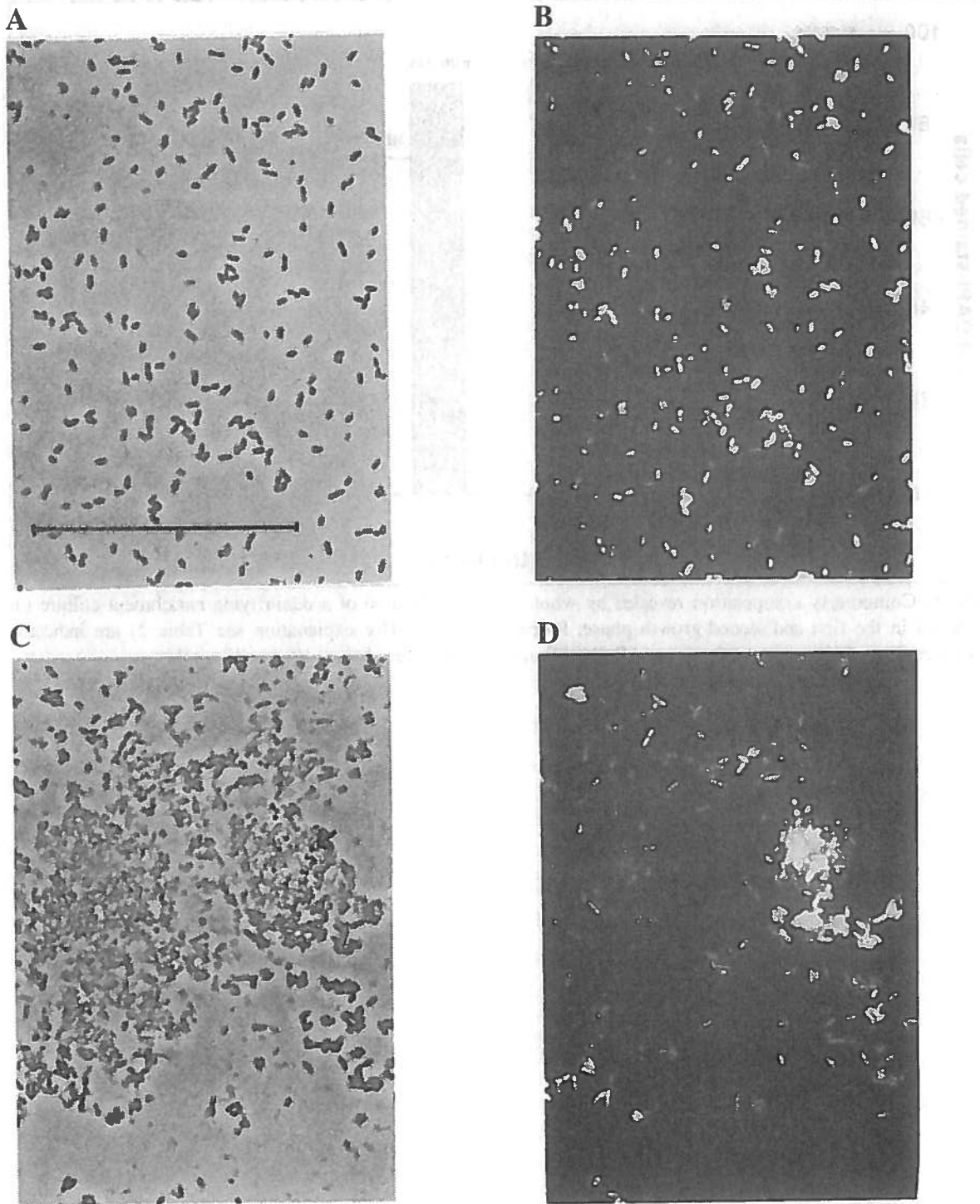


FIG. 4. Detection of members of the *Azoarcus/Thauera* group in a denitrifying enrichment culture from ditch sediment on crude oil by whole-cell hybridization with the new CY3-labeled probe AT1458. A, B. Phase contrast and epifluorescence micrograph, respectively, of a sample from the first growth phase. C, D. Phase contrast and epifluorescence micrograph, respectively, of a sample from the second growth phase. Arrow indicates oil droplets that are autofluorescent in micrograph D. Bar, 10 μm (applies also to epifluorescent micrograph).

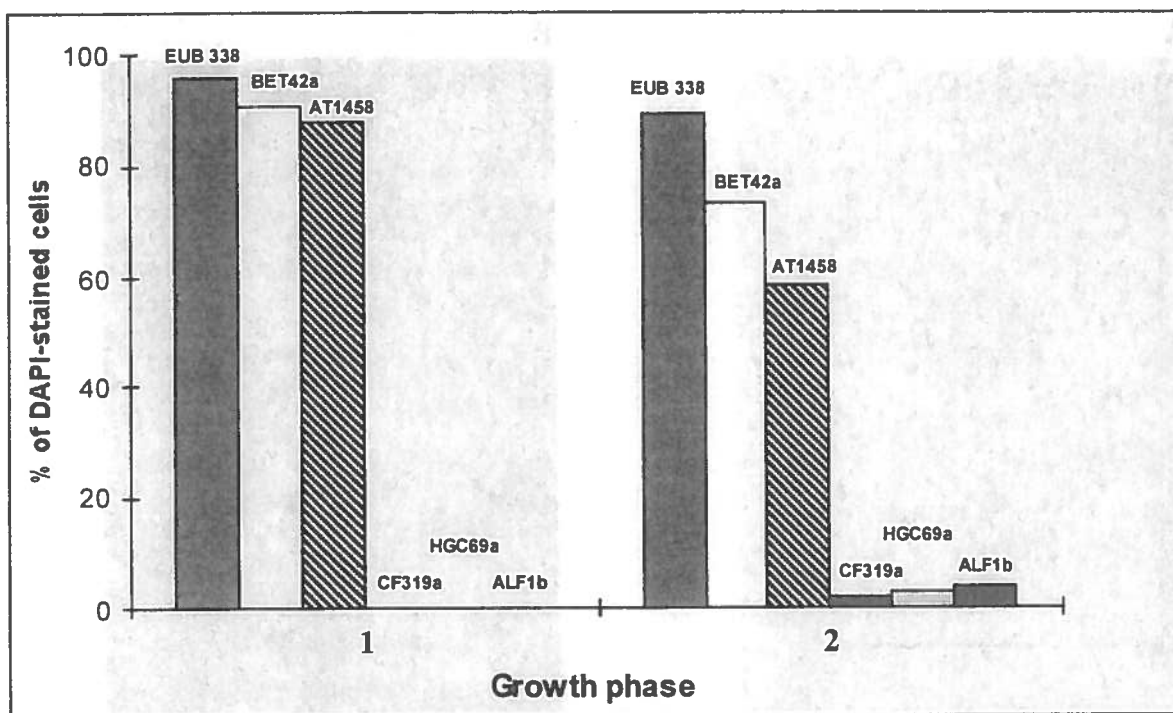


FIG. 5. Community composition revealed by whole cell hybridization of a denitrifying enrichment culture on crude oil in the first and second growth phase. Probe designations (for explanation see Table 2) are indicated above the bars. Cell counts with probes ARCH915 and GAM42a were below 1% in all samples.

Discussion

A goal of the present study was to estimate the range of oil hydrocarbons that are anaerobically degradable by denitrifying bacteria. Crude oil was therefore directly added to enrichment cultures. Inoculation with relatively large volumes (200 ml) of sediment from different locations ensured a high probability that bacteria with diverse degradative capacities were initially present in the enrichment culture. Indeed, the obtained enrichment cultures exhibited degradative capacities that exceeded those found so far in denitrifiers isolated on individual alkylbenzenes (Rabus and Widdel 1996). Hence, enrichment of bacteria with such degradative capacities may be also expected in anoxic habitats contaminated with oil. Nevertheless, the enrichment cultures obtained in this study present model systems the conditions in which are not fully comparable to those in natural habitats. In contrast to the *in situ* conditions that prevail e.g. in anoxic groundwater aquifers, growth conditions in the enrichment cultures were optimized with respect to hydrocarbon availability and supply of nitrate, phosphate and vitamins. These growth conditions probably allowed significantly higher growth rates than can be expected under most *in situ* conditions. On the other hand, the enrichment conditions might have excluded bacteria that occur *in situ* and degrade hydrocarbons that persisted in the enrichment cultures. For instance, the enrichment conditions were not suitable for bacteria with extremely slow growth or with the requirement for an attachment to mineral surfaces. A slowly growing denitrifying enrichment culture (incubation time, approx. 100 d) was recently shown to degrade the isoprenoid alkane pristane (Bregnard et al. 1997), which was not consumed in the present enrichment culture. Hence, the range of oil hydrocarbons degradable by denitrifying bacteria under *in situ* conditions may be even wider than observed in the studied enrichment culture.

The biphasic nitrate consumption, and gas production and appearance of bacterial growth coincided with a biphasic utilization of hydrocarbons from the crude oil (Fig. 1 and 2). During the first growth phase when bacteria grew homogeneously in the aqueous phase, only alkylbenzenes were utilized from the crude oil. During the second growth phase when cells partly adhered to the crude oil and subsequently emulsified the oil, only *n*-alkanes were consumed. The distinct growth behaviour observed in the two phases reflects the availability of the two classes of hydrocarbons that served as substrates. Alkylbenzenes are generally more water-soluble and therefore better available in the aqueous phase than alkanes with the same number of carbon atoms (Tissot and Welte 1984). Accordingly, various pure cultures of alkylbenzene-degrading denitrifiers (Rabus and Widdel 1995a) and sulfate reducers (Rabus et al. 1993) grew homogeneously in the aqueous phase and did not adhere to the carrier phase containing the alkylbenzene. In contrast, pure cultures of *n*-alkane degrading and sulfate-reducing or denitrifying bacteria were found to adhere to the alkane phase resulting in an

emulsification upon shaking (Aeckersberg et al. 1991, Ehrenreich 1996, Rueter et al. 1994). An exception is a *n*-hexane-degrading denitrifier isolated from the present enrichment culture (A. Behrends, F. Rainey, F. Widdel, unpublished). This isolate grew homogeneously in the medium, indicating that the relatively volatile *n*-hexane is sufficiently available in the aqueous phase to allow growth. The presently known anaerobic hydrocarbon-utilizing bacteria are specific with respect to the two major classes of hydrocarbons. Neither can alkylbenzene degraders utilize *n*-alkanes (Rabus et al. 1993, Rabus and Widdel 1995a), nor can *n*-alkane degraders utilize alkylbenzenes (Aeckersberg et al. 1991, Ehrenreich 1996, Rueter et al. 1994). It may, therefore, be concluded that also in the present enrichment cultures on crude oil nutritionally distinct populations of alkylbenzene- and alkane-utilizing denitrifying bacteria developed.

The accumulation of various alkylbenzoates during growth on crude oil (Fig. 3) is indicative of a partial oxidation of the corresponding alkylbenzenes. 4-Methylbenzoate is probably formed cometabolically from *p*-xylene by bacteria utilizing other methylbenzenes. This may be concluded from the observation (i) that *p*-xylene did not support growth in subcultures, (ii) that only a minor part of *p*-xylene was consumed from the oil, and (iii) that also pure cultures of denitrifiers or sulfate-reducing bacteria formed *p*-methylbenzoate as a dead-end-product from *p*-xylene (Beller et al. 1996, Biegert and Fuchs 1995, Rabus and Widdel 1995b, Seyfried et al. 1994). Similarly, another alkylbenzene with a *p*-methyl-substituent, 1,2,4-trimethylbenzene, may have been oxidized co-metabolically with growth-supporting alkylbenzene substrates. All three possible oxidation products, 2,4-, 2,5- and 3,4-dimethylbenzoate, were present in the aqueous phase. The degradation of trimethylbenzene isomers by an enrichment culture under N_2O -reducing conditions has been recently reported (Häner et al. 1997). Benzoate and 3-methylbenzoate which are the expected products of the growth-supporting alkylbenzenes toluene and *m*-xylene were only detected in some samples at very low concentrations, probably because they are favourable growth substrates. Naphthalenecarboxylic acids were also formed at low concentration. The presence of methylacetophenones indicates incomplete oxidation of corresponding ethylbenzenes with methyl-substituents, according to ethylbenzene oxidation to acetophenone by pure cultures (Ball et al. 1996, Rabus and Heider 1998). Detectable dimethylphenylacetate may be regarded as the product of an oxidation of dimethylethylbenzene at the terminal carbon atom of the ethyl side chain; to our knowledge, such a reaction is unknown from experiments with ethylbenzene-degrading denitrifiers. Formation of 1-indanone and 1-tetralone indicates that even methylene groups in non-aromatic ring systems may be oxidized.

The amount of reducing equivalents oxidized during growth on crude oil (Fig. 1) allows an approximate calculation (Rabus and Widdel 1996) of the anaerobically consumed portion of oil. During the first phase, 40 mmol [H] were oxidized from 10 ml oil in 400 ml culture

volume. Assuming for the utilized alkylbenzenes an average formula of C_8H_{10} and an average density of $0.87 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$, the consumed alkylbenzenes would amount to 1.2% (vol/vol) of the crude oil. During the second phase, 56 mmol [H] were oxidized. Assuming for the utilized *n*-alkanes an average formula of C_7H_{16} and an average density of $0.68 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$, the consumed *n*-alkanes would amount to 1.9% (vol/vol) of the crude oil. Hence, the total consumption would be 3.1% (vol/vol). This is less than the portion of crude oil (9%, vol/vol) oxidized by a previously isolated moderately thermophilic sulfate-reducing bacterium; this utilized only *n*-alkanes, but they were consumed to a higher extent. The present finding indicates that the fraction of crude oil that is anaerobically degradable with nitrate as electron acceptor is relatively restricted.

Whole-cell hybridization of the enrichment cultures with probe AT1458 revealed that 90% of the microbial communities consisted of members of the *Azoarcus/Thauera* group. Since all known alkylbenzene-degrading denitrifying bacteria belong to this group, one may conclude that also in the enrichment cultures *Azoarcus* and *Thauera* species are responsible for the observed alkylbenzene utilization. Recently, two oligonucleotide probes, Azo644 and Azo1251, were constructed according to sequences from isolated alkylbenzene-degrading denitrifiers related to *Azoarcus* species and used for the *in situ* detection of such bacteria in subsurface soil exposed to fuel hydrocarbons (Hess et al. 1997). Sequence comparison of these probes with the presently designed probe AT1458 revealed different ranges of specificities. Whereas the former two are suited for specific detection of certain *Azoarcus* species, the new probe matches with target sites in bacteria affiliating with both genera, *Azoarcus* and *Thauera*. Hybridization with probe AT1458 not only includes alkylbenzene-degrading denitrifiers, but also a *n*-hexane-utilizing denitrifier, strain HxN1. According to oil analysis, an *n*-alkane-degrading population developed during the second phase. Since the relative abundance of members of the *Azoarcus/Thauera* group decreased to 60% of total cells in the second phase, the alkane-degrading population is expected to consist not only of members of the *Azoarcus/Thauera* group, but also includes alkane degraders from other lines of descent that did not hybridize probe AT1458. This is in agreement with the recent finding that the newly isolated *n*-octane- and *n*-hexadecane-degrading denitrifiers, strains OcN1 and HdN1, are phylogenetically distinct from the *Azoarcus/Thauera* group (A. Behrends, F. Rainey, F. Widdel, unpublished). The failure to detect *Alcaligenes defragans* in the enrichment culture by specific probe hybridization is not surprising because occurrence of alkenoic monoterpenes in crude oil has not been observed (Tissot and Welte 1981).

Acknowledgements. We thank F. Leistner, M. Schwerdtfeger and H. Willsch for excellent technical assistance, and B. Reinhold-Hurek, J. Harder and G. Timmermann for providing bacterial cultures or prepared cells. This research was supported by the Max-Planck-Gesellschaft. During writing of the manuscript, R. Rabus was supported by the Alexander von Humboldt-Stiftung, Germany.

References

- Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**:5-14.
- Altenschmidt, U., and G. Fuchs. 1991. Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**:152-158.
- Amann, R., F.-O. Gloeckner, and A. Neef. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews.* **20**:191-200.
- Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**(2):762-770.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.* **59**:143-169.
- American Type Culture Collection. 1992. Catalogue of bacteria and bacteriophages, 18 ed. American Type Culture Collection, Rockville, Md.
- Anders, H.-J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig, and G. Fuchs. 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strain K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the proteobacteria. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **45**:327-333.
- Ball, H. A., H. A. Johnson, M. Reinhard, and A. M. Spormann. 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**:5755-5761.
- Beller, H. R., and A. M. Spormann. 1997. Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3729-3731.
- Beller, H. R., A. M. Spormann, P. K. Sharma, J. R. Cole, and M. Reinhard. 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1188-1196.
- Biegert, T., and G. Fuchs. 1995. Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **163**:407-417.
- Biegert, T., G. Fuchs, and J. Heider. 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**:661-668.
- Bregnard, T. P.-A., A. Haener, P. Hoehener, and J. Zeyer. 1997. Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2077-2081.
- Brosius, J., T. Dull, D. Sleeter, and H. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology.* **148**:107-127.
- Caldwell, M. E., R. M. Garrett, R. C. Prince, and J. M. Suflita. 1998. Anaerobic biodegradation of long-chain *n*-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2191-2195.
- Dean, B. J. 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research.* **154**:153-181.
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. 1993. Catalogue of strains, 6th ed. Braunschweig: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

- Dolfing, J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1990. Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**:336-341.
- Dunn, W. J., III, J. H. Block, and R. S. Pearlman.** 1986. Partition coefficient, determination and estimation. Pergamon Press, New York.
- Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1992. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2663-2666.
- Ehrenreich, P.** 1996 Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf *n*-Alkanen und Erdöl. Dissertation. Shaker Verlag, Aachen.
- Evans, P. J., D. T. Mang, K. S. Kim, and L. Y. Young.** 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1139-1145.
- Foß, S., U. Heyen, and J. Harder.** 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 press.
- Fries, M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje.** 1994. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2802-2810.
- Gersberg, R. M., W. J. Dawsey, and M. D. Bradley.** 1993. Nitrate enhancement of in situ bioremediation of monoaromatic compounds in groundwater. *Remediation.* **Spring**:233-245.
- Grbic-Galic, D., and T. M. Vogel.** 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:254-260.
- Häner, A., P. Höhener, and J. Zeyer.** 1995. Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3185-3188.
- Häner, A., P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. Degradation of trimethylbenzene isomers by an enrichment culture under N_2O -reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1171-1174.
- Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Haener, D. Stax, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene degrading bacteria in a diesel fuel contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.
- Hunkeler, D., P. Höhener, A. Häner, T. Bregnard, and J. Zeyer.** 1995. Quantification of hydrocarbon mineralization in a diesel fuel contaminated aquifer treated by *in situ* bioremediation, p. 421-430. *In* K. Kovar, and J. Krasny (ed.), *Groundwater Quality: Remediation and Protection (Proceedings of the Prague Conference, May 1995)*. IAHS Publication No. 225, Prague.
- Koch, R., and B. O. Wagner.** 1989. *Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Kuhn, E. P., J. Zeyer, P. Eicher, and R. P. Schwarzenbach.** 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:490-496.
- Leuthner B., and C. Leutwein, H. Schulz, P. Hörth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schägger, and J. Heider.** 1998. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycol radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* **28**:615-628.
- Lovley, D. R., J. D. Coates, J. C. Woodward, and E. J. P. Phillips.** 1995. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:953-958.

- Trebesius, K., R. Amann, W. Ludwig, K. Mühlegger, and K.-H. Schleifer.** 1994. Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive ²³S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:pp. 3228-3235.
- US E P A** 1986. Underground motor fuel storage tanks: a national survey. Publication NTIS PB 86-216512. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- Vanloo, R., R. De Borger, J. P. Voets, and W. Verstraete.** 1975. Soil and groundwater contamination by oil spills; problems and remedies. *International Journal of Environmental Studies*. **8**:99-111.
- Wagner, M., G. Rath, R. Amann, H.-P. Koops, and K.-H. Schleifer.** 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**:251-264.
- Widdel, F., and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2 ed., vol. 4. Springer-Verlag, New York, Berlin.
- Zarda, B., D. Hahn, A. Chatzinotas, W. Schönhuber, A. Neef, R. I. Amann, and J. Zeyer.** 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch. Microbiol.* **168**:185-192.
- Zhou, J., M. R. Fries, J. C. Chee-Sanford, and J. M. Tiedje.** 1995. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **45**:500-506.

- Lovley, D. R., and D. J. Lonergan.** 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1858-1864.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt, and K.-H. Schleifer.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophagaflavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology.* **142**:1097-1106.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.-H. Schleifer.** 1992. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:593-600.
- Marr, I. L., M. S. Cresser, and L. J. Ottendorfer.** 1988. *Umweltanalytik. Eine allgemeine Einführung.* Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rabus, R., M. Fukui, H. Wilkes, and F. Widdel.** 1996. Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3605-3613.
- Rabus, R., and J. Heider.** 1998. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, in press.
- Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995a. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1995b. Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* **164**:448-451.
- Rabus, R., and F. Widdel.** 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1238-1241.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* **140**:2849-2858.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch, and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature.* **372**:455-458.
- Schocher, R. J., B. Seyfried, F. Vazquez, and J. Zeyer.** 1991. Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**:7-12.
- Seyfried, B., G. Glod, R. Schocher, A. Tschech, and J. Zeyer.** 1994. Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and *m*-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4047-4052.
- Stahl, D. A., and R. Amann.** 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-247. *In* E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons, London.
- Strunk, O., and W. Ludwig.** ARB, a software environment for sequence data. <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>. Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich, Germany.
- Tissot, B. P., and D. H. Welte.** 1984. *Petroleum formation and occurrence*, 2 ed. Springer-Verlag, New York.

1) Die folgenden Aussagen sind wahr oder falsch? (10 Punkte)

- a) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine bijektive Abbildung. (1 Punkt)
- b) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine surjektive Abbildung. (1 Punkt)
- c) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine injektive Abbildung. (1 Punkt)
- d) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine bijektive Abbildung. (1 Punkt)
- e) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine surjektive Abbildung. (1 Punkt)
- f) Die Funktion $f: \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$ ist durch $f(x) = x^2 + 1$ gegeben. Dann ist f eine injektive Abbildung. (1 Punkt)

C Weitere Publikationen in Vorbereitung

1 Anaerobic degradation of alkylbenzenes and C-isotope fractionation by sulfate-reducing bacteria

H. Wilkes, C. Borhem, R. Rabus, G. Harms, K. Zengler, and F. Widdel.

Abstract

Introduction

The purpose of this study was to investigate the effect of a 12-week training program on the physical fitness and health of sedentary individuals. The study was conducted in a laboratory setting and involved a group of 20 participants who were randomly assigned to either a training or a control group. The training group performed a combination of aerobic and resistance training exercises, while the control group remained sedentary. The results of the study showed that the training group experienced significant improvements in cardiovascular fitness, muscle strength, and body composition compared to the control group. These findings suggest that a structured exercise program can effectively improve physical fitness and health in sedentary individuals.

Methods

The study was a randomized controlled trial. Participants were recruited from local gyms and community centers. They were screened for any medical conditions that might affect their ability to exercise. The training program consisted of three sessions per week, each lasting 45 minutes. The sessions included a warm-up, followed by 20 minutes of aerobic exercise (treadmill or stationary bike) and 25 minutes of resistance training using free weights and machines. The control group was instructed to maintain their current level of physical activity throughout the study. All participants were assessed at baseline and at the end of the 12-week period using a variety of physical fitness and health measures.

Results

The results of the study are presented in Table 1. The training group showed a significant increase in maximum heart rate, maximum oxygen consumption (VO₂max), and muscle strength compared to the control group. There was also a significant decrease in body mass index (BMI) and body fat percentage in the training group. The control group showed no significant changes in any of the measured variables. These results indicate that the 12-week training program had a positive effect on physical fitness and health in sedentary individuals.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gerda Harms
Geburtstag: 23. 04. 1969
Geburtsort: Aurich
Familienstand: ledig
Eltern: Lammert Harms; Landwirt
Etta Harms, geb. Aden; Hausfrau
Geschwister: zwei Brüder

Schulbildung

1976 - 1980 Grundschole in Victorbur, Gemeinde Südbrookmerland
1980 - 1982 Orientierungsstufe in Moorhusen, Gemeinde Südbrookmerland
1982 - 1986 Realschule in Moorhusen, Gemeinde Südbrookmerland;
Realschulabschluss
1986 - 1989 Integrierte Gesamtschule Aurich West in Aurich;
Abitur

Studium

1989 - 1995 Studium der Biologie an der Universität Bremen; Diplom
1995 - 1998 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung
von Prof. Dr. F. Widdel am Max-Planck-Institut für Marine
Mikrobiologie in Bremen

1. The first part of the document is a letter from the author to the editor, dated 10/10/1954. The letter discusses the author's interest in the subject of the journal and the possibility of publishing a paper on the topic.

2. The second part of the document is a letter from the editor to the author, dated 10/15/1954. The editor expresses interest in the author's work and suggests that the author submit a paper for consideration.

3. The third part of the document is a letter from the author to the editor, dated 10/20/1954. The author responds to the editor's letter and agrees to submit a paper for consideration.

4. The fourth part of the document is a letter from the editor to the author, dated 10/25/1954. The editor informs the author that the paper has been accepted for publication.

5. The fifth part of the document is a letter from the author to the editor, dated 10/30/1954. The author thanks the editor for accepting the paper and expresses hope that the paper will be published in the journal.

6. The sixth part of the document is a letter from the editor to the author, dated 11/5/1954. The editor informs the author that the paper has been published in the journal and provides information regarding the publication process.

7. The seventh part of the document is a letter from the author to the editor, dated 11/10/1954. The author expresses appreciation for the editor's assistance and interest in the author's work.

8. The eighth part of the document is a letter from the editor to the author, dated 11/15/1954. The editor expresses appreciation for the author's contribution to the journal and wishes the author well in future work.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Widdel für die Überlassung des Themas, die hervorragende Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Ralf Rabus, der mir eine fachkundige Einweisung in das Thema gab, bedanke ich mich für die somit erfolgte Ebnung zur Doktorarbeit.

Dr. Dror Minz, Karsten Zengler, Andreas Schramm und Dr. Ramón Rosselló-Mora danke ich für die gute Zusammenarbeit. Christina Probian danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen der Gaschromatographie. Herrn Dr. Jens Harder danke ich fürs Korrekturlesen und dafür, daß er bei jeglichen Fragen der Chemie mit Rat und Tat weiterhalf. Ich möchte auch Herrn Dr. Jan Kuever und allen anderen Korrekturlesern dieser Arbeit danken.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Heinz Wilkes von der KFA in Jülich, der die Erdölanalysen durchführte.

Herrn Dr. Fred A. Rainey (DSMZ Braunschweig) danke ich für die durchgeführten Sequenzanalysen der 16S rRNA der neu isolierten nitratreduzierenden Stämme pCyN1 und pCyN2.

Danke auch dem Rest vom guten alten A-Team, Dr. Andrea Friedrich, Astrid Behrends und Olaf Kniemeyer, sowie all denjenigen der Mikrobiologie-Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts, die irgendwie zum Gelingen dieser Arbeit, und sei es allein durch die freundschaftliche Atmosphäre, beigetragen haben.

Besonders danke ich Prof. Dr. Manabu Fukui, Dr. Alexander Galushko, Familie Minz und Christine Beardsley, mit denen ich über Gott und die Welt diskutieren konnte und so manches Mal meine Freude hatte!