

**Anaerobes Wachstum neuartiger
sulfatreduzierender und nitratreduzierender
Bakterien auf *n*-Alkanen und Erdöl**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Universität Bremen

vorgelegt von
PETRA EHRENREICH

Bremen 1996

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter Anleitung von Professor Dr. F. Widdel in der Zeit von Mai 1993 bis April 1995 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Juni 1996

Erstgutachter:

Prof. Dr. F. Widdel

Zweitgutachter:

Prof. Dr. U. Fischer



DS 4856

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Ehrenreich, Petra:

Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender
Bakterien auf *n*-Alkanen und Erdöl / Petra Ehrenreich. - Als Ms. gedr. -

Aachen: Shaker, 1996

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 1996

ISBN 3-8265-1948-5

Copyright Shaker Verlag 1996

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-1948-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A. Einleitung	1
A.1 Einführung	1
A.2 Struktur, Eigenschaften und Reaktionen von Alkanen.....	2
A.3 Vorkommen von Alkanen	4
A.4 Mechanismus der Alkansynthese in biologischen Systemen	5
A.5 Mikrobielle Verwertung von Alkanen.....	6
A.5.1 Alkanaufnahme in die Zelle	6
A.5.2 Aktivierung von Alkanen durch Mikroorganismen.....	7
A.5.3 Kenntnisstand zur anaeroben Alkanoxidation.....	12
A.5.3.1 Bedeutung anaerober Atmungsprozesse.....	13
A.5.3.2 Messungen zum anaeroben Alkanabbau in Sedimenten	14
A.5.3.3 Anaerobe Alkanoxidation durch Anreicherungen oder Reinkulturen unter sulfatreduzierenden Bedingungen	14
A.5.3.4 Oxidation von Alkanen durch nitratreduzierende Bakterien	15
A.6 Erdöl als Substrat für mikrobielles Wachstum	16
A.6.1 Zusammensetzung von Erdöl	16
A.6.2 Entstehung von Erdöl.....	17
A.6.3 Bakterielle Aktivitäten in Erdölreservoirs und Anlagen der Erdölindustrie.....	18
A.6.3.1 Geochemische Hinweise auf bakterielle Aktivität in Erdölreservoirs	18
A.6.3.2 Nachweis von anaeroben Mikroorganismen in Erdöl- förderanlagen und im Förderwasser verschiedener Ölfelder	20
A.6.3.3 Erklärungsansätze zur Herkunft und zum Wachstum anaerober Mikroorganismen in Ölfeldern und Anlagen der Erdölindustrie ..	21
A.6.3.4 Rohöl als bakterielles Substrat unter anoxischen Bedingungen...	22
A.6.3.5 Bedeutung der Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien in Anlagen der Erdölindustrie.....	23
A.6.4 Mikrobielle Sanierung ölkontaminierter Standorte	23
A.7 Zielsetzungen der Arbeit.....	25

B.3.6	Nachweis von Phenyl-substituierten Carbonsäuren durch Ionenchromatographie	46
B.3.7	N ₂ - und N ₂ O-Bestimmung durch Gaschromatographie	46
B.3.8	Gaschromatographische Analyse von Kohlenwasserstoffen.....	47
B.3.8.1	Decan- und Hexadecan-Bestimmung	47
B.3.8.2	Parallele Analyse von <i>n</i> -Hexadecan, 1-Hexadecen und 1-Hexadecanol.....	47
B.3.8.3	Parallele Analyse von <i>n</i> -Decan, 1-Decen, Decanal, 1-Decanol und <i>trans</i> -1,4-Dimethylcyclohexan.....	48
B.3.9	Analyse der Zellfettsäuren.....	48
B.3.10	Analyse von Erdölproben	50
B.3.11	Analyse von Polyhydroxyalkanoaten	50
B.4	Molekularbiologische Methoden.....	51
B.4.1	Präparation genomischer DNA	51
B.4.2	PCR-Amplifikation von rRNA-Genen für DGGE-Analysen	51
B.4.3	Agarosegelelektrophorese	52
B.4.4	Analyse von PCR-Produkten durch DGGE.....	53
B.4.5	Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA	54
B.4.6	Sequenzierung der 16S rDNA	54
C.	Ergebnisse.....	55
C.1	Anreicherung und Isolierung von alkanverwertenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen.....	55
C.1.1	Anreicherung und Isolierung mit Sulfat als Elektronenakzeptor unter thermophilen Bedingungen.....	55
C.1.2	Anreicherung und Isolierung mit Nitrat als Elektronenakzeptor unter mesophilen Bedingungen.....	57
C.1.2.1	Anreicherung und Isolierung eines Hexadecan verwertenden Denitrifizierers.....	57
C.1.2.2	Anreicherung und Isolierung eines Octan verwertenden Denitrifizierers.....	59
C.2	Physiologische Charakterisierung der neuen Bakterienstämme.....	60
C.2.1	Charakterisierung des thermophilen Sulfatreduzierers TD3.....	60
C.2.1.1	Morphologie	60
C.2.1.2	Optimierung des Mediums	62
C.2.1.3	Temperatur- und pH-Optimum	62
C.2.1.4	Elektronenakzeptoren	62
C.2.1.5	Beeinflussung des Wachstums durch Schütteln	63
C.2.1.6	Ermittlung verträglicher Alkankonzentrationen	63
C.2.1.7	Versuche zur Stimulierung des Wachstums mit α -Cyclodextrin .	63
C.2.1.8	Enzymatische Aktivitäten.....	64

C.2.2	Charakterisierung der neuen nitratreduzierenden Bakterienisolate.....	65
C.2.2.1	Morphologie	65
C.2.2.2	Temperatur- und pH-Optimum	67
C.2.2.3	Elektronenakzeptoren	67
C.2.2.4	Beeinflussung des Wachstums durch Schütteln	70
C.2.2.5	Ermittlung verträglicher Alkankonzentrationen	70
C.2.2.6	Vitaminabhängigkeit	70
C.3	Substratspektren der neuen Bakterienisolate	71
C.3.1	Substratspektrum des sulfatreduzierenden Stammes TD3	71
C.3.2	Substratspektrum des denitrifizierenden Stammes HdN1	75
C.3.3	Substratspektrum des denitrifizierenden Stammes OcN1.....	75
C.3.3.1	Untersuchung der Wirkung von 1-Decen auf die Verwertung von Decan, Decanol und Decanal durch Stamm OcN1	78
C.4	Systematische Einordnung der neuen Bakterienisolate.....	80
C.4.1	Taxonomische Einordnung des Stammes TD3	80
C.4.2	Taxonomische Einordnung des Stammes HdN1	82
C.4.3	Taxonomische Einordnung des Stammes OcN1.....	83
C.5	Bilanzierung des anaeroben Alkanabbaus	84
C.5.1	Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation in Stamm TD3.....	84
C.5.2	Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation in Stamm HdN1	85
C.6	Wachstumsversuche.....	89
C.6.1	Wachstum mit Alkanen	89
C.6.1.1	Wachstum von Stamm TD3 auf Decan	89
C.6.1.2	Anaerobes Wachstum von Stamm HdN1 auf Hexadecan.....	90
C.6.1.3	Anaerobes Wachstum von Stamm OcN1 auf Octan.....	92
C.6.2	Wachstum mit 1-Phenylalkanen.....	93
C.6.3	Wachstum mit Rohöl.....	95
C.6.3.1	Wachstum der sulfatreduzierenden Isolate mit Rohöl	96
C.6.3.2	Untersuchung des Wachstums der denitrifizierenden Isolate mit Rohöl	101
C.7	Induktionsversuche.....	105
C.7.1	Induktionsversuche mit Stamm HdN1.....	105
C.7.2	Induktionsversuche mit Stamm OcN1	107
C.8	Fettsäureanalysen.....	109
C.8.1	Analyse der Zellfettsäuren von Stamm HdN1	109
C.8.2	Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Pnd3.....	114

D. Diskussion.....	116
D.1 Nachweis der anaeroben Alkanoxidation durch neue Bakterienisolate.....	117
D.1.1 Anaerobe Alkanoxidation durch das sulfatreduzierende Isolat TD3.....	117
D.1.2 Anaerobe Alkanoxidation durch die denitrifizierenden Isolate HdN1 und OcN1.....	118
D.1.2.1 Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation mit Nitrat als Elektronenakzeptor.....	119
D.2 Taxonomische Einordnung der neuen Bakterienisolate.....	121
D.3 Betrachtungen zu möglichen Mechanismen der Alkanaufnahme der neuen Isolate und zu Versuchen zur Wachstumsstimulierung.....	123
D.4 Biochemische Aspekte der anaeroben Alkanoxidation.....	125
D.4.1 Betrachtungen zu Alkenen als möglichen Intermediaten der anaeroben Alkanoxidation.....	126
D.4.2 Die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung als mögliche Eingangsreaktion der anaeroben Alkanoxidation.....	129
D.4.2.1 Beispiele bekannter Carbonylierungs- und Decarbonylierungsreaktionen.....	129
D.4.2.2 Überprüfung der Hypothese der Veränderung der C-Kette bei der anaeroben Alkanoxidation.....	130
D.5 Bedeutung des Wachstums von Stamm TD3 sowie von Stamm OcN1 auf Erdöl ...	134
D.5.1 Betrachtungen zur Bedeutung von sulfatreduzierenden Bakterien, die zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl fähig sind.....	134
D.5.2 Hypothese der unterschiedlichen Zugänglichkeit verschiedener <i>n</i> -Alkane im Erdöl.....	136
E. Zusammenfassung.....	138
F. Literaturverzeichnis.....	140
G. Anhang: Vorschlag zur Beschreibung der Neuisolate.....	153
G.1 Description of <i>Desulfothermus naphthae</i> gen. nov., sp. nov. (suggested).....	153
G.2 Description of <i>Oleomonas alkani</i> gen. nov., sp. nov. (suggested).....	154
G.3 Description of <i>Azoarcus petrolei</i> sp. nov. (suggested).....	155

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
A4/8	thermophiles, sulfatreduzierendes Bakterienisolat, welches auf Capronat isoliert wurde
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
C _n	n C-Atome
CoA	CoenzymA
Cyt	Cytochrom
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneimittelbuch
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
den.	denaturierend
dest.	destilliert
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DH	Dehydrogenase
DMCH	<i>trans</i> -1,4-Dimethylcyclohexan
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E _o '	Standardelektrodenpotential bei pH 7 [V]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid (oxidierte Form)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
ΔG ^o '	Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen bei pH 7
GC	Gaschromatograph
G+C	Guanin und Cytosin
Gl.	Gleichung
h	Stunde

HdN1	<i>Oleomonas alkani</i> : auf Hexadecan isoliertes, denitrifizierendes Bakterium
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Hxd	<i>n</i> -Hexadecan
Hxd3	<i>Desulfobacterium oleovorans</i> : auf Hexadecan isoliertes, sulfatreduzierendes Bakterium
Konz.	Konzentration
konz.	konzentriert
l	Liter
m	Meter
min	Minute
M	Molar
mol	Mol
MPN	<i>most probable number</i>
M _r	relative Molekülmasse
MV	Methylviologen
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotid (-phosphat)
ox.	oxidiert
OcN1	<i>Azoarcus petrolei</i> : auf Octan isoliertes, denitrifizierendes Bakterium
Pa	Pascal (1 bar = 10 ⁵ Pa)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHA	Polyhydroxyalkanoate
Pnd3	auf Pentadecan isoliertes, sulfatreduzierendes Bakterium
ppm	<i>parts per million</i>
psi	<i>pounds per square inch</i>
red.	reduziert
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde
TD3	<i>Desulfothermus naphthae</i> : auf Decan isoliertes, moderat thermophiles, sulfatreduzierendes Bakterium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
verd.	verdünnt

Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
w/v	Gewicht pro Volumen

Abkürzungen für Fettsäuren

n:0	gesättigte Fettsäure mit n C-Atomen
n:1 <i>cis</i> m	ungesättigte Fettsäure mit n C-Atomen und einer <i>cis</i> -ständigen Doppelbindung in Position m
n:0 iso	gesättigte Fettsäure mit n C-Atomen, die eine endständige Methylverzweigung trägt
17:0 Δ	<i>cis</i> -9,10-Methylenhexadecanoat

A. Einleitung

A.1 Einführung

Alkane sind gesättigte Kohlenwasserstoffe, die neben aromatischen Kohlenwasserstoffen den Hauptbestandteil von Erdöl bilden. Hierin liegt auch das in jüngerer Zeit gesteigerte Interesse am mikrobiellen Abbau dieser Substanzklasse begründet. Die Belastung der Umwelt durch Erdöl beispielsweise durch verschiedene Schiffshavarien hat ein verstärktes öffentliches Aufsehen erregt. Die Möglichkeit einer mikrobiellen Sanierung derartig verseuchter Standorte wird verstärkt untersucht und auch bereits praktiziert (Schulz-Berendt, 1993; Zeyer, 1993). Aber auch andere Aspekte des mikrobiellen Wachstums auf Kohlenwasserstoffen haben durchaus industrielle Bedeutung erlangt. Dazu gehört die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen durch Mikroorganismen, die an ein Wachstum mit hydrophoben Substraten angepaßt sind. Weitere Punkte sind die Produktion von Einzellerprotein (SCP) als Futtermittel oder die Gewinnung von bestimmten mikrobiellen Metaboliten mit Paraffinen als billigen Substraten (Rosenberg, 1992).

Nachdem seit vielen Jahrzehnten aerobe Mikroorganismen bekannt sind, die Alkane mit Hilfe von Sauerstoff anzugreifen und abzubauen vermögen, konnte erst vor wenigen Jahren gezeigt werden, daß Alkane auch unter anoxischen Bedingungen von sulfatreduzierenden Mikroorganismen oxidiert werden können (Aeckersberg, 1989). Dieser anaerobe Alkanabbau ist von grundsätzlichem biochemischen Interesse, da die initiale Aktivierungsreaktion des Alkans ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff abläuft, was einen gänzlich neuen Reaktionsmechanismus erfordert.

Neben der Bedeutung für die Grundlagenforschung hat dieser neue Aspekt des Alkanmetabolismus auch angewandte Bedeutung. In der Industrie entstehen bei der Förderung, dem Transport und der Verarbeitung von Erdöl große Probleme durch die mikrobielle Bildung von Schwefelwasserstoff in Gegenwart einer Wasserphase. Hierfür sind hauptsächlich sulfatreduzierende Bakterien verantwortlich. Insbesondere diejenigen Arten, die zur anaeroben Verwertung von aliphatischen Kohlenwasserstoffen, also den Hauptbestandteilen des Erdöls, fähig sind, könnten signifikant zur Schwefelwasserstoffbildung beitragen. Eine genauere Charakterisierung der bekannten und möglicher weiterer Arten könnte der Erdölindustrie zu Maßnahmen zur Verhinderung des Wachstums dieser Bakterien verhelfen (Cord-Ruwisch et al., 1987a). Die Existenz von anaeroben alkanabbauenden Mikroorganismen eröffnet desweiteren neue Perspektiven für die biologische Sanierung von Standorten, die mit Erdöl kontaminiert wurden (Zeyer, 1993).

A.2 Struktur, Eigenschaften und Reaktionen von Alkanen

Alkane sind gesättigte, aliphatische Kohlenwasserstoffe der allgemeinen Formel C_nH_{2n+2} , die in unverzweigten (*n*-Alkane) oder verzweigten Ketten (Isoalkane) vorliegen. Ringförmige, gesättigte Kohlenwasserstoffe werden Cycloalkane genannt und besitzen die allgemeine Formel C_nH_{2n} . Unter Normalbedingungen liegen *n*-Alkane von C_1 (Methan) bis C_4 (Butan) im gasförmigen Zustand, *n*-Alkane von C_5 (Pentan) bis C_{16} (Hexadecan) als Flüssigkeiten und längerkettige Alkane im festen Zustand vor. Alkane besitzen eine äußerst geringe Löslichkeit in Wasser (10^{-4} - 10^{-9} v/v), die mit zunehmender Kettenlänge abnimmt (Crueger und Crueger, 1989). Da Alkane zu den reaktionsträgsten organischen Molekülen zählen, wurden sie in der älteren Literatur als Paraffine (lat. *parum* = wenig, *affinus* = geneigt) bezeichnet. Der unreaktive Charakter entsteht dadurch, daß Alkane ausschließlich unpolarisierte σ -Bindungen enthalten und weder einsame Elektronen noch freie bindende Orbitale zur Verfügung stehen (Crabtree, 1985).

Bei Raumtemperatur im Dunkeln sind Alkane gegenüber konzentrierten Säuren, Alkalimetallen, Sauerstoff und Halogenen (außer Fluor) praktisch völlig inert. Einzig mit Supersäuren und mit Fluor reagieren Alkane spontan. Bei der Reaktion mit Supersäuren (z. B. $FSO_3H \cdot SbF_5$, die sog. "Magische Säure" aus Fluoroschwefelsäure und Antimon-(V)-fluorid) entstehen nach Protonierung der Alkane sog. Carboniumionen, die nach Abspaltung von Wasserstoff als stark elektrophile Partikel beispielsweise andere Alkanmoleküle alkylieren können (Christen und Vögtle, 1988).

Viele Reaktionen von Alkanen verlaufen über radikalische Zwischenstufen, da die Apolarität der σ -Bindungen der Alkane die homolytische Spaltung begünstigt. Obgleich in den Alkanen die C-C-Bindungsenthalpien deutlich niedriger sind als die der C-H-Bindungen (346 kJ/mol gegenüber 414 kJ/mol), werden fast ausschließlich C-H-Bindungen angegriffen. Dies hat wahrscheinlich sterische Gründe, da die Kohlenstoffkette eines Alkans von C-H-Bindungen umschlossen ist (Beyer und Walter, 1988).

Der Nachteil radikalischer Reaktionsmechanismen bei chemischen Synthesen besteht darin, daß zumeist schlecht kontrollierbare Substanzgemische aus mehreren Isomeren entstehen. Die Suche nach Katalysatoren, die gezieltere Reaktionen unter milderen Bedingungen erlauben, hat daher in den letzten Jahren verstärkt zugenommen. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten, die C-H-Bindung selektiv unter milden Bedingungen zu spalten und das funktionalisierte Produkt relativ unreaktiv zu halten, wurden erst in wenigen Ansätzen im synthetischen Maßstab überwunden. Einige Arbeiten wurden veröffentlicht, die gezielte Reaktionen von Alkanen beispielsweise mit Übergangsmetallkomplexen unter milden Bedingungen zeigen (Jones, 1990). Die spezielle Eignung der Übergangsmetallkomplexe zur Aktivierung der unreaktiven C-H-Bindung wird damit begründet, daß die äußersten Orbitale dieser Komplexe energetisch den σ -Orbitalen der C-H-Bindung entsprechen und die ausgedehnten Hybridorbitale desweiteren gut mit den schwer zugänglichen σ -Orbitalen der Alkane überlappen können (Saillard, 1990).

Man unterscheidet prinzipiell drei verschiedene Arten der Alkanaktivierung durch Übergangsmetallkomplexe: (I) Die oxidative Addition, (II) die elektrophile Reaktion und (III) die homolytische Reaktion. Die oxidative Addition ist der wohl bislang am besten untersuchte Weg. Voraussetzung ist ein ungesättigter, hochenergetischer Übergangsmetallkomplex, der durch die formale Aufnahme zweier Elektronen eine stabile 18-Elektronen-Konfiguration erreichen kann. Dabei wird eine C-H-Bindung des Alkans, in den meisten Fällen die des α -C-Atoms, angegriffen. Ein Hydridion und ein Carbanion ligandieren formal den Übergangsmetallkomplex (Abb. 1).

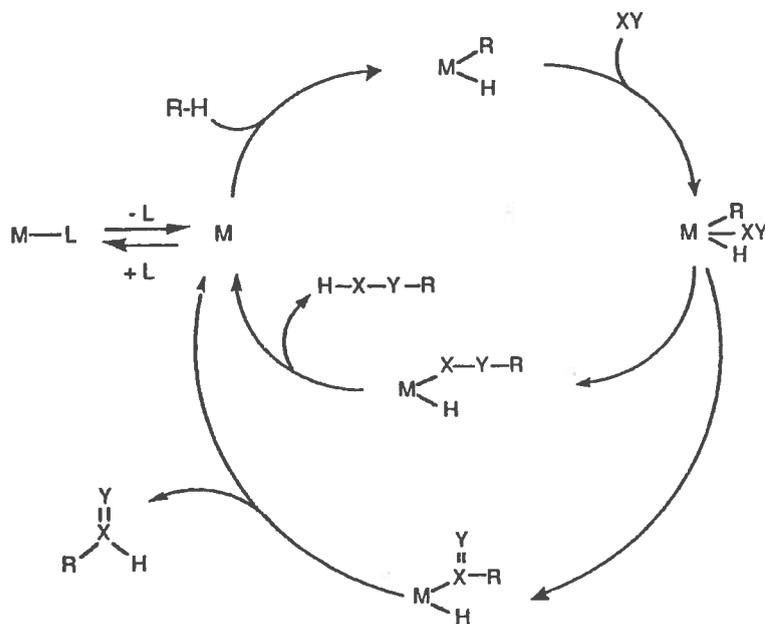


Abb. 1: Schematische Darstellung der oxidativen Addition eines Alkans (R-H) mit Hilfe eines Übergangsmetallkomplexes (M); L, Ligand; XY, kleines Molekül; modifiziert nach Jones (1990)

Durch oxidative Addition wurden unter anderem H/D-Austauschreaktionen, Alkan-Dehydrogenierungen oder Alkan-Carbonylierungen gezeigt. Energetisch ist jedoch sowohl die Dehydrogenierung (1) als auch die Carbonylierung (2) ungünstig (Jones, 1990).



Die aerobe Alkanaktivierung in biologischen Systemen (über Alkanmonooxygenase oder Methanmonooxygenase) erfolgt ebenfalls unter Katalyse von Übergangsmetallkomplexen. Der Mechanismus verläuft allerdings radikalisch über eine homolytische Spaltung der C-H-Bindung (siehe A.5.2).

A.3 Vorkommen von Alkanen

Das heutige Hauptvorkommen der Alkane ist Erdgas und Erdöl. Untersuchungen von 517 verschiedenen Rohölen haben ergeben, daß *n*-Alkane, Isoalkane und Cycloalkane in diesen Erdölen durchschnittlich 57,2 % (w/w) ausmachen (Tissot und Welte, 1984). Methan als das häufigste in der Umwelt vorkommende Alkan ist der Hauptbestandteil von Erdgas (Tissot und Welte, 1984). Desweiteren tritt Methan auch häufig aus anoxischen Gewässern wie Mooren oder an organischen Verbindungen reichen Sedimenten, sowie aus Faultürmen von Kläranlagen aus. In nicht unerheblichen Mengen entsteht Methan bei der Celluloseverwertung im Verdauungstrakt der Wiederkäuer. Verantwortlich für die Methanbildung bei diesen Prozessen sind methanogene Bakterien. Als Endprodukt des dissimilatorischen Stoffwechsels entsteht Methan aus der Disproportionierung von Acetat, Methanol oder Methylaminen oder der Reduktion von CO₂ mit H₂ oder Formiat. Weitere gasförmige Alkane wie Ethan, Propan und Butan entstehen in geringen Mengen vermutlich ebenfalls als Nebenprodukte bei der Methanogenese (Oremland, 1988).

Alkane können in fast allen Böden und Sedimenten nachgewiesen werden. Dies hat seine Ursache nur zu einem kleinen Teil in anthropogenen Aktivitäten wie beispielsweise Öltankerhavarien, Schiffsverkehr, Unfällen bei Ölbohrungen und Transport in Pipelines, bei denen Erdöl in erheblichen Mengen in die Umwelt gelangt. In einigen hydrothermalen Gebieten der Erde wie beispielsweise dem Guaymas Becken im Golf von Kalifornien werden fortwährend durch hohe Temperaturen und hohen Druck Kohlenwasserstoffe aus organischem Detritus gebildet (Bazylnski et al., 1988; Simoneit und Lonsdale, 1982). Eine Synthese von Kohlenwasserstoffen findet auch in vielen lebenden Organismen statt, in denen Alkane - zum Teil allerdings in sehr geringen Mengen - nachzuweisen sind (Kolattukudy, 1976). In Pflanzen und Insekten finden sich Alkane beispielsweise als Komponenten der Wachsschicht (Cuticula), die als Schutz gegen Wasserverdunstung wirkt. Natürlich vorkommende Wachse sind meist Gemische von Wachsestern (Fettsäureester von langkettigen oder zyklischen ein- oder zweiwertigen Alkoholen) mit Alkanen und freien langkettigen Alkoholen. Bei einigen pflanzlichen Wachsen bilden unverzweigte und verzweigte Alkane den Hauptbestandteil, so bei den Wachsen der Tabak- und Kohlblätter (Nuhn, 1990). Alle natürlich vorkommenden Alkane in Wachsen besitzen eine ungerade Anzahl von Kohlenstoffatomen im Bereich zwischen C₂₇ und C₃₇ (Fieser und Fieser, 1982). Die Grünalge *Botryococcus braunii* produziert unverzweigte Alkane mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen (C₂₇, C₂₉ und C₃₁), welche bis zu 32 % der Trockenmasse ausmachen (Dennis und Kolattukudy, 1992). Desweiteren enthalten Zellen dieser Alge große Mengen an mehrfach ungesättigten verzweigten Kohlenwasserstoffen, die auch Botryococcene genannt werden. Die Gattung *Botryococcus* ist seit dem Paläozoikum bekannt. Sie hat vermutlich einen bedeutenden Anteil an der Entstehung von Öllagerstätten (Benedix et al., 1991).

A.4 Mechanismus der Alkansynthese in biologischen Systemen

Höhere Alkane biologischer Herkunft besitzen gewöhnlich eine ungerade Anzahl von C-Atomen. Dies läßt sich mit dem Mechanismus der Alkansynthese erklären. Langkettige Fettsäuren, die Vorläufer der Alkansynthese sind, besitzen in biologischen Systemen vorwiegend geradzahlige C-Ketten. Diese langkettigen Fettsäuren werden nach der Aktivierung zunächst zum entsprechenden Aldehyd reduziert, der anschließend über eine Decarboxylierungsreaktion zu einem um eine C₁-Einheit kürzeren Alkan umgesetzt wird (Abb. 2).

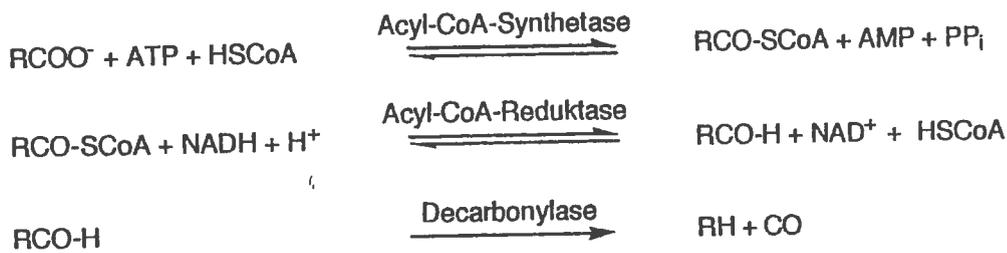


Abb. 2: Mechanismus der Alkan-Biosynthese in höheren Organismen. Eine langkettige Fettsäure wird dabei über mehrere Reaktionsschritte zum Aldehyd umgesetzt und letztendlich durch Abspaltung von CO in das um eine C₁-Einheit kürzere Alkan überführt.

Dieser Mechanismus der Alkansynthese ist in einigen Organismen wie der Erbse *Pisum sativum* (Cheesbrough und Kolattukudy, 1984), dem Schwarzhalstaucher *Podiceps nigricollis* (Cheesbrough und Kolattukudy, 1988) und der Grünalge *Botryococcus braunii* (Dennis und Kolattukudy, 1992; Dennis und Kolattukudy, 1991) gezeigt worden; bei anderen Organismen wie der Fleischfliege *Sarcophaga crassipalpis* (Yoder et al., 1992), der Amerikanischen Küchenschabe *Periplaneta americana* (Vaz et al., 1988) und dem Kaninchen (Cassagne und Darriet, 1977) gibt es Hinweise darauf. Eine Aldehyd-Decarboxylase aus *Botryococcus braunii* wurde gereinigt und grob charakterisiert (Dennis und Kolattukudy, 1992). Es handelt sich vermutlich um ein Heterodimer (121 kDa) aus einer 55 kDa und einer 66 kDa großen Untereinheit. Das Enzym enthält signifikante Mengen an Kobalt und könnte eventuell ein Co-Porphyrin oder eine Corrinoid-Struktur enthalten.

In höheren Pflanzen, die Alkane in der äußeren Wachsschicht enthalten (siehe A.3), konnte Kobalt meines Wissens jedoch bislang weder als B₁₂ noch in einer anderen Form nachgewiesen werden.

A.5 Mikrobielle Verwertung von Alkanen

Die Fähigkeit zur Verwertung von aliphatischen Kohlenwasserstoffen findet sich in einigen Bakterien- und Pilzgattungen (Britton, 1984; Bühler und Schindler, 1984; Rehm, 1988). Als Beispiele seien hier nur die am häufigsten vertretenen und gut untersuchten Bakteriengattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* und *Nocardia* sowie die Pilzgattung *Candida* (*Torulopsis*) genannt. Die weite Verbreitung von Mikroorganismen, die zur Verwertung von Alkanen fähig sind, ist bei dem zuvor (siehe A.3) dargestellten Angebot an Kohlenwasserstoffen in der Umwelt nicht erstaunlich. Im folgenden soll der Alkanstoffwechsel, soweit bekannt, beschrieben werden.

A.5.1 Alkanaufnahme in die Zelle

Die erste Schwierigkeit bei der Verwertung von Alkanen liegt in der Verfügbarkeit dieser nur schwer wasserlöslichen Substrate in der wäßrigen Umgebung der Zellen. Das Problem liegt nicht im eigentlichen Transport durch die Zellmembran, sondern im räumlichen Zusammentreffen der Zellen mit den lipophilen Alkanen. Die zwei prinzipiellen Mechanismen zur Aufnahme von Alkanen durch Mikroorganismen sind eine direkte Anheftung der Zellen an die Alkanphase und eine Pseudosolubilisierung des Alkans durch Ausscheidung amphiphiler Substanzen (Bühler und Schindler, 1984; Rosenberg, 1992).

Eine hydrophobe Zelloberfläche ermöglicht eine direkte Anheftung von Bakterienzellen an Paraffintropfen. Die Hydrophobizität wird durch Fimbrien, Fibrillen, Lipide oder hydrophobe Zelloberflächenproteine auf der Zelloberfläche erreicht. *Acinetobacter calcoaceticus* Stamm RAG-1 beispielsweise heftet sich beim Wachstum auf Hexadecan mit Hilfe von dünnen hydrophoben Fimbrien an das Alkan. Mutanten dieses Stammes ohne Fimbrien können nicht mehr auf Hexadecan wachsen.

Für Zellen, die sich direkt an den Öltropfen anheften, stellt das Ablösen der Zellen von diesem hydrophoben Öltropfen ein weiteres Problem dar. Nach Verbrauch der verwertbaren Substanzen ist ein weiteres Wachstum nur nach Ablösung der Zelle von dem Öltropfen möglich. Dieses Problem wird z. B. von *Acinetobacter calcoaceticus* Stamm RAG-1 dadurch gelöst, daß er sich von einer die Zelle umgebenden amphiphilen Kapsel löst. Diese Kapsel umschließt anschließend den Öltropfen, so daß eine erneute Anheftung der Zellen verhindert wird (Rosenberg, 1992).

Von anderen kohlenwasserstoffverwertenden Spezies wird eine Pseudosolubilisierung des Alkans durch Ausscheidung spezieller amphiphiler Substanzen erreicht. Diese verursachen durch Bildung von Mikrotropfen (10 - 500 nm im Durchmesser; Einsele, 1983) eine Emulgation der Alkane in der Wasserphase. Bekannte Beispiele von durch Mikroorganismen ausgeschiedenen

Emulgatoren sind die Rhamnolipide bei *P. aeruginosa* oder die bei anderen Bakterienstämmen gefundenen Trehaloselipide. Versuche, einem Medium bestimmte Emulgatoren zuzusetzen, um das Wachstum von Bakterien auf Alkanen zu stimulieren, waren nicht immer erfolgreich. Emulgatoren haben auf verschiedene Bakterien nicht immer die gleiche Wirkung; einige Bakterien werden durch bestimmte Emulgatoren gehemmt, andere werden im Wachstum stimuliert (Rosenberg, 1992).

Bei kohlenwasserstoffverwertenden Hefen sind ähnliche Mechanismen zur Alkanaufnahme wie bei Bakterien bekannt. Hefen können oberflächenaktive Substanzen bilden, die in das Kulturmedium abgegeben werden und die Kohlenwasserstoffe zu kleinen Tröpfchen emulgieren. Die Untersuchung dieser Substanzen hat beispielsweise zur Entdeckung eines Sophorolipids in *Candida bombicola* geführt, das beim Zusatz zum Medium die Verwertung von Alkanen deutlich stimulierte. Derartige Substanzen wurden auch in anderen *Candida*-Arten (*C. magnoliae*, *C. gropengiesseri*, *C. borogiensis*) nachgewiesen (Cartwright et al., 1989). Beim Wachstum auf gesättigten Kohlenwasserstoffen neigen einige Hefen dazu, Zellflocken oder Aggregate zu bilden, die Konglomerate von Zellen, Kohlenwasserstoffen und Luftbläschen darstellen. Zudem wurde häufig das spezifische Auftreten von intrazellulären Vesikeln beobachtet. Die Isolierung und Analyse dieser Vesikel zeigte, daß sich unter anderem eine Alkohol-Dehydrogenase für langkettige Alkohole und eine Aldehyd-Dehydrogenase für langkettige Aldehyde sowie die Enzyme für den Fettsäure-Stoffwechsel in diesen Vesikeln befanden. Auffällig war, daß diese Vesikel nur von einer einfachen Membran umgeben waren und daher als Mittler zwischen hydrophoben und hydrophilen Systemen betrachtet werden könnten (Cartwright et al., 1989; Tanaka und Fukui, 1989).

A.5.2 Aktivierung von Alkanen durch Mikroorganismen

Die bisherigen biochemischen Untersuchungen zum Alkanabbau haben sich ausschließlich mit den Systemen in aeroben Mikroorganismen befaßt. Dabei spielt molekularer Sauerstoff nicht nur als terminaler Elektronenakzeptor, sondern auch bei der Aktivierung der Alkanmoleküle die entscheidende Rolle.

Die metabolische Bedeutung von Sauerstoff liegt in seinem hohen Redoxpotential (z. B. für O_2/H_2O ist $E_0' = + 0,81$ V) bei gleichzeitiger kinetischer Stabilität. Dadurch zeichnet sich Sauerstoff gegenüber den Halogenen aus, da Reaktionen bei Raumtemperatur kontrollierbar sind. Die O-O-Bindung wird durch Einfügung von externen Elektronen in das π -Orbital erheblich geschwächt. Auf diese Weise wird beispielsweise durch Übergangsmetallkomplexe das Sauerstoffmolekül aktiviert und ein komplexgebundenes Sauerstoffatom mit hoher Reaktivität erzeugt, welches die Aktivierung sehr inerte Moleküle ermöglicht (Malmström, 1982).

Enzyme, die Sauerstoffatome direkt in das Substrat einfügen, werden Oxygenasen genannt. Bei der Oxidation von Alkanen spielen Monoxygenasen (auch Hydroxylasen oder *mixed function*

oxygenases genannt) eine entscheidende Rolle. Monooxygenasen reagieren mit aliphatischen oder aromatischen Substraten in Gegenwart von Sauerstoff, wobei eine Hydroxylgruppe in das Substrat eingefügt und das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Es sind drei verschiedene Wege der Alkanoxidation gezeigt worden, die monoterminale Oxidation, die diterminale Oxidation und die subterminale Oxidation (Britton, 1984; Bühler und Schindler, 1984; Müller-Hurtig und Wagner, 1990). Sie sollen im folgenden kurz skizziert werden.

Der verbreitetste Weg ist die monoterminale Oxidation. Dabei wird aus dem Alkan in einer Monooxygenase-Reaktion durch Insertion einer Hydroxylgruppe zunächst der entsprechende primäre Alkohol gebildet. Dieser wird dann über eine Alkoholdehydrogenase oder Alkoholoxidase (bei verschiedenen Hefen) zum Aldehyd oxidiert und anschließend durch eine Aldehyddehydrogenase zur Monocarbonsäure umgesetzt (Abb. 3 A). Die entstehenden Fettsäuren können über die Reaktionen der β -Oxidation weiter abgebaut werden.

Bei der monoterminalen Oxidation wird ein weiterer Reaktionsweg diskutiert, der eine Dioxygenase-Reaktion einschließt. Finnerty (1988) schlägt eine Reaktion über ein Peroxid vor und konnte in *Acinetobacter* sp. Stamm H01-N die postulierten Fettsäureperoxide nachweisen. Der vorgeschlagene Reaktionsweg verläuft über ein Alkanperoxid zu einem Fettsäureperoxid. Das Fettsäureperoxid wird zu einem Aldehyd reduziert. Durch Disproportionierung wird aus dem Aldehyd eine Fettsäure und ein Alkohol gebildet. Da der untersuchte Bakterienstamm keine nachweisbare Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität zeigt, vermutet man, daß der Alkohol als Bestandteil der Wachse ein Endprodukt ist. Die Fettsäure kann über die β -Oxidation abgebaut werden (Abb. 3 B).

Die diterminale Oxidation von Alkanen ist wesentlich weniger häufig als die monoterminale Oxidation. Man findet die diterminale Oxidation hauptsächlich in Hefen, selten in Bakterien. Die ω -ständige Methylgruppe wird entweder sofort nach Hydroxylierung der α -Methylgruppe oxidiert, oder die Oxidation der ω -Methylgruppe erfolgt erst nach der Bildung der Monocarbonsäure (Abb. 4).

Eine subterminale Oxidation wurde bei einigen Pseudomonaden bei der Verwertung von kürzerkettigen Alkanen (C_3 - C_8) gezeigt. Dabei wird das Alkan zunächst am β -C-Atom über den sekundären Alkohol zum Keton oxidiert. Anschließend wird die endständige CH_3 -Gruppe oxidiert und die Carboxylgruppe der α -Oxocarbonsäure abgespalten. Längerkettige Alkane werden bei anderen Pseudomonaden und Pilzen der Gattung *Fusarium* in einem der Baeyer-Villiger-Reaktion ähnlichen Mechanismus umgesetzt (Abb. 5).

Bei den Alkanmonooxygenasen unterscheidet man zwei verschiedene Typen, wobei es sich jeweils um mehrfach gekoppelte Systeme über die Redoxsysteme Rubredoxin (Fe^{2+}/Fe^{3+}) bzw. Cytochrom P450 handelt (Abb. 6)(Frey, 1990).

Die Monooxygenase-Reaktion mit Cytochrom P450 ist besser charakterisiert und vermutlich weiter verbreitet als die mit Rubredoxin (Frey, 1990). Als Cytochrom P450 werden Hämproteine bezeichnet, die ein an das Eisen ligiertes Thiolat-Anion besitzen und CO-Komplexe bilden, die eine

Absorptionsbande bei 450 nm zeigen. Verschiedene Typen von Cytochrom P450 katalysieren eine Reihe verschiedenartigster Reaktionen, hauptsächlich Monooxygenierungen lipophiler Substrate. Von den Oxygenierungen wurde die Alkanmonooxygenase-Reaktion bislang am besten charakterisiert (Abb. 7).

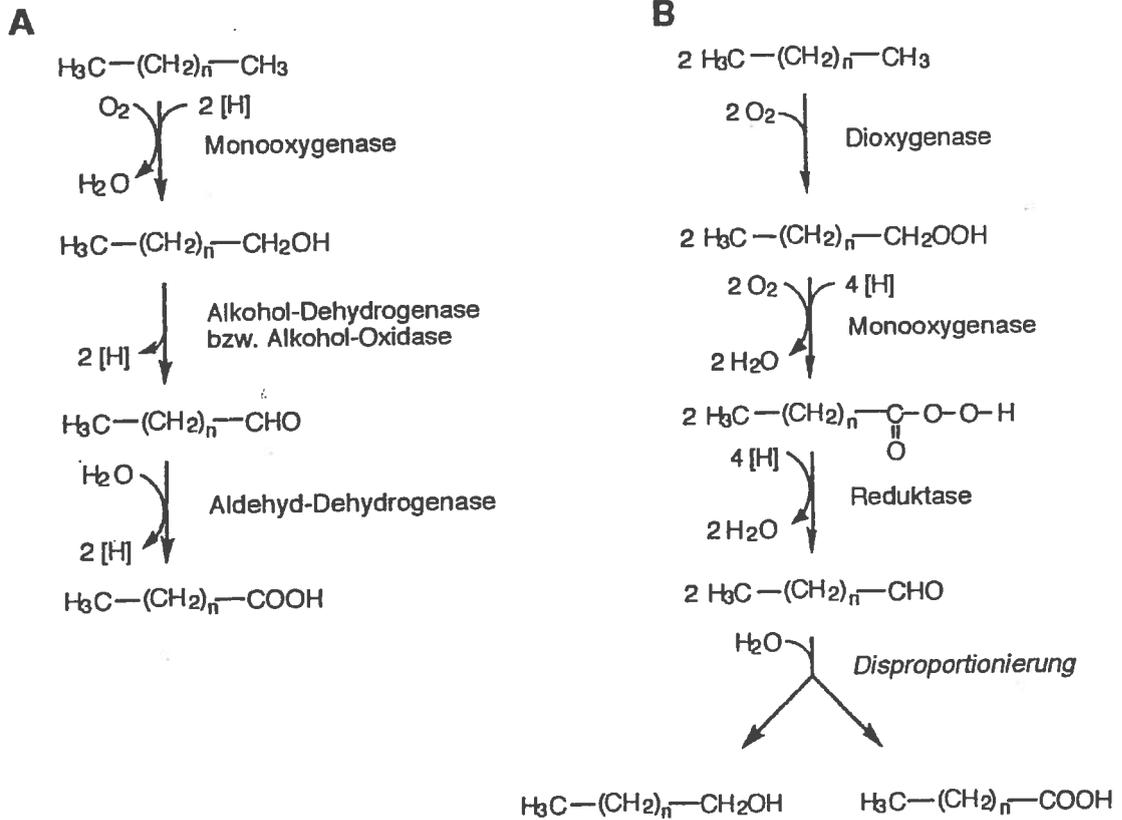


Abb. 3: Monoterminale Oxidation von Alkanen durch Oxygenasen. (A) zeigt den am weitesten verbreiteten Reaktionsweg mit einer Monooxygenasereaktion als ersten Aktivierungsschritt, in (B) ist der für *Acinetobacter* sp. Stamm H01-N vorgeschlagene Reaktionsweg über Peroxid-Zwischenstufen dargestellt.

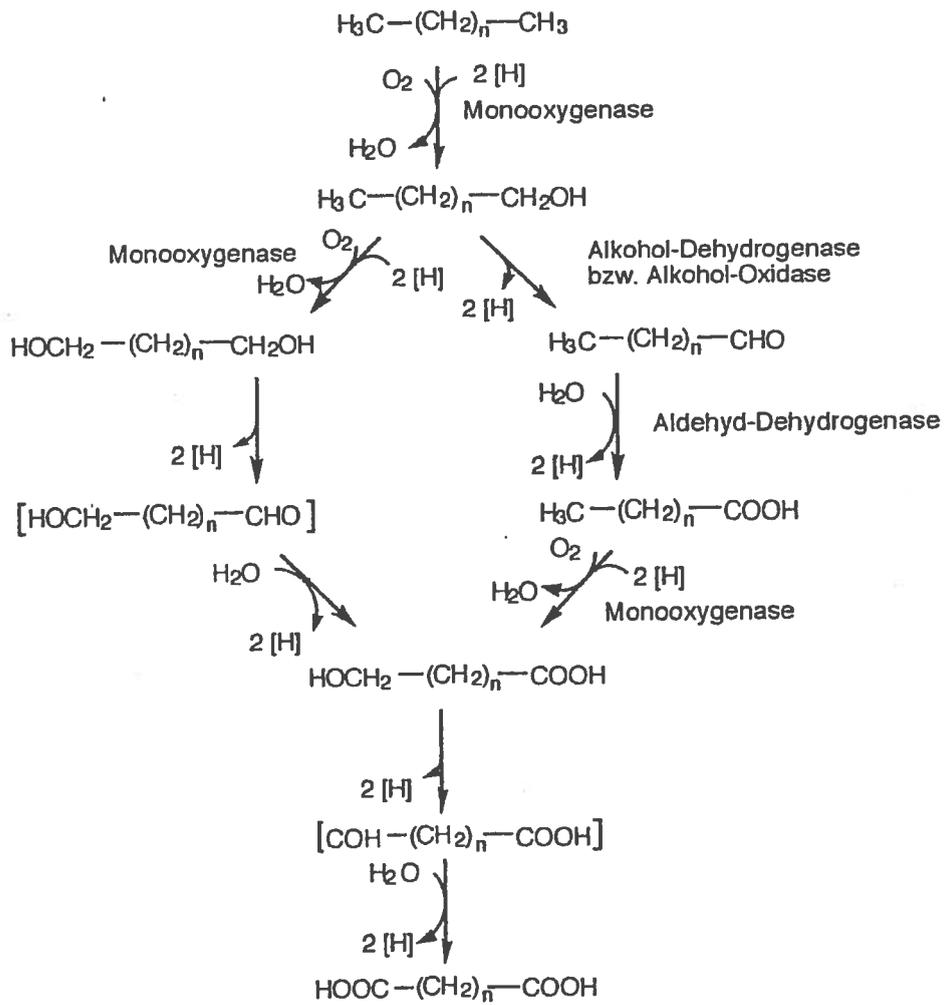


Abb. 4: Diterminale Oxidation von Alkanen durch Monooxygenasereaktionen, wobei der Angriff auf die ω -Methylgruppe parallel zur Einföhrung der Hydroxylgruppe am α -C-Atom oder aber erst nach Bildung der Monocarbonsäure erfolgen kann. ([] kein freies Intermediat)

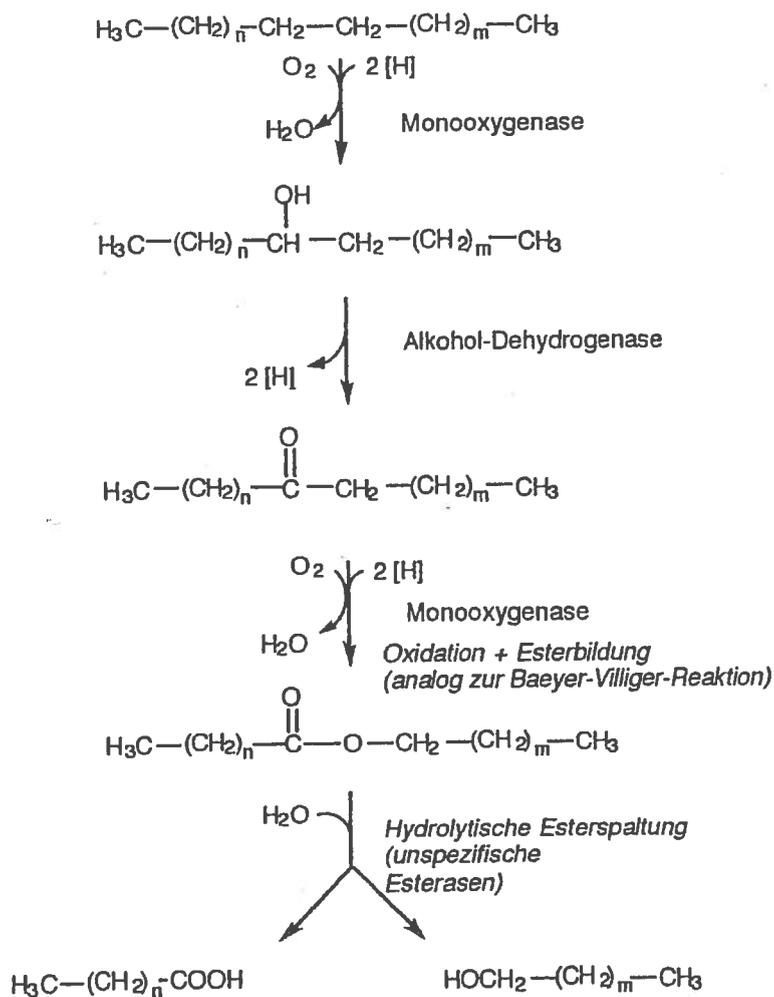
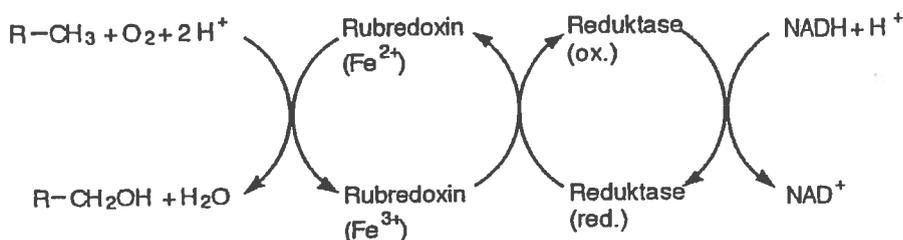


Abb. 5: Subterminale Oxidation von Alkanen, wie sie bei Pseudomonaden und *Fusarium* für länger-kettige Alkane gezeigt wurde.

A



B

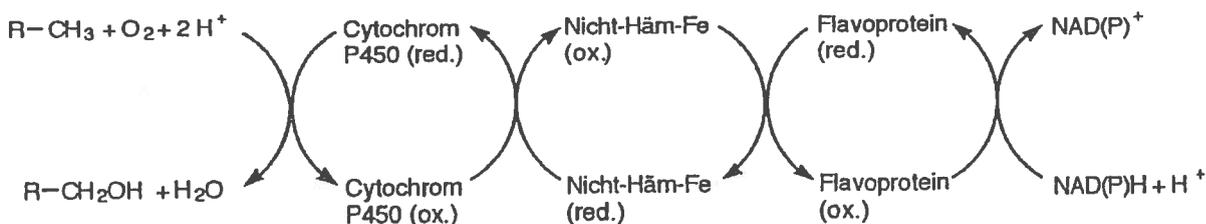


Abb. 6: Redoxsysteme der Alkan-Monooxygenasen: (A) Cytochrom P450-freies System, (B) Cytochrom P450

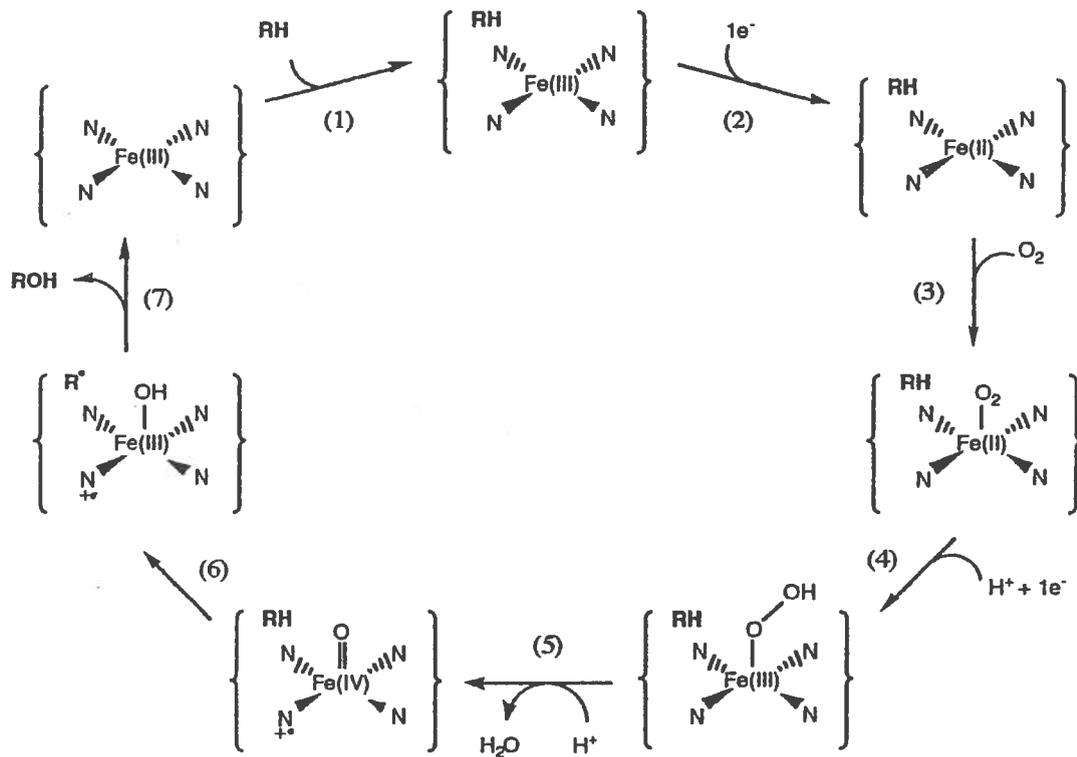
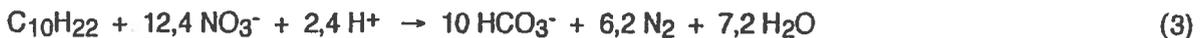


Abb. 7: Mechanismus der Alkan-Monooxygenase mit Cytochrom P450. Im ersten Schritt wird das Substrat an das Hämprotein gebunden (1); Fe(III) wird in einem Ein-Elektronen-Transfer zu Fe(II) reduziert (2).; anschließend wird Sauerstoff gebunden (3). Nach Übertragung eines zweiten Elektrons entsteht ein Peroxy-Ferrihäm (4). Durch Spaltung des Peroxy-Liganden unter Freisetzung von Wasser entsteht ein sehr reaktiver, kurzlebiger Komplex (5), der mit dem Alkan reagiert (6). Im letzten Schritt wird der gebildete Alkohol freigesetzt (7). Die Abbildung wurde nach Frey (1990) modifiziert.

A.5.3 Kenntnisstand zur anaeroben Alkanoxidation

Die Existenz einer anaeroben Alkanoxidation war sehr lange Gegenstand kontroverser Diskussionen. Aus thermodynamischen Überlegungen ist die anaerobe Alkanoxidation mit Nitrat (3), Mn(IV) (4), Fe(III) (5) oder Sulfat (6) als Elektronenakzeptoren oder unter methanogenen Bedingungen (7) durchaus möglich. Die Berechnungen der ΔG° -Werte beruhen auf den Zahlenangaben von Thauer et al. (1977) und Synowitz (1983).



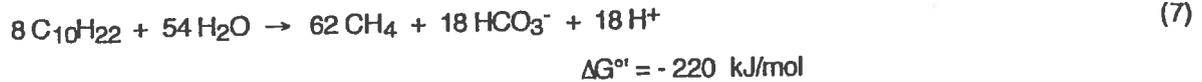
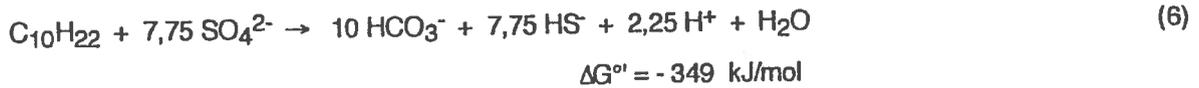
$$\Delta G^{\circ} = - 6117 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ} = - 5696 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ} = - 2425 \text{ kJ/mol}$$



Zweifel wurden hauptsächlich aus kinetischen Gründen laut. Alkane sind, wie bereits erläutert (siehe A.2), sehr reaktionsträge Moleküle, deren Aktivierung bei chemischen Synthesen oft nur unter extremen Bedingungen möglich ist. Daher war lange Zeit angenommen worden, daß zur Aktivierung in biologischen Systemen wie bei der Monooxygenase-Reaktion hochreaktive Sauerstoffspezies zur Aktivierung zwingend notwendig seien (vgl. A.5.2). Zwar gibt es bereits in früherer Literatur einige Hinweise auf eine anaerobe Alkanoxidation, aber viele dieser Arbeiten wurden angezweifelt (siehe A.5.3.3). Erst in jüngster Zeit sind eindeutige Versuche gemacht worden, die das anaerobe Wachstum von Mikroorganismen auf Alkanen als einziger Quelle organischer Substrate zeigen (Aeckersberg, 1989; Aeckersberg, 1994; Aeckersberg et al., 1991; Widdel, 1988). Im folgenden sollen die Bedeutung anaerober Atmungsprozesse sowie frühere Arbeiten zur anaeroben Alkanoxidation mit den dazu geäußerten Kritikpunkten kurz dokumentiert werden.

A.5.3.1 Bedeutung anaerober Atmungsprozesse

Die anaerobe Atmung wurde bislang bezüglich ihrer Bedeutung für den globalen Kohlenstoffkreislauf deutlich unterschätzt. In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, daß in marinen Sedimenten küstennaher Gebiete anaerobe Atmungsprozesse mit Nitrat, Sulfat, Mangan(IV) oder Eisen(III) als Elektronenakzeptor zusammen mit der Methanogenese mehr zur Remineralisierung beitragen als aerobe Prozesse (Canfield et al., 1993). Dabei variiert die Bedeutung der einzelnen Elektronenakzeptoren in unterschiedlichen Gebieten deutlich. Verallgemeinernd wird die Sulfatreduktion als der wichtigste anaerobe Atmungsprozeß in marinen Sedimenten betrachtet (Jørgensen, 1982). Die Sulfatkonzentration in Meerwasser beträgt durchschnittlich 28 mM. Süßwasserstandorte enthalten meist weniger als 1 mM Sulfat. An diesen Standorten erhält die Nitratreduktion gegenüber der Sulfatreduktion mehr Gewicht. Diese Tendenz wird durch starke Überdüngung vieler Gebiete durch intensive Landwirtschaft noch verstärkt. An einigen Standorten machen aber auch die Eisenreduktion oder die Manganreduktion einen relevanten Anteil der anaeroben Atmungsprozesse aus (Lovley, 1991; Nealson und Saffarani, 1994).

A.5.3.2 Messungen zum anaeroben Alkanabbau in Sedimenten

Von einigen Arbeitsgruppen wurden Untersuchungen zum anaeroben Alkanabbau in Sedimenten durchgeführt, wobei die einzelnen Gruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Ward und Brock (1978) untersuchten den Abbau von radioaktiv markiertem Hexadecan in Seesedimenten. Eine anaerobe biologische Oxidation von ^{14}C -Hexadecan konnte jedoch nicht gezeigt werden, da der Anteil der in CO_2 und der partikulären Fraktion wiedergefundenen Radioaktivität auch in Kontrollen, die mit Formaldehyd behandelt worden waren, erreicht wurde. Ebenso konnte auch in zwei jüngeren Arbeiten mit Sedimenten ohne Sauerstoff bzw. mit einem sehr geringen Sauerstoffpartialdruck (0,2 - 0,3 ppm) keine Abnahme von längerkettigen Alkanen gemessen werden (Michaelsen et al., 1992; Mille et al., 1988). Dagegen fanden DeLaune et al. (1980) in anaeroben Inkubationsexperimenten mit anoxischen Sedimenten aus Salzwiesen und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octadecan als Substrat unter einem Redoxpotential von -200 mV nach 25 Tagen 10 % der eingesetzten Radioaktivität in CO_2 wieder. Hambrick et al. (1980) konnten in einem analogen Experiment unter einem Redoxpotential von -250 mV sogar 18,8 % der Radioaktivität in CO_2 nachweisen. In diesen Arbeiten fehlen allerdings Sterilkontrollen. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, daß nach 80 Wochen Inkubation von Seesedimenten mit natürlich vorhandenem *n*-Heptadecan unter Sauerstoffausschluß mehr als 90 % der ursprünglichen Heptadecanmenge (8 - 9 $\mu\text{g/g}$) verschwunden waren (Giger et al., 1980).

A.5.3.3 Anaerobe Alkanoxidation durch Anreicherungen oder Reinkulturen unter sulfatreduzierenden Bedingungen

Arbeiten zum anaeroben Alkanabbau mit Rein- und Mischkulturen sulfatreduzierender Bakterien wurden bereits in den 40er Jahren veröffentlicht. Novelli und ZoBell (1944) beschrieben eine Sulfidbildung durch Anreicherungen und Reinkulturen von *Desulfovibrio* in anaeroben Ansätzen mit langkettigen Alkanen. Später konnte jedoch mit den beschriebenen Kulturen auf Hexadecan oder Erdöl kein anaerobes Wachstum mehr gezeigt werden (Updegraff und Wren, 1954). Rosenfeld (1947) beschrieb sulfatreduzierende Anreicherungen, die beim Wachstum auf langkettigen Alkanen langkettige Fettsäuren bildeten. Unglücklicherweise sind die Kulturen jedoch heute nicht mehr verfügbar. Da zum damaligen Zeitpunkt die Anaerobentechniken noch nicht sehr weit entwickelt waren, wurden häufig Zweifel an den vormals beschriebenen anoxischen Inkubationsbedingungen geäußert (Bertrand et al., 1989; Schink, 1988). Davis und Yarbrough (1966) verwendeten Kulturen von *Desulfovibrio desulfuricans* und führten den Nachweis einer alkanabhängigen Reduktion von Methylenblau sowie der Oxidation von ^{14}C -markiertem Methan, ^{14}C -Ethan und ^{14}C -Octadecan. Die in CO_2 wiedergefundene Radioaktivität betrug allerdings nur 0,18 % der eingesetzten Aktivität. Außerdem ergibt sich rechnerisch aus den Angaben zur

Reduktion von Methyleneblau, daß nur etwa 0,1 % des eingesetzten Substrats oxidiert wurden, so daß es sich dabei also durchaus um eine Verwertung von Verunreinigungen des Substrats gehandelt haben könnte. Die Tatsache, daß die verwendete Kultur Glucose als Substrat verwerten konnte, spricht zudem für eine mikrobielle Verunreinigung.

Erst vor wenigen Jahren wurde eindeutig das anaerobe Wachstum einer sulfatreduzierenden Reinkultur mit langkettigen Alkanen nachgewiesen (Aeckersberg, 1989; Aeckersberg, 1994; Aeckersberg et al., 1991). Das Inokulum für die Anreicherungskultur stammte aus dem Bodensatz eines Öl-Wasser-Separators eines norddeutschen Ölfeldes, in dem Schwefelwasserstoff gebildet wurde. Die gewonnene Reinkultur, Stamm Hxd3, wuchs unter strikt anoxischen, reduzierenden Bedingungen in Mineralmedium mit *n*-Hexadecan als einzigem Substrat und Sulfat als Elektronenakzeptor. In stöchiometrischen Untersuchungen mit Stamm Hxd3 wurde eine Oxidation von 90 % des eingesetzten Hexadecans unter strikt anoxischen Bedingungen gezeigt (Aeckersberg, 1994).

A.5.3.4 Oxidation von Alkanen durch nitratreduzierende Bakterien

Neben der Untersuchung der anaeroben Alkanoxidation unter sulfatreduzierenden Bedingungen wurden auch Untersuchungen an nitratreduzierenden Kulturen unternommen. Anaerobe Zellsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* Stamm Sol 20 mit *n*-Heptan reduzierten NAD⁺ oder Pyocyanin (Senez und Azoulay, 1961) und bildeten dabei 1-Hepten (Chouteau et al., 1962). Anaerobes Wachstum dieses Stammes auf Alkanen wurde jedoch nicht gezeigt. In einer weiterführenden Arbeit dieser Gruppe wurde berichtet, daß die Oxidation zum Aldehyd sauerstoffabhängig war. Als Mechanismus wurde eine Epoxidierung von 1-Hepten vorgeschlagen (Azoulay et al., 1963). Bei Untersuchungen eines anderen Stammes, *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196Aa, wurde erstmalig anaerobes Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen mit Octan und Hexadecan beschrieben (Traxler und Bernard, 1969). Die Autoren berichten von einer Alkan-Dehydrogenase- und einer Alken-Hydroxylase-Aktivität in zellfreien Extrakten dieses Stammes (Parekh et al., 1977). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht reproduziert werden (Atlas, 1981). Später wurde festgestellt, daß *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196Aa Alkane anaerob nicht verwerten kann. Das ehemals beobachtete anaerobe Wachstum war demnach wahrscheinlich auf die Verwertung von Aminosäuren zurückzuführen, die bei der aeroben Anzucht des Inokulums ins Medium ausgeschieden worden waren (Griffin und Traxler, 1981).

Weitere Untersuchungen zur anaeroben Verwertung von Alkanen durch nitratreduzierende Reinkulturen schlugen bislang ebenfalls fehl. Hansen und Kallio (1957) zeigten, daß *Pseudomonas stutzeri* aerob auf Alkanen wachsen konnte, Alkane in anaeroben Suspensionen mit Nitrat als Elektronenakzeptor jedoch nicht verwerten konnte. Zwei weitere Arten, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas nautica*, konnten Alkane ebenfalls nur unter oxischen Bedingungen

oder bei erniedrigten Sauerstoffpartialdrücken mit gleichzeitiger Nitratreduktion verwerten. Strikt anaerobes Wachstum erfolgte nicht (Bonin et al., 1992; Swain et al., 1978).

Gilewicz et al. (1991) beschrieben eine Reinkultur eines denitrifizierenden Bakteriums, *Pseudomonas* sp. Stamm A11, welche ein langkettiges Alken (1-Heptadecen) unter anoxischen Bedingungen abbauen konnte. Der Abbau von Alkanen durch dieses Bakterienisolat erfolgte nur unter oxischen Bedingungen. Die anaerobe Verwertung von langkettigen Alkenen war bereits in früheren Arbeiten mit einer methanogenen Anreicherungskultur (Schink, 1985) sowie durch den Sulfatreduzierer Hxd3 gezeigt worden (Aeckersberg, 1989; Aeckersberg et al., 1991).

A.6 Erdöl als Substrat für mikrobielles Wachstum

A.6.1 Zusammensetzung von Erdöl

Der Begriff Erdöl bezeichnet ein kompliziertes Gemisch aus mehr als 600 verschiedenen organischen Substanzen. Der Anteil der einzelnen Substanzen ist dabei in verschiedenen Erdölen nicht einheitlich, sondern unterliegt bei den an verschiedenen Stellen der Erde gefundenen Rohölen großen Schwankungen. Dennoch kann man die verschiedenen Komponenten des Erdöls verallgemeinernd in drei Fraktionen unterteilen (Tissot und Welte, 1984):

1. Gesättigte Kohlenwasserstoffe

In der Gruppe der gesättigten Kohlenwasserstoffe werden *n*-Alkane, Isoalkane und Cycloalkane (Naphthene) zusammengefaßt. Diese Substanzen machen bei den meisten Rohölen den Hauptanteil aus. Ein Durchschnittswert aus 517 verschiedenen Rohölen ergab einen Anteil von 57,2 % (w/w) (Abb. 8). Eine Ausnahme bilden beispielsweise Rohöle, die bereits durch mikrobielle Abbauvorgänge einen Großteil der Alkanfraktion verloren haben (Petrov, 1987b).

Man findet in Rohölen hauptsächlich *n*-Alkane im Bereich zwischen C_1 und C_{40} . Sie können bis zu 35 % (w/w) ausmachen. Dabei bilden *n*-Alkane von C_5 - C_7 den Hauptanteil einzelner Komponenten, ab C_{10} nimmt der Anteil mit zunehmender Kettenlänge kontinuierlich ab. Der *n*-Alkananteil einzelner Rohöle hängt stark vom Ursprung des abgelagerten organischen Materials ab.

2. Aromatische Kohlenwasserstoffe

Zu der Gruppe der aromatischen Kohlenwasserstoffe werden reine Aromaten und Cycloalkanaromaten (Naphthenaromaten), aber auch zyklische Schwefelkomponenten (Benzothiophene) gezählt. Der Anteil betrug in einer Stichprobe aus 517 verschiedenen Rohölen durchschnittlich 28,6 % (w/w) (Abb. 8). Den Hauptanteil aromatischer Substanzen stellen die reinen Aromaten mit einem einzigen oder bis zu fünf kondensierten aromatischen Ringen sowie die

alkylierten Derivate. In relevanten Mengen kommen oft Benzol, Toluol und die Xylole, Naphthalin und Methyl-Naphthaline vor.

3. Harze und Asphaltene

Die Gruppe der Harze und Asphaltene besteht aus hochmolekularen, polyzyklischen Verbindungen, die N, O oder S als Heteroatome enthalten. Der durchschnittliche Anteil in den 517 untersuchten Rohölen wird mit 14,2 % (w/w) angegeben (Abb. 8). Dieser Anteil steigt in Erdölen, die einem biologischen Abbau oder anderen Prozessen wie *water-washing* (bei Kontakt von Erdöl mit Wasser werden die leichter löslichen Substanzen wie Toluol, Benzol oder kurzkettige Alkane ausgewaschen) oder oxidativen Prozessen unterworfen waren, da es sich hier um biologisch schwer angreifbare bzw. schwer lösliche oder schwer flüchtige Substanzen handelt.

Andere niedermolekulare Substanzen mit polaren Gruppen wie etwa Fettsäuren, Cycloalkansäuren, Phenole, Alkylpyridine oder Thiole machen nur einen sehr geringen Anteil am Rohöl aus. In jüngeren Rohölen liegt der Anteil allerdings deutlich höher als in gereiften Rohölen.

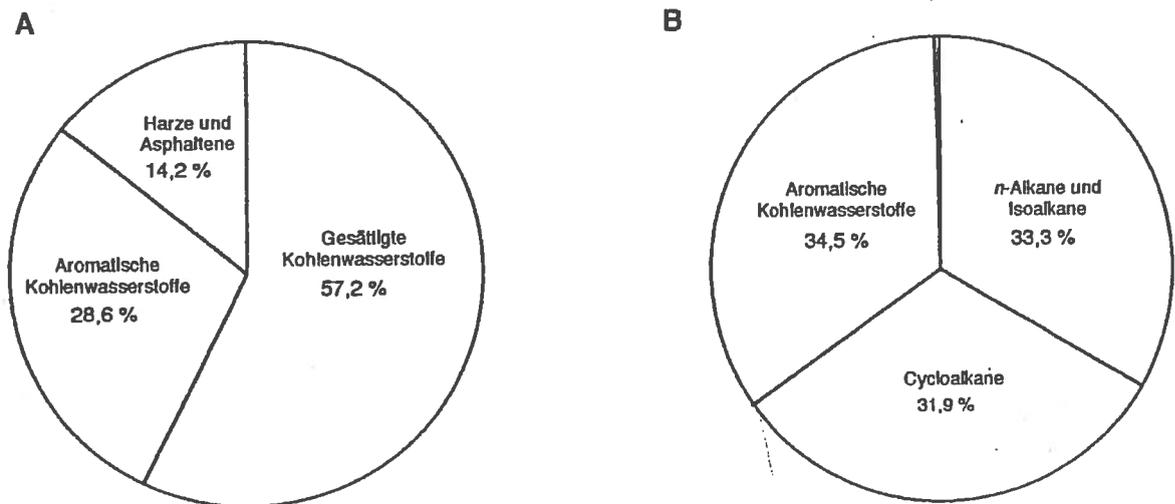


Abb. 8: Darstellung der Gesamtzusammensetzung von Rohöl (A) bzw. der reinen Kohlenwasserstofffraktion (B) als Durchschnittswerte aus 517 untersuchten Rohölen; in Anlehnung an Tissot und Welte (1984).

A.6.2 Entstehung von Erdöl

Das allgemein akzeptierte Modell zur Entstehung von Erdöl geht von einem biogenen Ursprung aus. Man nimmt an, daß Erdöl aus großen Mengen abgelagerter organischer Substanz (Landpflanzen und mariner Plankton) entstanden ist. Einen Großteil der organischen Substanz bildeten wahrscheinlich die sog. Stromatolithen. Als Stromatolithen werden Matten filamentöser Cyanobakterien bezeichnet, die ihre Blütezeit im Präkambrium hatten. Die bereits zuvor (siehe

A.3) kurz erwähnte Grünalge *Botryococcus braunii* hat vermutlich ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Erdölentstehung gespielt. Viele ölhaltige Sedimente enthalten Botryococcene, mehrfach ungesättigte verzweigte Kohlenwasserstoffe, die typisch für *Botryococcus braunii* sind. Eine Beteiligung der *Botryococcus braunii*-Wasserblüten wird insbesondere bei der Entstehung von Lagerstätten in Australien und Rußland vermutet (Poremba und Gunkel, 1994).

Das organische Material wurde in tektonischen Gräben wie beispielsweise der Nordsee oder dem Persischen Golf gefangen und gelangte dort durch die Überdeckung mit Sediment vor Jahrmillionen in tiefere Erdschichten. Dort war es von Sauerstoff abgeschlossen und hohem Druck und hohen Temperaturen ausgesetzt. Diese extremen Bedingungen in den Lagerstätten haben sicherlich zu einer Veränderung des abgelagerten organischen Materials geführt. Die Rolle von Mikroorganismen bei der Reifung (Maturation) des Erdöls, d. h. beispielsweise der Umwandlung der Lipide aus den Stromatolithen in die Kohlenwasserstoffe, ist noch nicht geklärt. Dennoch wird vermutet, daß es über Jahrmillionen auch durch die Aktivität von Bakterien und Pilzen zu einer Reifung der abgestorbenen Substanz über Humus zum reifen Erdöl kam (Rheinheimer, 1991).

Je nach Ursprung des organischen Materials unterscheiden sich die untersuchten Rohöle in ihrer Zusammensetzung. So sind beispielsweise Erdöle, die aus terrestrischem Material entstanden sind, reicher an *n*-Alkanen als Rohöle marinen Ursprungs, die reicher an zyklischen Verbindungen sind (Tissot und Welte, 1984). Neben der Herkunft des organischen Materials spielen aber auch die Bedingungen der Ablagerung eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung des resultierenden Erdöls (Blanc und Connan, 1993). Eine genauere Darstellung der Vorgänge bei der Erdölentstehung gibt Petrov (1987a).

A.6.3 Bakterielle Aktivitäten in Erdölreservoirs und Anlagen der Erdölindustrie

A.6.3.1 Geochemische Hinweise auf bakterielle Aktivität in Erdölreservoirs

Erdölreservoirs stellen extreme Bedingungen für mikrobielles Wachstum dar. In Lagerstätten, die in einer Tiefe von 2000 bis 4000 Metern liegen, herrschen Drücke von 20 bis 59 MPa bei Temperaturen zwischen 60 und 120°C. Die Salzkonzentrationen liegen meistens über 100 g NaCl pro l. Molekularer Sauerstoff ist nicht vorhanden (Donaldson et al., 1989). Dennoch gibt es recht eindeutige Hinweise, daß Erdöle in ihren Reservoirs bei Kontakt mit Wasser durch Mikroorganismen teilweise abgebaut wurden. Die Veränderungen des Erdöls, die auf mikrobielle Aktivitäten zurückgeführt werden, haben bis zu einer Temperatur von etwa 60°C stattgefunden (Connan et al., 1994). Mikrobielle Aktivität in Erdölreservoirs ist daran erkennbar, daß sich einige Rohöle hinsichtlich ihrer Kohlenwasserstoff-Zusammensetzung deutlich von als ursprünglich angesehenen Rohölen unterscheiden. In der geologischen Literatur findet man viele

Untersuchungen zur Veränderung der Zusammensetzung von Rohölen durch biologischen Abbau (Übersicht gibt Petrov, 1987b). In der Regel ist sowohl der Anteil der Alkanfraktion als auch der der Aromatenfraktion deutlich verringert. Harze und Asphaltene haben in diesen Erdölen einen signifikant größeren Anteil. Derart veränderte Rohöle haben einen geringeren ökonomischen Wert als ursprüngliche Rohöle.

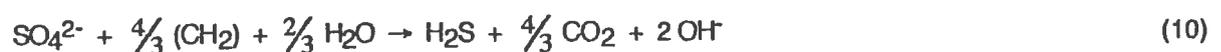
Erste Hinweise auf die möglicherweise beteiligten Mikroorganismen ergaben sich durch den Nachweis einer rezenten Bildung von Methan (Ekzertsev, 1960; Nazina et al., 1985) und Sulfid (Cord-Ruwisch et al., 1986; Ganahl und Kleinitz, 1983; Nazina et al., 1985; Rozanova und Nazina, 1982) in verschiedenen Ölfeldern. Teilweise wurde ausdrücklich ein Zusammenhang zwischen fortschreitender Wasserinjektion bei der Ölförderung und der gemessenen, langsam steigenden Sulfidkonzentration betont (Cord-Ruwisch et al., 1986).

Ein weiteres Indiz für die Aktivität sulfatreduzierender Bakterien in Erdöllagerstätten liefert die Diskriminierung des schwereren Isotops des Schwefels (^{34}S) gegenüber dem leichteren Isotop (^{32}S) durch bakterielle Sulfatreduktion. Bei abiotischen H_2S -Bildungsprozessen findet dagegen keine oder nur eine sehr geringe Isotopenfraktionierung statt (Schidlowski et al., 1983). Daher deutet man die Schwefelisotopenfraktionierung, d. h. die Anreicherung des leichteren ^{32}S -Isotops, als Zeichen für einen biologischen Ursprung. In vielen verschiedenen Erdöllagerstätten wurde eine starke Fraktionierung von Schwefelisotopen in H_2S gegenüber verbliebenem Sulfat gemessen. Diese Lagerstätten wiesen *in situ* Temperaturen bis 60°C auf (Nielsen et al., 1991). Damit ist zumindest in Lagerstätten bis 60°C die Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien während oder nach Beendigung der Reifung des Erdöls sehr wahrscheinlich.

Bei höheren Reservoirtemperaturen (ab etwa $80 - 120^\circ\text{C}$) liegt der Sulfidbildung vermutlich ein rein chemischer Prozeß zugrunde, wobei Sulfat und Sulfid durch Komproportionierung in elementaren Schwefel und Polysulfide überführt werden (8). Elementarer Schwefel und ebenso die genannten Polysulfide sind in der Lage, eine Oxidation von vielen organischen Molekülen zu bewirken. Selbst gesättigte Kohlenwasserstoffe können unter etwas drastischeren Bedingungen mit Schwefel unter Freisetzung von CO_2 und H_2S reagieren (9).



Der gesamte Prozeß (8 + 9) verläuft autokatalytisch mit H_2S sowohl als Katalysator als auch als Endprodukt (10)(Orr, 1974).



Eine weitere Quelle für die H_2S -Bildung in Erdöllagerstätten ist die thermische Spaltung schwefelhaltiger Komponenten des Öls (Orr, 1974).

A.6.3.2 Nachweis von anaeroben Mikroorganismen in Erdölförderanlagen und im Förderwasser verschiedener Ölfelder

Durch Verdünnung von Proben aus einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes in sog. MPN-Reihen in Mineralmedien mit verschiedenen organischen Substraten (z. B. Acetat, Lactat, Benzoat oder Butyrat + Capronat) wurde eine hohe Zellzahl von sulfatreduzierenden Bakterien, die u. a. den Gattungen *Desulfobacter* und *Desulfovibrio* ähnelten, gezeigt (Cord-Ruwisch et al., 1986; Cord-Ruwisch et al., 1987a; Cord-Ruwisch et al., 1987b). Aus dem Förderwasser eines Nordseeölfeldes vor Schottland wurden hyperthermophile sulfat- und schwefelreduzierende Archaeobakterien der Gattungen *Archaeoglobus*, *Thermococcus* und *Pyrococcus* isoliert (Stetter et al., 1993). Aus moderat thermophilen Anreicherungskulturen mit Förderwasser eines Nordseeölfeldes des norwegischen Sektors unter sulfatreduzierenden Bedingungen und organischen Substraten wie Lactat, Propionat, Butyrat oder einem Fettsäuregemisch wurden Arten der Gattung *Desulfotomaculum* isoliert (Rosnes et al., 1991a; Rosnes et al., 1991b). Desweiteren wurde aus diesem Erdölfeld das hyperthermophile sulfatreduzierende Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus* (Beeder et al., 1994) und das bislang unbekannte Bakterium *Thermodesulforhabdus norvegicus* (Beeder et al., 1995) isoliert. *Thermodesulforhabdus norvegicus* ist ein sulfatreduzierendes Eubakterium mit einem Temperaturoptimum bei 60°C und wächst beispielsweise mit Acetat, Lactat oder Fettsäuren. Aus einem kontinentalen Ölfeld bei Paris, in das noch kein externes Förderwasser injiziert worden war, wurden Isolate von *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermodesulfobacterium commune*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* und *Thermococcus litoralis* (L'Haridon et al., 1995), sowie des neuen moderat thermophilen, fermentativen Bakteriums *Thermotoga subterranea* (Jeanthon et al., 1995; L'Haridon et al., 1995) gewonnen. Eine andere Art der Gattung *Thermotoga*, *Thermotoga elfii*, wurde von Ravot et al. (1995) aus einem Ölfeld in Afrika gewonnen. Ein thermophiles sulfatreduzierendes Bakterium der neuen Gattung *Desulfacinum* wurde aus einem Nordseeölfeld isoliert (Rees et al., 1995). Dieses Bakterium, *Desulfacinum infernum*, hat ein Temperaturoptimum bei 60°C und wächst beispielsweise mit Acetat, Lactat, Propionat oder Fettsäuren als alleinigen organischen Substraten.

Mittels molekularbiologischer Methoden wurde das Vorhandensein von *Desulfovibrio* spp. in verschiedenen Öltanks und Ölpipelines gezeigt (Voordouw et al., 1990; Voordouw et al., 1991; Voordouw et al., 1992; Voordouw et al., 1993). Eine andere Arbeitsgruppe wies Arten der Gattung *Desulfobacter* mit Hilfe spezifischer Gensonden im Förderwasser und Injektionswasser eines Ölfeldes in Alaska nach (Brink et al., 1994).

A.6.3.3 Erklärungsansätze zur Herkunft und zum Wachstum anaerober Mikroorganismen in Ölfeldern und Anlagen der Erdölindustrie

Mit dem Nachweis von sulfatreduzierenden Bakterien in Erdöllagerstätten stellt sich auch die Frage nach der Herkunft dieser Mikroorganismen. Im Zuge der sekundären Erdölförderung läßt sich der Eintrag der Bakterien in Ölfelder leicht durch die Injektion von umgebendem Meerwasser erklären. Meerwasser kann trotz oxidischer Bedingungen lebensfähige sulfatreduzierende Bakterien enthalten. Auch hyperthermophile Mikroorganismen können in kaltem Meerwasser überleben und sogar eine jahrelange Inkubation bei 4°C in Gegenwart von Luftsauerstoff überstehen (Huber et al., 1990). In ursprünglichen Erdöllagerstätten erlauben vermutlich Verbindungen zum umgebenden Meerwasser über Risse in den umgebenden Gesteinsformationen ein Eindringen sulfatreduzierender Bakterien. Einige Autoren vertreten jedoch die Ansicht, daß Mikroorganismen seit der Bildung der Lagerstätten in diesen überdauert haben. In einigen Arbeiten wurde die Isolation von hyperthermophilen Archaeobakterien und thermophilen Eubakterien aus Erdölfeldern beschrieben, in die noch kein Meerwasser im Rahmen der sekundären Erdölförderung eingeleitet wurde (siehe A.6.3.2). Mit den aus einem solchen Ölfeld isolierten sporenbildenden *Desulfotomaculum* spp. wurde eine Sulfatreduktion noch bei Temperaturen bis zu 80°C und Drücken bis zu 30 MPa nachgewiesen. Die Sporen dieser Arten überdauerten sehr extreme Bedingungen (20 min bei 130°C), wie man sie auch in Lagerstätten findet (Rosnes et al., 1991a; Rosnes et al., 1991b).

Ein direkter Nachweis eines Zusammenhangs zwischen den beobachteten anaeroben Bakterien und dem biologischen Abbau des Erdöls fehlte bisher, da keines der Isolate aus den zuvor angeführten Arbeiten wesentliche Bestandteile des Erdöls als Substrate zu nutzen vermochte. Daher nahm man an, daß der primäre Angriff auf Komponenten des Erdöls durch aerobe Mikroorganismen erfolgt, während die aus den verschiedensten Erdölreservoirs und Erdölförderanlagen isolierten Anaerobier, in der Regel sulfatreduzierende Bakterien, auf Ausscheidungsprodukten aerober Mikroorganismen (Cord-Ruwisch et al., 1987a; Jobson et al., 1979; Nazina et al., 1985; Rozanova und Nazina, 1982; Shelton und Hunter, 1975) oder auf der abgestorbenen Zellmasse der aeroben Bakterien (Cord-Ruwisch et al., 1986) wuchsen. Der Eintrag von Sauerstoff in ursprünglich anaerobe Reservoirs erfolgte dabei vermutlich erst bei der sekundären Erdölförderung durch die Einleitung oxidischen Oberflächenwassers. Weitere Hypothesen zur Sulfidbildung waren ein Wachstum der Sulfatreduzierer auf polaren Substanzen der Harz- bzw. Asphaltfraktion des Erdöls (Cord-Ruwisch et al., 1986) oder auf natürlich vorkommenden Fettsäuren im Erdöl und Lagerstättenwasser (Beeder et al., 1995; Rosnes et al., 1991a; Rosnes et al., 1991b). Auch bei der Rohölförderung zugesetzte Chemikalien, wie beispielsweise das Lösungsmittel Methanol, das Polymer Xanthan, die als Chelatbildner eingesetzte Ascorbin- oder Zitronensäure, oder das Tensid Polyethylenglykol, stehen nach Umsetzung durch gärende Bakterien als Substrate für die Sulfatreduktion zur Verfügung (Cord-Ruwisch et al., 1986; Pini, 1991).

A.6.3.4 Rohöl als bakterielles Substrat unter anoxischen Bedingungen

Bereits vor etlichen Jahren wurden Arbeiten veröffentlicht, die durchaus ein direktes Wachstum von sulfatreduzierenden Bakterien auf Erdölbestandteilen in Betracht zogen. In anaeroben Anreicherungen mit Rohöl oder rohölhaltigen Harzen als Substrat wurde eine Bildung von Methan (Ekzertsev, 1960; Muller, 1957) oder Sulfid (Cord-Ruwisch et al., 1986; ZoBell und Prokop, 1966) beobachtet. In einer neueren Arbeit wurden hyperthermophile, sulfatreduzierende Anreicherungen bei 85°C und 102°C mit Rohöl als Substrat beschrieben (Stetter et al., 1993). Zwei sulfatreduzierende Isolate, *Archaeoglobus fulgidus* und *Thermodesulfobacterium commune*, wuchsen auf einer sterilen Öl-Wasser-Phase zur vier- bis fünffachen Zelldichte des Inokulums heran (L'Haridon et al., 1995). In keiner der erwähnten Arbeiten wurden jedoch die konkreten Wachstumssubstrate aus dem Erdöl nachgewiesen. In Laborkulturen wurde ein Wachstum der Isolate beispielsweise auf Lactat, H₂/CO₂ + Acetat oder komplexen Substraten wie Pepton oder verschiedenen Zellextrakten erreicht (Stetter et al., 1993; L'Haridon et al., 1995).

In jüngerer Zeit wurde in einigen Arbeiten die Verwertung von Substanzen, die bis dahin als inert unter anoxischen Bedingungen galten, unter strikt anoxischen, sulfatreduzierenden Bedingungen gezeigt. Dazu gehörten aromatische Substrate wie *p*-Cresol, Phenol (Bak und Widdel, 1986) sowie Toluol (Rabus et al., 1993) und auch gesättigte Kohlenwasserstoffe (Aeckersberg, 1989; Aeckersberg et al., 1991; Widdel, 1988). Damit erschien es durchaus möglich, daß strikt anaerobe Bakterien direkt wesentliche Bestandteile von Rohöl verwerten können. Diese Möglichkeit wurde daher auch in neueren Publikationen über die mikrobielle Verwertung von Rohöl als Substrat stärker berücksichtigt. Beispielsweise wurden zwei verschiedene Erdölreservoirs beschrieben, die deutlich einer mikrobiellen Veränderung unterlegen haben. In dem aus den Reservoirs geförderten Wasser wurden keine aeroben Bakterien gefunden und die Autoren zogen daher durchaus die Möglichkeit eines anaeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen aus Rohöl in Betracht (Connan et al., 1994). In einer parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Dissertation wurde das Wachstum einer Anreicherungskultur unter anoxischen, sulfatreduzierenden Bedingungen mit Rohöl als einziger Quelle organischer Substrate gezeigt. Gaschromatographische Untersuchungen des Erdöls nach dem Wachstum der Bakterien ergaben, daß die Alkanfraktion unverändert war, während die Anteile von Toluol und einigen in *ortho*- und *meta*-Position alkylsubstituierten Toluolen aus der Aromatenfraktion signifikant abgenommen hatten (Rabus, 1995). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war jedoch weder das Wachstum einer Reinkultur unter anoxischen sulfatreduzierenden Bedingungen auf Erdöl als einziger Quelle organischer Substrate noch die Verwertung von Alkanen aus Rohöl unter strikt anoxischen Bedingungen gezeigt.

A.6.3.5 Bedeutung der Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien in Anlagen der Erdölindustrie

Das Wachstum von sulfatreduzierenden Bakterien und die damit verbundene Schwefelwasserstoffbildung in Förderanlagen, Pipelines und Tanks der Erdölindustrie hat aus mehreren Gründen große wirtschaftliche Bedeutung erlangt.

Das Hauptproblem ist die anaerobe Korrosion von Eisen in den Anlagen, die zu großen wirtschaftlichen Verlusten führt. Als Hauptverursacher werden sulfatreduzierende Bakterien betrachtet, die mit Wasserstoff als Elektronendonator wachsen können. Der genaue Mechanismus der anaeroben Korrosion ist noch nicht vollständig verstanden. Der Beitrag der sulfatreduzierenden Bakterien liegt in der deutlichen Beschleunigung eines elektrochemischen Prozesses, der sogenannten kathodischen Depolarisierung (Hamilton, 1985; Widdel, 1990). Die in der anodischen Reaktion des Eisens freigesetzten Elektronen werden durch Protonen aus dem umgebenden Wasser aufgefangen. Noch hypothetisch ist die Annahme, daß bereits der entstehende atomare Wasserstoff und nicht erst H_2 durch Sulfatreduzierer verwertet werden kann und damit zu einer Beschleunigung der vorangegangenen Prozesse und somit zur Auflösung des Eisens führt (Widdel, 1990). Darüberhinaus wirkt das bei der Sulfatreduktion gebildete Sulfid durch Bildung von FeS ebenfalls stark korrosiv auf Eisen.

Neben der Korrosion sind auch unlösliche Sulfid-Präzipitate wie FeS in Lagerstätten- und Förderwasser ein großes Problem, da sie zu Verstopfungen von Ventilen führen oder die Porosität von erdöltragendem Gestein und damit die Förderleistung herabsetzen (Ganahl und Kleinitz, 1983). Desweiteren wird durch die H_2S -Bildung der Schwefelgehalt des gefördertten Erdöls erhöht und damit dessen Wert gemindert (Odom, 1993). Schließlich führt auch die Toxizität von Schwefelwasserstoff für den menschlichen Organismus zu Gefährdungen des Personals bei der Erdölförderung.

A.6.4 Mikrobielle Sanierung ölkontaminierter Standorte

Die Kontamination verschiedenster Umweltbereiche mit Erdöl ist ein heutzutage viel diskutiertes Problem. Sehr viel Aufmerksamkeit erregen die verschiedenen Tankerunglücke, bei denen punktuell sehr große Mengen Rohöl freiwerden. Dennoch machen diese Verschmutzungen nur einen Bruchteil (etwa 10 %) der insgesamt pro Jahr freigesetzten Mengen (etwa $33,7 \cdot 10^8$ l/a) aus (Prince, 1992). Einen sehr großen Anteil haben neben natürlichen Austritten häusliche und industrielle Abfälle, Undichtigkeiten in Pipelines und Öltanks, Unfälle auf Ölplattformen sowie der normale Schiffsverkehr.

Durch Tankerunglücke auf See entstehen lokal-relevante Verunreinigungen immensen Ausmaßes, deren Bekämpfung große Summen an Geldern verschlingt. Der Bekämpfung von

Ölunfällen auf See sind allerdings natürliche Grenzen gesetzt. Ein großer Anteil der Kontamination entzieht sich sehr schnell dem menschlichen Zugriff. So verschwinden etwa 30 - 50 % des Erdöls innerhalb weniger Tage durch die Verdunstung leichtflüchtiger Komponenten. Aromatische Substanzen lösen sich zum Teil im Wasser. Ein Teil der Kontamination gerät durch Anheftung an Partikel und anschließendes Absinken auf den Meeresboden (Poremba und Gunkel, 1994). Zur Bekämpfung der verbleibenden Ölmengen wurden verschiedenste Maßnahmenkataloge unterschiedlicher Effektivität entwickelt. Eine der bislang effektivsten Maßnahmen auf See ist das Abziehen des an der Oberfläche schwimmenden Öls durch Spezialschiffe, wobei allerdings nur ein Teil der Kontamination entfernt werden kann. Das Ausbringen von chemischen Bekämpfungsmitteln, sog. Dispergatoren, ist aufgrund der hohen Giftigkeit der ausgebrachten Substanzen eine sehr umstrittene Maßnahme. Gleiches gilt für mineralische Absinkmittel, da sie zum verstärkten Absinken toxischer Substanzen auf den Meeresboden und damit zur Vergiftung der Fauna in diesem Gebiet führen. Das Beimpfen der Ölteppiche mit speziell im Labor gezüchteten, zum Teil gentechnisch veränderten Mikroorganismen wurde ebenfalls erprobt. Es zeigte sich jedoch in den meisten Fällen, daß die an dem jeweiligen Standort natürlich vorkommenden Mikroorganismen beim Abbau erfolgreicher waren, vermutlich deswegen, weil sie bereits durch die Standortbedingungen selektiert waren. Beim verheerenden Tankerunglück der Exxon Valdez 1989 im Prince William Sound, Alaska, wurden mit großem Erfolg verschiedene Düngerkombinationen eingesetzt, die die natürliche Mikrobenpopulation durch gezieltes Einbringen von limitierenden Nährstoffen wie beispielsweise Phosphor und Stickstoff förderten (Prince, 1992).

Ölunfälle an Land haben für den Menschen häufig größere direkte Bedeutung, da die Kontaminationen das Grundwasser erreichen und Trinkwasser verunreinigen können. Andererseits sind derartige Unfälle besser zu bekämpfen als auf hoher See. Heutzutage hat sich insbesondere die mikrobielle Reinigung von Böden und Wasser durchgesetzt (Schulz-Berendt, 1993; Zeyer, 1993). Das Prinzip der Sanierung ist auch hier in der Regel die Wachstumsförderung der natürlicherweise am Standort vorkommenden, kohlenwasserstoffabbauenden Mikroorganismen durch Bereitstellung der optimalen äußeren Bedingungen, wie Nährstoffversorgung und Regulierung von Temperatur und Feuchtigkeit (Schulz-Berendt, 1993). Dabei stellt die ständige Versorgung der zu sanierenden Böden oder Gewässer mit Sauerstoff einen erheblichen Kostenfaktor dar. Es gibt daher Ansätze, den Abbau von Erdölbestandteilen durch anaerobe Mikroorganismen durch Einbringen von Nitrat zu fördern (Al-Bashir et al., 1990; Gersberg et al., 1989; Zeyer, 1993).

Diese Entwicklungen im Sanierungsbereich zeigen die Notwendigkeit, potentiell an den Abbauprozessen beteiligte Bakterien und deren Physiologie zu kennen. In jüngerer Zeit wurden verschiedene denitrifizierende Reinkulturen bekannt, die im Erdöl in relevanten Mengen vorkommende Substanzen wie Toluol, *m*-Xylol oder Ethylbenzol unter anoxischen Bedingungen

mineralisieren (Altenschmidt und Fuchs, 1991; Dolfing et al., 1990; Evans et al., 1991; Fries et al., 1994; Rabus und Widdel, 1995; Schocher et al., 1991). Eine neuere Arbeit zeigt, daß diese Substrate von verschiedenen Reinkulturen unter denitrifizierenden Bedingungen direkt aus Erdöl verwertet werden können (Rabus, 1995). Eine Verwertung von Alkanen unter anoxischen, denitrifizierenden Bedingungen konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden (vgl. A.5.3.4).

A.7 Zielsetzungen der Arbeit

1. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren zwei Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien bekannt, die anaerob auf *n*-Alkanen wuchsen. Es handelte sich dabei um die Stämme Hxd3 und Pnd3 (Aeckersberg, 1994). Da diese Stämme auf Alkanen nur sehr langsam wuchsen (Verdopplungszeit etwa 4 - 5 Tage), sollten zur Erleichterung weiterführender Untersuchungen zum Mechanismus der anaeroben Alkanoxidation weitere Bakterienstämme mit kürzerer Generationszeit isoliert und charakterisiert werden.
2. Aufgrund theoretischer Überlegungen ist eine anaerobe Alkanoxidation mit Nitrat als Elektronenakzeptor möglich und sollte wegen des positiveren Redoxpotentials mehr Energie und damit vermutlich kürzere Generationszeiten und einen höheren Zellertrag liefern als bei der Verwendung von Sulfat als Elektronenakzeptor. Die Existenz dieses neuen Stoffwechselltyps sollte durch Anreicherung und Isolierung nitratreduzierender Bakterien mit *n*-Alkanen in anaeroben Kulturen gezeigt werden.
3. Die physiologische Charakterisierung der neuen Bakterienisolate sollte auch im Vergleich mit entsprechenden Versuchen an den Stämmen Hxd3 und Pnd3 erste Hinweise auf den Weg der anaeroben Alkanoxidation liefern. Schwerpunkte sollten hierbei die Untersuchung der Substratspektren, Induktionsstudien sowie die Untersuchung der Zellfettsäuren bilden.
4. Die Möglichkeit der anaeroben Verwertung von Rohöl wurde häufig kontrovers diskutiert. Da Alkane ein Hauptbestandteil von Rohöl sind, sollte mit Hilfe der neuen Isolate mit mikrobiologischen und analytischen Methoden der Nachweis geführt werden, daß Teile der aliphatischen Kohlenwasserstofffraktion von Erdöl unter anoxischen Bedingungen durch Reinkulturen sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien abgebaut werden.

B. Material und Methoden

B.1 Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "reinst" bzw. "zur Analyse" und wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Bio-Rad (München), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Dickflüssiges und dünnflüssiges Paraffin hatten DAB9 Qualität und stammten von der Firma Henry Lamotte (Bremen). Pristan und 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan stammten von der Firma Aldrich (Steinheim).

Die nachstehenden Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Ritterhude) geliefert: CO (99,97 %), CO₂ (99,995 %), H₂ (99,999 %), He (99,999%), N₂ (99,999 %), N₂O (99 %), synthetische Luft (frei von Kohlenwasserstoffen), H₂/CO₂-Gemisch (80/20 v/v), N₂/CO₂-Gemisch (90/10 v/v), N₂/CO₂-Gemisch (80/20 v/v).

B.2 Mikrobiologische Methoden

B.2.1 Probenmaterial und Mikroorganismen

Eine Reinkultur des alkanoxidierenden Sulfatreduzierers Stamm Pnd3, sowie eine thermophile sulfatreduzierende Anreicherungskultur mit Decan und eine daraus teilweise gereinigte Kultur wurden freundlicherweise von Dr. Frank Aeckersberg zur Verfügung gestellt. Als Inokulum für die thermophile Anreicherungskultur hatte Sediment aus dem Guaymas Becken (Golf von Kalifornien/Mexiko) gedient (Aeckersberg, 1994).

Eine nitratreduzierende Anreicherungskultur mit Hexadecan, die mit oxischem Schlamm der Kläranlage Lintel (bei Osterholz-Scharmbeck) beimpft worden war, stammte von Dr. Jens Harder.

Als Inokulum für weitere Anreicherungskulturen nitratreduzierender, alkanverwertender Bakterien wurde ein homogenisiertes Gemisch aus Schlämmen der Weser und aus verschiedenen Gräben in Bremen eingesetzt.

Eine Kultur des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196Aa wurde uns freundlicherweise von Prof. B. Traxler (University of Rhode Island, USA) überlassen.

Reinkulturen folgender Stämme für Vergleichszwecke wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig) erhalten:

Desulfonema limicola DSM 2076^T

Desulfomicrobium baculatum (vormals *Desulfovibrio baculatus*) DSM 4028^T

Desulfovibrio desulfuricans DSM 1926

B.2.2 Kulturmedien

B.2.2.1 Stammlösungen für Medien

Spurenelementlösung I (sauer)

HCl (37 %ig)	8,5 ml/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2100,0 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190,0 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144,0 mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100,0 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36,0 mg/l
H ₃ BO ₃	30,0 mg/l
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24,0 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2,0 mg/l

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

Spurenelementlösung II (komplexiert)

Anstelle von HCl wurden der Spurenelementlösung II zunächst 5,2 g/l Dinatrium-EDTA zugegeben. Das (konzentrierte) EDTA in kleinem Volumen zu Beginn bewirkt, daß sich Flocken ausgefallener Fe(III)-Verbindungen auflösen. Anschließend wurden die Salze wie für Spurenelementlösung I eingewogen. Der pH-Wert wurde mit NaOH-Lösung unter Rühren auf 6,5 eingestellt.

Selenit-Wolframat-Lösung

NaOH	400,0 mg/l
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	8,0 mg/l
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	6,0 mg/l

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Durch Reaktion der alkalischen Lösung mit Glas können Ausfällungen entstehen, welche die Verwendbarkeit der Lösung jedoch nicht beeinträchtigen.

Vitamingemisch I (8 Komponenten)

2-Mercaptoethansulfonsäure, Natriumsalz	250,0 mg/l
Pyridoxin-Hydrochlorid	150,0 mg/l
Nicotinsäure	100,0 mg/l
Calcium-D(+)-Pantothenat	50,0 mg/l
4-Aminobenzoessäure	40,0 mg/l
Folsäure	40,0 mg/l
Liponsäure	15,0 mg/l
D(+)-Biotin	10,0 mg/l

Die Vitamine wurden in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,1, gelöst und sterilfiltriert.

Vitamingemisch II (5 Komponenten)

Pyridoxin-Hydrochlorid	150,0 mg/l
Nicotinsäure	100,0 mg/l
Calcium-D(+)-Pantothenat	50,0 mg/l
4-Aminobenzoesäure	40,0 mg/l
D(+)-Biotin	10,0 mg/l

Die Vitamine wurden in 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,1, gelöst und sterilfiltriert.

Thiaminlösung

Thiaminchlorid-Hydrochlorid 100,0 mg/l

Das Vitamin wurde in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 3,7, gelöst und sterilfiltriert.

Riboflavinlösung

konz. Essigsäure 1,0 ml/l
Riboflavin 25,0 mg/l

Das Vitamin wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Vitamin-B₁₂-Lösung

Cyanocobalamin 50,0 mg/l

Das Vitamin wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Alle Vitaminlösungen wurden über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 μm) sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

Natriumbicarbonatlösung (1 M)

NaHCO_3 84 g/l

Die Bicarbonatlösung wurde durch Einleiten von CO_2 gesättigt und in Portionen von 30 ml in 50 ml Flaschen unter CO_2 -Atmosphäre autoklaviert.

Natriumnitratlösung (1 M)

NaNO_3 85 g/l

Die Lösung wurde mehrmals mit N_2 be- und entgast und unter N_2 -Atmosphäre autoklaviert.

Natriumsulfidlösung (1 M; Reduktionsmittel)

Na₂S·9H₂O 240 g/l

Es wurden möglichst große und klare Kristalle von Na₂S·9H₂O verwendet. Diese wurden mit destilliertem Wasser gespült, um Oxidationsprodukte des Sulfids von der Oberfläche zu entfernen, gewogen und in bidestilliertem Wasser unter N₂-Atmosphäre gelöst. Danach wurde die Lösung in Portionen von 30 ml auf Serumflaschen (50 ml) verteilt und sofort unter N₂-Begasung mit Butylstopfen verschlossen. Die Gefäße wurden autoklaviert und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Durch Reaktion der alkalischen Lösung mit Glas können Ausfällungen entstehen, die aber die Verwendbarkeit der Lösung nicht beeinträchtigen.

Ascorbatlösung (1 M; Reduktionsmittel)

L(+)-Ascorbinsäure 176 g/l

Die Ascorbinsäure wurde unter N₂-Begasung auf Eis in bidestilliertem Wasser aufgelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und in speziellen Gefäßen mit Seitenarm (Abb. 9 B) unter N₂ aufbewahrt.

Natriumdithionit (5 %ig; Reduktionsmittel)

Natriumdithionit 50 g/l

Da gelöstes Dithionit durch Luftoxidation schnell zu Bisulfit oxidiert wird, wurde das Salz in sterilem, anoxischem H₂O in einem Spezialgefäß (Abb. 9 A) gelöst und unter N₂-Atmosphäre bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Lösung wurde bis ca. eine Woche nach der Herstellung verwendet.

Dithionit diente in den meisten Wachstumsversuchen mit sulfatreduzierenden Bakterienstämmen als zusätzliches Reduktionsmittel. Kurz vor dem Beimpfen wurden den Ansätzen pro l Medium 0,3 - 0,5 ml der sterilen Na₂S₂O₄-Stammlösung zugesetzt.

Suppline

Pepton und Hefeextrakt wurden als 10 %ige (w/v) Stammlösungen angesetzt und autoklaviert.

Resazurin

Resazurin 10 mg/10 ml

Das Resazurin wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und dunkel aufbewahrt. Resazurin wurde in einer Endkonzentration von 1 mg/l als Redoxindikator zugesetzt.

B.2.2.2 Herstellung von Medien für anaerobe Kulturen

Die hitzestabilen Salze der Medien (Tabelle 1, Teil a) wurden in bidestilliertem Wasser gelöst (Destamat, Heraeus) und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert (Widdel, 1980). Die Medien wurden nach dem Autoklavieren bei ca. 120°C unter einer Stickstoffatmosphäre in einem Wasserbad abgekühlt. Anschließend wurden die hitzelabilen Komponenten der Medien (Tabelle 1, Teil b) aus sterilen Stammlösungen unter Begasung mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) zugegeben. Der gewünschte pH-Wert wurde mit 1 M NaOH oder 2 M HCl eingestellt. Mit schwachem Überdruck (10 kPa) wurde das Medium anschließend mittels einer Abfüllglocke in Glasflaschen randvoll abgefüllt und anoxisch verschlossen. Kulturgefäße mit Gasraum wurden mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972) begast und verschlossen. Durch den Gehalt an CO₂ wurde der pH-Wert des Mediums aufrechterhalten. Die angegebene Zusammensetzung der Medien und Stammlösungen wurde in Anlehnung an Widdel (1992) zum Teil geringfügig verändert.

B.2.2.3 Herstellung von Medien für aerobe Kulturen

Aerobe Anzuchten in Mineralmedien

Zur Untersuchung des Wachstums der denitrifizierenden Bakterienstämme in oxischen Medien wurden Mineralmedien in der in Tabelle 1 aufgeführten Zusammensetzung, jedoch mit 0,6 g/l KH₂PO₄ hergestellt. Den Kulturen wurde kein Nitrat als Elektronenakzeptor zugesetzt. Bei Inkubation unter Luftatmosphäre wurden die Medien nicht mit Bicarbonat gepuffert, da sich ansonsten der pH-Wert des Mediums durch Entweichen von CO₂ stark verändern würde. Zur Inkubation in einer CO₂-haltigen Atmosphäre wurde den Medien 10 mM bzw. 20 mM NaHCO₃ bei 3 - 4 % bzw. 6 - 8 % (v/v) CO₂ zugesetzt. Die Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt, die etwa zu einem Zehntel ihres Volumens mit Medium gefüllt und mit Wattestopfen bzw. bei CO₂-haltiger Atmosphäre mit einem Gummistopfen verschlossen waren. Flüssigkulturen wurden entweder durch Schütteln belüftet oder im Ruhezustand inkubiert. Für Agarplatten wurde dem Medium 12 g/l Agar zugefügt.

Tabelle 1: Medienzusammensetzung für sulfatreduzierende und nitratreduzierende Bakterien

	Für sulfatreduzierende Bakterien [pro l]			Für nitratreduzierende Bakterien [pro l]		
	Süßwasser- medium	Salzwasser- medium	Synthetisches Meerwassermedium	Medium für Stamm TD3		
Zusätze vor dem Autoklavieren						
Na ₂ SO ₄	4,0 g	4,0 g	-	4,0 g	-	-
KH ₂ PO ₄	0,2 g	0,2 g	0,2 ^a g	0,2 g	0,5 g	0,5 g
NH ₄ Cl	0,25 g	0,25 g	0,25 ^a g	0,25 g	0,3 g	0,3 g
NaCl	1,0 g	20,0 g	26,4 g	20,0 g	-	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4 g	3,0 g	5,7 g	9,8 g	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	6,8	-	0,5 g	0,5 g
KCl	0,5 g	0,5 g	0,66 g	0,5 g	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g	0,15 g	1,47 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
KBr	-	-	0,09 g	-	-	-
NaHCO ₃	-	-	0,19 g	-	-	-
Zusätze nach dem Autoklavieren						
Spurenelementlösung I	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Spurenelementlösung II	-	-	-	-	1 ml	1 ml
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-	-
Vitamingemisch I	1 ml	1 ml	-	-	1 ml	1 ml
Vitamingemisch II	-	-	-	-	1 ml	1 ml
Thiaminlösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Riboflavinlösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Natriumbicarbonatlösung	30 ml	30 ml	20 ml	30 ml	30 ml	30 ml
Natriumsulfidlösung	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Natriumnitratlösung	-	-	-	-	10 ml	10 ml
Ascorbatlösung	-	-	-	-	4 ml	4 ml
eingestellter pH-Wert	6,7 - 6,9	6,7 - 6,9	6,7 - 6,9	6,7 - 6,9	6,7 - 6,9	7,2

^aBei der Herstellung von synthetischem Meerwassermedium wurden diese Salze separat autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Aerobe Anzuchten auf Vollmedien

Zur Stammhaltung von *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196Aa wurden Vollmedium-Agarplatten folgender Zusammensetzung verwendet:

Pepton	5,0 g/l
Fleischextrakt	3,0 g/l

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser aufgelöst und der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurden 12 g/l Agar zugefügt und das Medium autoklaviert.

B.2.2.4 Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen

Kohlenwasserstoffe

Gasförmige Kohlenwasserstoffe:

Gasförmige Kohlenwasserstoffe wurden mehrfach mit dem jeweiligen Kohlenwasserstoff gespülten Spritze über einen lösungsmittelresistenten Sterilfilter (regenerierte Cellulose, Porengröße 0,1 μm ; Schleicher und Schuell, Dassel) in bereits verschlossene und mit einem N_2/CO_2 -Gemisch (90/10 v/v) begaste Kulturgefäße durch den Stopfen eingespritzt. Die Gase wurden bis zu einem Partialdruck von 60 kPa (entspricht etwa 60 ml pro 100 ml Gasraum) zugegeben. Die Ansätze waren zur Hälfte mit Medium gefüllt und wurden flach liegend inkubiert, um eine möglichst große Flüssigkeitsoberfläche zu gewährleisten.

Leicht flüchtige Kohlenwasserstoffe:

Leicht flüchtige Kohlenwasserstoffe wurden durch spezielle Membranen, die gegen Lösungsmittel resistent sind (regenerierte Cellulose, Porengröße 0,1 μm ; Schleicher und Schuell, Dassel), sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in Schraubdeckelröhrchen mit Teflondichtungen. Diese Kohlenwasserstoffe wurden als verdünnte Lösungen in inerten Trägerphasen in Flüssigkulturen eingesetzt. Als Trägerphasen dienten dickflüssiges Paraffin, 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan) oder 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (im folgenden als HMN abgekürzt).

Schwer flüchtige Kohlenwasserstoffe:

Schwer flüchtige Kohlenwasserstoffe wie Hexadecan wurden in speziellen Gefäßen mit Seitenarm, die eine Begasung des Gefäßes und gleichzeitige Entnahme ermöglichen (Abb. 9 A), entgast und unter N_2 -Atmosphäre autoklaviert und aufbewahrt. Diese Kohlenwasserstoffe wurden den Kulturen unverdünnt zugesetzt.

Bei Raumtemperatur feste Substrate wie Octadecan wurden vor der Zugabe kurz vorsichtig erwärmt. Diese Substrate wurden den Kulturgefäßen vor der Beimpfung zugegeben, um ein mögliches Absterben der Zellen durch die Temperaturerhöhung zu vermeiden.

Carbonsäuren

Salze von Carbonsäuren wurden als 1 M Stammlösungen aus den freien Säuren und NaOH hergestellt, auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und anschließend autoklaviert oder sterilfiltriert.

Langkettige, bei Raumtemperatur feste Säuren (ab ca. C₁₀) wurden als 0,1 M Stammlösungen hergestellt, indem die freie Säure und eine äquivalente Menge an NaOH so lange im siedenden Wasserbad erhitzt und gerührt wurde, bis die Lösung klar und homogen war. Dann wurde das Endvolumen mit bidestilliertem Wasser eingestellt und die Lösungen autoklaviert. Bevor die langkettigen Carbonsäuren dem Medium zugesetzt werden konnten, mußte die beim Abkühlen als weiße Masse erstarrte Lösung wiederum im siedenden Wasserbad verflüssigt werden. Danach wurde die klare, homogene Lösung dem Medium heiß zugesetzt. Um auch bei dem stark salzhaltigen Medium für die Sulfatreduzierer eine möglichst feine Verteilung der bei der Zugabe ausfallenden Erdalkalisalze ("Kalkseifen") zu erreichen, wurden die geschmolzenen Natriumsalze der Carbonsäuren zunächst in salzärmeres Süßwassermedium (B.2.2.2./Tabelle 1) gegeben. Dieses wurde dann durch Zusatz steriler Stammlösungen von 5 M NaCl und 2 M MgCl₂·6H₂O in das Salzwasser- oder Meerwassermedium überführt. Da sich die Flocken der neutralisierten Säure am Boden der Kulturgefäße sammelten, wurden diese zur Vergrößerung der Substratoberfläche und zur Verringerung der Diffusionsstrecken flach liegend inkubiert.

Alkohole

Die kurzkettigen, löslichen Alkohole wurden als 0,5 M bis 1 M Stammlösungen in bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Längerkettige, schlecht wasserlösliche aber flüssige Alkohole wurden unverdünnt sterilfiltriert und den Kulturen in einer inerten Trägerphase (HMN) verdünnt zugesetzt. Die unlöslichen, festen Alkohole 1-Hexadecanol und 2-Hexadecanol wurden durch autoklavieren sterilisiert und den Kulturen in heißem Zustand zupipettiert, so daß sich Substratflocken bildeten.

Aldehyde

Die verwendeten Aldehyde wurden als Reinsubstanzen sterilfiltriert und den Kulturen in einer inerten Trägerphase (HMN) verdünnt zugegeben.

Rohöl

Rohöl wurde in speziellen Gefäßen mit Seitenarm (Abb. 9 B) entgast und unter einer N₂-Atmosphäre autoklaviert und verwahrt.

Sonstige Substrate

Zucker und Aminosäuren wurden als 1 M Stammlösungen hergestellt und sterilfiltriert.

Wasserstoff und Kohlendioxid

Ansätze, die auf Wachstum mit H₂ getestet werden sollten, wurden nach der Hungate-Technik mit einem H₂/CO₂-Gemisch (80/20 v/v) steril begast. Als Kohlenstoffquelle wurde diesen Ansätzen Acetat (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt.

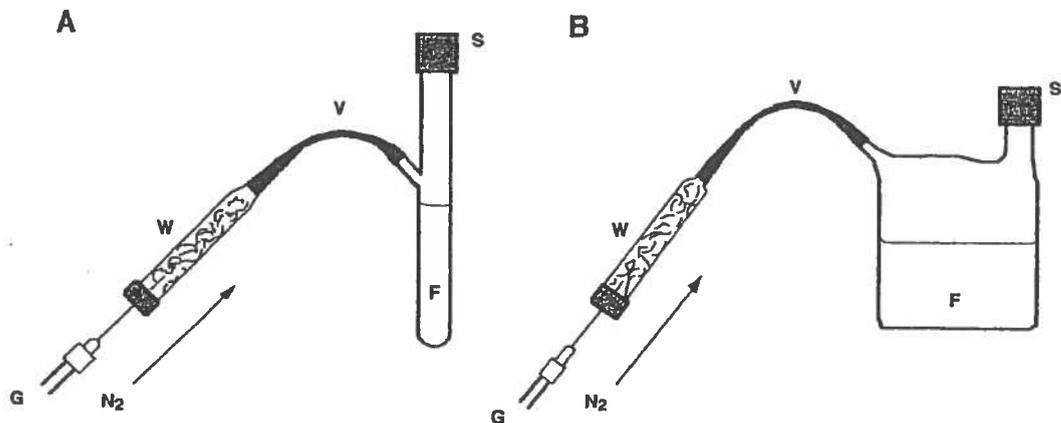


Abb. 9: Spezialgefäße zur sterilen Aufbewahrung und Entnahme von (A) Dithionit-Lösung, Alkanen und Alkenen bzw. (B) der in dieser Arbeit verwendeten Trägersubstrate (Paraffin, Pristan und HMN), Rohöl und Ascorbat unter einer Stickstoffatmosphäre. Die Flüssigkeiten (F) wurden in einem Glasgefäß mit Schraubdeckel (S), der eine Teflondichtung enthielt, aufbewahrt. Über eine seitliche Öffnung ist das Gefäß durch eine Schlauchverbindung (V) mit einer Begasungsvorrichtung (G) verbunden. Die Begasungsvorrichtung ermöglicht die Begasung des Gefäßes mit N₂ über einen sterilen Wattenfilter (W).

B.2.3 Kultivierung von Mikroorganismen

B.2.3.1 Kultivierung von sulfatreduzierenden Bakterien

Die Mikroorganismen wurden in 20 ml Röhrcchen (Pyrex) oder flachen Flaschen (Meplats-Flaschen; 100, 250 und 500 ml), die zu 4/5 mit Medium gefüllt waren, kultiviert. Dem Medium wurde, sofern nicht anders vermerkt, Natriumdithionit als zusätzliches Reduktionsmittel zugesetzt (B.2.2.1). Anschließend wurde der Elektronendonator in der zuvor (B.2.2.4) angegebenen Weise zugesetzt und die Kultur beimpft. Das Inokulum betrug in der Regel 5 % des

Kulturvolumens. Der Gasraum wurde mit N_2/CO_2 (90/10 v/v) nach der Hungate-Technik begast und die Kultur mit Butyl-Stopfen verschlossen.

Bei Kulturflaschen mit Kohlenwasserstoffen oder anderen Substraten, die in einer Trägerphase zugegeben wurden, erfolgte die Inkubation schräg liegend mit dem Stopfen unten, um einerseits eine möglichst große Substratoberfläche zu erreichen und andererseits den Kontakt des Substrats mit dem Stopfen zu vermeiden. Die Ansätze wurden ruhig liegend bei den für die betreffenden Stämme erforderlichen Temperaturen inkubiert und erst nach einer mehrere Tage dauernden Anwachsphase ein- bis zweimal am Tag kurz (2 s) mit der Hand geschüttelt.

B.2.3.2 Kultivierung von nitratreduzierenden Bakterien

Die Kultivierung nitratreduzierender Bakterien erfolgte ebenfalls in 20 ml Röhrchen oder flachen, zu 4/5 mit Medium gefüllten Flaschen. Das Medium enthielt in der Regel 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor und 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel. Der Elektronendonator wurde wie zuvor angegeben (B.2.2.4) zugesetzt und die Kultur mit etwa 1 % des Kulturvolumens beimpft. Die Begasung erfolgte mit N_2/CO_2 (90/10 v/v) nach der Hungate-Technik. Die Kulturen wurden mit Butyl-Stopfen verschlossen und bei 28°C inkubiert.

B.2.4 Isolierung von Bakterien

B.2.4.1 Agarverdünnungsreihen

Agar zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen wurde vor der Verwendung in destilliertem Wasser gewaschen, um lösliche Verunreinigungen zu entfernen. Dazu wurde 3,3 g Agar (Difco) in etwa 300 ml destilliertem Wasser für 15 min gerührt und der Überstand nach anschließender Sedimentation des Agars verworfen. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt und der Agar-Bodensatz nach dem letzten Durchgang in 100 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der Agar wurde in einem siedenden Wasserbad vorsichtig geschmolzen und in 3 ml Portionen auf Reagenzgläser (160 x 16 mm) verteilt. Die mit Alukappen verschlossenen Reagenzgläser wurden anschließend autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen wurden jeweils 6 dieser vorbereiteten Agarröhrchen in einem siedenden Wasserbad erhitzt, bis der Agar vollständig geschmolzen war, und anschließend in einem 60°C Wasserbad flüssig gehalten. In den Agar wurden dann 6 ml von auf 41°C vorgewärmtem Medium mit Substrat pipettiert und unverzüglich in ein 41°C warmes Wasserbad gestellt. Die Alukappen der Reagenzgläser wurden durch schwarze Gummistopfen ersetzt. Das erste Agarröhrchen wurde mit einem Tropfen aus der zu verdünnenden

Anreicherungskultur angeimpft, das Röhrchen mit dem Stopfen verschlossen und einmal kurz umgeschwenkt. Ein Tropfen aus diesem Ansatz wurde nun in das nächste Agarröhrchen gegeben und kurz umgeschwenkt. Daraus wurde wiederum ein Tropfen in das nächste Röhrchen überführt. In dieser Weise wurde verfahren, bis 6 - 7 Verdünnungsstufen vorlagen. Die beimpften Agarröhrchen wurden anschließend zum Abkühlen sofort in ein Eiswasserbad gestellt. Nach der Begasung der Röhrchen mit N_2/CO_2 (90/10 v/v) wurden sie umgedreht und bei derselben Temperatur wie die vorangegangene Anreicherung inkubiert.

B.2.4.2 Ausstriche in Gelrite *Bottle Plates*

Zur Herstellung von anoxischen Ausstrichen nach der *Bottle Plate*-Technik wurde eine 1,6 %ige Gelrite-Lösung (Scott, Fiskeville/USA) in bidestilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert. Diese Lösung wurde anschließend bei 60°C flüssig gehalten. Das Medium für Gelrite *Bottle Plates* wurde in doppelter Konzentration angesetzt. Für Ansätze mit Hexadecan als Substrat wurde ca. 0,4 ml Hexadecan auf 100 ml Medium gegeben und mittels Ultraschall emulgiert. Hierzu wurde die mit 70 % Ethanol sterilisierte Mikrospritze des Ultraschall-Gerätes (Sonoplus HD 70, Bandelin, Berlin) auf die Oberfläche der Hexadecan-Phase aufgesetzt und zweimal ein Impuls über 1 s (55 W, 20 kHz) gegeben. Das Medium mit dem emulgierten Substrat wurde anschließend in einem Wasserbad auf ca. 40°C vorgewärmt. 5 ml der flüssigen Gelrite-Lösung und 5 ml des Mediums mit Substrat wurden in einer vorgewärmten *Bottle Plate* (Bellco, USA) gemischt und anschließend liegend auf einem Eisbad abgekühlt. Die *Bottle Plates* wurden möglichst zügig mit N_2/CO_2 (90/10 v/v) begast und mit einem Stopfen verschlossen (Abb. 10). Nach dem völligen Erkalten des Mediums wurde die Probe mit einer am Ende rundgeschmolzenen, hakenförmig gebogenen, sterilen Pasteurpipette in "Zickzack"-Linien ausgestrichen, die *Bottle Plate* wieder begast und liegend bei 28°C inkubiert.

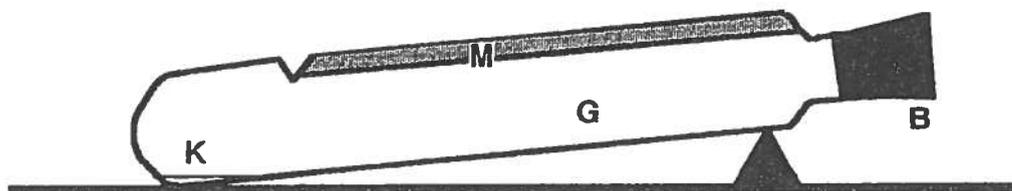


Abb. 10: *Bottle Plate* zur Isolierung von Stamm HdN1. Die mit Butylstopfen (B) verschlossene Glasflasche enthielt eine Gasatmosphäre (G) aus N_2/CO_2 (90/10 v/v). Das Gelritemedium (M) verlief in einer flachen Schicht bis zu einer speziellen Aufwölbung im Glas. Die Gefäße wurden leicht schräg inkubiert, so daß das Kondenswasser (K) beim Umdrehen und Mikroskopieren hinter der Aufwölbung blieb.

B.2.4.3 Reinheitskontrollen

Zur Reinheitskontrolle wurden die Kulturen nach mehreren Isolierungsschritten zunächst im Phasenkontrastmikroskop auf ein einheitliches Erscheinungsbild der Zellen geprüft. Ein weiterer Hinweis auf Reinheit einer Kultur ergab sich aus der Einheitlichkeit des Kolonietyps in Agarverdünnungsreihen bzw. auf Gelrite *Bottle Plates*. In Wachstumsversuchen mit Medien, denen 0,5 g/l Hefeextrakt und zusätzlich 5 mM Pyruvat, 5 mM Glucose oder 5 mM Acetat zugesetzt wurden, wurde auf das Auftreten von andersartigen Zelltypen geprüft.

B.2.4.4 Erhaltung von Stammkulturen

Stammkulturen aller Stämme wurden in 20 ml Röhren gehalten und alle 4 - 6 Wochen überimpft. Alle Stämme konnten über mehrere Passagen auf Fettsäuren kultiviert werden, ohne die Fähigkeit des anaeroben Wachstums auf Alkanen zu verlieren. Sicherheitshalber wurden die Stammkulturen zusätzlich noch auf Alkanen als Substraten gehalten.

B.2.5 Wachstumsversuche zur physiologischen Charakterisierung

Alle Wachstumsversuche wurden, sofern nicht anders vermerkt, unter anoxischen Bedingungen in 20 ml Röhren durchgeführt.

B.2.5.1 Bestimmung der Temperaturoptima

Zur Bestimmung der Temperaturoptima wurden jeweils mehrere Kulturen eines Bakterienstammes auf gleiche Weise beimpft. Sofern nicht anders vermerkt, wurden Alkane als organische Substrate verwendet. Die Inkubation erfolgte in Parallelansätzen in Brutschränken mit unterschiedlicher Temperatur. Das Wachstum der Kulturen wurde an aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet und verglichen.

B.2.5.2 Bestimmung der pH-Optima

Zur Bestimmung der pH-Optima wurden unterschiedliche Mengen steriler 1 M Na_2CO_3 oder 1 M HCl in jeweils 50 ml Medium pipettiert und auf diese Weise unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Das Medium wurde anschließend auf drei 20 ml Röhren verteilt und auf gleiche Weise mit

Substrat versetzt und beimpft. Sofern nicht anders vermerkt, wurden Alkane als Substrate zugesetzt. Anschließend wurde der pH-Wert in einem der Röhrchen gemessen. Während der Inkubation wurde das Wachstum der Kulturen beobachtet und verglichen. Der pH-Wert wurde nochmals am Ende des Wachstums gemessen.

Bei der Untersuchung des pH-Optimums des thermophilen Stammes TD3 wurde der pH-Wert des Mediums zunächst bei Raumtemperatur gemessen und anschließend nochmals nach mehrstündiger Äquilibration von CO₂ zwischen Flüssigkeit und Gasphase bei 60°C.

B.2.5.3 Substrattests

Zur Bestimmung eines Substratspektrums wurden pro Substrat mindestens 2 Parallelansätze mit zumeist unterschiedlicher Substratkonzentration hergestellt. Die Kontrollansätze wurden ohne Zugabe von Substrat hergestellt.

B.2.5.4 Ermittlung der Vitaminbedürfnisse

Zur Ermittlung der Vitaminbedürfnisse wurden die Bakterienstämme zunächst in mehreren Passagen auf vitaminfreiem Medium kultiviert. Gegenüber Kontrollen mit Vitaminzusatz wurde auf eine eventuelle Abnahme in der Wachstumsgeschwindigkeit und verringerte Zelldichte geachtet. Wurde solch ein schwächeres Wachstum beobachtet, so wurden anschließend mit diesen Kulturen als Inokula parallele Folgekulturen angeimpft, denen jeweils nur ein Vitamin fehlte. Die Kulturen wurden unter diesen Bedingungen jeweils weiter überimpft, bis bei dem Fehlen eines einzelnen Vitamins kein Wachstum mehr erfolgte. Die dabei als notwendig erkannten Vitamine wurden dann Kulturen als einzige Vitamine zugegeben. Das Wachstum wurde im Vergleich mit Kontrollen beobachtet.

B.2.5.5 Wachstumsversuche für stöchiometrische Analysen

Wachstumsversuche für stöchiometrische Analysen wurden in speziellen Flachgefäßen (Abb. 11) durchgeführt, die einige Vorzüge gegenüber normalen Kulturflaschen besaßen. Die nach unten gerichtete Öffnung der Gefäße war in Bezug auf das Kulturvolumen (110 - 120 ml) sehr klein. Die Grenzfläche der Alkanphase zum Medium war in diesen Gefäßen sehr groß, was den Zugang der Bakterien zum Substrat begünstigte. Das Medium wurde unter Begasung mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) in die senkrecht gestellten Flachgefäße gefüllt. Die Gefäße wurden mit Butylsepten und Schraubverschluß geschlossen und auf einen flachen Styroporblock gelegt, so daß die Öffnung

nach unten zeigte. Die weitere Handhabung der Flachgefäße erfolgte stets in dieser Position. Um einen Kontakt zwischen Alkanphase und Stopfen zu vermeiden, wurde das Substrat mit sterilen, mit N_2 gespülten Mikroliterspritzen durch die Septen in die Ansätze injiziert, so daß es nicht mit dem Septum in Berührung kam. Nachdem eventuelle Reste von Sauerstoff nach einer Vorinkubationszeit mit dem Reduktionsmittel reagiert hatten, wurde das Inokulum ebenfalls über die Septen in die Kultur gegeben.

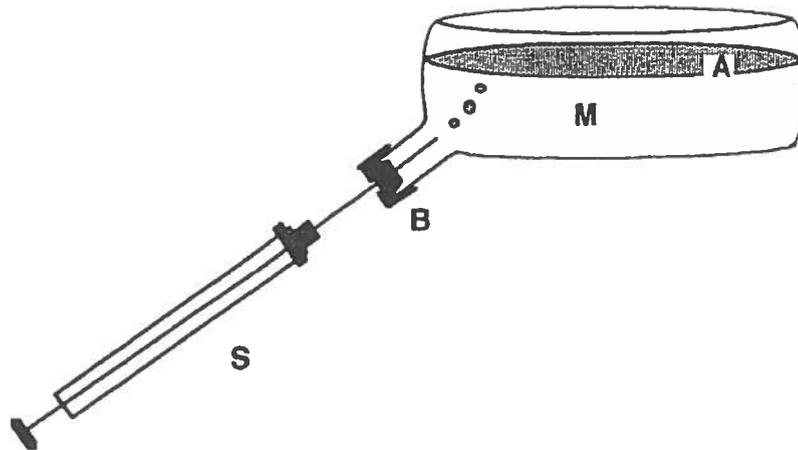


Abb. 11: Spezialgefäß zur Kultivierung von Bakterien für stöchiometrische Analysen. Das verwendete Flachgefäß besaß eine nach unten gerichtete Öffnung, die mit Butylseptum (B) und Schraubdeckel verschlossen wurde. Die hydrophoben Substrate wurden mit einer Mikroliterspritze (S) durch das Septum in das Medium (M) eingespritzt, so daß die Alkanphase (A) keinen Kontakt zum Septum hatte.

B.2.6 Herstellung von Zellsuspensionen

Zellsuspensionen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit zwei denitrifizierenden Neuisolaten hergestellt. Die Zellen zur Herstellung von Suspensionen wurden über mindestens zwei Passagen in anoxischem, mit Ascorbat reduziertem Medium auf dem entsprechenden Substrat kultiviert. Die Kulturen wurden jeweils in der exponentiellen Wachstumsphase unter strikt an-oxischen Bedingungen im Stickstoffzelt geerntet. Auf Kohlenwasserstoffen gewachsene Kulturen wurden über einen Scheidetrichter von der hydrophoben Phase getrennt und in Zentrifugenbecher überführt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 5000 rpm für 30 min bei 4°C (Beckman J2-MC mit JA-10-Rotor), um die Zellen nicht zu schädigen. Das Zellpellet wurde mit Medium gewaschen und anschließend in mit Ascorbat reduziertem Medium (1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf mehrere Glasröhrchen (10 ml) verteilt. Außerhalb des Stickstoffzeltes wurde die Gasphase der Ansätze gegen eine N_2/CO_2 -Atmosphäre (90/10 v/v) durch Begasung nach der Hungate-Technik ausgetauscht und das jeweilige Substrat zugegeben. Die Röhrchen mit den Suspensionen wurden ruhig liegend bei 28°C

inkubiert. Die Probenentnahme zur Nitratanalyse erfolgte durch die Butylsepten mit einer mit N_2/CO_2 (90/10 v/v) gespülten Spritze.

B.2.7 Nachweis von Enzymaktivitäten

B.2.7.1 Herstellung von Rohextrakten unter anoxischen Bedingungen

In 500 ml Flaschen angezogene, gut gewachsene Kulturen von Stamm TD3 auf Capronat mit einem Gesamtvolumen von ca. 2 l wurden in der Anaerobenkammer in verschließbare Zentrifugenbecher überführt und bei 6.000 rpm (Beckman J2-MC mit JA-10-Rotor) für 25 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in der Anaerobenkammer in insgesamt 50 ml Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 10.000 rpm (Beckman J2-MC mit SS 34-Rotor) für 20 min bei 4°C abzentrifugiert und in der Anaerobenkammer in ca. 4 ml reduziertem Aufschlußpuffer resuspendiert.

Ein vorgekühlter Druckzylinder der French-Press (American Instruments Co. Inc., Silver Spring, USA) wurde in der Anaerobenkammer mit der Zellsuspension beschickt und verschlossen. Der Zellaufschluß erfolgte anoxisch bei 900 psi (ca. 6,3 MPa) und wurde einmal wiederholt. Mikroskopisch wurde überprüft, ob der Zellaufschluß erfolgreich war. Die aufgeschlossenen Zellen wurden ständig im Eiswasser gekühlt und in der Anaerobenkammer in Zentrifugenbecher überführt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 20.000 rpm (Beckman J2-MC mit SS 34-Rotor) für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, im folgenden als Extrakt bezeichnet, wurde in einer 10 ml Serumflasche unter N_2 -Atmosphäre im Eiswasser aufbewahrt.

Reduzierter Aufschlußpuffer:

Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5 mM
DTE	2 mM

B.2.7.2 Aktivitätsbestimmungen von Enzymen unter anoxischen Bedingungen

Rohextrakte für enzymatische Tests wurden frisch hergestellt und ständig in Eiswasser gekühlt. Die verwendeten Puffer und Stammlösungen wurden ebenfalls frisch hergestellt und durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 von Sauerstoff befreit.

Die Messungen wurden in 1,0 ml Glasküvetten mit runder Öffnung durchgeführt, die mit einem Gummistopfen verschlossen und mit N₂ gespült worden waren. In die anoxischen Küvetten wurde 1 ml des jeweiligen anoxischen Reaktionspuffers mit einer mit N₂ gespülten Spritze gegeben und der Gasraum anschließend, sofern erforderlich, durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit dem für den jeweiligen Test notwendigen Gas (H₂ bzw. CO) gefüllt. Da der Reaktionspuffer kein Reduktionsmittel enthielt, wurde den Ansätzen jeweils 1 - 4 µl 100 mM Natriumdithionit-Lösung zugesetzt und durch Umschwenken verteilt. Dies wurde wiederholt, bis der Reaktionspuffer die durch teilweise Reduktion des Methylviologens gebildete hellblaue Farbe behielt. Alle Enzymaktivitäten wurden photometrisch bei 578 nm als Reduktionsrate von Methylviologen ($\epsilon_{578} = 9,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in einem UV-1202 UV-VIS-Spektrophotometer (Shimadzu, Duisburg) bei Raumtemperatur bestimmt. Als Einheit der Enzymaktivität (U) wurde der Umsatz von 1 µmol Elektronendonator oder 2 µmol Methylviologen pro min definiert.

Messung von CO-Dehydrogenase-Aktivität

(CO-Methylviologen-Oxidoreduktase (Daniels et al., 1977))



Reaktionspuffer:

Tris-HCl, pH 8,1	100 mM
Methylviologen	5 mM

Die Gasphase enthielt CO. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 - 10 µl Rohextrakt gestartet, nachdem sich die Basislinie auf einen konstanten Absorptionswert eingestellt hatte.

Messung von 2-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität

(2-Ketoglutarat-Methylviologen-Oxidoreduktase (Zeikus et al., 1977))



Reaktionspuffer:

Tris-HCl, pH 8,1	100,0 mM
Methylviologen	5,0 mM
2-Ketoglutarat	10,0 mM
Coenzym A	0,1 mM

Die Gasphase des Reaktionsansatzes enthielt N₂. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 - 20 µl Rohextrakt gestartet, nachdem sich die Basislinie auf einen konstanten Absorptionswert eingestellt hatte.

Messung von Formiat-Dehydrogenase-Aktivität

(Formiat-Methylviologen-Oxidoreduktase (Spormann und Thauer, 1988))



Reaktionspuffer:

Tris-HCl, pH 8,1	100 mM
Methylviologen	5 mM
Na-Formiat	10 mM

Die Gasphase des Reaktionsansatzes enthielt N_2 . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 - 20 μl Rohextrakt gestartet, nachdem sich die Basislinie auf einen konstanten Absorptionswert eingestellt hatte.

Messung von Hydrogenase-Aktivität

(H_2 -Methylviologen-Oxidoreduktase (Zeikus et al., 1977))



Reaktionspuffer:

Tris-HCl, pH 8,1	100 mM
Methylviologen	5 mM

Die Gasphase des Reaktionsansatzes enthielt H_2 . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 - 20 μl Rohextrakt gestartet, nachdem sich die Basislinie auf einen konstanten Absorptionswert eingestellt hatte.

B.2.7.3 Nachweis von Katalase-Aktivität

Der Nachweis von Katalase-Aktivität wurde mit einer 3 %igen wäßrigen H_2O_2 -Lösung geführt. Ein Katalase-positiver Organismus war nach Überschichten einer Kolonie des zu untersuchenden Bakterienstammes auf einer Agarplatte bzw. in einer Gelrite *Bottle Plate* mit dieser Lösung durch sofort einsetzende Gasbläschenbildung erkennbar.

B.2.7.4 Nachweis von Desulfovirdin

Desulfovirdin (Bisulfit-Reduktase) ist ein grünes Pigment, das häufig zur taxonomischen Einordnung von *Desulfovibrio*-Arten herangezogen wird. Der Nachweis dieses Pigments erfolgte mittels eines einfachen Fluoreszenz-Tests (Postgate, 1984). Dazu wurden etwa 30 - 50 ml einer Bakterienkultur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eine Petrischale gegeben. Das Pellet wurde leicht mit etwas Medium verdünnt und anschließend ein Tropfen einer 1 M NaOH-Lösung auf die Zellen pipettiert. Betrachtete man die Zellen anschließend sofort im langwelligen UV-Licht (302 nm), so wurde beim Vorhandensein von Desulfovirdin eine deutliche rötliche Fluoreszenz des vom Eisen befreiten Sirohäms (d. h. des Sirohydrochlorins) sichtbar. Zur Kontrolle wurden die Desulfovirdin-positiven Arten *Desulfovibrio desulfuricans* und *Desulfonema limicola*, sowie die Desulfovirdin-negative Art *Desulfomicrobium baculatum* (*Desulfovibrio baculatus*) mitgetestet.

B.3 Analytische Methoden

B.3.1 Qualitativer Schnellauchweis von Schwefelwasserstoff

Der qualitative Schnellauchweis von Schwefelwasserstoff wurde mit einer 5 mM CuSO₄-Lösung in 50 mM HCl durchgeführt (Cord-Ruwisch, 1985). Dazu wurden 0,25 ml der zu untersuchenden Probe in 1 ml der CuSO₄-Lösung pipettiert. Die Probe wurde direkt in das Reagenz hineingegeben, um Luftkontakt und dabei mögliches Entweichen von flüchtigem H₂S zu vermeiden. Nach dem Mischen der Probe mit dem Reagenz bildete sich bei Vorhandensein von Schwefelwasserstoff umgehend braunes, anfangs kolloidales CuS, welches nach wenigen Minuten in Form brauner Flocken ausfiel. Anhand der Intensität der Braunfärbung sofort nach Zugabe der Probe im Vergleich zu einer Kontrolle war eine grobe Abschätzung der Sulfidkonzentration in den Kulturen möglich.

B.3.2 Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff

Das Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Schwefelwasserstoff (Cline, 1969) über die Bildung von Methylenblau wurde leicht modifiziert.

Reagenzien

Lösung A: Konzentrierte Zinkacetat-Lösung

Zinkacetat·2H ₂ O	20,0 g/l
Essigsäure (100 %)	1,0 ml/l

Die Komponenten wurden in destilliertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Lösung B: 0,2 %ige Dimethyl-*p*-phenylendiamin-Lösung

konz. H ₂ SO ₄	200 ml/l
Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiammonium-dichlorid	2 g/l

200 ml konzentrierte Schwefelsäure wurden langsam in einem Eisbad in 500 ml destilliertes Wasser eingerührt. Der abgekühlten verdünnten Schwefelsäure wurden 2 g Dimethyl-*p*-phenylendiammonium-dichlorid zugesetzt. Danach wurde im Meßzylinder mit destilliertem Wasser auf 1000 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf das 2,5fache Volumen verdünnt.

Lösung C:

Eisen(III)-ammoniumsulfat·12H ₂ O	100 g/l
konz. H ₂ SO ₄	20 ml/l

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt und vor Gebrauch mit destilliertem Wasser auf das 50fache Volumen verdünnt.

Durchführung der Bestimmung

In ein kleines Reagenzglas wurden folgende Komponenten pipettiert:

- 1 ml Lösung A
- 2 - 20 µl Probe (10 - 100 nmol H₂S pro Ansatz)
- 1 ml dest. H₂O
- 1 ml Lösung B, 1 : 2,5 verdünnt
- 1 ml Lösung C, 1 : 50 verdünnt

Die Probe wurde dem verschlossenen Kulturgefäß über den Stopfen mit einer Mikroliterspritze entnommen und in die Zinkacetatlösung gegeben. Um das Entweichen von flüchtigem Schwefelwasserstoff zu vermeiden, wurde die Spitze der Spritze dabei direkt in die Lösung getaucht. Die Ansätze wurden jeweils nach der Zugabe der einzelnen Komponenten gut gemischt. Die Zugabe von Lösung C erfolgte möglichst zügig nach der Zugabe von Lösung B.

Anschließend wurden die Ansätze im Dunkeln bei Raumtemperatur ebensolange wie die Proben der Eichkurve (ca. 20 min) inkubiert. Die Extinktion wurde bei 670 nm gemessen.

Die Eichkurven wurden mit einem Na₂S-Standard erstellt. Zur Herstellung des Standards wurde ein Na₂S·9H₂O-Kristall zur Entfernung von Oxidationsprodukten kurz mit destilliertem Wasser gespült. Der Kristall wurde gewogen und sofort in einem Meßkolben in 1 l sauerstofffreiem, destilliertem Wasser unter einer N₂-Atmosphäre gelöst. Die Na₂S-Lösung wurde nach dem Auflösen des Kristalls unter Begasung mit N₂ auf 100 ml Flaschen verteilt, unter N₂-Atmosphäre mit einem Stopfen verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

B.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung in Zellextrakten wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Bei einem Testvolumen von 1 ml wurden zu 0,8 ml einer in destilliertem Wasser verdünnten Probe ($\leq 0,5 \mu\text{g}$ Protein) 0,2 ml der Coomassie-Reagenz-Lösung (Bio-Rad, München) zugegeben und gut gemischt. Nach 15 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

B.3.4 Photometrische Bestimmung von Ammonium

Der quantitative Nachweis von Ammonium erfolgte nach der Methode von Marr et al. (1988) über die Bildung von Indophenol.

Reagenzien

Lösung A:

Phenol	30,0 g/l
Na-Nitroprussid	0,03 g/l

Lösung B:

NaOH	20,0 g/l
NaClO (13 %)	20,0 ml/l

Beide Lösungen wurden vor einer Analyse frisch angesetzt.

Durchführung der Bestimmung

In ein großes Reagenzglas wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

10 ml H₂O
10 - 50 µl Probe (< 100 nM NH₄⁺ pro Ansatz)
1 ml Lösung A
1 ml Lösung B

Nach der Zugabe von Lösung A wurden die Ansätze gut durchmischt. Nach anschließender Zugabe von Lösung B und erneutem Mischen wurden die Ansätze für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 635 nm gemessen.

B.3.5 Nitrat- und Nitrit-Bestimmung durch Ionenchromatographie

Die quantitative Bestimmung von Nitrat und Nitrit erfolgte an einer Sykam (Gilching) HPLC-Anlage mit einer A09 Anionenaustauschersäule (3 x 125 mm) und einem UV-Detektor. Die Säulentemperatur betrug 65°C. Der Eluent bestand aus einer 70 mM NaCl-Lösung mit einer Flußrate von 1 ml/min. Die quantitative Bestimmung von Nitrat und Nitrit bei 220 nm ist mit dieser Methode in Süßwasserproben bis zu einer Konzentration von 50 µM möglich. Die Elutionszeiten betragen 1,8 min für Nitrit und 2,5 min für Nitrat.

B.3.6 Nachweis von Phenyl-substituierten Carbonsäuren durch Ionenchromatographie

Die qualitative Bestimmung von Benzoat und weiteren Phenyl-substituierten Carbonsäuren erfolgte mit einer HPLC-Anlage der Firma Sykam (Gilching). Zur Auftrennung dieser aromatischen Verbindungen wurde eine Sphaerisorb ODS2 *Reversed Phase* Säule (4,6 x 250 mm) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 25°C bei einem Druck von etwa 9,2 bis 9,4 MPa. Die Detektion erfolgte mit einem *Fast Scanner* Durchflußphotometer. Als Elutionsmittel diente eine Lösung von 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in destilliertem Wasser. Bei einer Flußrate von 1 ml/min eluierte Benzoat mit einer Retentionszeit von ca. 6,6 min, Phenylacetat nach ca. 6,2 min, Phenylpropionat nach ca. 9,0 min, Phenylbutyrat nach ca. 13,4 min und Phenylcapronat nach ca. 14,3 min.

B.3.7 N₂- und N₂O-Bestimmung durch Gaschromatographie

N₂ und N₂O wurden an einem GC-8A Gaschromatographen (Shimadzu, Duisburg) mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor nachgewiesen. Die Auftrennung erfolgte mittels einer Poraplot Q

Kapillarsäule (3 mm x 2 m) bei 40°C. Helium diente als Trägergas mit einer Flußrate von 16 ml/min. N₂ eluierte nach 0,7 min, N₂O nach 2,4 min.

B.3.8 Gaschromatographische Analyse von Kohlenwasserstoffen

B.3.8.1 Decan- und Hexadecan-Bestimmung

Decan und Hexadecan aus Wachstumsansätzen wurden mit Hexan aus den Kulturen extrahiert und quantitativ mittels eines Autosystem Gaschromatographen (Perkin Elmer, Hannover) bestimmt. Zur Trennung wurde eine PVMS/54 *Permaphase* Kapillarsäule verwendet. Trägergas war N₂ mit einer Flußrate von 3 ml/min und einem Split von 10 ml/min. Als Detektor diente ein FID. Das Brenngas war H₂ (50 ml/min) in synthetischer Luft (420 ml/min). Das Probenvolumen betrug 1 µl. HMN bzw. Pristan wurden in den Wachstumsansätzen als interner Standard eingesetzt.

Temperaturprogramm (20 min):

Injektortemperatur		220°C
Ofentemperatur 1	5 min	110°C isotherm
Temperaturerhöhung		15°C / min
Ofentemperatur 2	8 min	215°C isotherm
Detektortemperatur		280°C

n-Decan eluierte nach 6,6 min, HMN nach 11,6 min, *n*-Hexadecan nach 15,2 min und Pristan nach 17,2 min.

B.3.8.2 Parallele Analyse von *n*-Hexadecan, 1-Hexadecen und 1-Hexadecanol

Zur parallelen Bestimmung von *n*-Hexadecan, 1-Hexadecen und 1-Hexadecanol in Zellextrakten von Stamm HdN1 wurde ähnlich verfahren wie bei der Decan- und Hexadecan-Bestimmung (B.3.8.1). Lediglich das Temperaturprogramm wurde folgendermaßen verändert:

Temperaturprogramm (25 min):

Injektortemperatur		220°C
Ofentemperatur 1	5 min	110°C isotherm
Temperaturerhöhung		10°C / min
Ofentemperatur 2	9 min	220°C isotherm
Detektortemperatur		280°C

Die Retentionszeiten betragen für HMN 12,8 min, für *n*-Hexadecan 16,9 min, für 1-Hexadecen 18,7 min und für 1-Hexadecanol 22,3 min.

B.3.8.3 Parallele Analyse von *n*-Decan, 1-Decen, Decanal, 1-Decanol und *trans*-1,4-Dimethylcyclohexan

Zur parallelen Bestimmung dieser Substanzen in HMN aus Wachstumskulturen des Stammes OcN1 wurde wie zuvor (B.3.8.1) beschrieben verfahren, mit der Ausnahme, daß H₂ als Trägergas fungierte. Der Trägergasfluß war 1,5 ml/min mit einem Split von 30 ml/min. Das Brenngas war H₂ (50 ml/min) in synthetischer Luft (420 ml/min). Das Temperaturprogramm wurde wie folgt verändert:

Temperaturprogramm (11 min):

Injektortemperatur	220°C
Ofentemperatur 1	5 min 100°C isotherm
Temperaturerhöhung	15°C / min
Ofentemperatur 2	2 min 160°C isotherm
Detektortemperatur	280°C

Das als interner Standard verwendete *trans*-1,4-Dimethylcyclohexan eluierte nach 2,3 min, 1-Decen nach 3,8 min, *n*-Decan nach 3,9 min, Decanal nach 7,8 min, 1-Decanol nach 8,8 min und HMN nach 9,8 min.

B.3.9 Analyse der Zellfettsäuren

Kulturen zur Bestimmung von Zellfettsäuren wurden in 500 ml Ansätzen gezogen, die für mindestens zwei Passagen auf dem gleichen Substrat gewachsen waren. Die Zellen wurden nach Beendigung des Wachstums durch Zentrifugation (8000 rpm, 30 min; Beckman J2-MC mit JA-10-Rotor) geerntet und sofort weiterbehandelt oder bei -20°C gelagert. Die Zellfettsäuren wurden als Methylester gaschromatographisch bestimmt.

Veresterung und Extraktion der Zellfettsäuren (Sasser, 1990)

Verseifung: Ungefähr 40 mg Zellmaterial wurden in ein 7 ml Röhrchen mit Teflon-Schraubdeckel gegeben. Dann wurden 1,0 ml Reagenz 1 zugesetzt, die Röhrchen mit dem Schraubdeckel verschlossen und 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die

Röhrchen auf einem Vortex-Mixer 5 - 10 s kräftig geschüttelt und weitere 25 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Röhrchen wurden in einem Wasserbad bei Raumtemperatur abgekühlt.

Veresterung: Den abgekühlten Röhrchen wurden 2 ml Reagenz 2 zugesetzt. Die verschlossenen Röhrchen wurden für 10 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in einem Eiswasserbad schnell abgekühlt. Zeit und Temperatur müssen bei diesem Schritt genau eingehalten werden.

Extraktion: Nach Zugabe von 1,25 ml Reagenz 3 zu den abgekühlten Röhrchen wurden diese für 10 min permanent gründlich durchmischt. Danach wurde die wäßrige (untere) Phase verworfen.

Reinigung: Der verbliebenen organischen Phase wurden ungefähr 3 ml Reagenz 4 zugegeben, worauf die Röhrchen für 5 min gründlich durchmischt wurden. Nach anschließender Phasentrennung wurden etwa 2/3 der organischen Phase in ein verschraubbares Fläschchen (GC-Vial) pipettiert und mit Teflon-Deckel verschlossen.

Lösungen

Reagenz 1 (Verseifung):

NaOH	45 g
Methanol	150 ml
dest. H ₂ O	150 ml

Reagenz 2 (Veresterung):

HCl (6 N)	325 ml
Methanol	275 ml

Reagenz 3 (Extraktion):

Hexan	200 ml
Methyl-tert.-Butylether	200 ml

Reagenz 4 (Reinigung der Probe):

NaOH	10,8 g
NaCl	240 g
dest. H ₂ O	ad 900 ml

Analyse der Methylester der Zellfettsäuren mittels Gaschromatographie

Die Methylfettsäuren wurden qualitativ mittels eines Autosystem Gaschromatographen (Perkin Elmer, Hannover) bestimmt. Zur Trennung wurde eine OV351-Kapillarsäule (0,32 mm x 25 m) verwendet. Das Trägergas war N₂ mit einem Gasfluß von 3 ml/min und einem Split von 10 ml/min. Als Detektor diente ein FID. Das Brenngas war ein Gemisch aus H₂ (50 ml/min) und synthetischer Luft (420 ml/min). Das Probenvolumen betrug jeweils 1 µl.

Temperaturprogramm (20 min):

Injektortemperatur		250°C
Ofentemperatur 1	8 min	170°C isotherm
Temperaturerhöhung		2°C / min
Ofentemperatur 2	2 min	210°C isotherm
Detektortemperatur		270°C

Die Identifikation der Fettsäuremethylester erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen bekannter Standards (Sigma, München).

B.3.10 Analyse von Erdölproben

Die Fraktionierung von Erdöl und anschließende chromatographische Auftrennung der aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstofffraktion wurde freundlicherweise von Dr. H. Wilkes, Jülich, durchgeführt. Dazu wurden die Fraktionen durch *Medium Pressure* Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt (Radke et al., 1980) und anschließend an einem HP 5890 Gaschromatographen (Hewlett Packard, Waldbronn) mit einer Ultra 1 *Fused Silica* Kapillarsäule (0,21 mm x 50 m) analysiert. Die Ofentemperatur startete bei 90°C für 3 min und stieg dann mit 3°C pro min auf 310°C an.

B.3.11 Analyse von Polyhydroxyalkanoaten

Die Analyse von Polyhydroxyalkanoaten wurde freundlicherweise von Dr. A. Steinbüchel, Göttingen, durchgeführt. Dazu wurden gefriergetrocknete Zellen zur Überführung der Hydroxyfettsäuren und Fettsäuren in Methylester einer schwefelsauren Methanolyse unterzogen. Die Methylester wurden anschließend über einen Gaschromatographen mittels einer Kapillarsäule getrennt und per FID detektiert. Als Standards dienten Methylester aller 3-Hydroxyfettsäuren von C₃ bis C₁₂.

B.4 Molekularbiologische Methoden

B.4.1 Präparation genomischer DNA

Zur Präparation von DNA für anschließende PCR wurden 15 ml einer Kultur abzentrifugiert (8.000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8, resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Cup überführt, mit der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurde die Suspension für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann 1 min bei 40°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde 5-mal wiederholt. Anschließend wurden die Zelltrümmer in der Eppendorffzentrifuge (10.000 rpm, 10 min) abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die DNA und konnte bei -20°C gelagert werden.

B.4.2 PCR-Amplifikation von rRNA-Genen für DGGE-Analysen

Für eine DGGE-Analyse wurde ein 550 bp Fragment des 16S rRNA-Gens mittels PCR aus der Präparation der genomischen DNA amplifiziert. Die verwendeten Primer (Primer A: GM5F-GC-clamp; Primer B: DS907-reverse) wurden für einen hochkonservierten Bereich der 16S rRNA synthetisiert (Muyzer et al., 1995a; Muyzer et al., 1995b). Das PCR-Produkt besaß einschließlich der sogenannten GC-Klammer des Primers A eine Größe von 590 bp. Die PCR-Reaktion wurde in einem 50 µl Ansatz in einem PHC-3 Thermocycler (Techne Inc., USA) durchgeführt. Der PCR-Ansatz in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bestand aus folgenden Komponenten:

PCR-Puffer, 10fach konzentriert	5,0 µl
dNTP-Mix	4,0 µl
Primer A	0,5 µl
Primer B	0,5 µl
DNA-Präparation (siehe B.4.1)	1,0 µl
steriles Wasser	38,0 µl

Dieser Ansatz wurde gut gemischt, kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma, München) überschichtet. Der PCR-Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt und das Programm mit Zyklus 1 gestartet:

- 5 min 95°C (Denaturierung)
- 1 min 80°C (*Hot Start*)
- 1 min 65°C (*Annealing*)
- 3 min 72°C (Elongation)

Während des *Hot Start*-Schrittes wurde 1 μ l Super Taq DNA-Polymerase (0,5 Units) zugegeben. In den folgenden Zyklen fiel der *Hot Start*-Schritt aus, der Denaturierungsschritt wurde auf 1 min verkürzt und in jedem zweiten Zyklus wurde die *Annealing*-Temperatur um 1°C gesenkt, bis 55°C erreicht waren. Es folgten 9 Zyklen mit einer *Annealing*-Temperatur von 55°C, wobei im letzten Zyklus der Elongationsschritt 10 min betrug. Anschließend wurden die Proben auf 15°C abgekühlt.

Stammlösungen (in sterilem, destilliertem Wasser)

PCR-Puffer, 10fach konzentriert:

KCl	500 mM
Tris-HCl, pH 9	100 mM
MgCl ₂	15 mM
Gelatine	0,1 %
Triton X-100	1,0 %

dNTP-Lösung:

dATP	2,5 mM
dTTP	2,5 mM
dCTP	2,5 mM
dGTP	2,5 mM

B.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA wurde per Agarosegelelektrophorese analytisch aufgetrennt. Da die Fragmente eine Größe von etwa 600 bp besaßen, wurde ein 1,5 %iges Gel in TBE-Puffer mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in dest. H₂O verwendet, welches in eine Agaroseflachgel-Apparatur (Bio-Rad, München) gegossen wurde. 5 μ l der PCR-Probe wurden mit 2 μ l GLB-Ladepuffer (Sigma, München; enthielt Bromphenolblau und Ficoll in Puffer) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde bei 50 - 100 V für 30 min mit TBE-Laufpuffer gefahren.

TBE-Puffer:

Tris-HCl, pH 8	8,9 mM
Borsäure	8,9 mM
EDTA, Dinatriumsalz	0,2 mM

B.4.4 Analyse von PCR-Produkten durch DGGE

Die Analyse von PCR-Produkten durch DGGE (Muyzer et al., 1993) erfolgte mit einem Protean II-System (Bio-Rad, München). Es wurde ein 6 %iges Polyacrylamidgel in 0,5 x TAE angefertigt, das einen Harnstoff-Formamid-Gradienten von 30 % den. bis 70 % den. trug; 100 % den. entspräche 7 M Harnstoff sowie 40 % Formamid. Formamid wurde mit *Mixed Bed Resin* (Sigma, München) deionisiert. Das Gradientengel wurde nach Zugabe von 64 µl 10 % Ammoniumpersulfat (Bio-Rad, München) und 15 µl TEMED (Bio-Rad, München) zu jeweils 16 ml der beiden Polyacrylamid-Lösungen (30 % den.-Lösung bzw. 70 % den.-Lösung) mit Hilfe eines Gradientenmischers (Bio-Rad, München) gegossen. Als sog. *Stacking*-Gel wurden 10 ml einer 0 % den.-Lösung mit 64 µl 10 % Ammoniumpersulfat und 15 µl TEMED versetzt und über das Gradientengel gegossen. In diesem *Stacking*-Gel befanden sich die Geltaschen für die Auftragung der Proben. Nach der Polymerisation wurde das Gel in eine Gelkammer mit TAE-Puffer gegeben. Nach Auftragung der Proben wurde die Elektrophorese bei 60°C für 4 h mit 200 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in 200 ml Milli-Q-Wasser mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt und anschließend 10 min in 250 ml Milli-Q-Wasser gewaschen. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht (302 nm) mit einem Gel-Dokumentationssystem (Cybertech CS1) fotografiert.

Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden mit ultrafiltriertem Wasser (Milli-Q, Millipore, Eschborn) hergestellt.

TAE-Puffer, 20fach konzentriert:

Tris-Acetat pH 7,4	800 mM
EDTA, Dinatriumsalz	20 mM
Natrium-Acetat	400 mM

38 % Polyacrylamid-Lösung:

Acrylamid	370 g/l
Bisacrylamid	10 g/l

0 % den.-Lösung:

38 % Polyacrylamid-Lösung	157,9 ml/l
TAE-Puffer, 20fach konzentriert	25,0 ml/l

30 % den.-Lösung:

38 % Polyacrylamid-Lösung	157,9 ml/l
TAE-Puffer, 20fach konzentriert	25,0 ml/l
Formamid (deionisiert)	18,0 ml/l
Harnstoff	18,9 g/l

70 % den.-Lösung:

38 % Polyacrylamid-Lösung	157,9 ml/l
TAE-Puffer, 20fach konzentriert	25,0 ml/l
Formamid (deionisiert)	42,0 ml/l
Harnstoff	44,1 g/l

B.4.5 Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA

Der G+C-Gehalt der DNA wurde von Dr. F. Rainey, DSM Braunschweig bestimmt. Die DNA wurde chromatographisch nach der Methode von Cashion et al. (1977) isoliert und der G+C-Gehalt per HPLC nach Mesbah et al. (1989) ermittelt.

B.4.6 Sequenzierung der 16S rDNA

Die Ermittlung der Sequenzen der 16S rRNA wurde freundlicherweise von Dr. Fred Rainey, DSM Braunschweig, durchgeführt. Die Extraktion genomischer DNA und anschließende PCR der 16S rRNA wurde nach Rainey et al. (1992) und Rainey und Stackebrandt (1993) vorgenommen. Die PCR-Produkte wurden mit dem *Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers in einer Applied Biosystems 373A DNA Sequenzierapparatur sequenziert. Die nahezu vollständige Sequenz der 16S rRNA (> 1400 bp) wurde mit publizierten 16S rRNA-Sequenzen verglichen. Das Alignment wurde manuell vorgenommen und auf der Basis von Sekundärstrukturen optimiert. Es wurden paarweise evolutionäre Distanzen berechnet und die Sequenzen nach der *Least Squares Distance Methode* zu einem phylogenetischen Stammbaum angeordnet (DeSoete, 1983; Jukes und Cantor, 1969).

C. Ergebnisse

C.1 Anreicherung und Isolierung von alkanverwertenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen

C.1.1 Anreicherung und Isolierung mit Sulfat als Elektronenakzeptor unter thermophilen Bedingungen

Anreicherungskulturen zur Isolierung von thermophilen, sulfatreduzierenden Bakterien mit Alkanen wurden in 100 ml Flaschen in synthetischem Meerwassermedium (B.2.2.2; Tabelle 1) bei 60°C durchgeführt. Als Substrat wurde *n*-Decan verwendet, welches zu 4 % bzw. 8 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin (2 ml) verdünnt zugesetzt wurde. Die Anreicherungen wurden mit anoxischem, sulfidhaltigem Sedimentgemisch aus dem Guaymas Becken (Golf von Kalifornien/Mexiko) beimpft. Die Schlammproben stammten von einer Forschungsfahrt der Woods Hole Oceanographic Institution (Woods Hole, Massachusetts, USA) im März 1991 mit dem Tiefseetauchboot ALVIN. Das Guaymas Becken ist ein hydrothermales Tiefseegebiet, in dem in 2000 m Tiefe aus abgesunkenem organischen Material bei hohem Druck (200 bar) und hoher Temperatur (bis 250°C) rezente Erdölbildungsprozesse ablaufen. Die erste Anreicherungskultur sowie drei Folgepassagen und ein erster Reinigungsschritt wurden von Dr. F. Aeckersberg durchgeführt (Aeckersberg, 1994).

Die von mir weiterverwendete Kultur enthielt beim Wachstum auf Decan drei mikroskopisch unterscheidbare Zellformen. Der vorherrschende Zelltyp bestand aus leicht gekrümmten, langsam beweglichen Stäbchen, die zum größten Teil an der Kohlenwasserstoffphase beobachtet wurden. Desweiteren befanden sich deutlich gekrümmte Stäbchen mit sehr hoher Beweglichkeit sowie kleine coccoide Zellen im Kulturmedium. Aus der Kultur wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Folgepassagen mit 5 % (v/v) *n*-Decan in dickflüssigem Paraffin in mit Dithionit reduziertem, synthetischem Meerwassermedium angelegt. Etwa eine Woche nach der Beimpfung (10 % v/v) war bereits deutlich eine Emulgation der Alkanphase zu erkennen. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte, daß sehr viele stäbchenförmige, leicht gekrümmte Zellen an der Alkanphase klebten. Die Sulfidkonzentration in den Kulturen betrug nach einer Woche etwa 4 - 5 mM, nach 14 Tagen etwa 10 - 15 mM. In Kontrollen, die unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Decan, inkubiert wurden, zeigte sich nur eine geringfügige Sulfidbildung von etwa 1 - 2 mM nach zwei Wochen Inkubation.

Zur Isolierung wurden Agarverdünnungsreihen mit Capronat (3 mM) in reduziertem, synthetischem Meerwassermedium angefertigt. Als Inokulum diente dabei jeweils ein Tropfen der Alkanphase aus der sechsten Passage der Anreicherung. Die Ansätze wurden bei 60°C inkubiert. Bereits nach einer Woche waren in den Ansätzen unter dem Stereomikroskop kleine Kolonien erkennbar, die nach etwa 10 - 12 Tagen eine Größe erreicht hatten, die zum Animpfen von

Folgekulturen geeignet schien. Es waren drei Koloniefornen zu unterscheiden, die jeweils einen der in den Anreicherungskulturen beobachteten Zelltypen enthielten.

Die häufigsten Kolonien waren klein, rund, durchscheinend und weißlich und enthielten die zuvor erwähnten kleinen coccoiden Zellen. Flüssigkulturen mit Decan, die mit diesen Kolonien beimpft wurden, zeigten kein Wachstum und keine H₂S-Bildung.

Der zweite, ebenfalls häufige Typ war relativ groß und linsenförmig bei intensiv dunkelbrauner Färbung. Die einzelnen Zellen waren deutlich gebogene Stäbchen, die sehr beweglich waren. Diese Bakterien wuchsen ebenfalls nicht auf Decan, zeigten jedoch sehr gutes Wachstum mit Monocarbonsäuren. Daher wurde eine Reinkultur dieses Bakteriums, im folgenden als Stamm A4/8 bezeichnet, über eine Agarverdünnungsreihe mit Capronat für Vergleichsanalysen isoliert.

Der dritte unterscheidbare Kolonietyp war klein, rund und hellbräunlich. In der ersten Verdünnungsreihe aus der Anreicherung war dieser Kolonietyp zahlenmäßig deutlich weniger vertreten als die beiden vorher beschriebenen. Kolonien dieser Morphologie bestanden aus stäbchenförmigen, leicht gebogenen Zellen, die langsam beweglich waren. Diese Zellen entsprachen morphologisch den an der Alkanphase in der Anreicherung beobachteten Zellen. Kolonien dieses Typs zeigten als einzige ein Wachstum nach Übertragung in Flüssigkulturen mit Decan. Bei der Isolierung mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette zeigte sich, daß die Kolonien nur in ihrer Gesamtheit aufzunehmen waren, da die Zellen sehr stark aneinander klebten. Daher wurden die Kolonien zur mikroskopischen Untersuchung und zur Übertragung in weitere Verdünnungsreihen in sterilen, aus abgeschnittenen Pasteurpipetten gefertigten Miniatur-Homogenisatoren zerteilt. Auf diese Weise isolierte Einzelkolonien wurden in jeweils zwei weiteren, direkt aufeinanderfolgenden Verdünnungsreihen in der beschriebenen Weise weiter gereinigt. In den letzten Verdünnungsreihen konnte man außer den kleinen bräunlichen Kolonien keine Kolonien der beiden anderen beschriebenen Typen mehr finden. Aus der jeweils dritten Verdünnungsreihe wurden einzelne Kolonien mit fein ausgezogenen Pasteurpipetten abgeimpft und in mit Dithionit reduziertes, synthetisches Meerwassermedium mit Capronat übertragen. Nach einer langen lag-Phase waren die Zellen nach knapp drei Wochen angewachsen und wurden in Flüssigkultur mit Decan übertragen. Bereits nach einer Woche wurde eine deutliche H₂S-Bildung gemessen. Auf die beschriebene Weise wurden mehrere unter anoxischen Bedingungen auf Decan wachsende, sulfatreduzierende Reinkulturen gewonnen. Das Isolat mit dem schnellsten Wachstum, Stamm TD3, wurde im Verlauf dieser Arbeit eingehender untersucht.

C.1.2 Anreicherung und Isolierung mit Nitrat als Elektronenakzeptor unter mesophilen Bedingungen

C.1.2.1 Anreicherung und Isolierung eines Hexadecan verwertenden Denitrifizierers

Eine Anreicherungskultur, die zur Isolierung eines denitrifizierenden, alkanverwertenden Bakteriums führte, wurde von Dr. J. Harder mit der Absicht begonnen, eine Anreicherung von Denitrifizierern auf Monoterpenen unter anoxischen Bedingungen zu erhalten. Die Monoterpene wurden in dünnflüssigem Paraffin gelöst, um mögliche toxische Effekte zu vermeiden. Verwendet wurde ein phosphatgepuffertes Süßwassermedium mit 5 mM NaHCO₃ und 10 mM Nitrat. Ansätze mit jeweils 150 ml Medium in einer 250 ml Glasflasche wurden mit 1 mM verschiedener Monoterpene (bezogen auf die wäßrige Phase) versetzt und mit je 5 ml oxischem Schlamm aus einer Kläranlage (Lintel bei Osterholz-Scharmbeck) beimpft. Die Inkubationsgefäße wurden nach der Begasung mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) mit Butylstopfen verschlossen. Das Wachstum wurde anhand der Trübung und Gasbildung verfolgt. Es zeigte sich, daß in Kontrollen ohne Terpene das gleiche Wachstum wie in Ansätzen mit Monoterpenen als Substrat stattfand. Dieses war auch in Folgekulturen zu beobachten. Das Wachstum war allerdings generell eindeutig von der Zugabe von Nitrat und Paraffin zu der Anreicherungskultur abhängig. In weiteren Passagen wurde Paraffin durch Hexadecan ersetzt, ohne daß es dadurch zu einer Verlangsamung des Wachstums kam.

Die weitere Kultivierung der mir überlassenen Anreicherungskultur erfolgte in dem beschriebenen carbonatgepufferten Mineralmedium für nitratreduzierende Bakterien (B.2.2.2; Tabelle 1). Mit Hexadecan als einzigem Substrat und Nitrat als Elektronenakzeptor zeigte sich relativ schnelles Wachstum. In ungefähr einer Woche wurden 10 mM Nitrat verbraucht. Es war dann eine deutliche Trübung des gesamten Mediums zu beobachten, wobei sich die Zellen hauptsächlich an der Oberfläche des wäßrigen Mediums direkt unter der Alkanphase ansammelten. Bei leichtem Schütteln der Kulturen waren makroskopisch sichtbare Zellflocken erkennbar, die nach Beendigung des Schüttelns zur Kulturoberfläche aufstiegen.

Das mikroskopische Bild dieser Anreicherungskultur war sehr uneinheitlich. Die beschriebenen Zellflocken bestanden aus einem Klumpen vieler Zellen mit einer ungewöhnlichen Morphologie. Die einzelne Zelle erschien im Phasenkontrast sehr stark lichtbrechend mit einer unregelmäßigen Zellgrenze. Die Form war rundlich von mehreren µm Durchmesser. Die Zellen waren unbeweglich. Am Rand der Zellaggregate konnte man kleinere, bewegliche, stäbchenförmige Zellen beobachten, die auch zum Teil stark lichtbrechend erschienen. In der wäßrigen Phase der Kultur bestand der dominierende Zelltyp aus stäbchenförmigen Zellen, die zum größten Teil beweglich waren. Die Größenverteilung dieser Zellen war recht uneinheitlich. Man konnte auch vereinzelt Vibrionen oder coccoide Zellen beobachten, bei denen es sich wegen

der geringen Zelldichten wahrscheinlich nicht um die gesuchten, Hexadecan verwertenden Bakterien handelte.

Die Isolierung wurde zunächst in anoxischen Agarverdünnungsreihen mit Capronat oder Valerianat versucht. Bereits nach wenigen Tagen zeigten sich Kolonien verschiedenster Morphologie; im Agar war eine Blasenbildung, vermutlich N₂-Bildung, zu erkennen. Sehr viele dieser Kolonien wurden abgeimpft und auf anaerobes Wachstum mit Hexadecan geprüft, jedoch ohne Erfolg. Weitere Isolierungsversuche mit Acetat und Propionat in Agarverdünnungsreihen mißlangen ebenfalls. In den Agarverdünnungsreihen wuchsen offensichtlich nur Kommensalen, nicht jedoch die Alkan verwertenden Bakterien aus der Anreicherung.

Als letztendlich erfolgreiche Methode zur Isolierung einer Hexadecan verwertenden Reinkultur erwiesen sich anoxische *Bottle Plates* mit Gelrite (B.2.4.2). Eine Probe aus der anaeroben Hexadecan-Anreicherung wurde mit einer sterilen, rundgeschmolzenen Pasteurpipette in einer *Bottle Plate* mit Hexadecan ausgestrichen, der Ansatz mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) begast und bei 28°C inkubiert. Bereits nach 4 Tagen Inkubation waren deutlich einzelne Kolonien erkennbar. Die Kolonien waren weißlich, leicht durchscheinend und hatten eine glatte Oberfläche. Nach einer Woche waren die einzelnen Kolonien groß genug, um sie mit einer zugeschmolzenen, spitz zulaufenden Pasteurpipette abzuimpfen. Das mikroskopische Bild zeigte die beschriebenen großen, unförmigen, unbeweglichen und stark lichtbrechenden Zellen sowie viele Übergangsformen bis hin zu kleineren stäbchenförmigen, schnell beweglichen Zellen ohne stark lichtbrechende Einschlüsse. Einzelne, isoliert liegende Kolonien wurden von den *Bottle Plates* abgeimpft und wiederum in Hexadecan-*Bottle Plates* ausgestrichen. Dieses Verfahren wurde viermal wiederholt. Das mikroskopische Bild der Zellen in den Kolonien hatte sich jedoch nach der ersten *Bottle Plate* über die gesamte Reinigungsprozedur nicht geändert und erschien weiterhin uneinheitlich.

Im Anschluß an die Reinigungsschritte mit Hexadecan wurden zwei weitere Reinigungsschritte in *Bottle Plates* mit Valerianat angeschlossen. Das mikroskopische Bild der Zellen einer Kolonie von den Valerianat-*Bottle Plates* war sehr viel einheitlicher. Die Zellen bestanden sämtlich aus beweglichen Stäbchen ohne sichtbare Einschlüsse. Einzelkolonien von einer *Bottle Plate* mit Valerianat wurden in anoxische Flüssigkulturen mit Valerianat überimpft. Nach 3 Tagen waren die Kulturen deutlich trüb. Anschließend wurden die Kulturen in anoxische Flüssigkulturen mit Hexadecan überimpft. Bereits nach 1 Woche war eine deutliche Trübung des Mediums und Gasbildung zu beobachten. Eine dieser Flüssigkulturen, Stamm HdN1, wurde ausgewählt und im weiteren Verlauf der Arbeit genauer charakterisiert.

Reinheitstests mit verschiedenen löslichen Substraten (B.2.4.3) bestätigten, daß es sich bei dem Isolat um eine Reinkultur handelte. Das mikroskopische Bild einer auf Hexadecan gewachsenen Flüssigkultur dieses Isolats zeigte jedoch wiederum die zuvor beschriebene uneinheitliche Morphologie (siehe Abb. 15 B). Daher wurde zur weiteren Bestätigung der Reinheit des Isolats eine DGGE-Analyse mit amplifizierter DNA aus einem Abschnitt der 16S rRNA durchgeführt. Bei der DGGE wird eine Auftrennung von DNA-Molekülen nicht nur nach der

Größe der Fragmente, sondern zusätzlich nach dem G+C-Gehalt ermöglicht. Dies wird durch ein Acrylamidgel erreicht, welches einen Gradienten von denaturierenden Reagenzien enthält. Amplifizierte 16S rDNA aus mehreren verschiedenen Bakterienstämmen in einer Probe ergäbe in der DGGE-Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Muster mit mehreren DNA-Banden in verschiedener Laufhöhe. Zur Durchführung der DGGE wurde genomische DNA von Stamm HdN1 präpariert (B.4.1) und ein ca. 600 bp großes Fragment der 16S rRNA mittels universeller Primer durch PCR amplifiziert (B.4.2). Nach Kontrolle der PCR-Reaktion (B.4.3) wurden die PCR-Produkte durch DGGE aufgetrennt (B.4.4). Wie bei einer Reinkultur erwartet, wurde nach erfolgter DGGE nur eine einzige DNA-Bande beobachtet (Abb. 12). Alle Befunde sprechen also dafür, daß es sich bei Stamm HdN1 um eine Reinkultur mit pleiomorphem Zelltyp handelte, die bei Wachstum auf bestimmten Substraten Speichersubstanzen bildete.

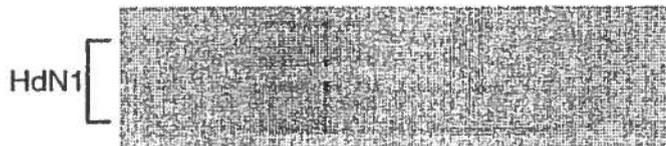


Abb. 12: Foto der DGGE-Analyse der amplifizierten 16S rDNA des Stammes HdN1.

C.1.2.2 Anreicherung und Isolierung eines Octan verwertenden Denitrifizierers

Weitere Anreicherungen zur Isolierung von denitrifizierenden Bakterien, die zur Verwertung von Alkanen unter Ausschluß von Sauerstoff fähig waren, wurden in flachen 500 ml Glasflaschen mit 400 ml anoxischem Medium für nitratreduzierende Bakterien (B.2.2.2; Tabelle 1) und 200 ml Schlammgemisch aus Gräben in Bremen durchgeführt (B.2.1). Als Substrat wurde 5 % (v/v) *n*-Octan in einer Paraffin-Trägerphase verwendet. Die Inkubation erfolgte ohne Schütteln bei 28°C. Die Kulturen wurden ein- bis zweimal täglich von Hand geschüttelt. Die Gasbildung in den einzelnen Ansätzen wurde regelmäßig kontrolliert und das gebildete Gas aus den Kulturflaschen abgelassen. Die Nitratreduktion wurde durch Nitratanalyse an der HPLC verfolgt. Nach Verbrauch des Nitrats wurde den Ansätzen erneut 10 mM Nitrat zugegeben. Anfänglich wurde in Kontrollen ohne zugegebenes Substrat die gleiche Nitrat-Abnahme gemessen wie in den eigentlichen Anreicherungen mit dem Alkan. Dies ist mit der Oxidation der im Schlammgemisch vorhandenen organischen Substrate zu erklären. Nach ca. 3 - 4 Monaten wurde jedoch in den Ansätzen mit Octan eine deutlich schnellere Nitrat-Abnahme als in Kontrollen ohne Substrat festgestellt. Aus diesen Anreicherungskulturen wurden Folgepassagen in 50 ml Flaschen mit 5 % (v/v) Octan in HMN angelegt. In diesen Kulturen zeigte sich ein Wachstum mit einhergehender Emulgierung der Alkanphase. Nach weniger als einer Woche waren 10 mM Nitrat verbraucht.

Aus der 2. Passage wurden Agarverdünnungsreihen mit Acetat, Valerianat, Capronat und Caprylat angefertigt. Die Agarkulturen mit Capronat entwickelten sich am schnellsten. Bereits nach etwa 4 Tagen waren große Kolonien zu erkennen. Nach etwa 10 Tagen waren desweiteren viele kleinere, etwas durchsichtige Kolonien gewachsen, die eine leicht bräunliche Färbung hatten. Die kleineren Kolonien waren deutlich in der Mehrzahl.

Aus diesen Verdünnungsreihen wurden Kolonien unterschiedlicher Morphologie mit spitz ausgezogenen Pasteurpipetten abgeimpft. Von den großen Kolonien wurden insgesamt 14 Isolate gewonnen, die jedoch nicht auf Octan wuchsen. Dagegen zeigten Kulturen aus den kleineren, zahlenmäßig vorherrschenden Kolonien das erwartete Wachstum auf Octan. Eine einzelne Kolonie wurde in anoxisches, mit Ascorbat reduziertes Flüssigmedium mit 5 % (v/v) Octan in HMN eingebracht. Um die Anwachsphase zu erleichtern, wurde noch 0,1 mM Capronat zugesetzt. Nach etwa einer Woche zeigte eine deutliche Trübung des Mediums und der Oberfläche der Alkanphase das erfolgte Wachstum an. Dieses Isolat wurde im folgenden als Stamm OcN1 bezeichnet. Reinheitstests (B.2.4.3) bestätigten die Reinheit des Isolats.

C.2 Physiologische Charakterisierung der neuen Bakterienstämme

C.2.1 Charakterisierung des thermophilen Sulfatreduzierers TD3

C.2.1.1 Morphologie

Zellen des Isolats TD3 waren relativ große, 2 - 3,5 μm lange und 0,8 - 1 μm breite, leicht gekrümmte Stäbchen, die langsam beweglich waren (Abb. 13 A). In Alkankulturen hefteten sich viele Zellen an die Alkanphase (Abb. 13 B). Das Wachstum einer Kultur von Stamm TD3 auf Alkanen wurde daher nicht durch Trübung des Mediums, sondern in erster Linie durch eine Emulgation und deutliche Trübung der Oberfläche der Alkanphase beobachtet (Abb. 14). Somit war auch keine Messung der optischen Dichte von Kulturen dieses Stammes als Maß für erfolgtes Wachstum möglich. Auch gegen Beendigung des Wachstums in solchen Kulturen aufgrund von hohen Sulfidkonzentrationen (ungefähr 20 mM) war nur eine geringe Trübung des Mediums zu erkennen. Die Produktion von Zellmasse war sehr gering; viele Zellen befanden sich weiterhin an der Alkanphase. Die Mikroskopie der wässrigen Phase zeigte vereinzelte Zellen sowie kleinere Zellflocken. Nach sehr langer Lagerung von gewachsenen Kulturen begannen die Zellen, sich von der Alkanphase zu lösen.

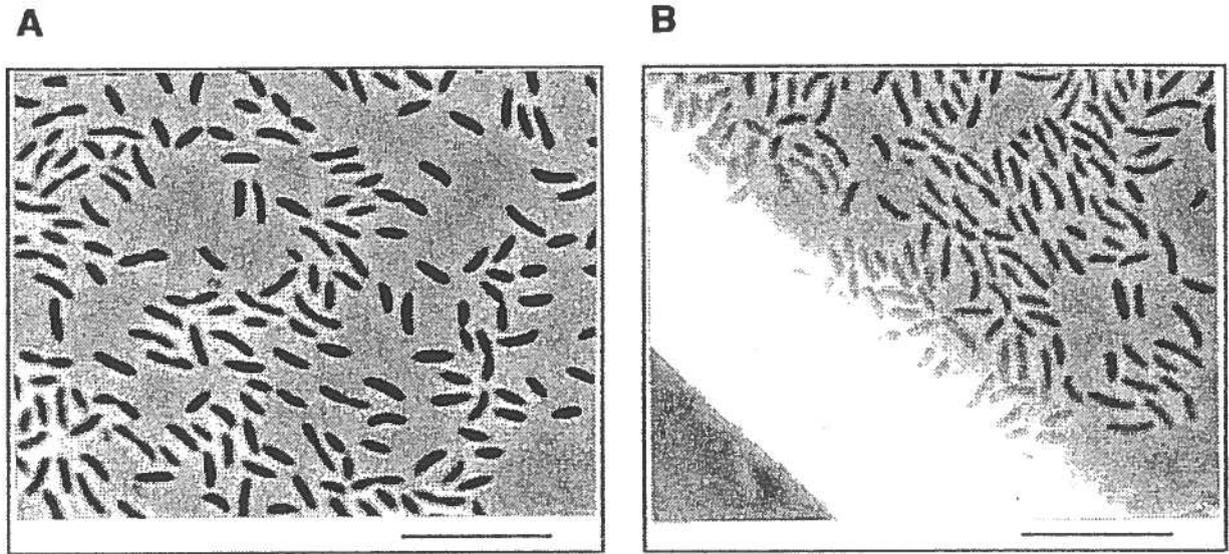


Abb. 13: Phasenkontrastaufnahmen der Reinkultur von Stamm TD3, die auf Capronat (A) bzw. Decan (B) gewachsen war. Der Phasenübergang zwischen dem Alkantropfen und dem wäßrigen Medium in (B) ist an der breiten hellen Zone erkennbar. Die Zellen halten sich vorwiegend direkt am Alkantropfen auf. Die eingezeichneten Balken entsprechen jeweils 10 μm .

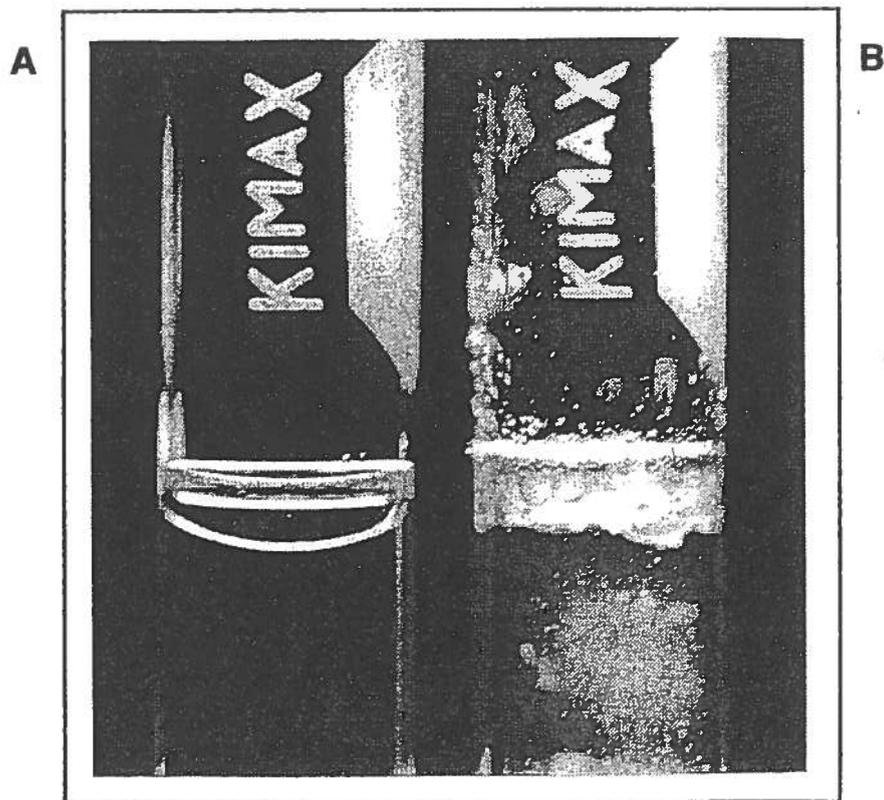


Abb. 14: Alkanphase (10% (v/v) Decan in HMN) einer nicht beimpften Kultur (A) bzw. einer mit Stamm TD3 beimpften Kultur (B) nach 3wöchiger Inkubation bei 60°C.

C.2.1.2 Optimierung des Mediums

Die Anreicherung sowie die Isolierung von Stamm TD3 waren in synthetischem Meerwassermedium durchgeführt worden. Da dieses Medium wegen der hohen Salzkonzentrationen Ausfällungen bildete, wurde die Anzucht von Stamm TD3 auf Salzwassermedium mit niedrigeren Salzkonzentrationen (B.2.2.2; Tabelle 1) versucht. Um ein Wachstum von Stamm TD3 zu erreichen, mußte dieses Medium allerdings mindestens 25 mM Mg^{2+} -Ionen enthalten. Das Wachstum war optimal ab einer Konzentration von etwa 45 mM Mg^{2+} . Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration bei niedriger Mg^{2+} -Konzentration (15 mM) ermöglichte ebenfalls ein Wachstum von Stamm TD3. Allerdings wurde auch bei starker Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (auf 50 mM) kein optimales Wachstum erreicht, da Ca^{2+} in diesen Konzentrationen mit anderen Mediumbestandteilen ausfiel. Das Medium mußte mind. 15 g/l NaCl enthalten, gutes Wachstum des Stammes TD3 erfolgte ab ca. 20 g NaCl pro l.

Stamm TD3 wurde im weiteren Verlauf der Arbeit daher in dem speziellen "Medium für Stamm TD3" (B.2.2.2; Tabelle 1) angezogen, auf dem auch die anderen in dieser Arbeit verwendeten Sulfatreduzierer gut wuchsen. Die Medien wurden vor der Beimpfung stets mit Dithionit reduziert, um ein besseres Anwachsen zu gewährleisten, obwohl Stamm TD3 auch in dem nur mit Sulfid reduzierten Medium ohne zusätzliche Dithionit-Reduktion anwuchs.

C.2.1.3 Temperatur- und pH-Optimum

Das Temperaturoptimum für den moderat thermophilen Stamm TD3 lag bei 60 - 65°C. Ab 70°C fand kein Wachstum mehr statt. Bei 50°C war das Wachstum deutlich verlangsamt. Alle weiteren Inkubationen wurden bei 60°C vorgenommen, um möglichen Streß bei höheren Temperaturen zu vermeiden. Stammkulturen auf Capronat oder Decan konnten bei 4°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Das pH-Optimum des Stammes TD3 befand sich im leicht sauren Bereich zwischen pH 6,5 und pH 6,8. Die pH-Werte wurden jeweils bei 60°C nach Äquilibrierung von CO_2 zwischen Medium und Gasphase gemessen. Das Wachstum im sauren Bereich wurde bis pH 6,1 getestet; es war im Vergleich zum optimalen Wachstum nur etwas langsamer. Bei höheren pH-Werten als pH 7,1 war das Wachstum jedoch deutlich verlangsamt.

C.2.1.4 Elektronenakzeptoren

Der thermophile Sulfatreduzierer TD3 verwertete neben Sulfat auch Thiosulfat als terminalen

Elektronenakzeptor. Dagegen erfolgte kein Wachstum mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor (F. Aeckersberg, pers. Mitteilung).

C.2.1.5 Beeinflussung des Wachstums durch Schütteln

Kulturen wurden in der Regel im 60°C Brutschrank ohne Schütteln inkubiert. Licht hatte keinen negativen Einfluß auf das Wachstum dieses Stammes. Versuche einer Wachstumsstimulierung durch Inkubation in einem Schüttelinkubator schlugen fehl. Kulturen, die ruhig liegend inkubiert wurden, zeigten stets ein schnelleres Wachstum als ständig bewegte Kulturen. Auch Kulturen, die nach einer mehrtägigen Anwachsphase ohne Schütteln anschließend im Schüttelinkubator langsam geschüttelt wurden, wuchsen nicht schneller als nicht geschüttelte Kulturen. Daher wurden die Kulturen im weiteren Verlauf stets ohne ständige Bewegung inkubiert und nur etwa einmal pro Tag per Hand einige Sekunden lang geschüttelt, um die Substrate und die Produkte neu zu verteilen.

C.2.1.6 Ermittlung verträglicher Alkankonzentrationen

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, daß Alkane mit einer Kettenlänge bis zu C₁₀ für den mesophilen sulfatreduzierenden Stamm Hxd3 toxisch waren (Aeckersberg, 1994). Die Verdünnung in einer hydrophoben Trägerphase setzt den Dampfdruck und damit die Gleichgewichtskonzentration von Alkanen im Medium herab. Auf diese Weise kann eine Wachstumshemmung vermieden werden (Gill und Ratledge, 1972). Decan besitzt als relativ kurzkettiges Alkan einen merklichen Dampfdruck bei der Inkubationstemperatur von 60°C und war als reine Substanz für Stamm TD3 toxisch. Daher wurde untersucht, in welchen Konzentrationen Decan als Substrat für ein Wachstum des Stammes TD3 eingesetzt werden konnte. Es zeigte sich, daß Decankonzentrationen bis zu 60 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Wachstums führten. Bei einer Konzentration von 80 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin war das Wachstum bereits deutlich verlangsamt.

C.2.1.7 Versuche zur Stimulierung des Wachstums mit α -Cyclodextrin

In einer vorangegangenen Arbeit war eine deutliche Stimulierung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Hexadecan durch Zusatz von α -Cyclodextrin, das nicht als Substrat verwertet wurde, gezeigt worden (Aeckersberg, 1994). Cyclodextrin wirkte wahrscheinlich durch die Aufnahme von Hexadecan in die hydrophobe Pore des ringförmigen Oligosaccharids als Lösungsvermittler

für das unlösliche Alkan. Daher wurde versucht, auch bei dem thermophilen Isolat TD3 durch Zusatz von α -Cyclodextrin eine Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit zu erreichen. Dazu wurde dem Medium eine Konzentration von 5 g/l α -Cyclodextrin zugesetzt. Als Substrat diente Decan in verschiedenen Konzentrationen von 5 % bis 80 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin. In keinem der Wachstumsansätze wurde jedoch eine Stimulierung des Wachstums beobachtet.

C.2.1.8 Enzymatische Aktivitäten

Zur Untersuchung, ob in Stamm TD3 die vollständige Oxidation der organischen Substrate über den bei Sulfatreduzierern verbreiteten CO-Dehydrogenase-Weg erfolgt, wurden verschiedene Enzymaktivitäten in anaeroben Zellextrakten von auf Capronat gewachsenen Zellen bei Raumtemperatur gemessen (B.2.7.2). Es wurden eine hohe CO-Dehydrogenase-Aktivität und eine deutliche Formiat-Dehydrogenase-Aktivität festgestellt (Tabelle 2). Zusammen mit den Bilanzmessungen (vgl. C.5.1) zeigt dies, daß Stamm TD3 zur Endoxidation mittels CO-Dehydrogenase fähig ist. Eine Aktivität von α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym des Citratzyklus, konnte bei Raumtemperatur nicht gemessen werden. Ebenso war bei Raumtemperatur keine Hydrogenase-Aktivität vorhanden.

Tabelle 2: Spezifische Aktivität wichtiger kataboler Enzyme bei dem thermophilen Stamm TD3. Die Zellen waren auf Capronat angezogen worden. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die angegebenen Aktivitäten verstehen sich nach Abzug der Hintergrund-Aktivität von $0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$.

Enzym	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$]
CO-Dehydrogenase	1,72
Formiat-Dehydrogenase	0,33
α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	0,0
Hydrogenase	0,0

C.2.2 Charakterisierung der neuen nitratreduzierenden Bakterienisolate

C.2.2.1 Morphologie

Stamm HdN1

Stamm HdN1 bestand aus stäbchenförmigen, beweglichen Zellen von 1,5 - 2,5 μm Länge und einem Durchmesser von etwa 0,5 μm (Abb. 15 A). Wie zuvor bereits erwähnt, bildete dieser Stamm auf bestimmten Substraten wie beispielsweise Alkanen, Alkenen oder Aldehyden Einschlüsse, die die Zellen sehr groß, unförmig und im Phasenkontrast stark lichtbrechend erscheinen ließen (Abb. 15 B).

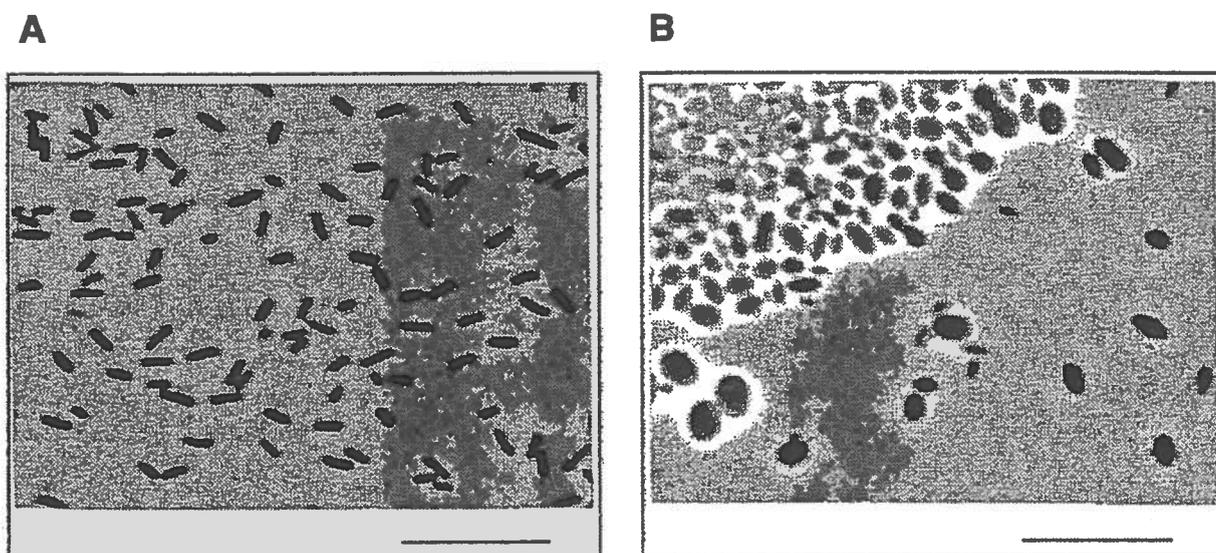


Abb. 15: Phasenkontrastaufnahmen von Zellen des Bakterienisolats HdN1 nach Wachstum auf Valerianat (A) bzw. Hexadecan (B). Die eingezeichneten Balken entsprechen jeweils 10 μm .

In Alkankulturen fand man alle Übergangsformen von stäbchenförmigen, beweglichen Zellen ohne sichtbare Einschlüsse über Zellen mit wenig Einschlüssen bis hin zu den sehr großen, prall gefüllten Zellen, die sich im Medium nicht aktiv bewegten. Diese wahrscheinlich mit Speicherstoffen gefüllten, sehr dicken Zellen bildeten häufig Zellklumpen, die in Kulturen makroskopisch zu erkennen waren. Solche Zellklumpen schienen leichter zu sein als die wäßrige Phase, da sie an der Oberfläche der Kulturen direkt unter der Alkanphase trieben.

Lyophilisierte Zellen von Stamm HdN1, die unter anoxischen bzw. oxischen Bedingungen auf Hexadecan bzw. Pentadecan gewachsen waren, wurden durch Dr. A. Steinbüchel (Göttingen) auf ihren Gehalt an Polyhydroxyalkanoaten (PHAs) untersucht (B.3.11). Dabei fand sich kein Hinweis auf eine Akkumulation von PHAs. Allerdings wurden ungewöhnlich hohe Konzentrationen an dem jeweils als Wachstumssubstrat zugegebenen Alkan nachgewiesen. Dies

könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Zellen das Alkan selbst akkumulierten (A. Steinbüchel, pers. Mitteilung). Möglicherweise ist dies die Erklärung für die Tendenz der beobachteten Zellklumpen, an der Oberfläche der Kulturen zu treiben.

Die direkte Anheftung der Zellen von Stamm HdN1 an Alkantropfen war nicht so ausgeprägt wie bei den Stämmen TD3 und OcN1. Beim Mikroskopieren der Kulturen konnte man eine Vielzahl kleiner Alkantropfen (Durchmesser mehrere μm) in der wäßrigen Phase erkennen. Die wäßrige Phase war bei diesem Isolat deutlich trüber als bei den Stämmen TD3 und OcN1, jedoch war auch bei Stamm HdN1 die Verfolgung des Wachstums durch Messung der optischen Dichte wegen der Flockenbildung nicht sinnvoll.

Stamm OcN1

Zellen des Stammes OcN1 waren stäbchenförmig, zum Teil leicht gebogen und sehr beweglich. Sie hatten eine Länge von 1 - 2 μm und einen Durchmesser von etwa 0,5 μm (Abb. 16). Das Wachstum dieser Zellen in Alkankulturen war, wie für Stamm TD3 beschrieben und im Gegensatz zu Stamm HdN1, zunächst nur anhand der Emulgation der Alkanphase erkennbar. Anders als Stamm TD3 bildete Stamm OcN1 jedoch deutlich mehr Zellmasse, weshalb mit fortschreitendem Wachstum eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war. Eine kontinuierliche Verfolgung des Wachstums durch Messung der optischen Dichte war jedoch aufgrund der Anheftung vieler Zellen an die Alkanphase nicht möglich.

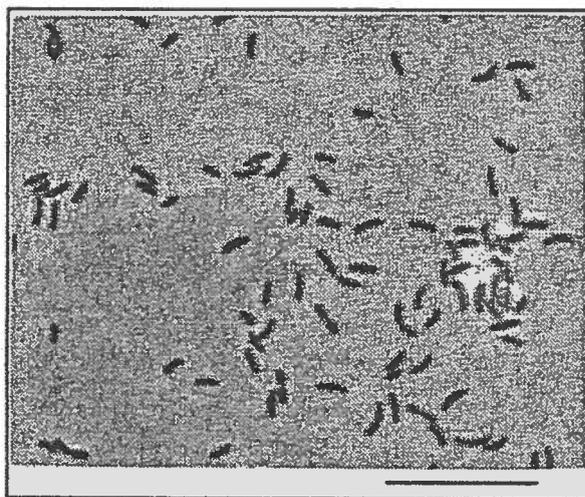


Abb. 16: Phasenkontrastaufnahme von Zellen des Stammes OcN1 nach Wachstum auf Valerianat. Der eingezeichnete Balken entspricht 10 μm .

C.2.2.2 Temperatur- und pH-Optimum

Stamm HdN1

Stamm HdN1 ist ein mesophiles Isolat mit einem Temperaturoptimum zwischen 28 und 30°C. Bereits bei 35°C war nur noch ein geringes anfängliches Wachstum zu beobachten, bei 40°C erfolgte kein Wachstum mehr; die Zellen in diesen Kulturen lysierten schnell. Bei 25°C war das Wachstum deutlich verlangsamt. Dieser Stamm wurde für alle weiteren Untersuchungen bei 28°C inkubiert.

Stamm HdN1 zeigte das schnellste Wachstum bei pH 6,8 - 7,2. In dem gesamten untersuchten pH-Bereich von pH 6,5 - 8,5 erfolgte gutes Wachstum, das gegenüber dem optimalen Wachstum nur leicht verlangsamt war. Der pH-Wert des Mediums stieg in einer Hexadecan-Kultur mit 10 mM Nitrat während des Wachstums um etwa 0,3 - 0,4 an.

Die Kultivierung dieses Stammes für alle weiteren Versuche erfolgte in Medien mit pH 7,2, da so für die Kultivierung der beiden denitrifizierenden Stämme HdN1 und OcN1 das gleiche Medium verwendet werden konnte.

Stamm OcN1

Das Temperaturoptimum des mesophilen Stammes OcN1 lag bei 30 - 32°C. Dieser Stamm erwies sich als nicht so temperaturempfindlich wie Stamm HdN1, da auch bei 35°C das Wachstum gegenüber Ansätzen bei 30°C nur wenig verlangsamt war. Bei 40°C erfolgte kein Wachstum. Bei 25°C war das Wachstum stark verlangsamt. In allen weiteren Versuchen wurde dieser Stamm aus praktischen Gründen mit Stamm HdN1 zusammen bei 28°C inkubiert.

Das pH-Optimum von Stamm OcN1 befand sich zwischen 7,2 und 7,8. Bei pH-Werten unter 7,0 war das Wachstum deutlich verlangsamt. Der pH-Wert stieg in Octan-Kulturen mit 10 mM Nitrat, wie auch bei Stamm HdN1 beobachtet wurde, um etwa 0,3 - 0,4 an. Um mit einem einheitlichen Medium für die denitrifizierenden Alkanverwerter zu arbeiten, erfolgte die weitere Kultivierung bei pH 7,2.

C.2.2.3 Elektronenakzeptoren

Bezüglich der Elektronenakzeptoren unterschieden sich die beiden nitratreduzierenden Neuisolate HdN1 und OcN1 nicht signifikant voneinander. In anaeroben Kulturen zur Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung wurde in der Regel Nitrat als Elektronenakzeptor eingesetzt. Die Quantifizierung des gebildeten Gasvolumens in fertig gewachsenen Kulturen ließ auf eine vollständige Reduktion des Nitrats zu gasförmigem Stickstoff schließen (Tabelle 3). In Kulturen, die zu Beginn des Wachstums eine Gasphase aus He/CO₂ (90/10 v/v) enthielten, wurde gaschromatographisch (B.3.7) gezeigt, daß es sich bei dem gebildeten Gas um Stickstoff handelte.

Tabelle 3: Quantifizierung des gebildeten Gasvolumens in anaeroben Ansätzen der Isolate HdN1 und OcN1 nach Wachstum auf Hexadecan bzw. Octan. Die Gasphase in den Ansätzen bestand aus He/CO₂ (90/10 v/v). Die Kulturvolumina betragen 97 ml für Stamm HdN1 bzw. 96 ml für Stamm OcN1.

Ansatz	Nitrat		Gasvolumen ^b	
	eingesetzt [mM]	verbraucht [mM]	gebildet [ml]	erwartet [ml] ^c
ohne Inokulum	10,0	0,0	0	0
HdN1	0,2 ^a	0,2	0,3	0,2
	5,2	5,2	6,7	6,1
	10,2	10,2	12,5	12,0
OcN1	0,4 ^a	0,4	0,4	0,5
	5,4	5,4	6,5	6,3
	10,3	10,3	11,2	12,0

^a In der Negativkontrolle waren durch das Inokulum geringe Mengen Nitrat enthalten.

^b Das Gasvolumen wurde bei 23°C quantifiziert.

^c Der angegebene Wert bezieht sich allein auf die erwartete N₂-Bildung bei vollständiger Reduktion des eingesetzten Nitrats ohne Berücksichtigung der CO₂-Bildung. Zur Berechnung wurde ein Molvolumen bei 23°C von 24,3 l · mol⁻¹ angenommen.

Während des Wachstums wurde Nitrat vollständig verbraucht, ohne daß signifikante Mengen Nitrit gebildet wurden. Lediglich in Einzelfällen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geringe Nitritkonzentrationen von weniger als 100 µM nachgewiesen, die jedoch nach Beendigung des Wachstums verschwunden waren. In Kulturen, in denen Nitrat vollständig reduziert worden war, konnte weder Distickstoffoxid noch eine Bildung von Ammonium nachgewiesen werden. Nach diesen Befunden handelte sich bei den Isolaten HdN1 und OcN1 um denitrifizierende Bakterien, die Nitrat vollständig zu N₂ reduzierten.

Die Verwertung verschiedener möglicher Elektronenakzeptoren wurde mit beiden denitrifizierenden Neuisolaten mit Alkanen als Elektronendonatoren untersucht (Tabelle 4). Obwohl beide Isolate Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor verwerteten, verlangsamte dieses das Wachstum stark. Bereits mit 1 mM Nitrit verlängerte sich die anfängliche lag-Phase der Kulturen. In Ansätzen, denen Nitrat und Nitrit gleichzeitig zugegeben wurden, verschwand nach einer deutlich verlängerten lag-Phase zunächst das Nitrit und anschließend das Nitrat (Abb. 17). Dieses Verhalten zeigte sich sowohl beim Wachstum auf Alkanen als auch beim Wachstum auf Fettsäuren. Stamm OcN1 reagierte im Vergleich zu Stamm HdN1 noch empfindlicher auf Nitrit.

Beide neu isolierten Denitrifizierer wuchsen auch mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Mit Stamm HdN1 wurde gezeigt, daß aerobe Kulturen mit Alkanen bei einer Inkubation ohne Bewegung schneller wuchsen, als beim Inkubieren auf dem Schüttler. Da sowohl Stamm HdN1 als auch Stamm OcN1 Katalase-Aktivität besitzen, hat dieses Verhalten seine Ursache wahrscheinlich nicht in einer Empfindlichkeit gegenüber hohen Sauerstoffpartialdrücken, sondern

in der verminderten Verfügbarkeit des Substrates beim ständigen Ablösen der Zellen von der Alkanoberfläche durch die Bewegung. Auch mit anaeroben Alkankulturen dieses Stammes wurde bei ruhender Inkubation ein schnelleres Wachstum als bei einer ständigen Bewegung der Kulturen auf einem Schüttler gezeigt (vgl. C.2.2.4).

Bei einer oxischen Inkubation beider Stämme auf Agarplatten wurde eine deutliche Abhängigkeit des Wachstums von CO₂ gezeigt. Kulturen beider Stämme wuchsen auf Agarplatten mit 4 mM Valerianat deutlich besser, wenn das Medium 10 oder 20 mM NaHCO₃ und die Luftatmosphäre 3 bzw. 6 % CO₂ enthielt. Bei einer Inkubation auf Medium ohne Bicarbonat und ohne CO₂-Zusatz wuchsen auf den Platten nur vereinzelte Kolonien.

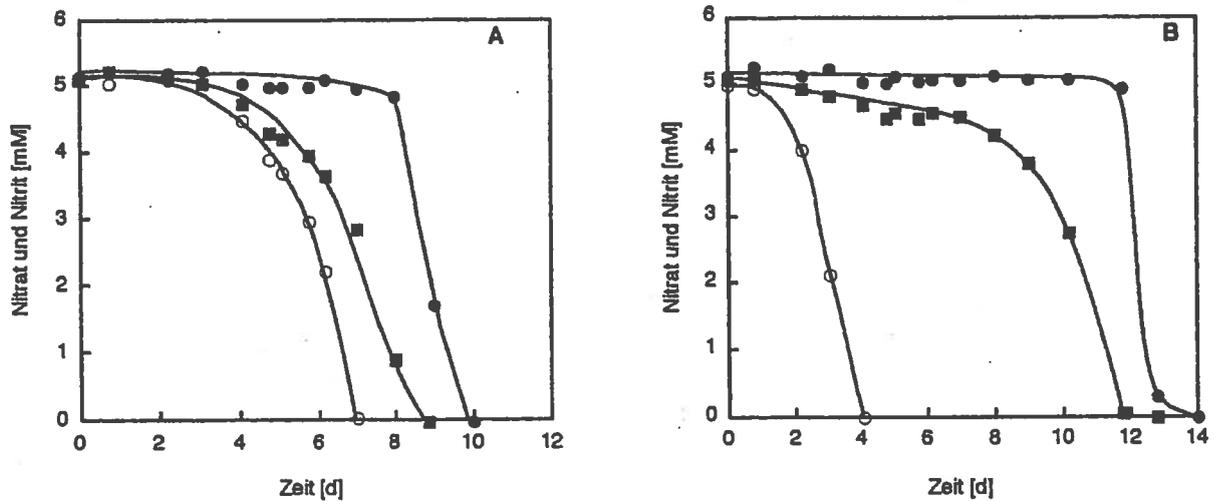


Abb. 17: Verbrauch von Nitrat (●) und Nitrit (■) bei gleichzeitigem Zusatz beider Elektronenakzeptoren zu Kulturen der Stämme HdN1 auf Hexadecan (A) und OcN1 auf Octan (B). Den Medien wurden 5 mM Nitrat und 5 mM Nitrit zugesetzt. Eine parallele Kultur als Kontrolle (○) erhielt jeweils nur 5 mM Nitrat.

Tabelle 4: Prüfung verschiedener Elektronenakzeptoren in Kulturen der Isolate HdN1 und OcN1 auf Hexadecan bzw. Octan. Symbole: + gutes Wachstum, o Wachstum, - kein Wachstum

Stamm	HdN1	OcN1
Nitrat (10 mM)	+	+
Nitrit (5 mM)	o	o
Distickstoffoxid (10 / 20 mM)	o	o
Sauerstoff (Luftatmosphäre)	+	+
Sulfat (15 mM)	-	-
Thiosulfat (5 mM)	-	-
Schwefel	-	-
Fumarat (10 mM)	-	-

C.2.2.4 Beeinflussung des Wachstums durch Schütteln

Stamm HdN1

Flüssigkulturen des Stammes HdN1 wurden ohne Schütteln bei 28°C inkubiert. Versuche zur Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit durch stetiges, langsames Schütteln auf einem Schüttelinkubator hatten keinen stimulierenden Effekt gezeigt. Die Kulturen wurden im allgemeinen täglich einmal per Hand einige Sekunden lang geschüttelt, um die Substrate und die Produkte gleichmäßig zu verteilen.

Stamm OcN1

Die Inkubation von Stamm OcN1 erfolgte ebenfalls ohne Schütteln bei 28°C. Die Kulturen wurden pro Tag einmal per Hand für wenige Sekunden geschüttelt.

C.2.2.5 Ermittlung verträglicher Alkankonzentrationen

Stamm OcN1

Octan war das Anreicherungssubstrat von Stamm OcN1 und wurde auch später für viele Wachstumsversuche eingesetzt, da es sich unter den Alkanen als ein schnell verwertbares Substrat für diesen Stamm erwies. Analog zur Ermittlung geeigneter Decankonzentrationen für Stamm TD3 (vgl. C.2.1.6) wurde die für Stamm OcN1 verträgliche Octankonzentration ermittelt. Bis etwa 35 % (v/v) Octan in HMN war keine Beeinträchtigung des Wachstums erkennbar. Bei 50 % (v/v) war das Wachstum leicht verlangsamt. Auch auf reinem Octan erfolgte sehr langsames Wachstum, jedoch verhielten sich die Zellen anders als bei einer Verdünnung des Alkans. Die beschriebene Emulgation der Alkanphase durch Anheften der Zellen erfolgte nicht. Stattdessen bildeten sich Zellverbände aus, die frei im Medium schwebten. Derartige Zellverbände waren auch bei sehr alten Kulturen zu beobachten, nachdem sich die Zellen von der Alkanphase gelöst hatten. Die Morphologie der einzelnen Zelle war nicht deutlich verändert.

C.2.2.6 Vitaminabhängigkeit

Stamm HdN1

Das Vitaminbedürfnis wurde wie bei den anderen Wachstumstests mit Hexadecan als Substrat geprüft. Es zeigte sich, daß Stamm HdN1 ohne Zusatz von Vitaminen über 10 Folgepassagen auf Hexadecan ohne erkennbare Verschlechterung des Wachstums gegenüber Kontrollen mit Vitaminzusätzen kultiviert werden konnte. Stamm HdN1 besaß demnach keine Vitaminauxotrophie.

Stamm OcN1

Das Vitaminbedürfnis von Stamm OcN1 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft.

C.3 Substratspektren der neuen Bakterienisolate

Die Substratverwertung der Neuisolate wurde eingehend untersucht, um einerseits eine genaue taxonomische Beschreibung der Mikroorganismen zu ermöglichen und andererseits Hinweise auf die Verwertung möglicher Intermediate des anaeroben Alkanabbaus zu erhalten. Kurzkettige Alkane und andere Substrate, die in reiner Form vermutlich toxisch sind, wurden in inerten Trägerphasen zugesetzt. Bei Stamm TD3 wurde anfangs das für den Sulfatreduzierer Hxd3 etablierte Verfahren verwendet, Paraffinöl als inerte Trägerphase einzusetzen. Später wurde dann die chemisch definierte Reinsubstanz Pristan verwendet. Den Denitrifizierern wurden die jeweiligen Substrate in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN) verdünnt zugeführt, da Stamm HdN1 auf dünnflüssigem und sogar dickflüssigem Paraffin sehr gutes Wachstum zeigte und auch auf reinem Pristan leichtes Wachstum erfolgte. Die im folgenden beschriebene Substratspezifität der einzelnen Stämme bezieht sich grundsätzlich auf strikt anaerobes Wachstum, andernfalls wird im Text ausdrücklich auf oxische Bedingungen hingewiesen.

C.3.1 Substratspektrum des sulfatreduzierenden Stammes TD3

Untersuchungen zum Substratspektrum der bereits bekannten anaeroben Alkanverwerter (Stämme Hxd3 und Pnd3) hatten gezeigt, daß die Isolate jeweils einen spezifischen Kettenlängenbereich an Alkanen zu verwerten vermögen. Dies zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Neuisolaten. Stamm TD3 verwertete Alkane von C₆ bis C₁₆, wobei die Verwertung der Alkane im Randbereich dieses Spektrums wie Hexan, Heptan und auch Dodecan bis Hexadecan bereits deutlich langsamer als auf Octan und Decan war. Der bevorzugte Bereich waren Alkane von C₈ bis C₁₁. Ein Test auf Wachstum mit den im Handel erhältlichen Methylalkanen ergab, daß Stamm TD3 einzig auf 3-Methyloctan wuchs, und zwar mit einer nur leicht verlangsamten Geschwindigkeit gegenüber dem Wachstum auf *n*-Octan. Phenylalkane und zyklische Alkane wurden von diesem Isolat nicht verwertet. Durch die Verwertung von gleichzeitig zugegebenem Decan (5 % v/v in Pristan) wurde eine Toxizität der getesteten Isoalkane, Cycloalkane sowie Phenylalkane in den eingesetzten Konzentrationsbereichen ausgeschlossen.

Überraschenderweise erfolgte kein Wachstum von Stamm TD3 auf 1-Alkenen, primären Alkoholen oder Aldehyden, also auf Verbindungen, die als mögliche Intermediate des anaeroben Alkanabbaus diskutiert wurden. Da diese Substanzen toxisch für das Wachstum von Mikroorganismen sein können, wurden sehr kleine Konzentrationen (zwischen 0,3 und 1 % v/v)

in einer Pristanphase eingesetzt. Durch gleichzeitige Zugabe von Capronat ins Medium wurde aufgrund des nun erfolgten Wachstums gezeigt, daß die 1-Alkene, primären Alkohole und Aldehyde in den verwendeten Konzentrationen keinen generell hemmenden Einfluß auf Stamm TD3 hatten. Bei Versuchen mit gleichzeitiger Zugabe von Decan (0,5 % v/v in Pristan) zu Ansätzen mit 1-Decen (0,3 % v/v in Pristan), 1-Decanol (0,3 % v/v in Pristan) oder Decanal (0,3 % v/v in Pristan) erfolgte jedoch kein Wachstum. Desweiteren wurde gezeigt, daß 1-Hepten (0,5 % v/v in Pristan), Caprylaldehyd (0,5 % v/v in Pristan) sowie Oenanthaldehyd (0,5 % v/v in Pristan) ebenfalls die Verwertung von Decan (3 % v/v in Pristan) durch Stamm TD3 hemmten. 1-Undecen (0,5 % v/v in Pristan) und 1-Dodecen (0,5 % v/v in Pristan) hemmten die Verwertung von Undecan bzw. Dodecan, nicht jedoch die Verwertung von Capronat. Diese Ergebnisse deuteten auf eine spezifische Hemmung des Alkanstoffwechsels durch die erwähnten Verbindungen hin.

Stamm TD3 wuchs sehr gut auf Monocarbonsäuren in einem Bereich von C₄ bis C₁₈, also einem breiteren Kettenlängenbereich als bei der Verwertung von Alkanen. Auf Decanat erfolgte nur sehr wenig Wachstum. Es wurde bereits häufiger beobachtet, daß Fettsäuren in diesem Kettenlängenbereich toxisch sind (vgl. auch Stamm HdN1, Tabelle 6).

Häufige Substrate für sulfatreduzierende Bakterien wie etwa Wasserstoff, Pyruvat, Lactat, Ethanol oder Acetat wurden von Stamm TD3 nicht verwertet. Ebensowenig wurde ein Wachstum auf Zuckern, Aminosäuren, Dicarbonsäuren, aromatischen Verbindungen oder auf komplexen Substraten wie Hefeextrakt oder Pepton beobachtet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich das Substratspektrum des thermophilen sulfatreduzierenden Stammes TD3 auf Alkane und Monocarbonsäuren beschränkt.

Tabelle 5: Substratverwertung durch das thermophile sulfatreduzierende Neuisolat TD3 sowie durch die bereits beschriebenen alkanoxidierenden Sulfatreduzierer Hxd3 und Pnd3 (Aeckersberg, 1994) unter strikt anoxischen Bedingungen. Hinter jeder geprüften Verbindung sind die eingesetzten Konzentrationen in Klammern angegeben. Zahlen ohne Zusatz beziehen sich auf Lösungen im Medium in mM, Prozentzahlen weisen auf die jeweilige Verdünnung (in % v/v) in einer Trägerphase aus Pristan bzw. dickflüssigem Paraffin hin. Sofern keine Angaben vorhanden sind, wurden die Substrate unverdünnt zugesetzt.

Symbole: + gutes Wachstum, o langsames Wachstum, - kein Wachstum, nb nicht bestimmt

Verbindung ^a	Stamm		
	TD3	Hxd3	Pnd3
<i>Alkane</i>			
Methan	-	-	-
Butan	-	-	-
Pentan (2 %)	-	-	-
Hexan (2 %)	o	-	-
Heptan (3 %)	o	-	-
Octan (3 %)	+	-	-
Nonan (4 %)	+	nb	nb
Decan (5 % / 10 %)	+	-	-
Undecan (10 % / 20 %)	+	nb	nb
Dodecan (10 % / 20 %)	o	+	-
Tridecan (10 % / 20 %)	o	+	-
Tetradecan (10 % / 20 %)	o	+	+
Pentadecan (10 % / 20 %)	o	+	+
Hexadecan (10 % / 20 %)	o	+	+
Octadecan (10 % / 20 %)	-	+	-
2-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
3-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
4-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
2-Methyloctan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
3-Methyloctan (2 % / 4 %)	+	nb	nb
4-Methyloctan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
2-Methylnonan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
3-Methylnonan (2 % / 4 %)	-	nb	nb
dünfl. Paraffin	-	-	-
dickfl. Paraffin	-	-	-
Cyclohexan (2 %)	-	nb	nb
Ethylcyclohexan (2 %)	-	nb	nb
<i>Phenylalkane</i>			
1-Phenylhexan (1 % / 2 %)	-	nb	nb
1-Phenylheptan (1 % / 2 %)	-	nb	nb
1-Phenyldecan (1 % / 2 %)	-	nb	nb
1-Phenyldodecan (1 % / 2 %)	-	nb	-
1-Phenyltridecan (1 % / 2 %)	-	nb	-
<i>1-Alkene</i>			
1-Hepten (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Decen (0,3 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Undecen (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Dodecen (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Tetradecen (0,5 % / 1 %)	-	+	+

Verbindung ^a	Stamm		
	TD3	Hxd3	Pnd3
<i>Alkohole</i>			
Methanol (10)	-	-	-
Ethanol (10)	-	-	-
1-Propanol (10)	-	nb	nb
1-Butanol (5)	-	nb	nb
1-Heptanol (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Octanol (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Decanol (0,3 % / 1 %)	-	nb	nb
1-Hexadecanol	-	+	+
<i>Aldehyde</i>			
Heptanal (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
Octanal (0,5 % / 1 %)	-	nb	nb
Decanal (0,3 % / 0,5 %)	-	nb	nb
<i>Monocarbonsäuren</i>			
Formiat ^b (10)	-	-	+
Acetat (10)	-	-	-
Propionat (5)	-	-	+
Butyrat (5)	+	o	+
Valerianat (4)	+	-	+
Capronat (3 / 6)	+	o	+
Caprylat (2)	+	o	+
Decanat (0,3)	o	+	nb
Myristinat (1)	+	+	+
Palmitat (1)	+	+	+
Stearat (1)	o	+	+
<i>Aromatische Verbindungen</i>			
Benzoat (1)	-	-	-
Benzylalkohol (0,5)	-	-	nb
Toluol (1 %)	-	-	nb
<i>Weitere Verbindungen</i>			
H ₂ ^b	-	-	-
Glucose (10)	-	-	-
Tartrat (5)	-	nb	nb
Lactat (10)	-	nb	nb
Pyruvat (10)	-	-	-
Succinat (5)	-	-	-
Fumarat (10)	-	-	-
Malat (10)	-	-	-
Citrat (5)	-	-	-
Glutamat (5)	-	-	-
Hefeextrakt (5 g/l)	-	nb	nb
Pepton (5 g/l)	-	nb	nb

^a Die Konzentrationsangaben beziehen sich ausschließlich auf die Untersuchungen an Stamm TD3 für die beiden anderen Isolate sei auf die Arbeit von (Aeckersberg, 1994) verwiesen.

^b Die Inkubation erfolgte unter Zusatz von 1 mM Acetat als C-Quelle.

C.3.2 Substratspektrum des denitrifizierenden Stammes HdN1

Wie schon für Stamm TD3 beschrieben, beschränkte sich auch die Verwertung von Alkanen durch Stamm HdN1 auf einen bestimmten Kettenlängenbereich. Stamm HdN1 verwertete Alkane unter anoxischen Bedingungen im länger-kettigen Bereich von C₁₄ bis C₂₀, wobei Tetradecan bereits langsamer als die übrigen Alkane verwertet wurde. Stamm HdN1 war der einzige der bisher bekannten anaeroben Alkanverwerter, der mit einem Phenylalkan, nämlich 1-Phenyltridecan, relativ gutes anaerobes Wachstum zeigte (vgl. C.6.2).

Im Gegensatz zu Stamm TD3 wuchs Stamm HdN1 auf 1-Alkenen, primären Alkoholen und Aldehyden. Dabei wurden diese Verbindungen in einem weiteren Kettenlängenbereich als Alkane verwertet. Es wurde beispielsweise Wachstum auf 1-Decen, Decanal und 1-Octanol beobachtet.

Sehr gutes Wachstum zeigte sich auch auf Monocarbonsäuren in einem sehr weiten Kettenlängenbereich von Acetat (C₂) bis Stearat (C₁₈). Von weiteren getesteten Substanzen wie Zuckern, Aminosäuren, Dicarbonsäuren und aromatischen Verbindungen wurde nur Pyruvat langsam verwertet.

Stamm HdN1 wuchs auch aerob auf Alkanen und Monocarbonsäuren. Aerob wurden Alkane in einem weiteren Kettenlängenbereich als anaerob verwertet. So fand beispielsweise auf Dodecan und Tridecan ein gutes aerobes Wachstum statt, während diese Alkane unter anaeroben Bedingungen nicht verwertet wurden.

C.3.3 Substratspektrum des denitrifizierenden Stammes OcN1

Das Isolat OcN1 zeigte bei der anaeroben Verwertung von Alkanen eine Spezialisierung auf den Kettenlängenbereich von C₈ bis C₁₂. Es erfolgte sehr gutes Wachstum auf Octan, während Heptan nicht als Wachstumssubstrat diente. Eine Giftigkeit von Heptan in der eingesetzten Konzentration (2 und 4 % in HMN) wurde ausgeschlossen, da bei gleichzeitiger Zugabe von Valerianat oder Octan zu Ansätzen mit Heptan ein Wachstum stattfand. Die Verwertung von Undecan war etwas langsamer, die von Dodecan deutlich langsamer als die Verwertung von Octan. Die verfügbaren Isoalkane, Cycloalkane und Phenylalkane dienten nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle für anaerobes Wachstum.

Stamm OcN1 verwertete primäre Alkohole und Aldehyde, jedoch keine 1-Alkene. Da die Unfähigkeit zur Verwertung von 1-Alkenen ein wichtiger Hinweis darauf sein könnte, daß die anaerobe Alkanoxidation möglicherweise nicht über 1-Alkene verläuft, wurde dieses Phänomen genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in C.3.3.1 dargestellt.

Monocarbonsäuren in einem breiten Kettenlängenbereich (C₂ - C₁₆) ermöglichten ein schnelles Wachstum dieses Stammes.

Das Isolat OcN1 zeigte ein im Vergleich mit den anderen Stämmen relativ breites Spektrum

verwertbarer Substrate. Anaerobes Wachstum wurde auf Lactat, Pyruvat, Fumarat, Malat und ebenso auf komplexen Substraten wie Hefeextrakt und Pepton beobachtet. Die untersuchten Zucker und aromatischen Verbindungen wurden nicht verwertet.

Aerobes Wachstum fand wie bei Stamm HdN1 auf Alkanen und Monocarbonsäuren statt. Jedoch entsprach auch hier der Kettenlängenbereich der aerob verwerteten Alkane nicht dem der anaerob verwerteten. So wurde aerob sowohl die Verwertung längerkettiger Alkane wie Dodecan und Tridecan als auch die Verwertung von Hexan und Heptan beobachtet.

Tabelle 6: Substratverwertung durch die denitrifizierenden Neuisolate HdN1 und OcN1 unter strikt anoxischen Bedingungen. Hinter jeder geprüften Verbindung sind die eingesetzten Konzentrationen in Klammern angegeben. Zahlen ohne Zusatz beziehen sich auf Lösungen im Medium in mM, Prozentzahlen weisen auf die jeweilige Verdünnung (in % v/v) in einer Trägerphase aus HMN hin. Sofern keine Angaben vorhanden sind, wurden die Substrate unverdünnt zugesetzt. Symbole: + gutes Wachstum, o langsames Wachstum, - kein Wachstum, nb nicht bestimmt

Verbindung	Stamm	
	HdN1	OcN1
<i>Alkane</i>		
Butan	-	nb
Hexan (2 % / 4 %)	nb	
Heptan (2 % / 4 %)	nb	-
Octan (2 % / 5 %)	-	+
Nonan (2 % / 5 %)	nb	+
Decan (5 %)	-	+
Undecan (5 % / 20 %)	-	+
Dodecan (5 % / 20 %)	-	o
Tridecan	-	-
Tetradecan	o	-
Pentadecan	+	nb
Hexadecan	+	-
Heptadecan	+	nb
Octadecan	+	nb
Eicosan	+	nb
2-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	-
3-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	-
4-Methylheptan (2 % / 4 %)	-	-
2-Methyloctan (2 % / 4 %)	-	-
3-Methyloctan (2 % / 4 %)	-	-
4-Methyloctan (2 % / 4 %)	-	-
2-Methylnonan (2 % / 4 %)	-	-
3-Methylnonan (2 % / 4 %)	-	-
dünndl. Paraffin	+	-
dickfl. Paraffin	+	-
Cyclohexan (1 % / 2 %)	-	-
Ethylcyclohexan (1 % / 2 %)	-	-

Verbindung	Stamm	
	HdN1	OcN1
<i>Phenylalkane</i>		
1-Phenylhexan (1 % / 2 %)	nb	-
1-Phenylheptan (1 % / 2 %)	nb	-
1-Phenyloctan (1 % / 2 %)	nb	-
1-Phenylnonan (1 % / 2 %)	nb	-
1-Phenyldecan (1 % / 2 %)	-	-
1-Phenyl-dodecan (1 % / 2 %)	-	-
1-Phenyl-tridecan (1 % / 2 %)	o	-
<i>1-Alkene</i>		
Hepten (0,5 % / 1 %)	nb	-
Octen (0,5 % / 1 %)	nb	-
Decen (0,3 % / 1 %)	o	-
Hexadecen	+	nb
Heptadecen	+	nb
<i>Alkohole</i>		
Methanol (10)	-	-
Ethanol (10)	-	-
Isopropanol (5 / 10)	nb	-
1-Propanol (5 / 10)	-	-
2-Propanol (5 / 10)	-	-
1-Butanol (5 / 10)	-	-
2-Butanol (5 / 10)	-	-
1-Heptanol (0,5 % / 1 %)	nb	-
1-Octanol (0,5 % / 1 %)	+	o
1-Decanol (0,5 % / 1 %)	-	o
1-Hexadecanol	+	nb
2-Hexadecanol	o	nb
<i>Aldehyde</i>		
Heptanal (0,5 % / 1 %)	nb	-
Octanal (0,5 % / 1 %)	nb	+
Decanal (0,5 % / 1 %)	+	+
<i>Monocarbonsäuren</i>		
Formiat ^a (10)	-	-
Acetat (10)	+	+
Propionat (5)	o	+
2-Methyl-Propionat (5)	-	+
Butyrat (5)	o	+
2-Methyl-Butyrat (4)	+	+
3-Methyl-Butyrat (2 / 4)	+	+
Valerianat (4)	+	+
Capronat (3)	+	+
Oenanthat (2)	+	+
Caprylat (2)	o	+
Decanat (0,5 / 1)	o	+
Laurinat (1)	+	+
Myristinat (1)	+	o
Pentadecanat (1)	+	o
Palmitat (1)	+	o
Heptadecanat (1)	+	nb
Stearat (1)	+	-

Verbindung	Stamm	
	HdN1	OcN1
<i>Aromatische Verbindungen</i>		
Benzoat (1)	-	-
Benzylalkohol (0,5)	-	-
Toluol (1 % / 2 %)	-	-
<i>Weitere Verbindungen</i>		
H ₂ ^a	-	-
Tartrat (5 / 10)	-	-
Lactat (5 / 10)	-	+
Pyruvat (5 / 10)	o	+
Succinat (5 / 10)	-	+
Fumarat (5 / 10)	-	+
Malat (5 / 10)	-	+
Citrat (5 / 10)	-	-
Glutarat (5 / 10)	-	-
Mannose (5 / 10)	-	nb
Fructose (5 / 10)	-	-
Glucose (5 / 10)	-	-
Ascorbat (4 / 8)	-	-
Gluconat (5 / 10)	-	-
Glycin (5)	-	-
Alanin (5)	-	-
Serin (5)	-	-
Aspartat (5)	-	-
Hefeextrakt (5 g/l)	-	o
Pepton (5 g/l)	-	o

^a Die Inkubation erfolgte unter Zusatz von 1 mM Acetat als C-Quelle.

C.3.3.1 Untersuchung der Wirkung von 1-Decen auf die Verwertung von Decan, Decanol und Decanal durch Stamm OcN1

Eine genauere Untersuchung der Unfähigkeit von Stamm OcN1 zur Verwertung von 1-Alkenen zeigte, daß, ähnlich wie bei Stamm TD3 (vgl. C.3.1), eine generelle Toxizität der Alkene in den verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen werden konnte. Bei gleichzeitiger Zugabe von Monocarbonsäuren und 1-Alkenen erfolgte nämlich gutes Wachstum. Bei gleichzeitiger Zugabe von Alkan und Alken unterblieb jedoch die Verwertung des Alkans. Hier könnte, wie bei Stamm TD3, eine spezifische Hemmung der Alkanverwertung durch Alkene erfolgen. Es mußte jedoch auch die Möglichkeit bedacht werden, daß bei der geringen Löslichkeit des Alkens in der wäßrigen Phase eine Toxizität erst dann sichtbar wird, wenn die Zellen auf die Verwertung eines Substrats aus der hydrophoben Phase angewiesen sind. Diese Toxizität würde sich nicht bemerkbar machen, wenn die Zellen, wie im Fall der Monocarbonsäuren, lösliche Verbindungen aus der wäßrigen Phase aufnehmen.

Daher wurde ein weiterer Versuch mit einem in Wasser wenig löslichen Alkohol und

Aldehyd als Substrat durchgeführt. Kulturen in 215 ml Medium mit 17 mM Nitrat wurden mit 20 ml Inokulum aus einer exponentiell wachsenden Decan-Vorkultur beimpft. Es wurden Ansätze mit *n*-Decan, 1-Decen, 1-Decanol und Decanal in unterschiedlichen Kombinationen hergestellt (Tabelle 7). *Trans*-1,4-Dimethylcyclohexan (im folgenden mit DMCH abgekürzt) wurde dabei als interner Standard für die gaschromatographische Analyse der Alkanphase vor und nach der Inkubation verwendet. Vorversuche hatten gezeigt, daß auf DMCH kein Wachstum erfolgte. Die anaeroben Ansätze wurden bei 28°C inkubiert. Vor Beginn der Inkubation sowie nach 40 Tagen wurden mit sterilen, mit N₂ gespülten Spritzen Proben für die Analyse von Nitrat und der Alkanphase gezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Versuchsergebnisse bestätigten, daß keine Verwertung von 1-Decen erfolgte. Desweiteren ließ sich eindeutig zeigen, daß die Wirkung von 1-Decen in einer spezifischen Hemmung der Verwertung von *n*-Decan bestand. Die Verwertung von 1-Decanol und Decanal wurde durch 1-Decen nicht beeinträchtigt (Ansatz E; Tabelle 7). Da Decanol und Decanal in der wäßrigen Phase ähnlich unlöslich sind wie Decan, ist es unwahrscheinlich, daß die Hemmwirkung nur dann auftritt, wenn die Zellen auf ein Substrat aus der Alkanphase angewiesen sind. In den Kulturen, in denen Wachstum erfolgt war (Ansätze B, D und E; Tabelle 7), wurde ferner eine deutliche Trübung und Emulgation der Alkanphase beobachtet. Im mikroskopischen Bild sah man eindeutig, daß die Alkantropfen sehr dicht mit Bakterienzellen besiedelt waren. Dies zeigt, daß auch in Ansatz E die Verwertung von Decanol und Decanal aus der unlöslichen Phase erfolgte, und daß das 1-Decen diese Verwertung nicht störte.

Tabelle 7: Untersuchung der Wirkung von 1-Decen auf das Wachstum von Stamm OcN1 auf Decan, 1-Decanol und Decanal. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Analysen von Nitrat und unlöslicher Phase zu Beginn und am Ende des Wachstums.

Ansatz	Zusatz ^a	eingesetzt [mM] ^b	wiedergefunden [%]	Nitrat verbraucht [mM]
A	ohne Zusatz	-	-	0
B	<i>n</i> -Decan	0,37	9	2,6
C	<i>n</i> -Decan	0,37	99	0
	1-Decen	0,38	98	
D	<i>n</i> -Decan	0,37	10	6,4
	1-Decanol	0,37	0	
	Decanal	0,38	2	
E	<i>n</i> -Decan	0,37	98	4,3
	1-Decen	0,38	97	
	1-Decanol	0,37	0	
	Decanal	0,38	1	

^a Alle Substanzen wurden in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan als Trägerphase zugesetzt. Die Trägerphase enthielt ferner *Trans*-1,4-Dimethylcyclohexan (DMCH) als internen Standard für die gaschromatographische Analyse.

^b Bei der Konzentrationsangabe wurden die zugesetzten Substanzmengen formal auf die wäßrige Phase bezogen.

C.4 Systematische Einordnung der neuen Bakterienisolate

Da die bislang ermittelten phänotypischen Merkmale für eine systematische Einordnung der Neuisolate nicht ausreichten, wurden die 16S rRNA-Sequenzen als weiteres, genotypisches Merkmal ermittelt. Die Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA sowie der anschließende Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen anderer Bakterienisolate erfolgte durch Dr. F. Rainey. Die Ermittlung des G+C-Gehaltes wurde ebenfalls von Dr. F. Rainey durchgeführt.

C.4.1 Taxonomische Einordnung des Stammes TD3

Die Ermittlung der Sequenz der 16S rRNA durch Dr. F. Rainey ergab eine Zugehörigkeit des Stammes TD3 zur δ -Gruppe der Proteobakterien. Dieser Stamm ist mit keiner bekannten Gattung näher verwandt und zweigt tief im Stammbaum der sulfatreduzierenden Bakterien ab. Die beiden weiteren bekannten sulfatreduzierenden Alkanverwerter, Stamm Hxd3 und Stamm Pnd3 (Aeckersberg, 1994), gehören zwar ebenfalls zu der δ -Gruppe, zeigen aber bezüglich der 16S rRNA keinerlei nähere Verwandtschaft zu Stamm TD3 (Abb. 18). Der G+C-Gehalt dieses Isolats betrug 37,4 mol%.

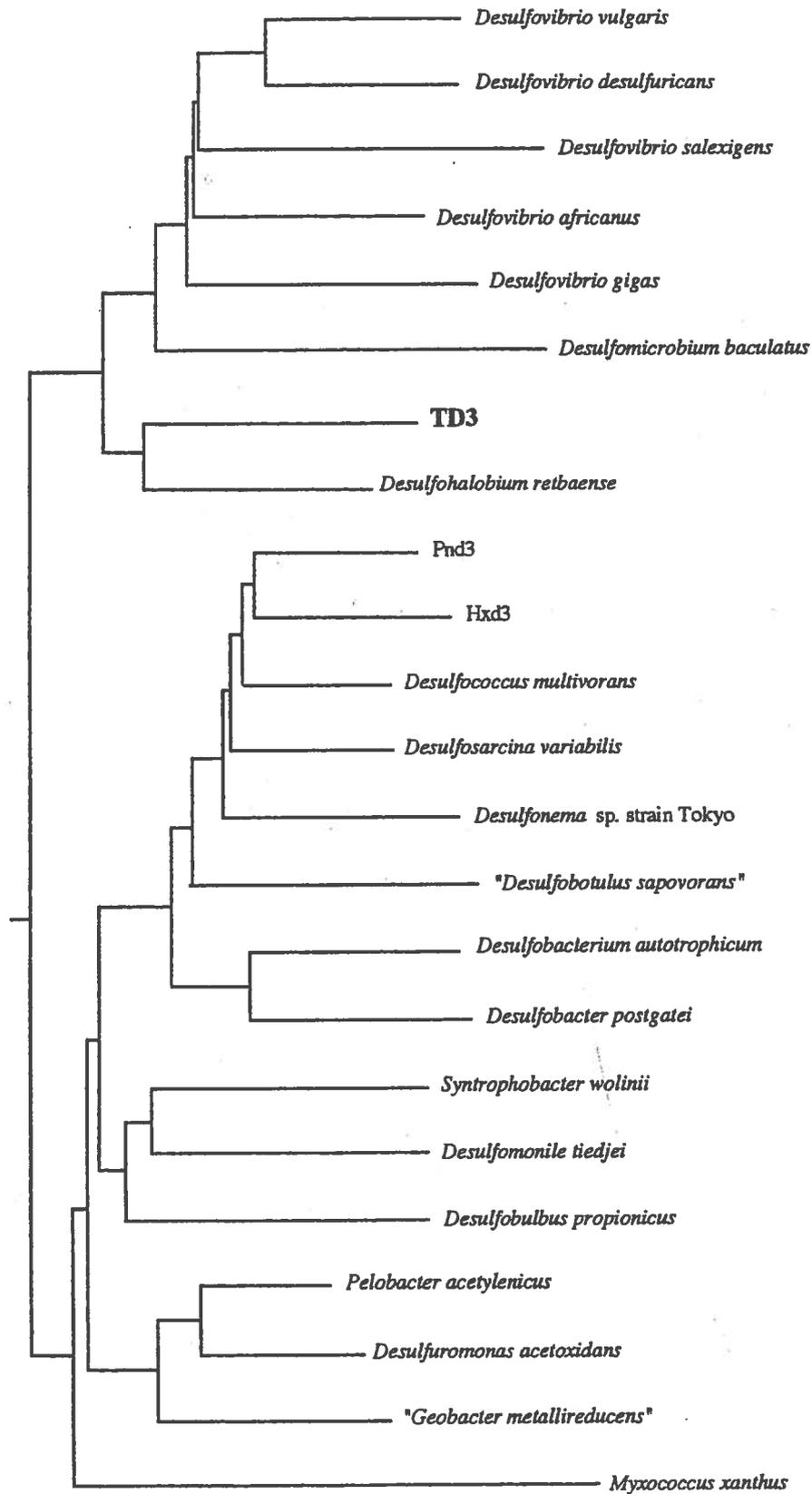


Abb. 18: Phylogenetische Einordnung von Stamm TD3 in die δ -Gruppe der Proteobakterien anhand der 16S rRNA-Sequenz. Die eingetragene Strecke entspricht 5 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA-Sequenzen.

C.4.2 Taxonomische Einordnung des Stammes HdN1

Das Neuisolat HdN1 gehört aufgrund seiner 16S rRNA-Sequenz zur γ -Gruppe der Proteobakterien, ist aber mit keinem bekannten Organismus aus dieser Gruppe, dessen 16S rRNA-Sequenz für Vergleiche zur Verfügung stand, näher verwandt (Abb. 19). Der G+C-Gehalt dieses Stammes betrug 53,8 mol%.

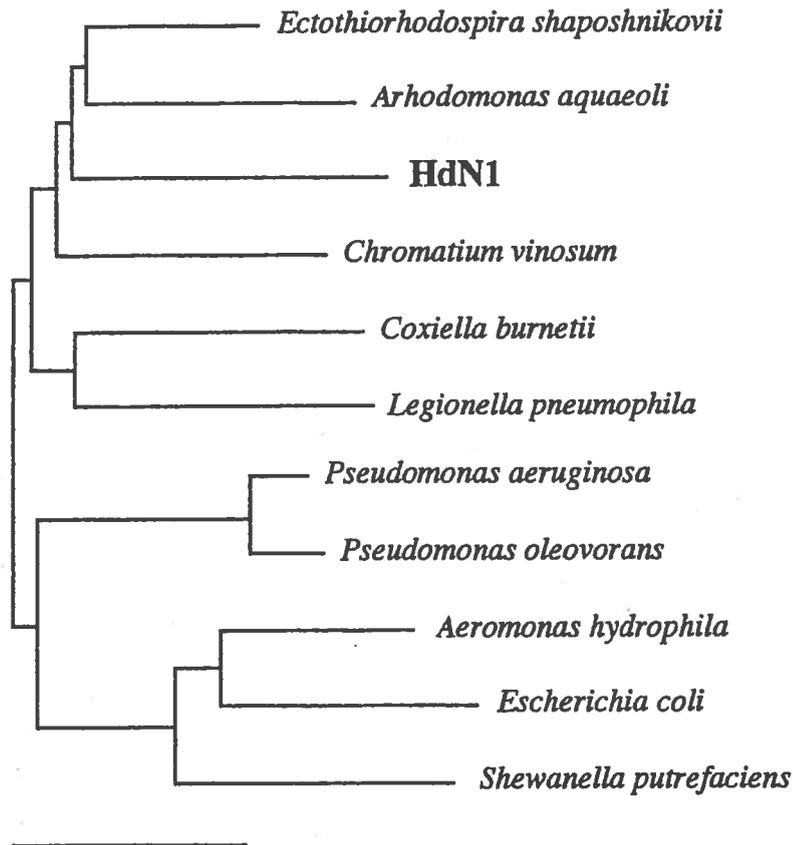


Abb. 19: Phylogenetische Verwandtschaft des Stammes HdN1 in der γ -Gruppe der Proteobakterien, wie sie anhand von Vergleichen der 16S rRNA-Sequenzen ermittelt wurde. Die eingetragene Strecke entspricht 5 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA-Sequenzen.

C.4.3 Taxonomische Einordnung des Stammes OcN1

Die 16S rRNA-Sequenz des Stammes OcN1 ergab eine Zugehörigkeit des Neuisolats zur β -Gruppe der Proteobakterien. Dabei zeigte sich eine relativ enge Verwandtschaft zu bekannten Stämmen der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* (Abb. 20). Der G+C-Gehalt des Stammes OcN1 betrug 63,1 mol% und lag damit etwas niedriger als bei anderen Arten der Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* (ca. 65 - 67 mol%; Anders et al., 1995; Rabus und Widdel, 1995).

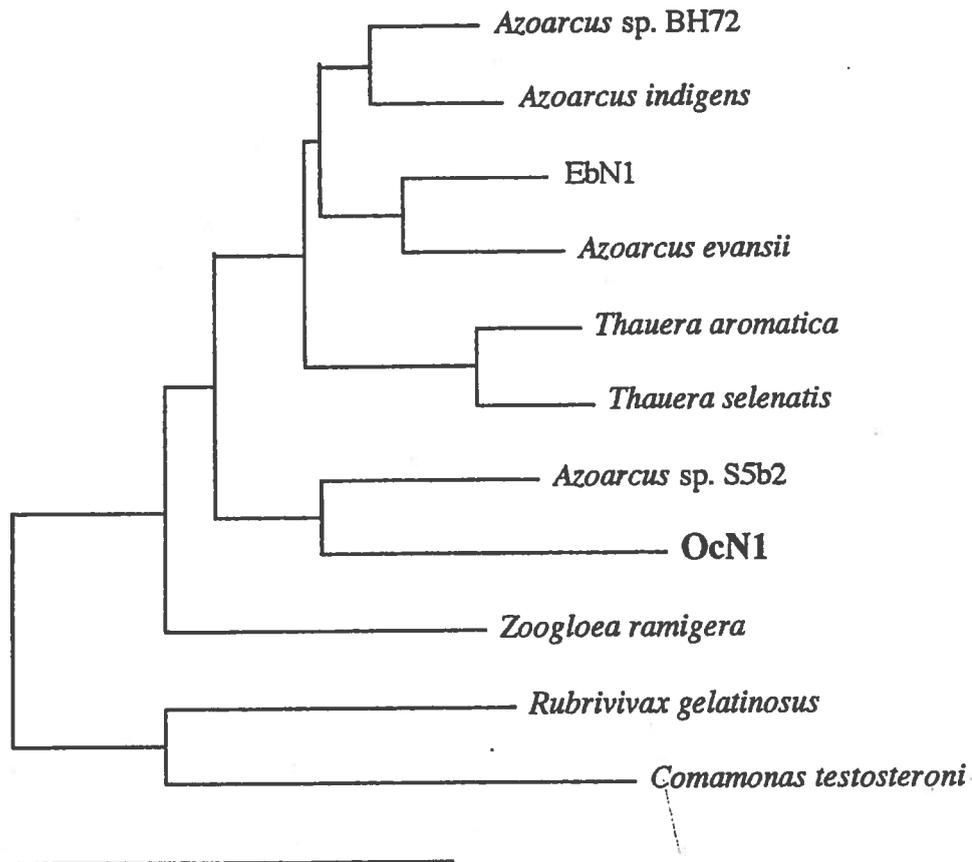


Abb. 20: Phylogenetische Einordnung von Stamm OcN1 in die β -Gruppe der Proteobakterien anhand der 16S rRNA-Sequenz. Die eingetragene Strecke entspricht 5 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA-Sequenzen.

C.5 Bilanzierung des anaeroben Alkanabbaus

Zum direkten Nachweis, daß das Wachstum der neu isolierten Bakterien unter anoxischen Bedingungen tatsächlich auf einer Verwertung von Alkanen beruhte, wurde die Substratumsetzung bilanziert.

C.5.1 Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation in Stamm TD3

Kulturen von Stamm TD3 für stöchiometrische Analysen wurden in Flachgefäßen (B.2.5.5) mit 92 ml Medium, welches mit Sulfid und Dithionit reduziert worden war, angesetzt. Es wurden 350 µl Alkanphase eingespritzt. Diese Alkanphase setzte sich aus 88 % (v/v) Pristan als Trägerphase und internem Standard für die spätere gaschromatographische Analyse und 12 % (v/v) sterilfiltriertem Decan als Substrat zusammen. In einem Ansatz wurde die Decanmenge auf 9 % (v/v) verringert (Ansatz 1, Tabelle 8). Die Ansätze wurden mit 10 ml aus einer Capronat-Kultur, die mit einer limitierenden Menge Sulfat (15 mM) angezogen worden war, beimpft. Die Gefäße wurden 40 Tage bei 60°C inkubiert und dabei etwa einmal täglich geschüttelt.

Der Sulfidgehalt der Kulturen wurde vor und nach der Inkubation gemessen. Die während des Wachstums auf Decan gebildete Zellmasse wurde in diesem Versuch vernachlässigt. Die Vernachlässigung der assimilierten Substratmenge war möglich, weil sulfatreduzierende Bakterien generell einen niedrigen Ertragskoeffizienten haben. Zudem hafteten die Zellen fast ausschließlich an der Alkanphase, so daß das Ernten der Zellen und die gleichzeitige quantitative Bestimmung des verwerteten Alkans problematisch gewesen wäre. Die Alkanphase wurde durch Hexanextraktion aus den Kulturen gewonnen und gaschromatographisch analysiert. Die Alkankonzentration wurde aus dem Verhältnis der integrierten Peakflächen des Decans und des internen Standards Pristan im Gaschromatogramm nach Vergleich mit Standards ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

In den Wachstumsansätzen wurde ein Verbrauch von 99 % (1,49 mM) bzw. 82 % (1,73 mM) des eingesetzten Decans unter Bildung von 11,3 bzw. 12,7 mM Sulfid gemessen. In einem Kontrollansatz ohne den Elektronenakzeptor Sulfat wurde keine Decan-Abnahme gemessen. Ebenso wenig verschwand Decan in einem Ansatz mit durch Hitze (75°C, 3 h) abgetöteten Zellen. Somit konnte eine Abnahme von Decan durch Adsorption an die Zellen oder an den Butylstopfen ausgeschlossen werden. Die fehlende Sulfidbildung im Kontrollansatz ohne Decan zeigte, daß Pristan nicht als Elektronendonator genutzt wurde.

Tabelle 8: Decanabnahme sowie Sulfidbildung beim anaeroben Wachstum von Stamm TD3 nach 40tägiger Inkubation bei 60°C.

Ansatz	Decan		verbraucht		Sulfidbildung		Molares Verhältnis Sulfid/Decan
	zugesezt ^a [mM]	gefunden ^a [mM]	[mM]	[%]	gemessen [mM]	netto ^b [mM]	
Wachstumsansätze mit Stamm TD3							
Ansatz 1	1,50	0,01	1,49	99	11,6	11,3	7,58
Ansatz 2	2,10	0,37	1,73	82	13,0	12,7	7,34
Kontrollansätze							
Stamm TD3; ohne Sulfat	2,10	2,10	< 0,01	0	0,2	-	
Stamm TD3; abgetötete Z. (75°C, 3 h)	2,10	2,10	< 0,01	0	-	-	
Stamm TD3; ohne Decan	-	-	-	-	0,3	-	
Ansatz ohne Zellen	2,10	2,10	< 0,01	0	-	-	

^a Die Substanzmengen wurden formal auf die wäßrige Phase bezogen.

^b Sulfidbildung nach Abzug des Wertes im Kontrollansatz ohne Decan.

C.5.2 Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation in Stamm HdN1

Da der denitrifizierende Stamm HdN1 nicht empfindlich gegenüber Sauerstoff war und diesen als Elektronenakzeptor verwendete, war es für den Nachweis der anaeroben Alkanoxidation wichtig, vollständig anoxische Bedingungen zu gewährleisten. Daher wurden alle Gefäße bereits vor der Befüllung mit Medium mit N₂/CO₂ (90/10 v/v) begast und auch während der weiteren Handhabung möglichst keinem Luftsauerstoff ausgesetzt. Alle zugesetzten Substanzen wurden bereits vor der Zugabe durch mehrmaliges Begasen mit N₂ und anschließendes Evakuieren von Sauerstoff befreit. Die Bilanzierung wurde mit Kulturen in den bereits beschriebenen Flachgefäßen (B.2.5.5) mit 100 ml Medium, das 16 mM Nitrat und 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel enthielt, durchgeführt. Es wurden 100 µl Alkanphase injiziert, die aus HMN (60 % v/v) und Hexadecan (40 % v/v) bestand. HMN diente in der gaschromatographischen Analyse als interner Standard. Die noch nicht beimpften Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen, damit eventuell noch vorhandener Sauerstoff mit dem Reduktionsmittel Ascorbat

reagieren konnte. Eine Kontrolle mit 1 mg/l Resazurin als Redoxindikator entfärbte sich über Nacht.

Die Wachstumsansätze wurden am folgenden Tag mit 1 ml Inokulum aus einer Vorkultur auf Valerianat beimpft. Der Kontrollansatz mit Resazurin blieb steril. Die pasteurisierte Kontrolle wurde mit 10 ml einer pasteurisierten Zellsuspension des Stammes HdN1 (10fach konzentriert) aus der Vorkultur auf Valerianat in entsprechend weniger Volumen (91 ml) beimpft.

Alle Ansätze wurden 14 Tage bei 28°C inkubiert. Während der gesamten Inkubationszeit wurde keine Rosafärbung des Kontrollansatzes mit Resazurin beobachtet.

Die Meßergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Nitratkonzentration wurde zu Beginn und nach Beendigung der Inkubation bestimmt. Die sehr kleine Alkanphase wurde nach Beendigung der Inkubation mittels Hexan aus den Kulturgefäßen extrahiert. Anschließend wurden die Kulturen zur Bestimmung der Zelltrockenmasse durch vorher gewogene Nitrocellulosefilter (Porengröße 0,2 µm) filtriert. Eine Ernte der Zellen durch Zentrifugation war nicht möglich, da auf Hexadecan gewachsene Zellen die beschriebenen Einschlüsse bildeten und daher nicht quantitativ abzentrifugiert werden konnten (vgl. C.2.2.1). Die Filter wurden anschließend bei 60°C bis zu konstantem Gewicht getrocknet und die Zellmasse durch Wiegen der Filter bestimmt. Zur Kontrolle, ob die vorangehende Hexanextraktion durch Zellyse die auf dem Filter erfaßbare Zellmasse vermindert, wurde ein Ansatz ohne vorherige Hexanextraktion filtriert. Die anschließende Zellmassenbestimmung ergab einen Zellertrag in einem ähnlichen Bereich wie bei den anderen Kulturen (siehe Ansatz Trockenmasse, Tabelle 9).

Einer der Ansätze (Ansatz B, Tabelle 9) wurde ohne Ascorbat als Reduktionsmittel inkubiert. Die damit erzielten Werte für gebildete Trockenmasse und verbrauchtes Hexadecan und verbrauchtes Nitrat stimmten mit den Werten aus anderen Ansätzen im wesentlichen überein. Demnach hatte Ascorbat keinen Einfluß auf die anaerobe Alkanoxidation. In der Kontrolle ohne Nitrat wurde nur eine geringfügige Abnahme der Hexadecankonzentration gemessen, die in einem ähnlichen Bereich lag wie in der pasteurisierten Kontrolle. Die Kontrolle mit reinem HMN ohne Zusatz zeigte, daß das Wachstum von der Zugabe von Hexadecan abhing und HMN nicht als Substrat verwertet wurde (Ansatz ohne Hexadecan, Tabelle 9).

Der aerobe Alkanoxidierer *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196Aa (Griffin und Traxler, 1981; Traxler und Bernard, 1969) wurde als Kontrollstamm in diesem Versuch eingesetzt. Unter den genannten Versuchsbedingungen wurde nur eine geringfügige Abnahme der Hexadecankonzentration gemessen, die im Bereich der pasteurisierten Kontrolle lag. Eine Nitratreduktion fand nicht statt. In einem parallelen Ansatz unter oxidischen Bedingungen wurde gezeigt, daß Stamm 196Aa prinzipiell zum Wachstum auf Hexadecan in dem hier verwendeten Mineralmedium in der Lage war.

In den Wachstumsansätzen mit Stamm HdN1 verschwand das eingesetzte Hexadecan bei limitierender Konzentration zu 98 %, bei einem Hexadecan-Überschuß waren 87 % bzw. 91 % am Ende des Wachstums verbraucht. Auffällig war, daß Kulturen mit einem Überschuß an Hexadecan

sehr viel mehr Hexadecan im Verhältnis zum reduzierten Nitrat verbrauchten, als Kulturen mit einer limitierenden Menge Alkan. Die mikroskopische Untersuchung dieser Kulturen zeigte, daß bei einem Überschuß an Alkan ein sehr viel größerer Anteil der Zellen Einschlüsse aufwies (vgl. C.2.2.1) als bei limitierender Substratmenge. Das deutet darauf hin, daß eine gewisse Menge an Hexadecan nicht dissimilatorisch zur Energiegewinnung genutzt, sondern zum Aufbau von Speichersubstanzen verwendet wurde.

Tabelle 9: Bestimmung der gebildeten Zelltrockenmasse sowie des Hexadecan- und Nitrat-Verbrauchs in anaeroben Kulturen von Stamm HdN1 nach 14-tägiger Inkubation bei 28°C

Ansatz	gebildete Zelltrockenmasse [mg]	Hexadecan		verbraucht		Nitrat		Molares Verhältnis Nitrat/Hexadecan			
		eingesetzt [mM] ^b	gefunden [mM] ^b	[mM] ^b	[%]	eingesetzt [mM]	gefunden [mM]				
Wachstumsansätze mit Stamm HdN1											
Ansatz A Hexadecan im Überschub	21	2,00	0,26	1,74	87	0,35	1,39	16,0	0,0	16,0	11,5
Ansatz B Hexadecan im Überschub ohne Ascorbat	27	2,00	0,18	1,82	91	0,44	1,38	16,0	0,0	16,0	11,6
Ansatz C Hexadecan limitierend	16	1,00	0,02	0,98	98	0,26	0,72	34,0	24,0	10,5	14,6
Ansatz D Hexadecan limitierend	13	1,00	0,02	0,98	98	0,21	0,76	34,0	22,0	12,0	15,8
Kontrollansätze											
Trockenmasse ^c	24	2,00	nb ^d	-	-	-	-	16,0	0,0	16,0	
Stamm HdN1 ohne Nitrat	0	2,00	1,97	0,03	1,5	-	-	< 0,05	< 0,05	< 0,05	
Stamm HdN1 pasteurisiert	nb	2,00	1,99	0,01	0,5	-	-	16,0	16,0	< 0,05	
Stamm HdN1 ohne Hexadecan	0	-	-	-	-	-	-	16,0	16,0	< 0,05	
Stamm HdN1 ohne HIMN und Hexadecan	0	-	-	-	-	-	-	16,0	16,0	< 0,05	
<i>P. aeruginosa</i> Stamm 196Aa	0	2,00	1,97	0,03	1,5	-	-	16,0	16,0	< 0,05	

^a Die für die Bildung der Zelltrockenmasse assimilierte Hexadecan-Menge wurde nach folgender Gleichung geschätzt:



^b Die Konzentrationsangaben wurden formal auf die wäßrige Phase bezogen.

^c Bei diesem Ansatz wurde die Zelltrockenmasse ohne vorherige Hexanextraktion bestimmt

^d nb, nicht bestimmt

C.6 Wachstumsversuche

C.6.1 Wachstum mit Alkanen

C.6.1.1 Wachstum von Stamm TD3 auf Decan

Ein großer Nachteil der in einer vorangegangenen Arbeit (Aeckersberg, 1994) beschriebenen alkanoxidierenden Sulfatreduzierer war die geringe Wachstumsgeschwindigkeit auf Alkanen. Das erste Isolat Hxd3 benötigte auf Hexadecan in Mineralmedium ungefähr sechs Wochen bis zur Bildung von 10 mM Sulfid. Die Wachstumsgeschwindigkeit wurde nach verschiedenen Optimierungsversuchen durch die Zugabe von α -Cyclodextrin auf eine Bildung von 10 mM Sulfid innerhalb von vier Wochen gesteigert. Der zweite Stamm Pnd3, benötigte etwa vier Wochen zur Bildung von 15 mM Sulfid mit Pentadecan bei gleichzeitiger Zugabe von α -Cyclodextrin (Aeckersberg, 1994).

Das neue thermophile Isolat TD3 hatte demgegenüber eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf Alkanen. Abbildung 21 zeigt das Wachstum des Stammes TD3 auf *n*-Decan (10 % v/v in Pristan) und zum Vergleich mit Capronat (5 mM). Als Kontrolle ohne Substrat diente eine Kultur mit reinem Pristan. Das Inokulum (9 % v/v) für den Wachstumsversuch stammte aus einer frischen Kultur mit Capronat (5 mM), da Alkankulturen aufgrund der hauptsächlich an der Alkanphase klebenden Zellen schlecht als Inokulum zu verwenden waren. Das Wachstum wurde anhand der Sulfidbildung in den Kulturen verfolgt, da Messungen zur optischen Dichte aufgrund der Inhomogenität der Kulturen nicht möglich waren. Die mehrere Tage dauernde lag-Phase zu Beginn der Kulturen war vermutlich mit der Induktionszeit für den Alkanstoffwechsel und auch mit dem nur allmählich erfolgenden Anheften der Zellen an die Alkanphase zu erklären. Die Dauer der lag-Phase korrelierte deutlich mit dem Alter des Inokulums. Je frischer das Inokulum war, desto kürzer war die lag-Phase der Kulturen. Stamm TD3 bildete auf Decan innerhalb von zwei Wochen etwa 10 mM Sulfid. Die Verdopplungszeit auf Decan betrug zwei bis drei Tage in der kurzen exponentiellen Wachstumsphase. Das Wachstum auf Capronat war mit der Bildung von fast 25 mM Sulfid innerhalb von zwei Wochen deutlich schneller als auf Alkanen.

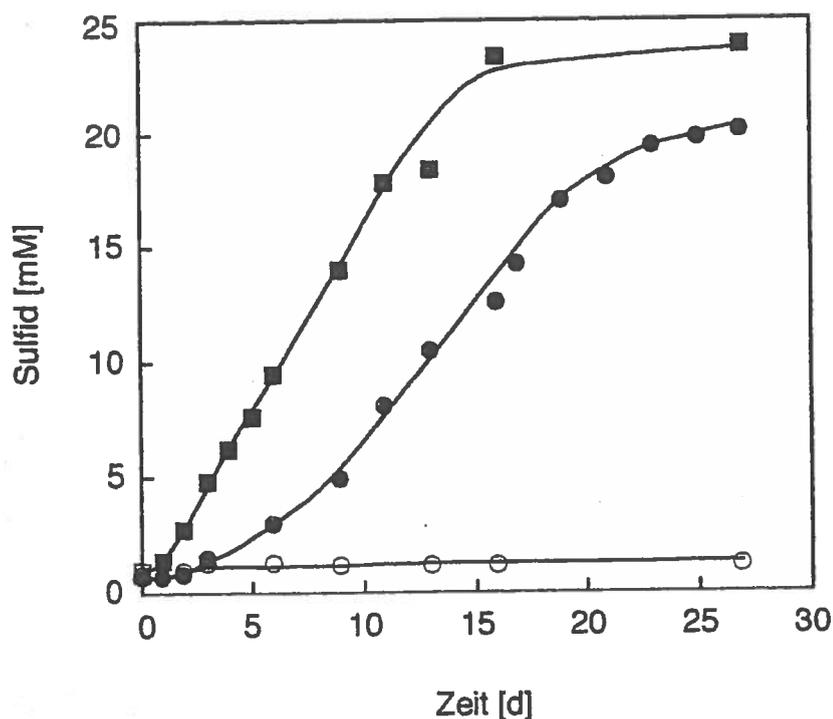


Abb. 21: Sulfidbildung beim Wachstum von Stamm TD3 auf Decan (10 % v/v in Pristan) (●) bzw. 5 mM Capronat (■). In der Kontrolle ohne Substrat (○) war keine Sulfidbildung festzustellen.

C.6.1.2 Anaerobes Wachstum von Stamm HdN1 auf Hexadecan

Das Wachstum der Denitrifizierer auf Alkanen war deutlich schneller als das der Sulfatreduzierer. Ein weiterer Vorteil war eine im Vergleich zu den Sulfatreduzierern höhere Bildung von Zellmasse, was für zukünftige Untersuchungen an Zellextrakten, Enzymreinigungen etc. vorteilhaft ist. Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der Nitratreduktion verfolgt, da die Bildung von Zellflocken im Fall des Stammes HdN1 sowie die Anheftung der Zellen an die Alkanphase im Falle des Stammes OcN1 die Verfolgung des Wachstums anhand von Trübungsmessungen verhinderten.

Die in Abbildung 22 dargestellten Wuchskurven von Stamm HdN1 wurden in anaeroben Kulturen ermittelt, die mit 1 % (v/v) einer auf Valerianat gewachsenen Kultur beimpft worden waren. Mit 0,5 ml Hexadecan in einer 100 ml Kultur war eine sehr lange lag-Phase von ca. 5 Tagen zu beobachten. Anschließend wurden innerhalb von 3 Tagen die eingesetzten 8,5 mM Nitrat verbraucht. Mittels halblogarithmischer Auftragung der Nitratreduktion mit Hexadecan wurde eine Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase von etwa 15 bis 20 Stunden ermittelt. In der Kontrolle ohne Hexadecan zeigte sich keine nennenswerte Nitrat-Abnahme. Zum Vergleich ist das Wachstum einer parallelen Kultur auf Valerianat (4 mM) dargestellt. Hier wurden die eingesetzten 9 mM Nitrat innerhalb von ca. 3,5 Tagen reduziert. Die anfängliche lag-Phase der

Kulturen unterlag sehr starken Schwankungen mit einer deutlichen Abhängigkeit vom Alter des Inokulums.

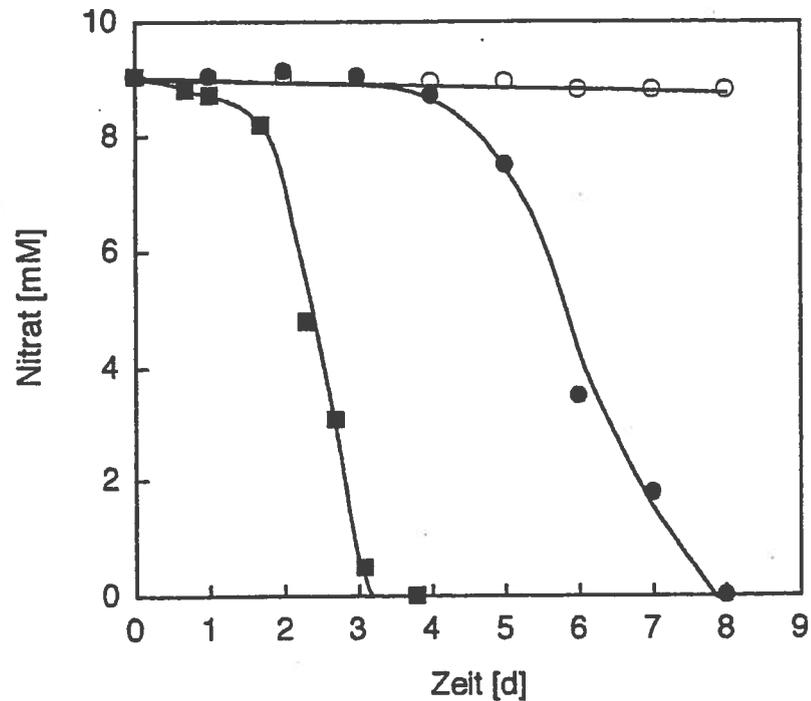


Abb. 22: Nitratreduktion bei Wachstum von Stamm HdN1 mit Hexadecan (●) bzw. 4 mM Valerianat (■) als Substrat. In einer Kontrolle ohne Substrat (○) erfolgte im Beobachtungszeitraum nur eine sehr geringe Abnahme der Nitratkonzentration.

Eine Verdünnung von Hexadecan in HMN als Trägerphase setzte die Wachstumsgeschwindigkeit von Stamm HdN1 deutlich herab. Wie Abbildung 23 zeigt, war die Nitrat-Abnahme in einer Kultur, die Hexadecan (2 % v/v) in HMN verdünnt enthielt, viel langsamer als bei der Zugabe von reinem Hexadecan. Im Vergleich war das zugegebene Nitrat (17 mM) in einer parallelen Kultur auf reinem Hexadecan bereits nach 8 Tagen vollständig verbraucht. Die geringfügige Nitrat-Abnahme in der Kontrolle ohne Substrat ist damit zu erklären, daß das Inokulum aus einer Hexadecan-Kultur stammte und diese Zellen vermutlich mit Speicherstoffen gefüllt waren (vgl. C.2.2.1).

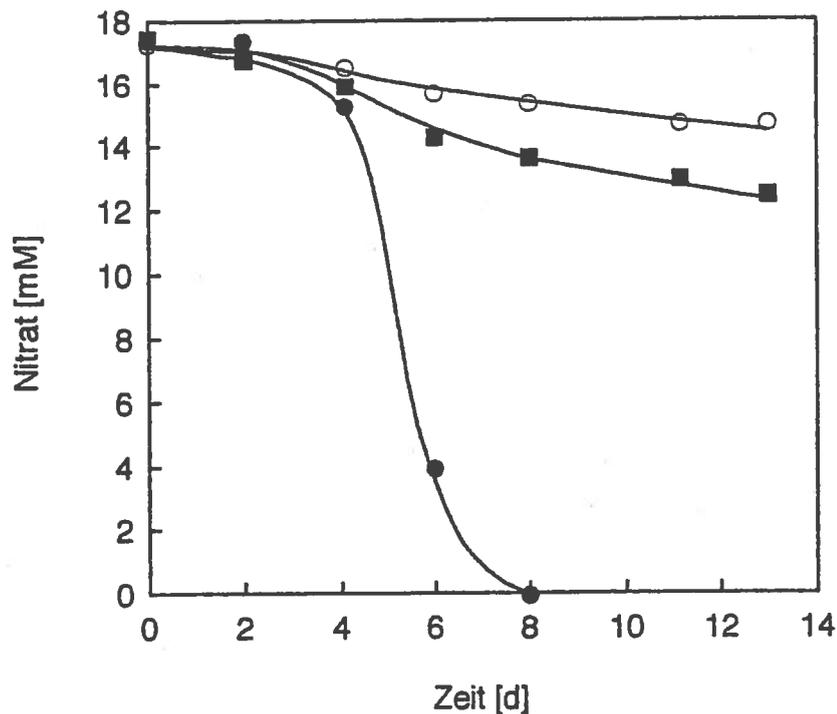


Abb. 23: Vergleich der Nitratabnahme in anaeroben Kulturen des Stammes HdN1 mit reinem Hexadecan (●), mit in HMN verdünntem Hexadecan (2 % v/v) (■) und mit HMN allein ohne Substrat (○).

C.6.1.3 Anaerobes Wachstum von Stamm OcN1 auf Octan

Das Isolat OcN1 wuchs mit einer mit Stamm HdN1 vergleichbaren Geschwindigkeit (Abb. 24). Mit 10 % (v/v) Octan in HMN als Trägerphase wurden nach einer mehrere Tage währenden lag-Phase 8 mM Nitrat innerhalb von ca. 3 Tagen verbraucht. Mittels halblogarithmischer Auftragung der Nitratreduktion mit Hexadecan wurde wie bei Stamm HdN1 eine Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase von etwa 15 bis 20 Stunden ermittelt. In der Kontrolle mit reinem HMN zeigte sich keine signifikante Nitratabnahme. Ein Parallelansatz mit 2 mM Caprylat zeigte deutlich schnelleres Wachstum mit einer Reduktion der eingesetzten 8,5 mM Nitrat innerhalb von ca. 1,5 Tagen im Anschluß an eine lag-Phase von ca. 1 Tag.

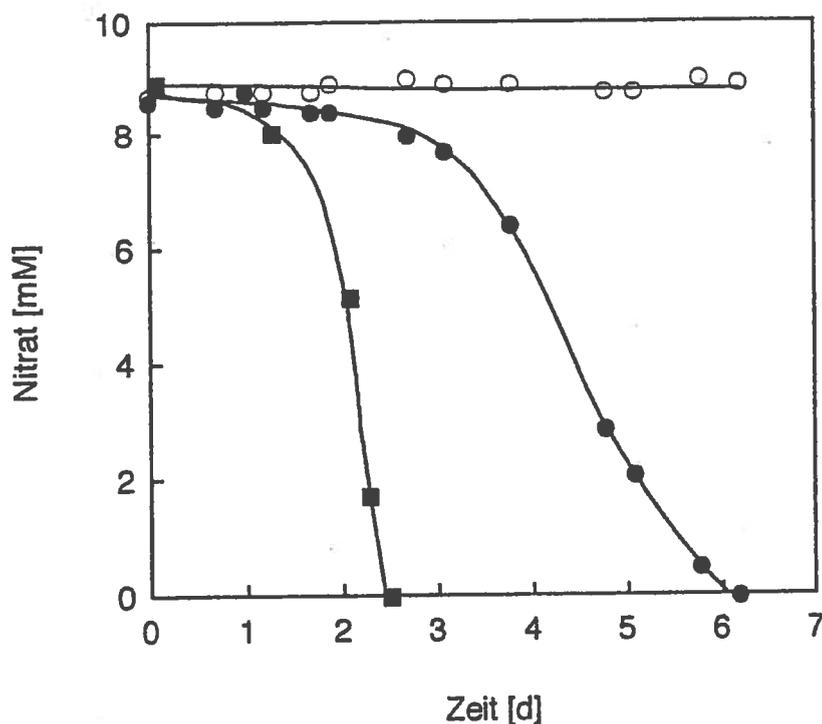


Abb. 24: Anaerobes Wachstum von Stamm OcN1 mit Octan (10 % v/v) (●) bzw. 2 mM Caprylat (■). Das Wachstum wurde anhand der Nitratreduktion verfolgt. In einer parallelen Kontrolle ohne Substrat (○) fand keine signifikante Nitratreduktion statt.

C.6.2 Wachstum mit 1-Phenylalkanen

Neben verschiedenen *n*-Alkanen, verzweigten Alkanen und Cycloalkanen wurden auch 1-Phenylalkane als Substrate für ein anaerobes Wachstum der neuen Isolate getestet. Diese Substanzklasse war insofern interessant, als die in dieser Arbeit beschriebenen Bakterienstämme keine aromatischen Substanzen verwerten konnten (vgl. Tabellen 5 und 6) und 1-Phenylalkane im Gegensatz zu *n*-Alkanen daher bei einer Oxidation theoretisch nur von einer Seite angegriffen werden konnten. Desweiteren sind diese Substrate aufgrund des aromatischen Ringes durch UV-Absorption sehr gut meßbar.

1-Phenylalkane waren jedoch nur mit Seitenketten bis zu einer Länge von 13 C-Atomen im Handel erhältlich. Nur diese wurden daher als Substrate für die drei neu beschriebenen Stämme TD3, HdN1 und OcN1 sowie für den Sulfatreduzierer Pnd3 getestet (vgl. Tabellen 5 und 6). Es stellte sich heraus, daß mit einer Ausnahme auf keinem der Phenylalkane ein meßbares Wachstum der getesteten Stämme erfolgte. Die einzige Ausnahme bildete 1-Phenyltridecan, welches ein relativ gutes Substrat für Stamm HdN1 darstellte.

In Abbildung 25 ist die Nitratzunahme während des anaeroben Wachstums von Stamm HdN1 auf 1-Phenyltridecan dargestellt. Bei einer Zugabe von reinem 1-Phenyltridecan wurden

die zugesetzten 17 mM Nitrat innerhalb von 48 Tagen verbraucht, wobei kein Nitrit gebildet wurde. Im Vergleich zu einer parallelen Kontrolle auf Hexadecan, die 17 mM Nitrat innerhalb von 8 Tagen verbrauchte, war das Wachstum also deutlich langsamer. Wie Hexadecan (vgl. C.6.1.2) wurde auch 1-Phenyltridecan in der unverdünnten Form besser verwertet als bei einer Verdünnung in HMN (10 % v/v) als Trägerphase. In einer parallelen Kultur wurde nochmals bestätigt, daß Stamm HdN1 *n*-Tridecan unter anoxischen Bedingungen nicht verwerten konnte.

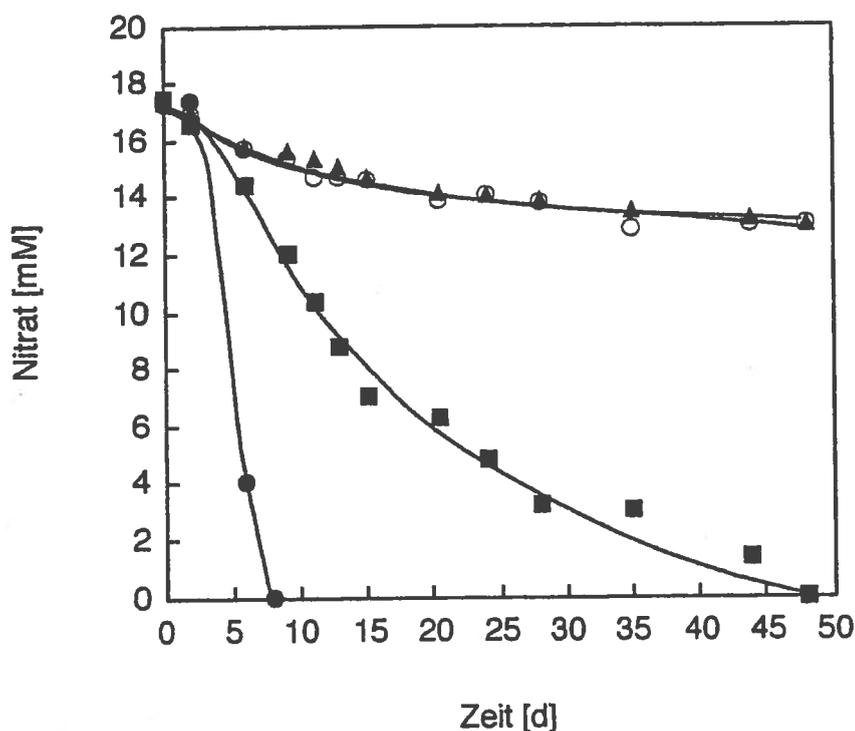


Abb. 25: Nitratreduktion bei Wachstum des Stammes HdN1 auf 1-Phenyltridecan (■) im Vergleich zum Wachstum auf Hexadecan (●). Die Kontrolle mit *n*-Tridecan (▲) verhielt sich wie eine Kontrolle, der kein Substrat zugesetzt worden war (○). Sämtliche Substrate wurden unverdünnt zugesetzt.

Fertig gewachsene Kulturen von Stamm HdN1 auf 1-Phenyltridecan wurden anschließend auf Phenyl-substituierte Carbonsäuren im Kulturüberstand untersucht. Dazu wurden wenige Milliliter aus der jeweiligen Kultur entnommen, sofort über einen lösungsmittelresistenten Membranfilter filtriert und an der HPLC untersucht (B.3.6). Kulturen von Stamm HdN1 auf 1-Phenyltridecan ergaben im Chromatogramm einen sehr deutlichen Peak (Abb. 26), der weder beim Wachstum von Stamm HdN1 auf Hexadecan noch in nicht beimpften Parallelansätzen mit 1-Phenyltridecan nachgewiesen wurde. Die Substanz wurde anhand der Retentionszeit und des Absorptionsspektrums sowie nach einer Standardaddition als Benzoat identifiziert. Weitere Phenyl-substituierte Carbonsäuren wurden nicht nachgewiesen.

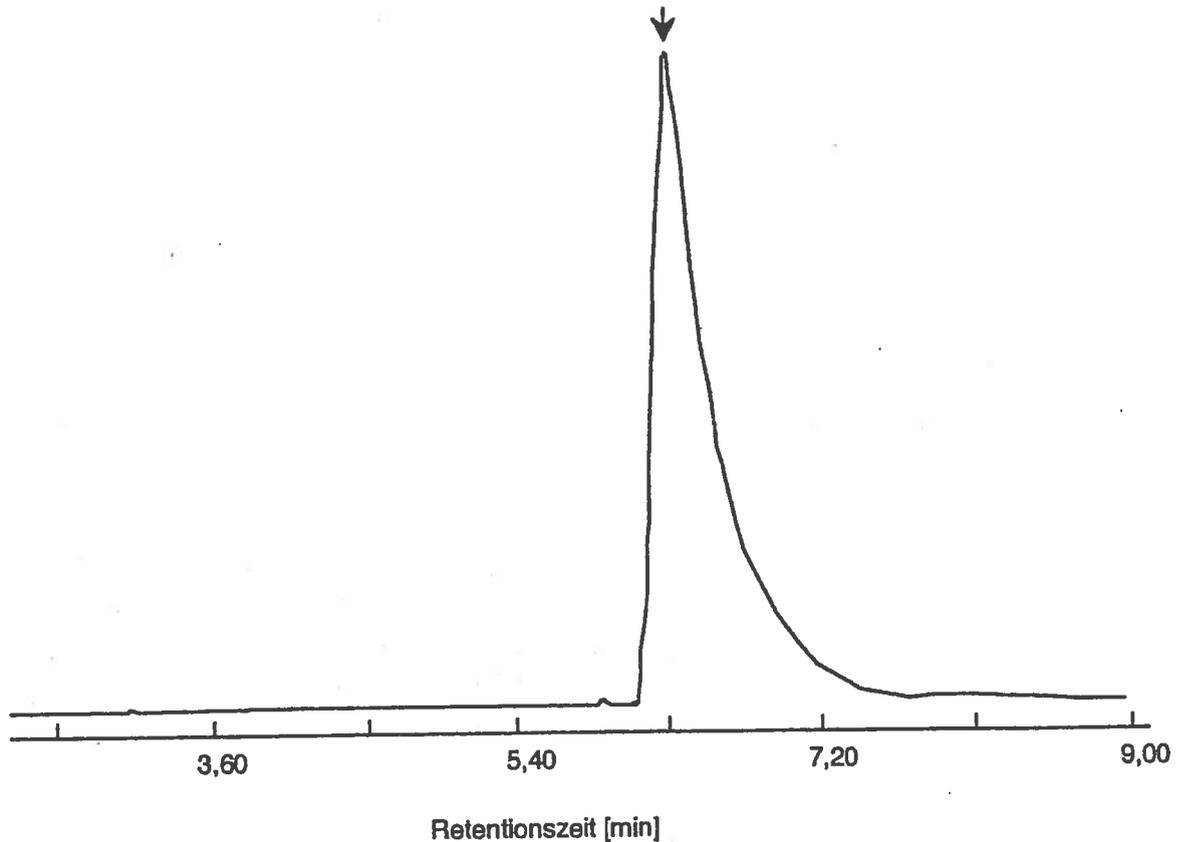


Abb. 26: HPLC-Chromatogramm der wässrigen Phase einer anaeroben Kultur von Stamm HdN1 auf 1-Phenyltridecan. Die Probe aus der stationären Wachstumsphase der Kultur wurde über einen Membranfilter filtriert und 1:10 verdünnt. Der Metabolit (Pfeil) wurde aufgrund seiner Retentionszeit (6,6 min), seines Absorptionsspektrums und einer Standardaddition als Benzoat identifiziert.

C.6.3 Wachstum mit Rohöl

Neben der anaeroben Verwertung von reinen Alkanen wurde auch untersucht, ob Rohöl, welches zu einem großen Anteil aus Alkanen besteht, den Neuisolaten ebenfalls als Elektronendonator dienen konnte. Der in einer vorangegangenen Arbeit beschriebene Sulfatreduzierer Stamm Hxd3 verwertete Rohöl nur äußerst langsam unter Bildung von 7 mM Sulfid innerhalb von 3 Monaten (Aeckersberg, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die anderen Isolate anaerober Alkanoxidierer auf die anaerobe Verwertung von Rohöl getestet werden. Das in dieser Arbeit verwendete Rohöl stammte, sofern nicht anders vermerkt, aus einem norddeutschen Erdölfeld bei Sinstorf in der Nähe von Hamburg. In diesem Erdölfeld wurde bereits seit mehr als 20 Jahren eine sogenannte sekundäre Erdölförderung durch Einleitung von Injektionswasser angewandt. Dem geförderten Gemisch aus Öl und Wasser wurden nur geringe Mengen an Ölfeldchemikalien, nämlich ca. 50 ppm eines nichtionischen Tensids, als öllöslicher Demulgator in Kombination mit einem Korrosionsinhibitor zugesetzt.

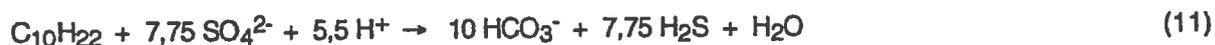
C.6.3.1 Wachstum der sulfatreduzierenden Isolate mit Rohöl

In Kulturen von Stamm Pnd3 auf Rohöl erfolgte innerhalb von 10 Wochen keine gegenüber Kontrollen ohne Substrat gesteigerte Sulfidbildung. Auch durch Zusatz von α -Cyclodextrin (5 g/l) zu Kulturen mit Erdöl wurde kein Wachstum erreicht. Bei Zusatz von Capronat als verwertbarem Substrat zu Kulturen in Gegenwart von Öl wurde ein relativ schnelles Wachstum beobachtet. Das eingesetzte Erdöl war demzufolge nicht giftig für die Zellen. Nach Zusatz von Hexadecan (0,1 ml zu 0,2 ml Erdöl) und α -Cyclodextrin (5 g/l) zu Erdölkulturen wurde nach 3 1/2 Wochen nur eine geringfügige Sulfidbildung gemessen. Wurden die gleichen Mengen Hexadecan und α -Cyclodextrin zu parallelen Kulturen ohne Erdöl gegeben, hatten die Kulturen zu diesem Zeitpunkt bereits ca. 15 mM Sulfid gebildet.

Das thermophile Isolat TD3 wurde wie beschrieben (vgl. C.1.1) aus Schlämmen des hydrothermalen Tiefseegebietes des Guaymas Becken isoliert, wo rezente Erdölbildungsprozesse stattfinden (Bazylnski et al., 1988; Kawka und Simoneit, 1987; Simoneit und Lonsdale, 1982). Es erschien also möglich, daß Stamm TD3 an ein Wachstum mit Erdöl angepaßt war. Die vorgereinigte Kultur reduzierte Sulfat in Gegenwart von Erdöl (Aeckersberg, 1994).

Stamm TD3 wurde daher mit sterilem, anoxischem Rohöl als einziger Quelle organischer Substrate bei 60°C inkubiert. Bereits nach einer Woche Inkubation setzte eine deutliche Sulfidbildung ein. Das Rohöl veränderte während des Wachstums deutlich seine Konsistenz. Aus der anfangs zusammenhängenden Ölphase auf den Kulturen bildeten sich teilweise kleine Erdöltropfen (Abb. 27). Mit zwei weiteren Rohölen aus norddeutschen Ölfeldern (Eddesse, Knesebeck) wurde ebenfalls gutes Wachstum gezeigt.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs, in dem unterschiedliche Rohölmengen (Sinstorf) von 0,2 bis 3 ml in ein definiertes Kulturvolumen von 115 ml eingesetzt wurden. An den Sulfidbildungskurven ist zu erkennen, daß Rohölmengen von 1 ml und weniger in diesen Ansätzen das Wachstum limitierten. Es wurde eine grobe Abschätzung des verbrauchten Rohölanteils aufgrund der Sulfidproduktion mit der geringsten eingesetzten Rohölmenge (7,5 mM Sulfid mit 0,2 ml Rohöl) durchgeführt. Die Berechnung beruht auf der Annahme, daß das C/H-Verhältnis des verwerteten Teils des Rohöls durch die Formel von Decan ($C_{10}H_{22}$) angenähert werden kann (11). Die Bildung von 7,5 mM H_2S wäre demnach auf eine Oxidation von $1,58 \cdot 10^{-2}$ g Decan in einem 115 ml Ansatz zurückzuführen. Bei einer eingesetzten Ölmenge von 0,2 ml, entsprechend 0,177 g bei einer Dichte des verwendeten Öls von 0,884 kg/l, bedeutet dies eine Oxidation von etwa 9 % (w/w).



Stamm A4/8 ist ein thermophiler (60°C) Sulfatreduzierer, der aus derselben Anreicherung wie Stamm TD3 isoliert wurde (vgl. C.1.1). Dieser Stamm verwertete unter den für Stamm TD3 beschriebenen, strikt anoxischen Bedingungen Butyrat (5 mM), Capronat (3 mM), Myristinat, Palmitat oder Stearat (jeweils 1 mM), jedoch keine *n*-Alkane. Dieses Isolat zeigte keinerlei Wachstum auf dem verwendeten Rohöl, was ein Hinweis darauf ist, daß das Öl keine Fettsäuren enthielt, die für diesen Stamm verfügbar waren. Eine Giftigkeit des Rohöls wurde auch in diesem Fall durch den Nachweis des Wachstums nach Zusatz von 3 mM Capronat ausgeschlossen.

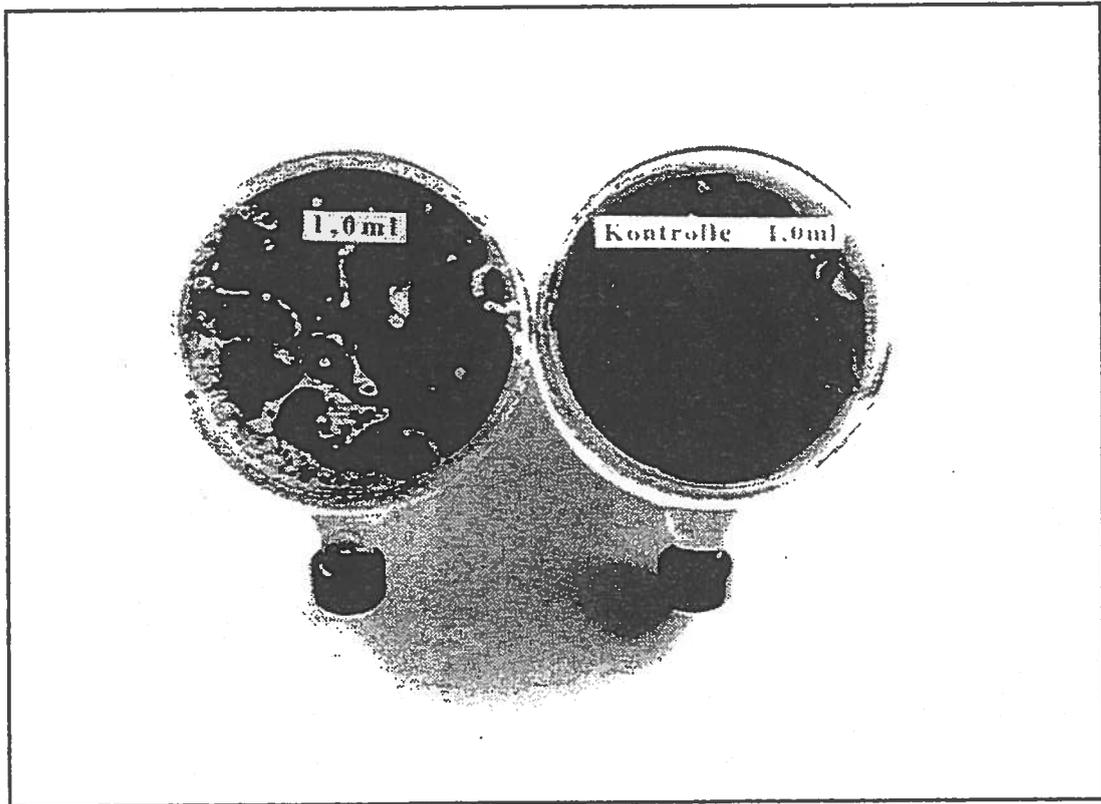


Abb. 27: Flache Kulturgefäße, die jeweils 115 ml Kulturmedium und 1 ml Erdöl enthielten. Der linke Ansatz wurde mit Stamm TD3 beimpft; die Kontrolle zeigt einen nicht beimpften Ansatz. Die Aufnahme wurde nach etwa 10wöchiger Inkubation bei 60°C gemacht.

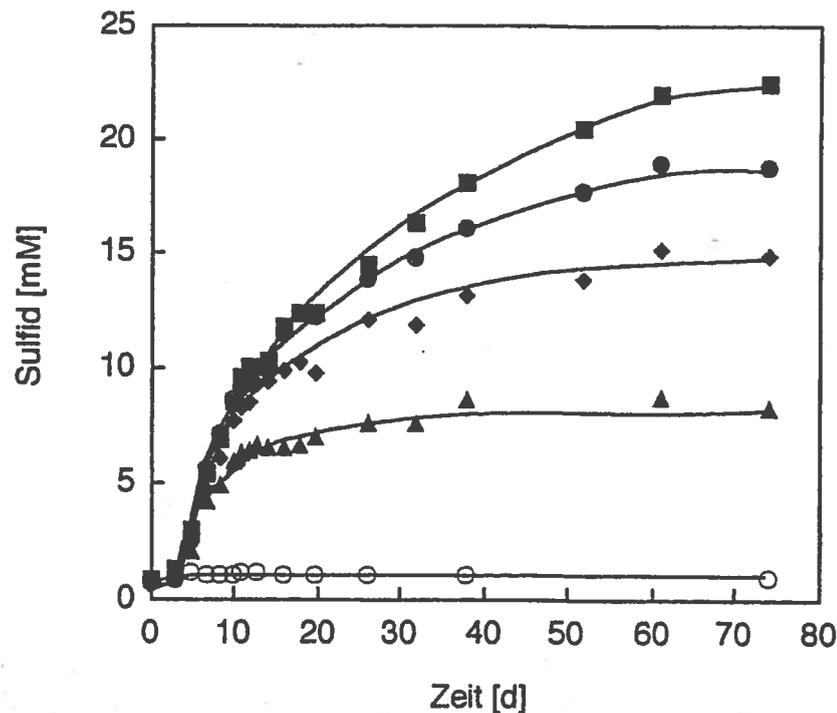


Abb. 28: Sulfidbildung in Kulturen von Stamm TD3 mit unterschiedlichen Mengen Rohöl. Symbole: ▲, 0,2 ml; ◆, 0,5 ml; ●, 1,0 ml; ■, 3,0 ml Öl als einzige Quelle organischer Substrate; ○, Kontrolle ohne Öl.

Basierend auf diesen Versuchen wurden größere Kulturvolumina (420 ml) des Stammes TD3 auf limitierenden Mengen Rohöl (1,2 ml) angezogen. Die Ansätze wurden vor dem Beimpfen mit Dithionit reduziert. Als Inokulum diente eine auf Capronat gewachsene Vorkultur. Nach 30 Tagen Inkubation der Erdölansätze bei 60°C wurde die Sulfidbildung gemessen. Sie entsprach mit 10 mM der aufgrund des Vorversuchs erwarteten Konzentration nach Beendigung des Wachstums. Parallel wurden Kontrollen ohne Inokulum und ohne Sulfat inkubiert. Das Öl wurde anschließend mittels Pasteurpipetten aus den Kulturen und Kontrollen herauspipettiert und möglichst ohne wässrige Phase in kleine Glasgefäße mit Teflondeckel überführt. Alle Gefäße wurden für 3 Stunden bei 70°C inkubiert, um mögliches aerobes Wachstum durch Kontaminanten, die während der Präparation in die Gefäße gelangt sein könnten, zu verhindern.

Die Ölproben wurden anschließend durch MPLC fraktioniert und die gewonnenen Fraktionen gaschromatographisch analysiert (B.3.10). Die Chromatogramme der Alkanfraktionen des Öls aus einer gewachsenen Kultur von Stamm TD3 sowie aus der Kontrolle ohne Sulfat sind in Abbildung 29 dargestellt. Im Wachstumsansatz waren im Vergleich zur Kontrolle *n*-Alkane in einem Kettenlängenbereich von C₈ bis C₁₁ aus dem Öl vollkommen verschwunden. Die kürzerkettigen Alkane Hexan und Heptan waren fast vollkommen verschwunden, und die längerkettigen Alkane bis zu C₁₆ waren teilweise verschwunden. Diese Daten spiegeln exakt den Kettenlängenbereich der *n*-Alkane wider, den Stamm TD3 auch bei der Prüfung der Reinsubstanzen bevorzugte (vgl. Tabelle 5). Die Aromatenfraktion des Ansatzes mit Stamm TD3 zeigte keine signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen (Abb. 30).

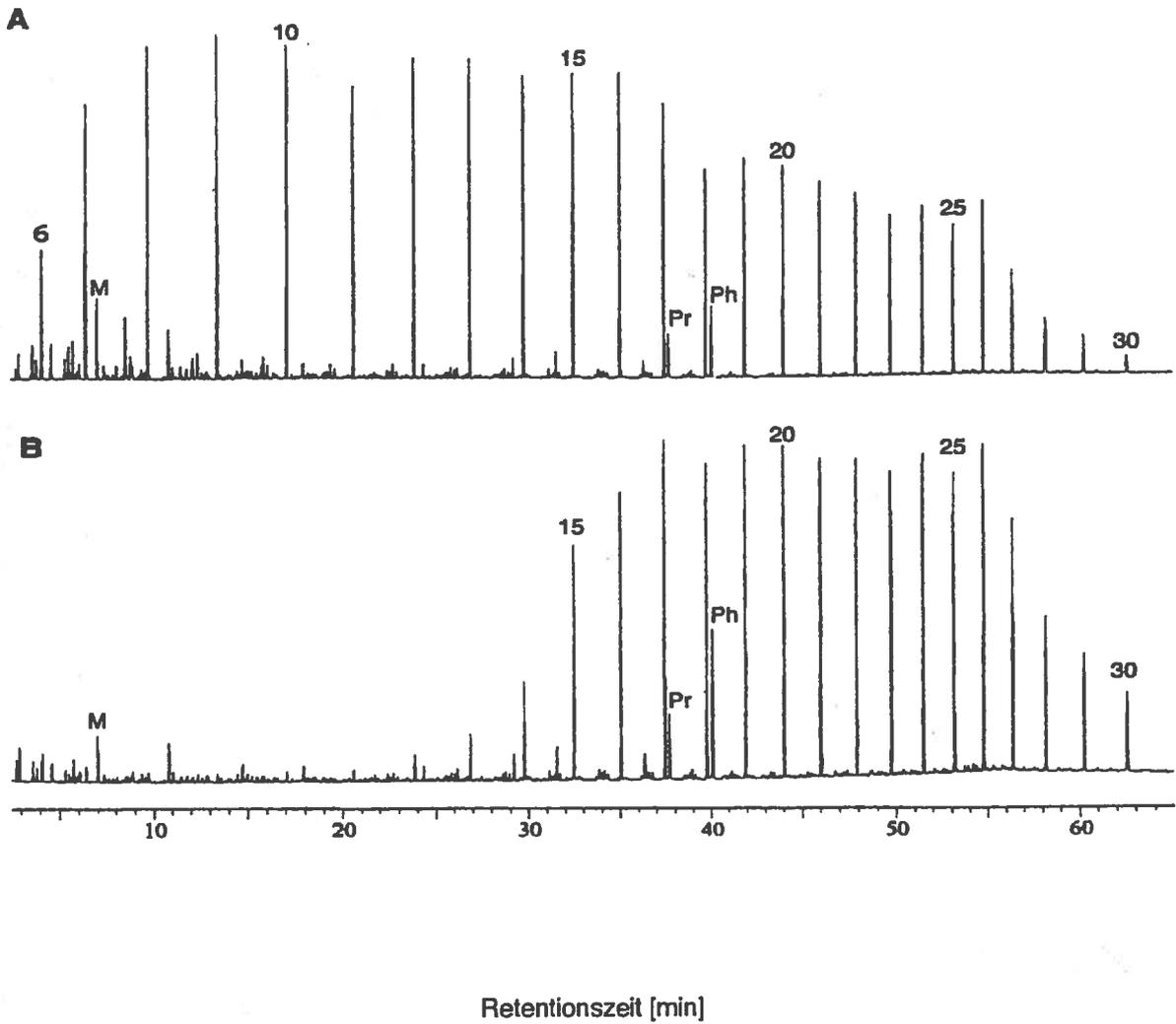


Abb. 29: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der Alkanfraktion des eingesetzten Rohöls in Kulturen von Stamm TD3. (A) zeigt die Analyse eines Kontrollansatzes ohne Sulfat, (B) zeigt die Analyse des Öls nach Wachstum von Stamm TD3. Die Zahlen über einzelnen Peaks verweisen auf die Kettenlänge der *n*-Alkane; M, Methylcyclohexan; Pr, Pristan; Ph, Phytan.

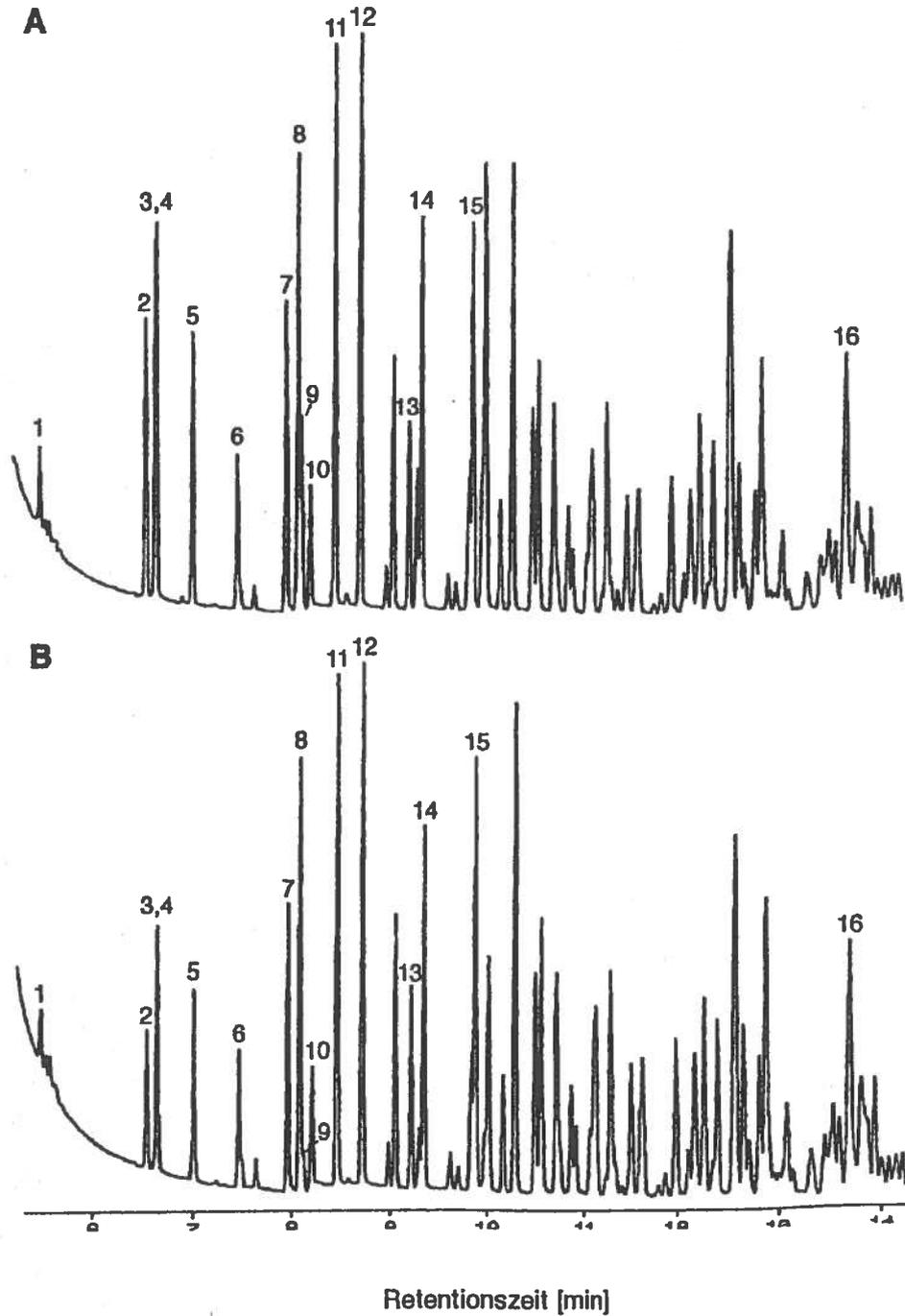


Abb. 30: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der Aromatenfraktion des eingesetzten Rohöls in Kulturen von Stamm TD3. (A) zeigt die Analyse eines Kontrollansatzes ohne Sulfat, (B) zeigt die Analyse des Öls nach Wachstum von Stamm TD3. Einzelne Peaks wurden anhand der Retentionszeiten sowie des erhaltenen Massenspektrums folgendermaßen identifiziert: 1, Toluol; 2, Ethylbenzol; 3, *p*-Xylol; 4, *m*-Xylol; 5, *o*-Xylol; 6, *t*-Propylbenzol; 7, Propylbenzol; 8, *m*-Ethyltoluol; 9, *p*-Ethyltoluol; 10, 1,3,5-Trimethylbenzol; 11, *o*-Ethyltoluol; 12, 1,2,4-Trimethylbenzol; 13, *m*-Cymol (*m*-Isopropyltoluol); 14, 1,2,3-Trimethylbenzol; 15, *m*-Propyltoluol; 16, Naphthalin.

C.6.3.2 Untersuchung des Wachstums der denitrifizierenden Isolate mit Rohöl

Die denitrifizierenden Neuisolate wurden ebenfalls auf ein Wachstum mit anoxischem, sterilem Rohöl untersucht. In Kulturen von Stamm HdN1 auf Rohöl erfolgte über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Nitratreduktion. Kontrollen mit Rohöl und Valerianat als verwertbarem Substrat zeigten gutes Wachstum, woraus man schließen kann, daß das Rohöl nicht toxisch für Stamm HdN1 ist.

Das zweite Isolat Stamm OcN1 zeigte demgegenüber jedoch gutes Wachstum unter anoxischen Bedingungen mit Rohöl (Sinstorf) als einziger Quelle organischer Substrate. Bei einem Wachstumsversuch mit unterschiedlichen Rohölmengen von 0,2 bis 0,8 ml in einem definierten Kulturvolumen von 88 ml wurde mit steigender Ölmenge eine zunehmende Nitratreduktion gemessen (Abb. 31). Ein Vergleich mit den aus Sulfat gebildeten Konzentrationen an Sulfid in Versuchen mit Stamm TD3 (vgl. C.6.3.1) deutete an, daß durch Stamm OcN1 weniger Substrate aus dem Erdöl verwertet wurden als durch Stamm TD3. Abschätzungen der oxidierten Rohölmenge erfolgten unter Annahme einer vollständigen Oxidation der verwerteten Substanzen zu CO₂ und einem durch die Formel von Decan (C₁₀H₂₂) abgeschätzten C/H-Verhältnis der oxidierten Substanzen (12). So ergäbe sich unter Berücksichtigung der gemessenen Reduktion von 4,4 mM Nitrat in 88 ml Kulturvolumen in einem Ansatz, in dem die eingesetzte Rohölmenge von 0,2 ml limitierend war, eine Oxidation von $4,44 \cdot 10^{-3}$ g Decan. Bei einer eingesetzten Ölmenge von 0,2 ml, entsprechend 0,177 g bei einer Dichte des verwendeten Öls von 0,884 kg/l, bedeutet dies eine Oxidation von etwa 2,5 % (w/w).



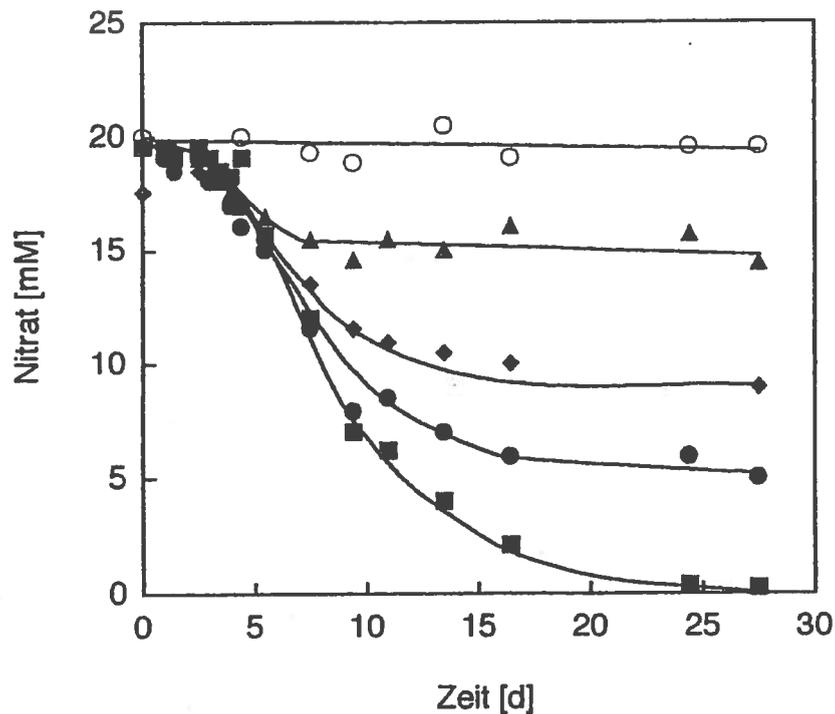


Abb. 31: Nitratreduktion beim anaeroben Wachstum von Stamm OcN1 auf unterschiedlichen Mengen an Rohöl. Symbole: ▲, 0,2 ml; ◆, 0,4 ml; ●, 0,6 ml; ■, 0,8 ml Öl als einzige Quelle organischer Substrate; O, Kontrolle ohne Öl.

Auch in diesem Fall war es von Interesse zu zeigen, ob wiederum wie erwartet die Alkane selektiv aus dem Rohöl verwertet worden waren. Dazu wurden je 212 ml anoxisches Medium mit 20 mM Nitrat, 1,5 ml Rohöl (Sinstorf) und 4 mM Ascorbat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze mit 5 ml einer auf Octan gewachsenen Vorkultur des Stammes OcN1 beimpft. Gleichzeitig wurden Kontrollansätze ohne Nitrat sowie ohne Inokulum hergestellt. Nach 4 Wochen Inkubation bei 28°C entsprach die verbliebene Nitratkonzentration in den Ansätzen mit Stamm OcN1 der aufgrund des Vorversuchs erwarteten Konzentration nach weitestgehender Beendigung des Wachstums. Die Ansätze wurden anschließend für 3 Stunden bei 70°C inkubiert, um die Zellen abzutöten und so das mögliche aerobe Wachstum bei der Entnahme des Öls zu vermeiden. Anschließend wurde das Öl in analoger Weise wie für Stamm TD3 beschrieben (vgl. C.6.3.1) aus den Ansätzen herauspipettiert.

Die Ergebnisse der Ölanalyse sind in Abbildung 32 und Abbildung 33 gezeigt. Bei dem Öl aus Kulturen von Stamm OcN1 war im Vergleich zu der Kontrolle ohne Nitrat die Alkanfraktion im Kettenlängenbereich von C₈ bis C₁₂ verändert. Eine Verwertung von Alkanen dieser Kettenlängen durch Stamm OcN1 wurde bereits in Tests mit den Reinsubstanzen ermittelt (vgl. Tabelle 6). Alkane von C₈ bis C₁₀ waren aus dem Öl fast vollständig verbraucht, während Undecan und Dodecan zu einem geringen Anteil verschwunden waren (Abb. 32). In der Aromatenfraktion traten keine signifikanten Änderungen gegenüber den Kontrollen auf (Abb. 33).

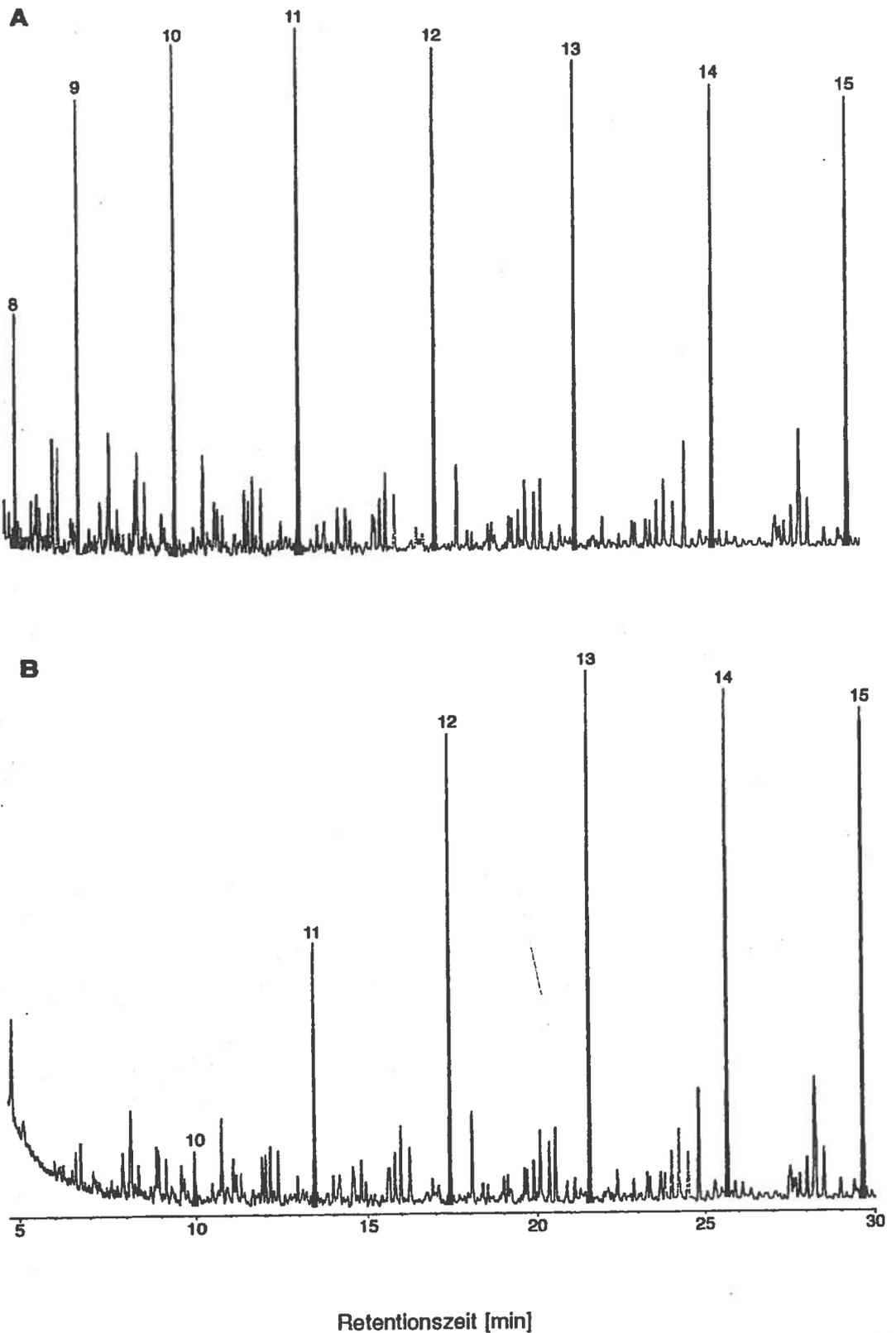


Abb. 32: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der Alkanfraktion des Erdöls aus anaeroben Kulturen von Stamm OcN1. (A) zeigt die Analysen aus einer Kontrolle ohne Nitrat, (B) zeigt die Analysen aus einem Wachstumsansatz mit Stamm OcN1. Die Zahlen über einzelnen Peaks verweisen auf die Kettenlänge der *n*-Alkane.

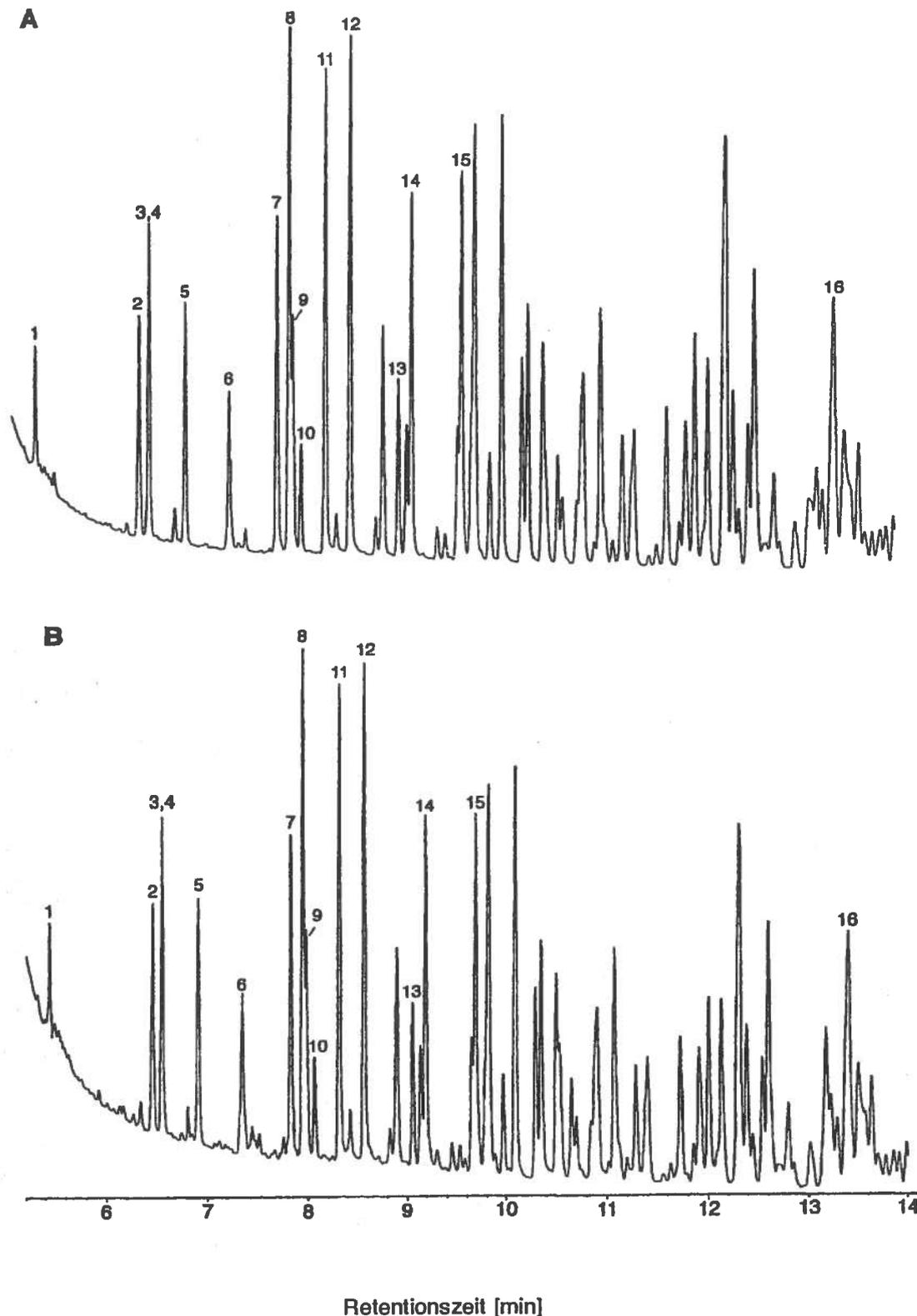


Abb. 33: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm der Aromatenfraktion des Erdöls aus anaeroben Kulturen von Stamm OcN1. (A) zeigt die Analysen aus einer Kontrolle ohne Nitrat, (B) zeigt die Analysen aus einem Wachstumsansatz mit Stamm OcN1. Einzelne Peaks wurden anhand der Retentionszeiten und der zugehörigen Massenspektren identifiziert: 1, Toluol; 2, Ethylbenzol; 3, *p*-Xylol; 4, *m*-Xylol; 5, *o*-Xylol; 6, *i*-Propylbenzol; 7, Propylbenzol; 8, *m*-Ethyltoluol; 9, *p*-Ethyltoluol; 10, 1,3,5-Trimethylbenzol; 11, *o*-Ethyltoluol; 12, 1,2,4-Trimethylbenzol; 13, *m*-Cymol (*m*-Isopropyltoluol); 14, 1,2,3-Trimethylbenzol; 15, *m*-Propyltoluol; 16, Naphthalin.

C.7 Induktionsversuche

In Induktionsversuchen mit dichten Zellsuspensionen der Stämme HdN1 und OcN1 sollte festgestellt werden, ob die Enzymsysteme zur anaeroben Verwertung von Alkanen auch beim Wachstum auf Fettsäuren, also konstitutiv exprimiert wurden, oder ob das Enzymsystem induziert werden mußte.

C.7.1 Induktionsversuche mit Stamm HdN1

Zellsuspensionen wurden aus exponentiell wachsenden Kulturen von Stamm HdN1 auf Palmitat (1 mM) hergestellt (B.2.6). Diesen Suspensionen wurde Palmitat (1 mM), Hexadecan (0,1 ml auf 10 ml Suspension; mit Ultraschall emulgiert), 1-Hexadecanol oder 1-Hexadecen (0,1 ml auf 10 ml Suspension; mit Ultraschall emulgiert) als Substrat angeboten. Das Wachstum wurde anhand der Nitrat-Abnahme verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Das Wachstum auf Palmitat wurde in den Suspensionen unverzüglich fortgesetzt, während das Wachstum auf Hexadecan erst nach etwa 20 h schneller als in der Kontrolle ohne Substrat war (Abb. 34 A). Diese lag-Phase kann mit der Induktionszeit für die Bildung des zur Alkanverwertung notwendigen Systems erklärt werden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre allerdings auch die schlechtere Angreifbarkeit aufgrund der Unlöslichkeit von Hexadecan. In diesem Versuch wurde jedoch die Oberfläche des Hexadecans durch Emulgation mittels Ultraschall stark vergrößert, so daß es für die Zellen leichter zugänglich war. In der Kontrolle ohne Substrat fand vermutlich aufgrund eingeschlossener Speicherstoffe ebenfalls anfänglich eine leichte Nitratreduktion statt.

Die Verwertung von Hexadecanol begann nach einer kurzen lag-Phase von etwa 5 - 6 h deutlich eher als auf Hexadecan. Die anfängliche Nitratreduktion verlief parallel zur Negativkontrolle ohne Substrat. Im Falle des Hexadecanols kann die lag-Phase als Induktionszeit bezeichnet werden, da Hexadecanol wie Palmitat Substratflocken im Medium bildete und damit ähnlich gut angreifbar gewesen sein sollte. Die Nitratreduktionsrate mit Hexadecen entsprach der mit Hexadecan. Hier könnte neben der Induktionszeit wie beim Hexadecan die Hydrophobizität des Hexadecens eine Erklärung für die lange lag-Phase sein. Es wurde jedoch auch hier durch die Oberflächenvergrößerung mittels Ultraschall versucht, diesen Faktor möglichst gering zu halten (Abb. 34 B).

In weiteren Experimenten wurde versucht, entsprechende Suspensionsversuche mit auf Hexadecan angezogenen Zellen des Stammes HdN1 durchzuführen. Diese Versuche erwiesen sich jedoch als problematisch, da die Negativkontrollen dieser Suspensionen ohne Substrat bereits eine derart hohe Nitratreduktionsrate aufwiesen, daß keine klaren Unterschiede mit und ohne Substratzusatz erkennbar waren. Die hohe Aktivität dieser Zellen ist vermutlich auf die Verwertung der bereits beschriebenen, in auf Alkanen gewachsenen Zellen deutlich erkennbaren Einschlüsse,

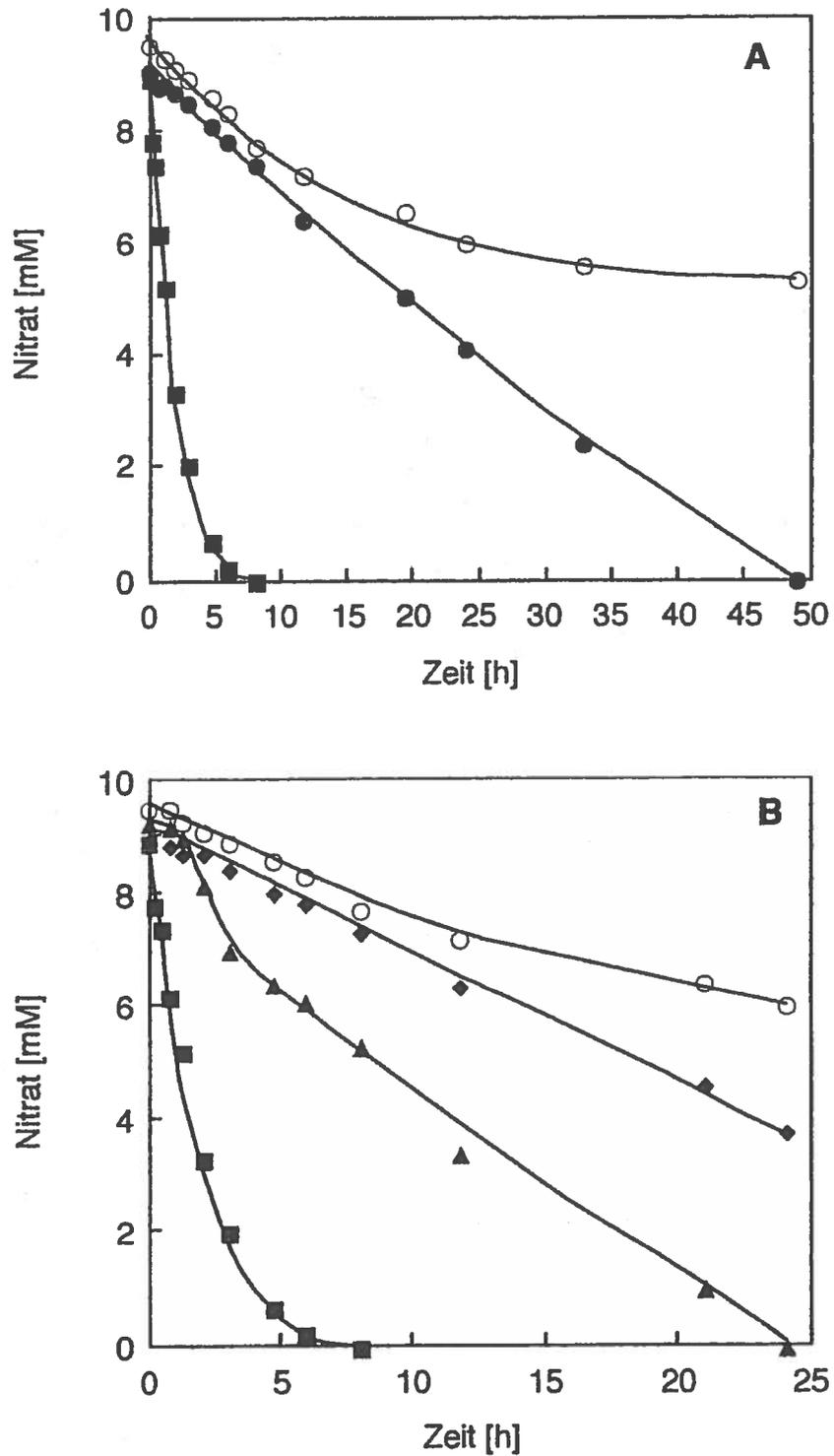


Abb. 34: Untersuchung der Fähigkeit zur Verwertung von (A) Palmitat (■) und *n*-Hexadecan (●) und (B) Palmitat (■), 1-Hexadecen (◆) und 1-Hexadecanol (▲) in anaeroben Suspensionen von Zellen des Stammes HdN1, die auf Palmitat gewachsen waren. Die Verwertung der Substrate wurde anhand der Nitrat- abnahme in den Ansätzen verfolgt. Eine weitere Kurve (O) zeigt die Kontrolle ohne Substrat.

die vermutlich aus Speicherstoffen bestehen (vgl. C.2.2.1), zurückzuführen. Mehrere Versuche, die Zellen vor Zugabe von Substrat solange ohne Substrat wachsen zu lassen, bis die Speicherstoffe verbraucht waren, scheiterten, da anschließend auch noch nach 2 Tagen keine Nitratreduktion mit Hexadecan beobachtet wurde.

C.7.2 Induktionsversuche mit Stamm OcN1

Zellsuspensionen von Stamm OcN1 aus Anzuchten mit Octan (5 % v/v in HMN) oder Caprylat (2,5 mM) wurde Octan (5 % v/v in HMN) bzw. Caprylat (2,5 mM) als Substrat zugesetzt. Desweiteren wurde je eine Kontrolle ohne Substrat angesetzt. Die Nitratkonzentration in den einzelnen Ansätzen über den Versuchszeitraum wurde als Maß für das Wachstum verfolgt.

In Suspensionen von Zellen, die auf Octan gewachsen waren, begann die Nitrat-Abnahme sowohl auf Caprylat als auch auf Octan sofort nach Substratzusatz (Abb. 35 A). Die Nitratreduktion mit Caprylat war deutlich schneller als mit Octan. Für die Reduktion von etwa 9,5 mM Nitrat benötigte die Suspension mit Octan ca. 34 h, während das Nitrat in der Suspension mit Caprylat bereits nach 11 h verbraucht war. Da die Nitratreduktion auf Caprylat in den Suspensionen aus Zellen, die auf Octan gewachsen waren, unmittelbar nach Herstellung der Suspensionen begann, mußte die Fähigkeit zur Verwertung von Monocarbonsäuren in diesen Zellen konstitutiv vorhanden gewesen sein.

Zellsuspensionen von auf Caprylat angezogenen Zellen zeigten eine sehr schnelle Verwertung von Caprylat (Abb. 35 B). Die anfänglichen 8,5 mM Nitrat waren innerhalb von 4 h verbraucht. Demgegenüber verlief die Nitrat-Abnahme in dem Ansatz mit Octan über mehr als 10 h parallel zur Kontrolle ohne Substrat. Erst nach ca. 15 h war eine deutlich gesteigerte Nitrat-Abnahme im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. In dem Octan-Ansatz war das eingesetzte Nitrat nach ungefähr 55 h vollständig verwertet. Die Fähigkeit zur anaeroben Verwertung von Octan war demzufolge eine induzierbare Fähigkeit, die beim Wachstum auf Caprylat nicht vorhanden war. Die in der hier dargestellten Suspension erkennbare Induktionszeit von ca. 15 h variierte in verschiedenen Suspensionen beträchtlich. Es wurden auch Induktionszeiten von mehr als einem Tag beobachtet.

Vergleicht man den Nitratverbrauch mit Caprylat in den hier beschriebenen Suspensionsversuchen, so fällt auf, daß das Wachstum in der Suspension von auf Caprylat angezogenen Zellen (Abb. 35 B) deutlich schneller war als in der Suspension, deren Zellen auf Octan angezogen worden waren (Abb. 35 A). Die Geschwindigkeit der Nitrat-Abnahme ist jedoch zwischen diesen Suspensionen nicht genau vergleichbar, da die Werte nicht für eine einheitliche Proteinkonzentration berechnet wurden. Zwar wurden beide Vorkulturen zu einem Zeitpunkt geerntet als ungefähr gleich viel Nitrat verbraucht worden war; dennoch war die Zelldichte in den Suspensionen der auf Octan gewachsenen Zellen geringer, da bei der Ernte durch Zentrifugation

die an der Alkanphase klebenden Zellen nicht pelletierten.

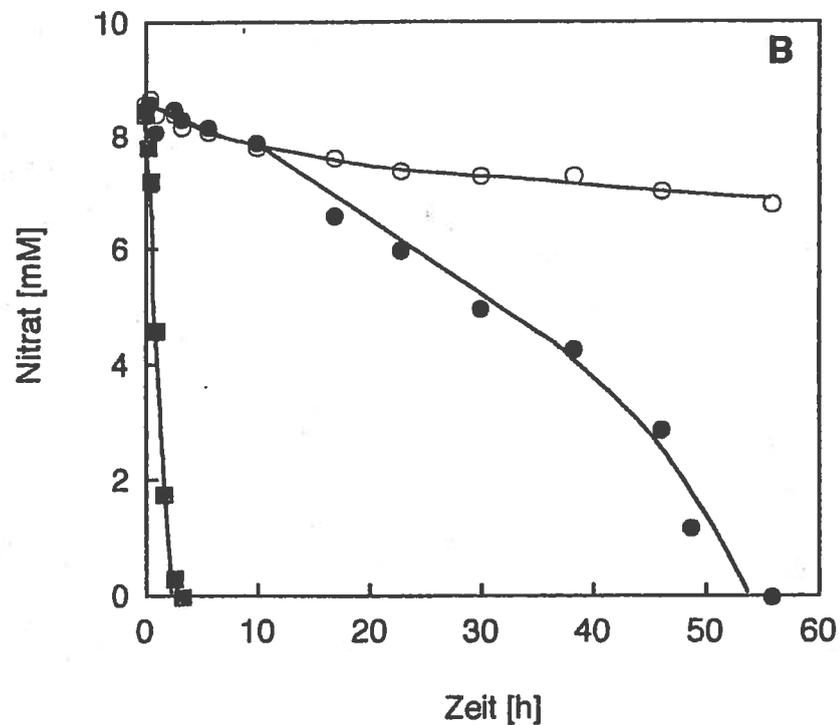
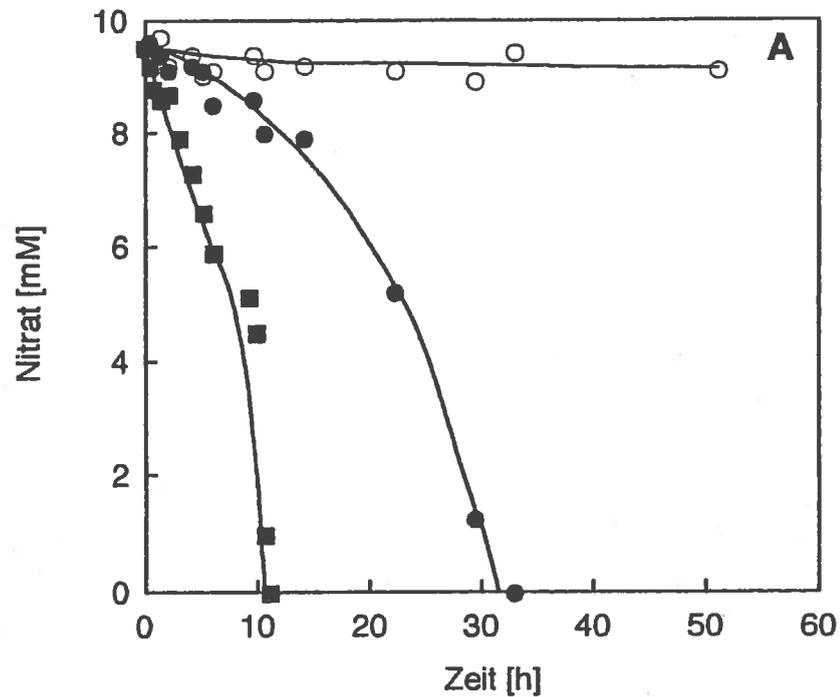


Abb. 35: Untersuchung der Fähigkeit zur Verwertung von Caprylat (■) und Octan (●) in anaeroben Zellsuspensionen von Stamm OcN1. (A) zeigt die Ergebnisse mit Suspensionen aus Zellen, die auf Octan angezogen wurden, (B) zeigt die Ergebnisse mit Suspensionen von Zellen, die auf Caprylat angezogen wurden. Die Verwertung der Substrate wurde anhand der Nitrat-Abnahme in den Ansätzen verfolgt. In Kontrollen ohne Substrat (O) wurde nur eine sehr geringe Nitrat-Abnahme festgestellt.

C.8 Fettsäureanalysen

Die anaerobe Oxidation von *n*-Alkanen führt vermutlich über bislang unbekannte Zwischenschritte zur Bildung der korrespondierenden Säuren und mündet somit in den Fettsäurestoffwechsel der Zellen ein. Daher könnten Zellen, die auf langkettigen Alkanen wachsen, anstelle einer *de novo* Synthese der Zellfettsäuren die aus dem Substrat entstehenden langkettigen Fettsäuren als Vorläufer der Zellfettsäuren verwenden. Unter diesen Voraussetzungen könnte eine Analyse der aus langkettigen Alkanen unter anoxischen Bedingungen zunächst entstehenden Fettsäuren Hinweise auf die Aktivierungsreaktion der Alkansubstrate in dem jeweiligen Bakterienstamm geben. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß die Fettsäurezusammensetzung der Membran bei Mikroorganismen starken Schwankungen aufgrund der Umgebungs- und Wachstumsbedingungen unterliegt (Schweizer, 1989).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zellfettsäuren von Zellen zweier Isolate, Stamm HdN1 und Stamm Pnd3, nach Wachstum auf *n*-Alkanen, 1-Alkenen, Monocarbonsäuren und primären Alkoholen unterschiedlicher Kettenlänge analysiert. Eine Analyse der Zellfettsäuren von den beiden weiteren Isolaten TD3 und OcN1 erschien nicht angebracht, da diese Stämme lediglich auf Alkanen mittlerer Kettenlänge gutes Wachstum zeigten. Beim Wachstum auf Alkanen mittlerer Kettenlänge ist die Wahrscheinlichkeit höher, daß die Zellfettsäuren *de novo* synthetisiert werden.

C.8.1 Analyse der Zellfettsäuren von Stamm HdN1

Zur Analyse der Zellfettsäuren des Stammes HdN1 wurden anaerobe Flüssigkulturen in großen Volumina (500 ml) mit 1 % (v/v) einer auf dem entsprechenden Substrat gewachsenen Vorkultur beimpft. Die langkettigen Fettsäuren wurden in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt; *n*-Alkane, 1-Alkene sowie 1-Hexadecanol wurden in reiner Form im Überschuß zugesetzt. Die Zellernte erfolgte nach Beendigung des Wachstums, indem die Kulturen im Stickstoffzelt in Zentrifugenbecher überführt und anschließend zentrifugiert wurden (B.3.9). Bei Kulturen, die auf Alkanen oder Alkenen gewachsen waren, erfolgte die Abtrennung der Alkanphase von der wäßrigen Phase durch einen Scheidetrichter. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter B.3.9 beschrieben unter oxischen Bedingungen.

Bei der Auswertung der gaschromatographischen Analysen der Zellfettsäuren von Stamm HdN1 fiel in vielen Chromatogrammen ein besonders dominanter Peak auf, der mit den verfügbaren Standards der verschiedensten Fettsäuren nicht identifiziert werden konnte. Es stellte sich bei weiteren Untersuchungen heraus, daß es sich um langkettige Alkohole handelte, die bei dem Verfahren zur Zellgewinnung und Veresterung ebenfalls extrahiert wurden. Bei aerob oder anaerob auf Hexadecan gewachsenen Kulturen wurde der Peak aufgrund seiner Retentionszeit und

nach Standardadditionen mit zwei verschiedenen gaschromatographischen Methoden (B.3.8.2 und B.3.9) als 1-Hexadecanol identifiziert. 2-Hexadecanol oder 1-Pentadecanol wurden nicht gefunden. Abbildung 36 zeigt den 1-Hexadecanol-Peak innerhalb eines Gaschromatogramms der Zellfettsäuren von auf Hexadecan gewachsenen Zellen. Bei Kulturen, die aerob oder anaerob auf Pentadecan gewachsen waren, wurde eindeutig 1-Pentadecanol identifiziert; bei auf Palmitat gewachsenen Kulturen wurden ebenfalls große Mengen 1-Hexadecanol angehäuft. Zur genaueren Untersuchung des Auftretens der langkettigen Alkohole wurden wiederum Zellen, die anaerob auf Hexadecan gewachsen waren, gemäß dem unter B.3.9 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet, wobei jedoch bis einschließlich dem ersten Schritt der Veresterung anaerob gearbeitet wurde. Die Verseifung wurde in mit Butylstopfen verschlossenen Röhrchen mit einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. In mehreren derartigen Versuchen wurde beobachtet, daß der 1-Hexadecanol-Peak fast verschwunden war. Demnach muß die Bildung der großen Mengen des zum jeweiligen Wachstumssubstrat korrespondierenden primären Alkohols durch die Anwesenheit von Sauerstoff bei der Prozedur der Zellernte und Veresterung der Zellfettsäuren erklärt werden. Die übrigen Peaks veränderten sich auch bei strikt anaerober Aufarbeitung nicht.

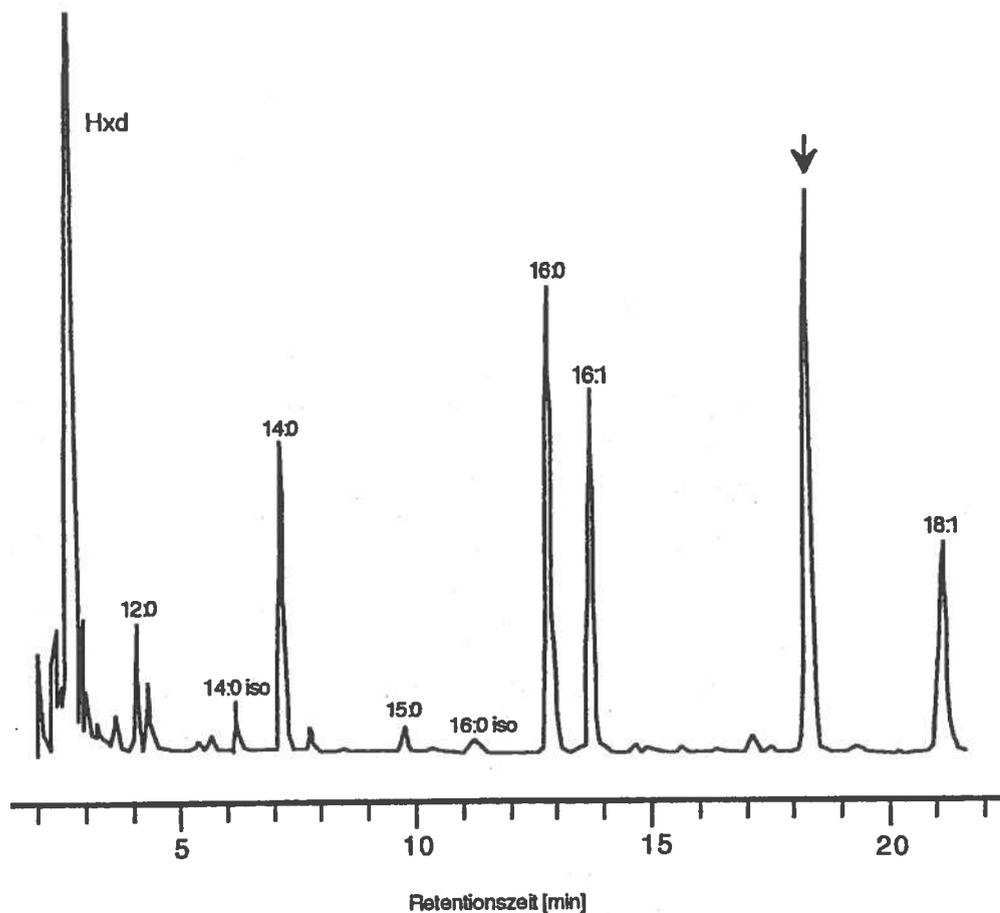


Abb. 36: Gaschromatographische Analyse der Zellfettsäuren von anaeroben Anzuchten des Stammes HdN1 auf Hexadecan. Der eingezeichnete Pfeil zeigt auf den Peak, der als 1-Hexadecanol identifiziert wurde. 1-Hexadecanol bildete sich bei der Aufarbeitung der Zellen in Gegenwart von Sauerstoff.

Die Analyse der Zellfettsäuren ergab, daß tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem Wachstumssubstrat und der Kettenlänge der Zellfettsäuren bestand. In Kulturen, die auf Palmitat gewachsen waren, hatten 85 % der analysierten Zellfettsäuren eine gerade Anzahl an C-Atomen, wobei Palmitat, Myristat und Hexadecenoat dominierten (Abb. 37 A). Die deutliche Dominanz von Palmitat kann zum Teil sicherlich mit Substratresten aus den Wachstumskulturen erklärt werden, die mit Palmitat gezogen worden waren. Octadecenoat wurde in allen Kulturen dieses Stammes unabhängig vom Wachstumssubstrat nachgewiesen. Die Untersuchung von auf Heptadecanat gewachsenen Kulturen ergab, daß hier hauptsächlich Heptadecanat und Pentadecanat vorhanden waren (Abb. 37 B). Myristat und Palmitat waren nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Diese Ergebnisse zeigen, daß ein Wachstum auf Monocarbonsäuren mit einer geraden bzw. ungeraden Anzahl an C-Atomen zu einer deutlichen Dominanz von Zellfettsäuren mit einer geraden bzw. ungeraden Anzahl an C-Atomen führte.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach dem Wachstum von Stamm HdN1 auf Alkanen erhalten. Nach Wachstum der Zellen auf Hexadecan wurden hauptsächlich Zellfettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen gefunden. Bezüglich der identifizierten Zellfettsäuren wurde ferner kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die aerob oder anaerob auf Hexadecan gewachsen waren, festgestellt (Abb. 37 C, E). In den aeroben Kulturen traten bei der gaschromatographischen Analyse zusätzliche Peaks auf, die jedoch nicht identifiziert wurden.

Mit Pentadecan als Wachstumssubstrat bestanden die Zellfettsäuren hauptsächlich aus Pentadecanat und Tridecanat (Abb. 37 D, F). Wiederum wurde kein signifikanter Unterschied zwischen aerob und anaerob gewachsenen Zellen festgestellt, wobei auch hier in den aerob gewachsenen Zellen einige zusätzliche Peaks im Gaschromatogramm erschienen.

Die nachgewiesenen Zellfettsäuren von Zellen, die auf 1-Hexadecanol, 1-Hexadecen oder 1-Heptadecen gewachsen waren, sind in Abbildung 38 dargestellt. Erstaunlicherweise lieferten die Gaschromatogramme der auf den beiden Alkenen (C_{16} und C_{17}) gewachsenen Zellen untereinander fast identische Ergebnisse mit einer eindeutigen Dominanz der geradzahligen Kettenlängen (> 90 %) (Abb. 38 A, B). Anhand des Substratpeaks in den Chromatogrammen wurde eindeutig gezeigt, daß die Kulturen auf unterschiedlichen Alkenen gewachsen waren. Auffällig war der hohe Anteil von Octadecenoat, welches in geringeren Anteilen in allen Kulturen unabhängig vom Wachstumssubstrat vorhanden war und somit vermutlich charakteristisch für die Zellfettsäuren dieses Stammes war. In auf Alkenen gewachsenen Kulturen wurde die Kettenlänge der Zellfettsäuren also augenscheinlich nicht durch die Kettenlänge des Wachstumssubstrats beeinflußt.

Nach dem Wachstum auf 1-Hexadecanol bestanden die identifizierten Zellfettsäuren zu mehr als 99 % aus geradzahligen C-Gerüsten (Abb. 38 C).

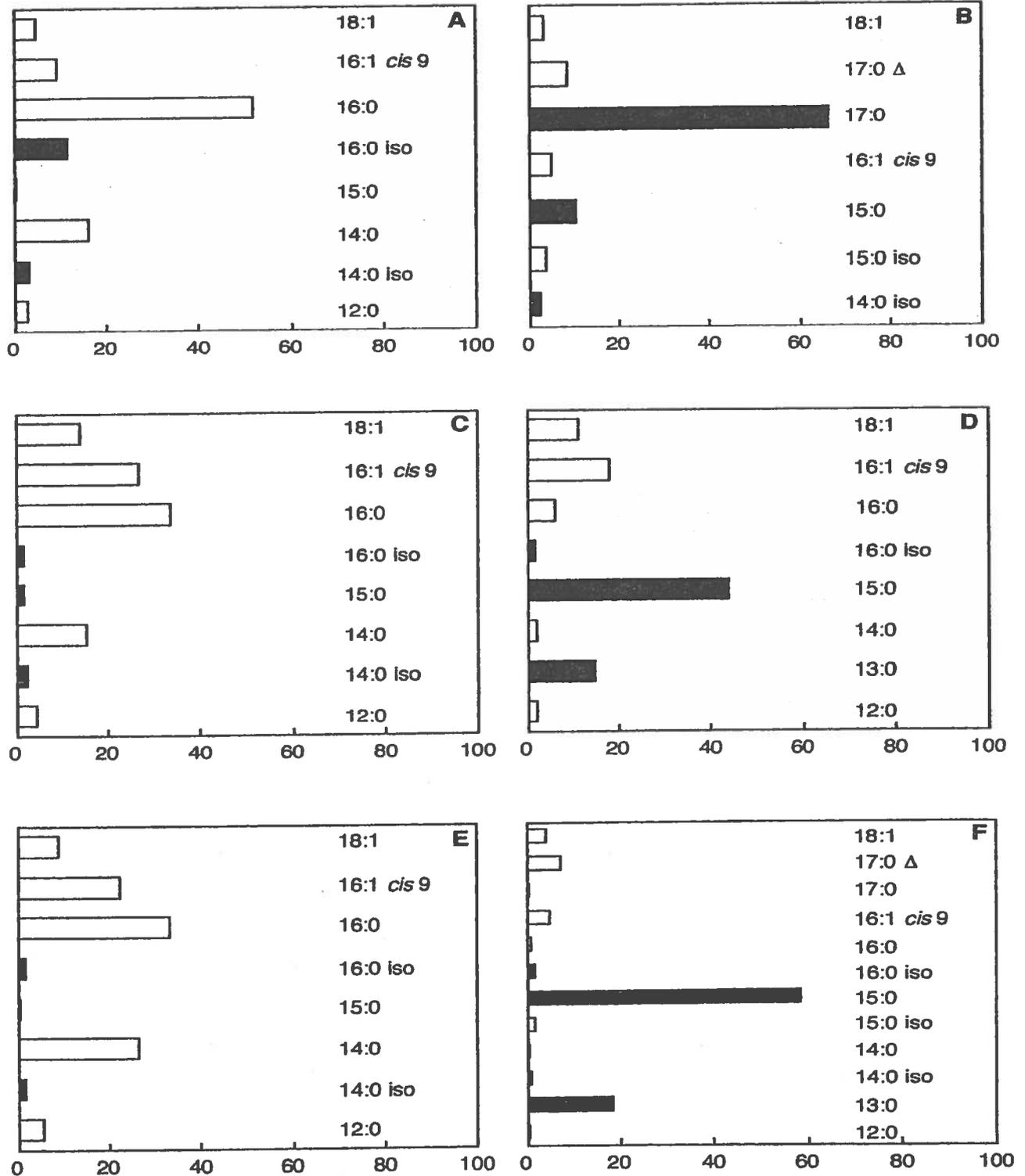


Abb. 37: Prozentuale Verteilung der analysierten Zellfettsäuren von Stamm HdN1 in anaeroben Anzuchten auf Palmitat (A), Heptadecanat (B), *n*-Hexadecan (C) und *n*-Pentadecan (D) bzw. aeroben Anzuchten auf *n*-Hexadecan (E) und *n*-Pentadecan (F). Schwarze Balken (■) symbolisieren Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen, weiße Balken (□) symbolisieren Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Hauptkette.

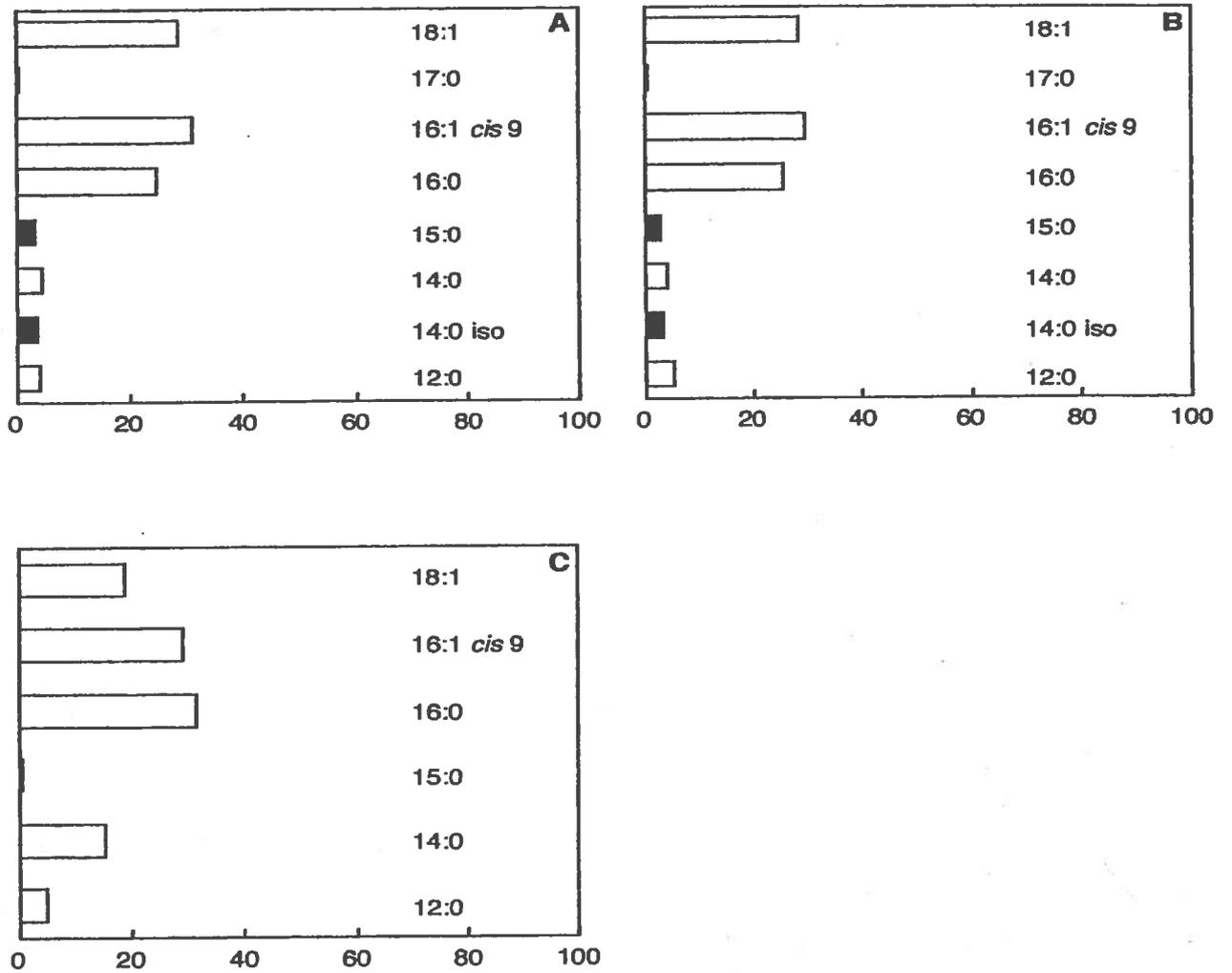


Abb. 38: Prozentuale Verteilung der analysierten Zellfettsäuren von Stamm HdN1 in anaeroben Anzuchten auf 1-Hexadecen (A), 1-Heptadecen (B) bzw. 1-Hexadecanol (C). Schwarze Balken (■) symbolisieren Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen, weiße Balken (□) symbolisieren Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Hauptkette.

C.8.2 Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Pnd3

Zur Analyse der Zellfettsäuren wurde der sulfatreduzierende Stamm Pnd3 in mit Dithionit reduziertem Medium in 500 ml Ansätzen auf dem jeweiligen Substrat angezogen. Die langkettigen Monocarbonsäuren wurden in einer Konzentration von 1 mM, Alkane in einem deutlichen Überschuß bei gleichzeitiger Zugabe von α -Cyclodextrin (5 g/l) zugesetzt. Das Inokulum (5 % v/v) für die Kulturen stammte jeweils aus einer kleineren Vorkultur, die auf dem gleichen Substrat gewachsen war. Nachdem das Wachstum aufgrund der hohen Sulfidproduktion beendet war, erfolgte die Ernte der Zellen unter zunächst anoxischen Bedingungen im Stickstoffzelt. Die auf Alkanen gewachsenen Kulturen wurden über einen Scheidetrichter von unlöslichen Komplexen aus α -Cyclodextrin und Alkanen befreit, welche sich schnell absetzten. Anschließend wurde die wäßrige Phase in einen Zentrifugenbecher gefüllt, verschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum im Stickstoffzelt abgegossen, die restliche Prozedur wurde wie beschrieben (B.3.9) unter oxischen Bedingungen durchgeführt.

Die gaschromatographische Auftrennung der extrahierten Zellfettsäuren ergab eine Vielzahl an Substanzen, von denen etliche mit den verfügbaren Standards nicht identifiziert werden konnten. Es zeigte sich jedoch eindeutig, daß auch bei diesem Stamm die Zusammensetzung der Zellfettsäuren von dem Wachstumssubstrat abhängig war. Nach dem Wachstum auf Palmitat wurden fast ausschließlich Fettsäuren mit einer geradzahligen C-Kette identifiziert, während nach dem Wachstum auf Pentadecanat vorwiegend Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen in der Kette gefunden wurden (Abb. 39 A, B).

Die Analyse der Zellfettsäuren nach dem Wachstum auf Alkanen ergab die gleiche Tendenz, wenngleich die Ergebnisse nicht ganz so deutlich waren wie nach dem Wachstum auf Monocarbonsäuren. Auf Pentadecan gewachsene Zellen zeigten eine deutliche Dominanz von Pentadecanat und Tridecanat im Zellfettsäuremuster (Abb. 39 C). Es wurden jedoch ebenfalls signifikante Mengen an Fettsäuren mit einer geradzahligen C-Kette identifiziert (ca. 40 % der identifizierten Zellfettsäuren).

Auf Hexadecan gewachsene Zellen enthielten hauptsächlich C₁₄- und C₁₆-Fettsäuren; die ungeradzahligen Fettsäuren machten nur einen kleinen Anteil aus. Auffallend war jedoch, daß der größte Peak aus 14-Methylpentadecanat (16:0 iso) bestand (Abb. 39 D). Diese Fettsäure wurde bei der Auswertung der Analysen zu den Fettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen in der Kette gezählt. Die Synthese von Fettsäuren mit Isoverzweigungen geht meistens von verzweigten Carboxylsäuren oder verzweigten α -Ketosäuren aus. Häufig dienen beispielsweise Isobutyryl-CoA oder das aktivierte Transaminierungsprodukt von Leucin, Isovaleroyl-CoA, als Primer. Daher muß man davon ausgehen, daß 14-Methylpentadecanat in dem beschriebenen Versuch nicht aus Hexadecan gebildet, sondern *de novo* synthetisiert wurde.

Zusammengefaßt zeigen diese Versuchsergebnisse die gleiche Tendenz, die bereits beim denitrifizierenden Isolat HdN1 beschrieben wurde (vgl. C.8.1). Sowohl auf Monocarbonsäuren

als auch auf Alkanen gewachsene Zellen enthielten vorwiegend solche Zellfettsäuren, die wie das jeweilige Substrat eine gerade oder ungerade Anzahl an C-Atomen in der Kette hatten.

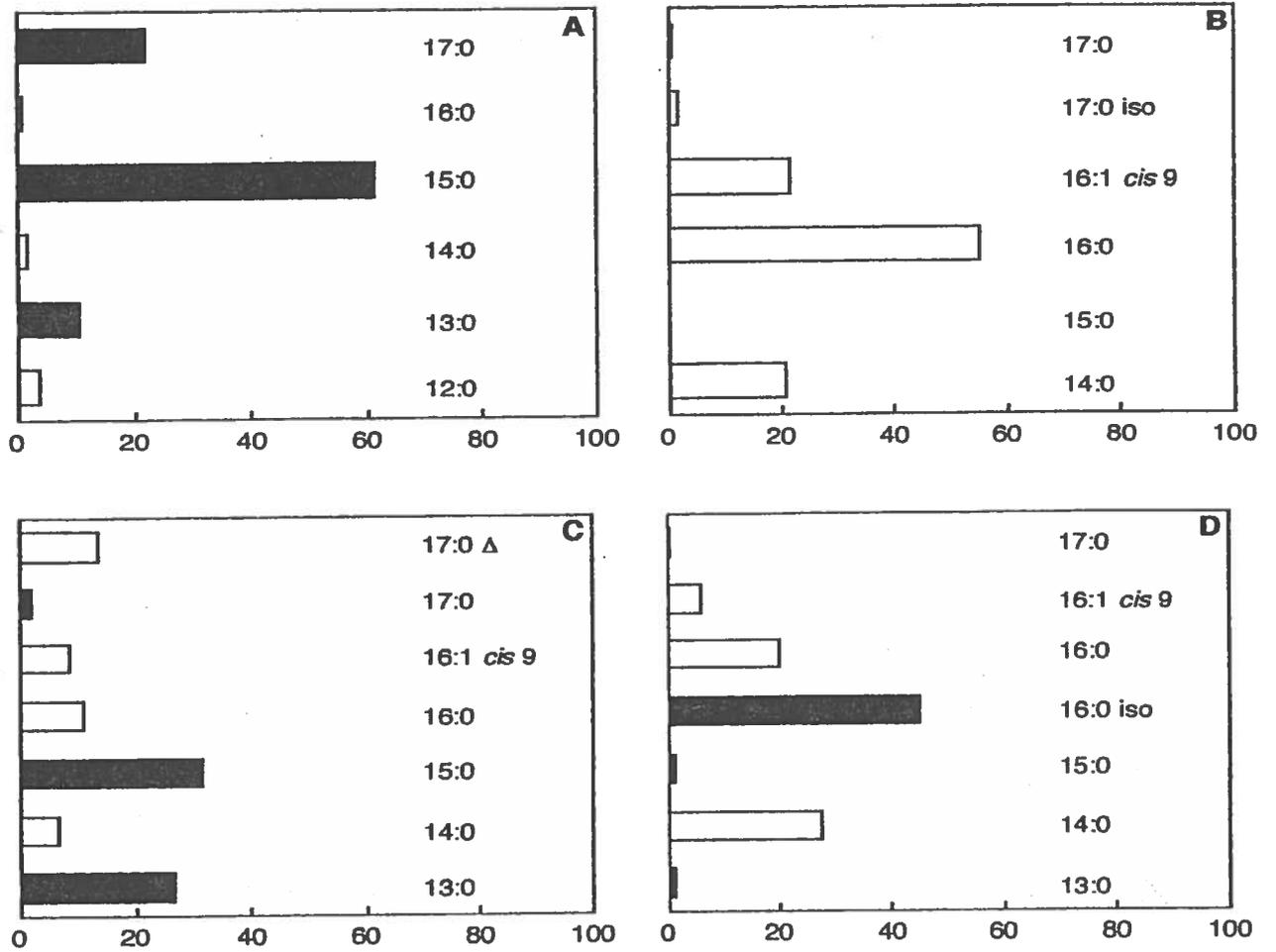


Abb. 39: Prozentuale Verteilung der analysierten Zellfettsäuren in anaeroben Anzuchten von Stamm Pnd3 auf Pentadecanat (A), Palmitat (B), *n*-Pentadecan (C) und *n*-Hexadecan (D). Schwarze Balken (■) symbolisieren Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen, weiße Balken (□) symbolisieren Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen in der Hauptkette.

D. Diskussion

Die Möglichkeit einer anaeroben Oxidation von Alkanen durch Mikroorganismen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Publikationen über Mikroorganismen, die Alkane unter anoxischen Bedingungen anzugreifen vermögen, tauchten in der Literatur über mehrere Jahrzehnte wiederholt auf. Ein schlüssiger Beweis gelang dabei jedoch nie (vgl. A.5.3.3 und A.5.3.4). Die von anderen Autoren geäußerten Zweifel betrafen beispielsweise die bei den damaligen Versuchen verwendeten anoxischen Versuchsbedingungen (Davis und Yarbrough, 1966; Novelli und ZoBell, 1944; Rosenfeld, 1947), da die heutigen Anaerobentechniken (Bryant, 1972; Hungate, 1969) erst später entwickelt wurden und sich verbreiteten. Desweiteren fehlten in den meisten Arbeiten Angaben zur Reinheit der verwendeten Kohlenwasserstoffe. Da häufig die Umsetzung eines sehr geringen Anteils an Alkan gemessen wurde (Davis und Yarbrough, 1966), könnte das festgestellte Wachstum durchaus auf die Verwertung von Verunreinigungen im zugesetzten Substrat zurückzuführen sein. Bei publizierten Versuchen mit radioaktiv markiertem Alkan fehlte der Nachweis, daß sich die Markierung tatsächlich ausschließlich im Alkan befand (Davis und Yarbrough, 1966; DeLaune et al., 1980; Hambrick et al., 1980; Ward und Brock, 1978). Die beschriebenen, zur anaeroben Alkanoxidation fähigen Bakterienisolate blieben entweder nicht in Kultur erhalten, so daß eine spätere Überprüfung der Daten nicht möglich war, oder erwiesen sich im nachhinein als nicht zur anaeroben Alkanoxidation fähig (Griffin und Traxler, 1981; Updegraff und Wren, 1954). Erst Versuche Ende der 80er bis Anfang der 90er Jahre führten zur Anreicherung und Isolierung der ersten sulfatreduzierenden Reinkultur, die nachweislich zur vollständigen Mineralisierung von langkettigen Alkanen unter strikt anoxischen Bedingungen in der Lage war. Das Isolat Hxd3 war aus einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes isoliert worden (Aeckersberg, 1989; Aeckersberg et al., 1991; Widdel, 1988). Wachstumsversuche wurden in anoxischen Medien durchgeführt, die sowohl mit Sulfid als auch mit Dithionit reduziert worden waren. Für stöchiometrische Analysen wurden die anaeroben Kulturen in zugeschmolzenen Glasampullen inkubiert. Dabei wurde eine Verwertung von 90 % des zugesetzten, hochreinen Hexadecans (99,5 %) gaschromatographisch gezeigt (Aeckersberg, 1994).

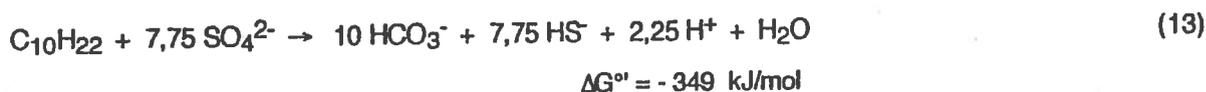
In derselben Arbeit (Aeckersberg, 1994) wurde außerdem eine zweite Reinkultur eines sulfatreduzierenden Bakteriums gewonnen, die zur anaeroben Oxidation von Alkanen in der Lage war. Beide Bakterienisolate wuchsen jedoch relativ langsam und bildeten geringe Zellerträge. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ein weiteres sulfatreduzierendes Bakterium und außerdem denitrifizierende Bakterienstämme isoliert, die ebenfalls zur anaeroben Alkanoxidation befähigt waren und schneller wuchsen als die vormals isolierten Stämme.

D.1 Nachweis der anaeroben Alkanoxidation durch neue Bakterienisolate

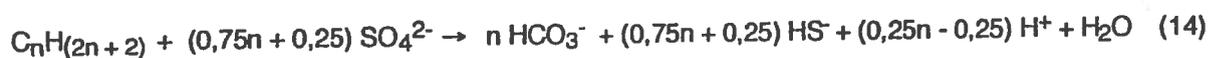
D.1.1 Anaerobe Alkanoxidation durch das sulfatreduzierende Isolat TD3

Stamm TD3 ist ein moderat thermophiler Sulfatreduzierer, der Alkane in einem Kettenlängenbereich von C₆ - C₁₆ verwertet. Stamm TD3 wuchs deutlich schneller als die Stämme Hxd3 und Pnd3. Die Verdopplungszeit von Stamm TD3 betrug auf Decan etwa zwei bis drei Tage, während Stamm Hxd3 auf Hexadecan mit einer Verdopplungszeit von 4 bis 5 Tagen wuchs (Aeckersberg, 1994).

Mit Stamm TD3 wurde die Verwertung des eingesetzten Decans unter strikt anoxischen Bedingungen eindeutig gezeigt. In zwei unabhängigen Ansätzen wurden 99 % bzw. 82 % des eingesetzten Decans oxidiert. Das in den zwei Ansätzen gemessene molare Verhältnis von gebildetem Sulfid zu verbrauchtem Decan von 7,58 bzw. 7,34 ließ auf eine vollständige Oxidation des Alkans zu CO₂ schließen. Gemäß der stöchiometrischen Gleichung (13) beträgt das theoretisch erwartete molare Verhältnis 7,75.



Die allgemeine Gleichung lautet:



Diese Gleichung beruht auf der Annahme einer vollständigen Mineralisierung des Substrats zu CO₂. Messungen von CO-Dehydrogenase-Aktivität und Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in Zellextrakten von Stamm TD3 (vgl. C.2.1.8) deuteten darauf hin, daß Acetyl-CoA über den CO-Dehydrogenase-Weg verwertet wurde (Schauder et al., 1986; Thauer et al., 1989). Das Substratspektrum (vgl. Tabelle 5) zeigte allerdings, daß Stamm TD3 nicht zur Verwertung von Acetat befähigt war. Diese Eigenschaft wurde auch bei Stamm Hxd3 oder *Archaeoglobus fulgidus* (Thauer et al., 1989) beobachtet. Vermutlich fehlen in diesen Stämmen die Acetat-Kinase oder die Phosphotransacetylase zur Aktivierung von Acetat.

D.1.2 Anaerobe Alkanoxidation durch die denitrifizierenden Isolate HdN1 und OcN1

Die anaerobe Alkanoxidation mit Sulfat als Elektronenakzeptor ermöglicht aufgrund des relativ negativen Redoxpotentials von Sulfat nur eine geringe Energieausbeute für die Bakterien. Um eine Bildung von höheren Zellerträgen zu erreichen, wurde die Isolierung von weiteren Bakterienisolaten mit Nitrat als Elektronenakzeptor begonnen. Nitrat besitzt ein sehr positives Redoxpotential und ermöglicht als Elektronenakzeptor daher eine hohe Energieausbeute (Abb. 40). Experimente zum schlüssigen Nachweis des anaeroben Wachstums auf Alkanen mit Nitrat fehlen in früheren Arbeiten (vgl. A.5.3.4).

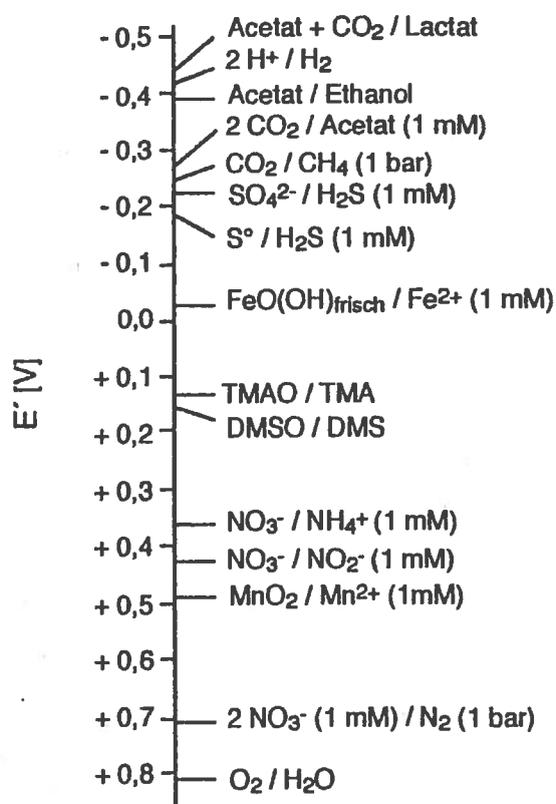


Abb. 40: Redoxpotentiale einiger biologisch relevanter Redoxpaare. Bei unlöslichen Komponenten wurde die Konzentration der zugehörigen löslichen Komponente in Klammern angegeben. Bei gasförmigen Komponenten wurde der Druck in Klammern angegeben. Bei Reaktionen mit mehr als zwei beteiligten Elektronen sind Durchschnittspotentiale gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue Bakterienstämme isoliert, die zur anaeroben Alkanoxidation mit Nitrat als Elektronenakzeptor fähig sind. Es sind die ersten und bislang einzigen Beispiele für diesen neuen anaeroben Stoffwechseltyp. Die Wachstumsgeschwindigkeit der neuen Isolate HdN1 und OcN1 auf Alkanen war mit einer Verdopplungszeit von 15 bis 20 Stunden auf Hexadecan bzw. Octan deutlich schneller im Vergleich zu den sulfatreduzierenden

Reinkulturen. Zudem zeichneten sich Kulturen der Denitrifizierer dadurch aus, daß eine deutliche Trübung des Mediums beim Wachstum auf Alkanen erfolgte und somit signifikante Zellerträge gebildet wurden.

Beide denitrifizierenden Isolate, die Stämme HdN1 und OcN1, oxidierten Alkane auch unter oxischen Bedingungen. Es fiel auf, daß der Kettenlängenbereich der verwerteten Alkane bei diesen Isolaten unter oxischen Bedingungen anders war als unter anoxischen Bedingungen. Das Isolat HdN1 wuchs unter oxischen Bedingungen auf Dodecan und Tridecan, welche diesem Stamm unter anoxischen Bedingungen nicht als Substrate dienten (vgl. C.3.2). Stamm OcN1 verwertete Hexan, Heptan, Dodecan und Tridecan unter oxischen, aber nicht unter anoxischen Bedingungen (vgl. C.3.3). Diese Befunde sprechen sehr dafür, daß die Aktivierungsreaktion unter anoxischen und oxischen Bedingungen bei den denitrifizierenden Isolaten durch unterschiedliche Enzyme bewerkstelligt wird, so wie es auch vom biochemischen Standpunkt zu erwarten ist.

D.1.2.1 Bilanzierung der anaeroben Alkanoxidation mit Nitrat als Elektronenakzeptor

In Ansätzen zur Bestimmung der Wachstumsbilanz mit Stamm HdN1 wurde gezeigt, daß die Oxidation von Hexadecan in anaeroben Kulturen von der Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor abhängig war (vgl. C.5.2). Ebenfalls wurde gezeigt, daß die Oxidation der gemessenen Hexadecan-Menge keinesfalls auf Reste von Sauerstoff in den Kulturen zurückgeführt werden kann. Bei der Herstellung der Medien und Kulturen wurden die bewährten Anaerobentechniken verwendet, die sich auch zur Handhabung sauerstoffempfindlicher Mikroorganismen eignen. Als Reduktionsmittel diente Ascorbat, welches über Nacht in den Kulturen mit eventuellen Resten von Sauerstoff reagieren konnte. Die Redoxaktivität des eingesetzten Ascorbats wurde durch die Entfärbung von Resazurin in einem Kontrollansatz demonstriert.

Die im Wasser im Gleichgewicht bei 20°C unter Normaldruck gelöste Menge Sauerstoff beträgt 8,9 mg oder 0,278 mmol O₂ pro l H₂O (Schwoerbel, 1984). Selbst bei einer 100 %igen Sättigung des Mediums mit Sauerstoff aus der Luft und unter der Annahme, daß dieser Sauerstoff ausschließlich für die Monooxygenase-Reaktion verwendet wird, könnten nur also nur 0,278 mmol 1-Hexadecanol pro l gebildet werden. Dies entspräche 15 % bzw. 28 % der in diesem Versuch oxidierten Hexadecan-Menge von 1,82 mmol · l⁻¹ bzw. 0,98 mmol · l⁻¹ (vgl. Tabelle 9). Diese Überlegungen bestätigten, daß Stamm HdN1 tatsächlich zur Oxidation von Alkanen ohne elementaren Sauerstoff fähig war.

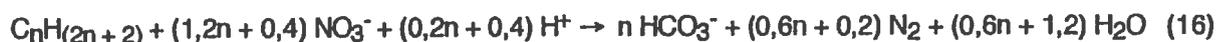
Zur Bilanzierung der Hexadecan-Oxidation wurde in anaeroben Kulturen sowohl die Hexadecan-Abnahme als auch die Nitrat-Abnahme gemessen. Die gemessene Wachstumsbilanz

ergab ein molares Verhältnis von reduziertem Nitrat zu oxidiertem Hexadecan von 15,8 (vgl. Tabelle 9). Wie bereits zuvor dargelegt, bildete dieser Stamm Einschlüsse unbekannter Art. Auch Zellen, die mit einer limitierenden Substratmenge angezogen wurden, zeigten, wenn auch in geringerem Ausmaß, solche Einschlüsse. Daher ist zu vermuten, daß der durch die in Tabelle 9 angegebene Gleichung geschätzte Anteil des assimilierten Hexadecans die tatsächliche Menge deutlich unterschätzt. Wie in Abschnitt C.2.2.3 gezeigt wurde, reduzierte das Isolat HdN1 Nitrat als Elektronenakzeptor vollständig zu N_2 . Die Kulturen schieden intermediär kein Nitrit aus. In fertig gewachsenen Kulturen wurde weder N_2O noch neu gebildetes NH_4^+ nachgewiesen. Ascorbat, welches den Kulturen als Reduktionsmittel zugesetzt wurde, wurde nicht als Substrat verwertet (vgl. Tabelle 6). In einer Kultur ohne Ascorbat wurden vergleichbare Meßwerte wie in den anderen Wachstumsansätzen mit Ascorbat gemessen, was einen Einfluß von Ascorbat auf die Bilanz ausschloß. Stamm HdN1 verwendete Acetat als einzigen Elektronendonator, was bedeutet, daß dieses Isolat zur Endoxidation befähigt ist. All diese Ergebnisse sprechen für eine vollständige Mineralisierung des Hexadecans mit gleichzeitiger Reduktion des Nitrats zu N_2 nach folgender Gleichung (15):



$$\Delta G^\circ = - 9709 \text{ kJ/mol Hexadecan}$$

Die allgemeine Gleichung lautet:



D.2 Taxonomische Einordnung der neuen Bakterienisolate

Zur taxonomischen Einordnung der neuen Bakterienisolate wurde die Sequenz der 16S rRNA ermittelt. Die neuen Isolate wurden in den auf Sequenzvergleichen beruhenden phylogenetischen Stammbaum der Prokaryonten eingeordnet. Die bislang bekannten Isolate Hxd3 und Pnd3 gehören zur δ -Klasse der Proteobakterien und liegen im Stammbaum relativ nah beieinander (Abb. 18). Daher stellte sich die Frage, ob die Fähigkeit zur anaeroben Alkanoxidation ausschließlich auf eine Gruppe eng verwandter Mikroorganismen beschränkt ist.

Taxonomische Einordnung von Stamm TD3

Der sulfatreduzierende Stamm TD3 gehört wie die bereits bekannten Isolate Hxd3 und Pnd3 zur δ -Gruppe der Proteobakterien. Stamm TD3 hat allerdings einen relativ tiefen Verzweigungspunkt und ist mit keinem der bekannten Stämme dieser Gruppe verwandt (Abb. 18). Die größte Sequenzhomologie besteht mit 89,4 % zu *Desulfohalobium retbaense*, einem mesophilen sulfatreduzierenden Bakterium, das aus einem hypersalinen Sediment isoliert wurde und mit Acetat oder Lactat wächst. Der Stamm TD3 war das erste thermophile Bakterium, das in die δ -Gruppe der Proteobakterien eingruppiert wurde (Rueter et al., 1994). Thermophile Sulfatreduzierer gibt es bislang in sechs verschiedenen Bakteriengattungen. Die meisten bekannten moderat thermophilen Sulfatreduzierer, nämlich 6 Arten, gehören der Gattung *Desulfotomaculum* an (Fardeau et al., 1995). Die Gattung *Desulfotomaculum* umfaßt alle sporenbildenden Gram-positiven sulfatreduzierenden Bakterien. Sie oxidieren ein breites Spektrum an Elektronendonatoren wie beispielsweise H_2 , Alkohole, Fettsäuren, Dicarbonsäuren und Hexosen unter moderat thermophilen Bedingungen (Widdel, 1992a). In der Gattung *Thermodesulfobacterium*, die Gram-negative, nicht-sporenbildende sulfatreduzierende Bakterien enthält, sind bislang die Arten *T. mobile* und *T. commune* beschrieben worden. Beide Arten sind moderat thermophile, unvollständige Oxidierer, die H_2 , Formiat, Pyruvat oder Lactat als Elektronendonatoren verwenden (Widdel, 1992b). Ähnliche physiologische Eigenschaften, aber Unterschiede bezüglich des G+C-Gehalts und der 16S rRNA, weist *Thermodesulfovibrio yellowstonii* auf (Henry et al., 1994). Die Gattungen *Thermodesulfobacterium* und *Thermodesulfovibrio* zweigen tief im Stammbaum der Eubakterien ab. Eine weitere Gattung thermophiler Sulfatreduzierer, *Archaeoglobus*, umfaßt Vertreter hyperthermophiler Archaeobakterien. Die beiden beschriebenen Arten *A. fulgidus* und *A. profundus* haben coccoide Zellen und ein Temperaturoptimum über $80^\circ C$. *A. fulgidus* wächst chemolithoautotroph mit H_2 oder chemoorganotroph mit Formiat, Lactat, Pyruvat oder Glucose. *A. profundus* wächst obligat chemolithoheterotroph beispielsweise mit H_2 + Acetat oder Lactat oder Pyruvat (Stetter, 1992). Kürzlich wurden zwei neue Gattungen moderat thermophiler sulfatreduzierender Bakterien beschrieben, *Thermodesulforhabdus* und *Desulfacinum*, die ebenfalls in die δ -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet wurden. Die beschriebenen Stämme *Thermodesulforhabdus norvegicus* (Beeder et al., 1995) und *Desulfacinum*

infernum (Rees et al., 1995), haben ein Temperaturoptimum bei 60°C und wachsen beispielsweise mit Acetat, Lactat oder Fettsäuren als alleiniger Quelle organischer Substrate.

Das neue Isolat TD3 läßt sich aufgrund der 16S rRNA-Sequenz in keine der genannten Gattungen einordnen. Es unterscheidet sich auch physiologisch deutlich von den Vertretern der Gattungen *Desulfotomaculum*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulfovibrio*, *Archaeoglobus*, *Thermodesulforhabdus* und *Desulfacinum*. Daher wird in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen, dieses Isolat in die neue Gattung *Desulfothermus* gen. nov. einzuordnen und als *Desulfothermus naphthae* gen. nov., sp. nov. zu bezeichnen.

Taxonomische Einordnung von Stamm HdN1

Das denitrifizierende Neuisolat HdN1 gehört aufgrund der 16S rRNA-Sequenz zur γ -Gruppe der Proteobakterien. Es konnten keinerlei signifikante Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Bakteriengattungen festgestellt werden. Physiologisch stellt dieser Stamm aufgrund seines anaeroben Wachstums auf gesättigten Kohlenwasserstoffen mit Nitrat als Elektronenakzeptor einen bislang unbekanntem Stoffwechsellyp dar. Aufgrunddessen und der ungewöhnlichen Morphologie wird in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen, diesen Stamm in die neue Gattung *Oleomonas* gen. nov. einzuordnen und als *Oleomonas alkani* gen. nov., sp. nov. zu bezeichnen.

Taxonomische Einordnung von Stamm OcN1

Stamm OcN1 muß aufgrund der 16S rRNA-Sequenz in die β -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet werden. Innerhalb dieser Gruppe bildet dieser Stamm mit der neuen Familie der *Comamonadaceae* ein Cluster, dessen Mitglieder genotypisch untereinander große Ähnlichkeit besitzen, phänotypisch allerdings recht unterschiedlich sind. Die nächsten Verwandten zum Stamm OcN1 in dieser Familie sind die Gattungen *Thauera* und *Azoarcus* (Macy und Kirsch, 1989; Reinhold-Hurek et al., 1993). Diesen Gattungen wurde eine Vielzahl neuer denitrifizierender Bakterienisolate zugeordnet, die zum Abbau aromatischer Substanzen unter anoxischen Bedingungen fähig sind (Anders et al., 1995; Fries et al., 1994; Rabus, 1995). Die größte Sequenzhomologie des Neuisolats OcN1 besteht zu *Azoarcus* sp. S5b2 mit 93,9 % Sequenzidentität (Abb. 20). Entgegen früheren Veröffentlichungen sind bereits klassifizierte *Azoarcus*-Stämme durchaus zur Denitrifikation fähig (Anders et al., 1995). Für keinen dieser Stämme wurde bislang ein anaerobes Wachstum auf Alkanen beschrieben.

Nach neuerer Konvention ist bei weniger als 95 % Sequenzidentität der 16S rRNA eine neue Art zu definieren (Amann et al., 1995). Daher wird in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen, Stamm OcN1 als *Azoarcus petrolei* sp. nov. zu bezeichnen.

Die fünf verschiedenen Isolate anaerober Alkanoxidierer bilden demnach fünf neue Arten in vier verschiedenen Gattungen der β -, γ - und δ -Gruppe der Proteobakterien. Zusammenfassend kann man also feststellen, daß die Fähigkeit zur Oxidation von Alkanen unter anoxischen Bedingungen

nicht eine spezifische Eigenschaft einer kleinen Gruppe von Bakterien ist, sondern im Stammbaum der Proteobakterien gestreut vorkommt.

D.3 Betrachtungen zu möglichen Mechanismen der Alkanaufnahme der neuen Isolate und zu Versuchen zur Wachstumsstimulierung

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, erfordert die Verwertung von Alkanen durch Mikroorganismen aufgrund der Unlöslichkeit dieser Verbindungen in Wasser besondere Mechanismen bei der Substratversorgung. Der Kontakt der Zellen zum Alkan könnte in Analogie zu aeroben Alkanverwertern (vgl. A.5.1) entweder durch eine direkte Anheftung der Zellen mittels hydrophober Zelloberflächen oder durch eine Pseudosolubilisierung der Alkane in der wäßrigen Phase mittels spezifischer Emulgatoren erreicht werden. Bei Stamm Hxd3 erfolgte der Kontakt durch direkte Anheftung der Zellen an die Alkanphase (Aeckersberg, 1994). Gleiches gilt auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Isolate TD3 und OcN1. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß größere Alkantropfen mit Bakterienzellen überzogen waren (Abb. 13 B). Beim Wachstum dieser Isolate war zunächst eine fortschreitende Emulgation und Trübung der Alkanphase aufgrund anheftender Bakterienzellen zu beobachten, während eine Trübung des Mediums erst später auftrat. Die beobachteten Zellflocken entstanden wahrscheinlich durch Zusammenlagern der Zellen aufgrund der hydrophoben Zelloberflächen.

Stamm HdN1 hatte vermutlich auf etwas andere Weise Zugang zum Alkan als die anderen Isolate. Alkantropfen mit anheftenden Zellen wurden bei Stamm HdN1 seltener als bei den anderen Isolaten beobachtet. Eine auffällige Eigenschaft dieses Isolats war die Bildung makroskopisch sichtbarer Zellflocken, die häufig an der Oberfläche der Kulturen zu finden waren, beim Wachstum auf Alkanen und anderen unlöslichen Substraten. Bei Hefen findet man beim Wachstum auf Alkanen häufig ähnliche Aggregate, die aus Zellen, Kohlenwasserstoff und Luftbläschen bestehen. Die einzelnen Zellen des Stammes HdN1 erschienen beim Wachstum auf Alkanen und anderen unlöslichen Substraten häufig sehr stark vergrößert und unförmig. Dies deutete darauf hin, daß große Mengen an Speicherstoffen eingelagert wurden. Die Zusammensetzung dieser Stoffe ist noch nicht geklärt, es besteht jedoch die Möglichkeit, daß es sich bei auf Alkan gewachsenen Zellen um eine Einlagerung der Alkane selbst handelte (vgl. C.2.2.1). Bei verschiedenen aeroben Alkanverwertern wie *Flavobacterium* sp., *Brevibacterium* sp. und *Acinetobacter* sp. H01-N wurden Lipideinschlüsse gefunden. Diese Einschlüsse sind von einer einfachen Membran umgeben und bestehen aus Phospholipiden, Polypeptiden und neutralen Lipiden einschließlich des nicht umgesetzten Alkans (Britton, 1984). Man könnte sich vorstellen, daß Stamm HdN1 durch Ausscheidung spezifischer Substanzen eine Pseudosolubilisierung des Alkans erreicht. Die beobachteten Zellaggregate könnten analog zu den beobachteten Aggregaten bei Hefezellen

Konglomerate aus Zellen und Alkantröpfchen darstellen. Desweiteren könnte man sich vorstellen, daß die Zellen die emulgierten Alkane schneller aufnehmen als sie sie verwerten können, wodurch die beobachteten prall gefüllten Zellen entstanden sein könnten. Diese gespeicherten Substrate könnten dann bei Substratmangel verwertet werden. Tatsächlich reduzierten anaerobe Suspensionen von Zellen dieses Stammes aus Anzuchten mit Alkan ohne nochmals zugegebenes Substrat große Mengen an Nitrat (vgl. C.7.1). Dieses wurde bei keinem der anderen Isolate beobachtet.

Geschüttelte Kulturen der Stämme TD3 und HdN1 wuchsen deutlich langsamer als ruhende Kulturen. Bei Stamm HdN1 wurde dies sowohl bei anaeroben als auch bei aeroben Kulturen mit Alkanen beobachtet. Alle Isolate wurden daher beim Wachstum auf Alkanen in Flüssigkulturen nur etwa einmal täglich per Hand geschüttelt. Für Stamm Hxd3 wurden ähnliche Beobachtungen beschrieben. Das schnellste Wachstum mit diesem Stamm wurde erreicht, wenn die Kulturen zunächst eine Woche ruhend inkubiert wurden und anschließend bei 65 rpm kontinuierlich geschüttelt wurden (Aeckersberg, 1994). Vermutlich wird durch ständige Bewegung der Kulturen die Anheftung und damit die Aufnahme der Alkane behindert. Bei *P. aeruginosa* Stamm 196Aa wurde das Zellwachstum auf Glucose durch Schütteln gesteigert, während Alkankulturen ruhend schneller wuchsen (Traxler und Bernard, 1969). Die Autoren führten dies auf eine gewisse Sauerstoffempfindlichkeit der Zellen beim Wachstum auf Alkanen zurück und deuteten dies als Hinweis auf eine anaerobe Alkanverwertung. Später wurde jedoch bekannt, daß der Stamm nicht zur anaeroben Verwertung von Alkanen in der Lage ist (Griffin und Traxler, 1981). Das bessere Wachstum auf Alkanen bei ruhender Inkubation könnte also auch bei Stamm 196Aa mit der besseren Anheftung der Zellen an das Substrat als im Falle ständigen Schüttelns zusammenhängen.

Für die Stämme Hxd3 und Pnd3 wurde eine Stimulierung des Wachstums auf Alkanen durch Zugabe von 5 g/l α -Cyclodextrin zum Medium beschrieben (Aeckersberg, 1994). α -Cyclodextrin ist ein ringförmiges Molekül, bestehend aus sechs α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Cyclodextrine bilden hydrophobe Kanäle und können so als Carrier für hydrophobe Moleküle wie beispielsweise Alkane fungieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von α -Cyclodextrin auf das Wachstum von Stamm TD3 untersucht. Es zeigte sich jedoch, daß die eingesetzte Konzentration von 5 g α -Cyclodextrin pro l auch bei Variation der Konzentration von Decan in Heptamethylnonan keinen stimulierenden Einfluß auf das Wachstum dieses Stammes hatte.

D.4 Biochemische Aspekte der anaeroben Alkanoxidation

Bisher war in biologischen Systemen eine Aktivierung der inerten Alkanmoleküle lediglich durch hochreaktive Sauerstoffspezies bekannt, wobei C-H-Bindungen homolytisch gespalten werden. Homolytische Spaltungen ohne Beteiligung von Sauerstoff werden häufig durch Coenzym B₁₂- oder S-Adenosylmethionin-abhängige Enzyme katalysiert. Bei der Abstraktion eines H-Atoms (H-Radikals) durch die bislang bekannten Coenzym B₁₂- oder S-Adenosylmethionin-abhängigen Reaktionen sind allerdings funktionelle Gruppen am oder in Nachbarschaft zu dem betroffenen Kohlenstoffatom erforderlich (Dowd, 1990; Frey, 1990; Groh und Nelson, 1990). In Alkanen gibt es keine funktionellen Gruppen. Dennoch besteht die initiale Aktivierungsreaktion der anaeroben Alkanoxidation vermutlich in der Spaltung einer C-H-Bindung. Im folgenden werden weitere Befunde aus lebenden Organismen beschrieben, die eine anaerobe Aktivierung von isolierten C-H-Bindungen erfordern.

Die Synthese der Tetraetherlipide (Abb. 41) in dem strikt anaeroben Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* erfordert die ungewöhnliche Reaktion der Kopf an Kopf-Kopplung isoprenoider Biphytanyl-Vorläufer.

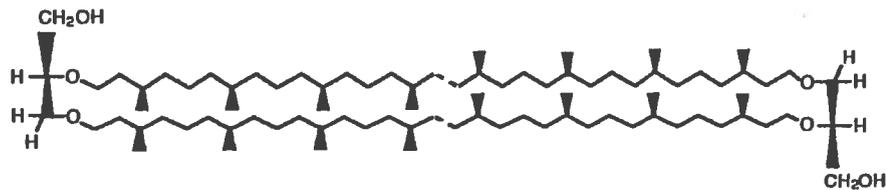


Abb. 41: Struktur des Dibiphytanyl-Diglycerol-Tetraethers aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Die bei der Synthese dieser Substanz geknüpfte C-C-Bindung, die vermutlich durch das Einschleiben in eine nicht aktivierte C-H-Bindung entstanden ist, ist gestrichelt dargestellt.

Lange Zeit war eine Reaktion noch auf der ungesättigten Stufe der Isoprenoide gefordert worden. Galliker (1990) konnte jedoch zeigen, daß die Kopplung an gesättigten Strukturen stattfindet. Bei bestimmten Wachstumsbedingungen der Kulturen wurde zudem eine Methylgruppe am C-13-Atom in die Biphytanylkette eingebaut. Auch für diesen Einbau wurde gezeigt, daß die Methylgruppe in einem lokal gesättigten Bereich der Kohlenwasserstoffkette an die Stelle einer nicht aktivierten C-H-Bindung eingeschoben wird. Bei beiden Prozessen handelt es sich also um die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung an der Stelle einer nicht aktivierten C-H-Bindung. Mögliche Mechanismen wären Reaktionen, die über Radikale oder Carbenium-Ionen verlaufen, wobei letztere durch Markierungsexperimente ausgeschlossen wurden. Galliker schlägt daher einen radikalischen Mechanismus unter Beteiligung eines Corrinoids vor (Galliker, 1990).

Einen ähnlichen Mechanismus könnte die Synthese von Diabolinsäuren (Dicarbonsäuren mit zwei vicinalen Methylgruppen; Abb. 42) in dem anaeroben, aus dem Pansen von Wiederkäuern isolierten Bakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* bedingen.

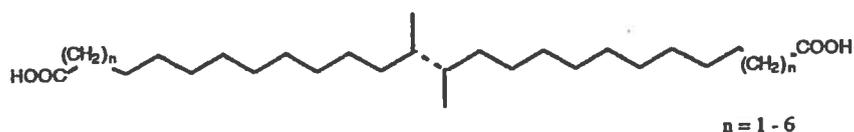


Abb. 42: Struktur der Diabolinsäuren aus *Butyrivibrio fibrisolvens*. Die bei der Synthese dieser Substanz geknüpfte C-C-Bindung, die vermutlich durch das Einschleiben in eine nicht aktivierte C-H-Bindung entstanden ist, ist gestrichelt dargestellt.

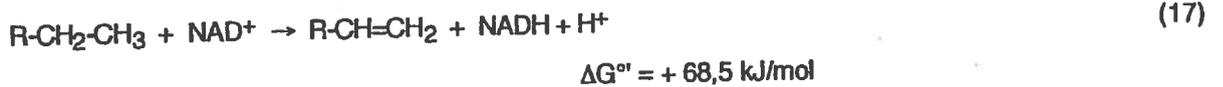
Diabolinsäuren sind Bestandteil der Lipide dieses Organismus. Das Wachstum von *Butyrivibrio fibrisolvens* erforderte den Zusatz von langkettigen Fettsäuren. Die isolierte Diabolinsäure entsprach der dimeren Form der jeweils zugesetzten Fettsäure. Durch Markierungsexperimente wurde ein Reaktionsverlauf über ungesättigte Teilstrukturen ausgeschlossen (Fitz und Arigoni, 1992), woraus sich folgern ließ, daß zwei gesättigte Fettsäure-Moleküle über die terminale Methylengruppe miteinander verknüpft wurden. Eine Diabolinsäure sowie eine Verbindung mit einer ähnlichen Struktur wurden auch aus dem strikt anaeroben Eubakterium *Thermotoga maritima* isoliert (De Rosa et al., 1988). Dies läßt eine weitere Verbreitung derartiger Substanzen und möglicherweise der zuvor skizzierten, bislang unbekanntem Synthesemechanismen vermuten.

Die genannten Beispiele belegen, daß in biologischen Systemen die Spaltung einer nicht aktivierten C-H-Bindung an gesättigten Teilstrukturen auch unter anoxischen Bedingungen möglich sein muß, so wie es auch für die anaerobe Alkanoxidation gefordert wird. In der Literatur werden heute zwei mögliche Mechanismen einer Alkanaktivierung ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff diskutiert. Eine Möglichkeit wäre die initiale Dehydrogenierung, die zur Einführung einer Doppelbindung in das Alkan führen würde (Abbott und Casida jr., 1968; Bühler und Schindler, 1984; Iizuka et al., 1969; Iizuka et al., 1968; Wagner et al., 1967). Die andere Möglichkeit wäre die Aktivierung der Alkanmoleküle über die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung (Aeckersberg, 1994). Beide Möglichkeiten sollen in den folgenden Abschnitten im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit eingehender diskutiert werden.

D.4.1 Betrachtungen zu Alkenen als möglichen Intermediaten der anaeroben Alkanoxidation

Die initiale Dehydrogenierung eines Alkans zum korrespondierenden 1-Alken wurde in früheren Publikationen als eine allgemeine Möglichkeit zur Alkanaktivierung, d. h. auch als Aktivierungsmechanismus in Gegenwart von Sauerstoff, in Betracht gezogen. Eine derartige Reaktion wäre auch unter anoxischen Bedingungen vorstellbar, da kein molekularer Sauerstoff

involviert ist. Man findet in der früheren Literatur mehrere Arbeiten, die eine Umsetzung von Alkanen zu Alkenen in biologischen Systemen beschreiben. Die ersten Arbeiten zu diesem Thema wurden von einer französischen Arbeitsgruppe an *Pseudomonas aeruginosa* Stamm Sol 20 durchgeführt. In anaeroben Zellsuspensionen wurde die Umsetzung von Heptan zu 1-Hepten mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor Pyocyanin gezeigt (Chouteau et al., 1962; Senez und Azoulay, 1961). Die weitere Oxidation erforderte allerdings molekularen Sauerstoff (Azoulay et al., 1963). In einer anderen Arbeit mit *P. aeruginosa* Stamm 196Aa wurden anaerobe Enzymtests mit einem gereinigten Enzym durchgeführt. Die Autoren berichten in der Arbeit von einer Umsetzung von Decan zu Decen mit NAD^+ als Elektronenakzeptor (Parekh et al., 1977). Entgegen früheren Behauptungen (Traxler und Bernard, 1969) ist der in dieser Arbeit untersuchte Stamm allerdings nicht in der Lage, anaerob auf Alkanen zu wachsen (Griffin und Traxler, 1981). Die publizierten Ergebnisse des Enzymtests sind desweiteren anzuzweifeln, da die Reaktion von Alkanen zu Alkenen mit NAD^+ (17) eine endergone Reaktion ist (Aeckersberg, 1994; McKenna und Kallio, 1965) und in dem beschriebenen Testsystem mit gereinigten Komponenten die zusätzlich notwendige energieliefernde Reaktion kaum möglich erscheint.



Wagner et al. (1967) konnten nach Wachstum der aeroben Mikroorganismen *Micrococcus cerificans*, *Mycobacterium phlei*, *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. und *Rhodotorula* sp. auf olefinfreiem Hexadecan in Mineralmedium die Bildung von 1-Hexadecen nachweisen. Abbott und Casida jr. (1968) berichteten von der Umsetzung von Hexadecan zu Monoalkenen (hauptsächlich 7-Hexadecen) in einem sauerstoffabhängigen Prozeß durch stationäre Zellen von *Nocardia salmonicolor* PSU-N-18. In der aerob angezogenen Hefe *Candida rugosa* wurde in anaeroben Zellextrakten und Zellsuspensionen eine Anhäufung von Decen nach Zugabe von Decan gezeigt (Iizuka et al., 1969; Iizuka et al., 1968). Die Bildung von Alkenen aus Alkanen durch Mikroorganismen wurde jedoch in keiner neueren Arbeit mehr demonstriert. Keine der erwähnten Kulturen zeigte anaerobes Wachstum auf Alkanen. Im Gegenteil, in einigen Arbeiten wurde ausdrücklich auf die Notwendigkeit von Sauerstoff selbst bei der Bildung des Alkens hingewiesen. Eine in der Biochemie bekannte Reaktion, bei der eine Doppelbindung in gesättigte Teilstrukturen eingeführt wird, ist die Fettsäuresaturase-Reaktion. Auch diese Reaktion ist sauerstoffabhängig (Fulco, 1974).

Der hypothetische Aktivierungsmechanismus von Alkanen über 1-Alkene bei den anaeroben Alkanoxidierern wurde zunächst in Wachstumstests auf 1-Alkenen untersucht. Die Stämme Hxd3 und Pnd3 wuchsen auf langkettigen 1-Alkenen. Induktionsversuche mit Stamm Hxd3 ließen vermuten, daß die zur Alkenverwertung notwendigen Enzyme bei Zellen, die auf Alkan gewachsen waren, zunächst induziert werden mußten. Zudem unterschied sich das Zellfettsäuremuster von

Zellen, die auf Alkanen gewachsen waren, von solchen, die auf den korrespondierenden Alkenen gewachsen waren. Diese Befunde wurden dahingehend interpretiert, daß in Stamm Hxd3 zwei unabhängige Systeme für die Aktivierung von Alkanen bzw. Alkenen existieren (Aeckersberg, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuisolate verhielten sich unterschiedlich in Wachstumstests auf 1-Alkenen. Stamm HdN1 wuchs sehr gut auf Alkenen, während die Stämme TD3 und OcN1 Alkene nicht verwerteten. Um festzustellen, ob die Unfähigkeit zum Wachstum mit diesen Alkenen auf einer Giftigkeit dieser Substanzen beruhte, wurde das Wachstum auf Fettsäuren getestet, wenn gleichzeitig Alkene zugesetzt wurden. Beide Stämme, TD3 und OcN1, verwerteten Fettsäuren auch in Anwesenheit von Alkenen. Hingegen wuchs keiner der zwei Stämme, wenn Ansätzen mit Alkenen die ansonsten verwertbaren Alkane zugegeben wurden. Dies deutete eine spezifische Hemmung der Alkanverwertung durch 1-Alkene an. Für Stamm TD3 wurde auch das Wachstum auf längerkettigen Alkenen (1-Undecen, 1-Dodecen, 1-Tetradecen), die wahrscheinlich eine geringere Giftigkeit als die kurzkettigen haben, untersucht. Auch hier erfolgte auf dem Alken allein kein Wachstum, während bei gleichzeitiger Zugabe von Fettsäuren Wachstum beobachtet wurde, bei gleichzeitiger Zugabe der ansonsten verwertbaren Alkane jedoch nicht.

Es könnte argumentiert werden, daß die Hemmung der Alkanoxidation durch Alkene unspezifischer Natur ist und nur deshalb auftritt, weil die Zellen bei der Verwertung von Alkanen auf die Anheftung an die Trägerphase, in der sich auch das Alken befindet, angewiesen sind, bei der Verwertung der Fettsäure jedoch nicht. Dies wurde in einem Experiment mit Stamm OcN1 untersucht, in dem gleichzeitig ein Alkan, ein Alken, ein Alkohol und ein Aldehyd angeboten wurden (siehe C.3.3.1). Dabei zeigte sich, daß das Alkan und das Alken nicht oxidiert wurden, während eine Verwertung des Alkohols und des Aldehyds stattfand. Die Löslichkeit des eingesetzten Alkohols und des Aldehyds in der wäßrigen Phase ist sehr gering. Die Zellen waren bei der Verwertung dieser Substrate also ebenfalls auf die Anheftung an die Trägerphase angewiesen. Dies wurde in den Kulturen auch deutlich durch die Trübung der Trägerphase beobachtet. Die toxische Wirkung des Alkens schien also tatsächlich eine spezifische Hemmung der Alkanoxidation in Stamm OcN1 zu sein.

Diese Ergebnisse sprechen sowohl bei Stamm OcN1 als auch bei Stamm TD3 gegen ein Alken als freies Intermediat bei der anaeroben Alkanoxidation. Die bei den zwei Stämmen beobachtete spezifische Hemmung der anaeroben Alkanverwertung durch 1-Alkene könnte damit erklärt werden, daß sich das Alken als Strukturanalogon in die Enzymtasche einlagert, aber nicht umgesetzt werden kann und daher das aktivierende Enzym blockiert.

D.4.2 Die Knüpfung einer neuen C-C-Bindung als mögliche Eingangsreaktion der anaeroben Alkanoxidation

Vorstellbare Reaktionen, die zur Knüpfung einer neuen C-C-Bindung führen würden, wären die Carboxylierung und die Carbonylierung. Carboxylierungen werden als Aktivierungsreaktionen beispielsweise beim anaeroben Abbau von Hydroxyaromaten, Anilin und Aceton postuliert (Bissaillon et al., 1991; Janssen und Schink, 1995; Platen et al., 1990; Ramanand und Sufliya, 1991; Roberts et al., 1990; Rudolphi et al., 1991; Schnell et al., 1989; Schnell und Schink, 1991; Tschech und Fuchs, 1989). Bei allen diesen Substraten ist jedoch die Bildung der vermutlich intermediär gebildeten Carbanionen infolge einer Mesomeriestabilisierung durch das π -Elektronensystem des aromatischen Ringes oder durch das Enolation im Falle von Aceton begünstigt. Bei Alkanen wäre eine derartige Mesomeriestabilisierung nicht möglich, weshalb die Abspaltung eines Protons aus einer völlig unpolarisierten C-H-Bindung zur Bildung eines Carbanions sehr unwahrscheinlich ist. Daher erscheint die Aktivierung über eine Carbonylierung der wahrscheinlichere Weg.

D.4.2.1 Beispiele bekannter Carbonylierungs- und Decarbonylierungsreaktionen

Die Carbonylierungsreaktion in Form einer reversiblen Bildung von Acetyl-CoA aus einer gebundenen Methylgruppe, CO und CoA spielt im Stoffwechsel von vielen anaeroben Bakterien eine wichtige Rolle. Diese Reaktion stellt einen entscheidenden Schritt bei der autotrophen CO₂-Fixierung in den meisten methanogenen, vielen sulfatreduzierenden und homoacetogenen Bakterien dar. Bei homoacetogenen Bakterien entsteht Acetyl-CoA aus CO₂ als Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel, wobei ebenfalls eine Carbonylierungsreaktion stattfindet. Diese häufig als Acetyl-CoA-Weg bezeichnete Reaktionsfolge sich dadurch aus, daß wichtige Intermediate ausschließlich enzymgebunden vorkommen und einige organometallische Komplexe an der Katalyse beteiligt sind. Die typischen Enzyme sind eine Methyltransferase, ein Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein und die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-Dehydrogenase). Die eigentliche Carbonylierung findet wahrscheinlich am Nickel der CO-Dehydrogenase (Ragsdale, 1991) oder am Kobalt des Corrinoid-Proteins (Thauer, 1989) statt. Die Reaktion der CO-Dehydrogenase ist reversibel und stellt in der umgekehrten Richtung einen wichtigen Schritt bei der Oxidation von Acetyl-CoA in sulfatreduzierenden Bakterien sowie bei der Disproportionierung von Acetat zu CO₂ und Methan in methanogenen Bakterien dar (Thauer et al., 1989).

Auch chemische Prozesse zur selektiven Carbonylierung von Alkanen unter milden Bedingungen mit Hilfe von Übergangsmetallkomplexen wurden beschrieben. Beispielsweise gelang die Carbonylierung von *n*-Pentan zu Hexanal an einem Rhodium-Komplex

$[\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ unter Bestrahlung mit einer Quecksilberlampe (Sakakura und Tanaka, 1987) (Abb. 43).

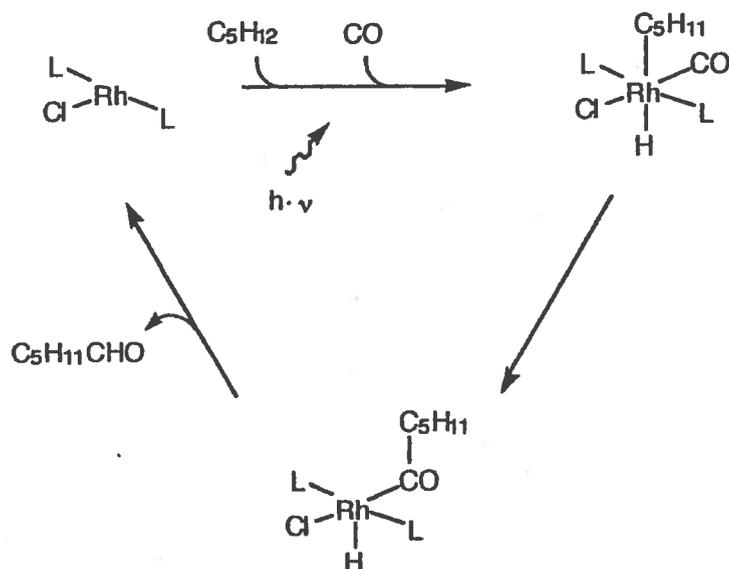


Abb. 43: Mechanismus der chemischen Carbonylierung von *n*-Pentan zu Hexanal an einem Rhodium-Komplex unter milden Bedingungen

Decarbonylierungsreaktionen werden beispielsweise bei der Synthese von Alkanen in biologischen Systemen postuliert. Hierbei wird durch Abspaltung von CO aus einem Aldehyd das um eine C_1 -Einheit verkürzte *n*-Alkan synthetisiert (vgl. A.3.2). Das erste Enzym dieses Reaktionsweges, die Aldehyd-Decarbonylase, wurde aus der Grünalge *Botryococcus braunii* gereinigt. Das Enzym enthält vermutlich ein Kobalt-Porphyrin oder eine Corrinstruktur als prosthetische Gruppe (Dennis und Kolattukudy, 1992). Die mögliche Reversibilität der Reaktion, d. h. die Carbonylierung eines Alkans zu dem um eine C_1 -Einheit längeren Aldehyd, wurde in einer Arbeit an der Aldehyd-Decarbonylase des Schwarzhalstauchers *Podiceps nigricollis* angedeutet (Cheesbrough und Kolattukudy, 1988).

Auch chemische Verfahren zur Decarbonylierung von Aldehyden sind bekannt. Domazetis et al. (1980) beschrieben beispielsweise eine Decarbonylierung von Heptanal zu *n*-Hexan bei Umgebungstemperatur. Dabei diente ein Ruthenium(II)-Porphyrin-Komplex als Katalysator.

D.4.2.2 Überprüfung der Hypothese der Veränderung der C-Kette bei der anaeroben Alkanoxidation

Erste Hinweise auf eine mögliche Veränderung der Kettenlänge bei der anaeroben Aktivierung der Alkanmoleküle sollte die Untersuchung der Zellfettsäuren geben. In einigen früheren Arbeiten war gezeigt worden, daß die *de novo* Fettsäuresynthese in Mikroorganismen, die auf langkettigen

aliphatischen Kohlenwasserstoffen gewachsen waren, deutlich gehemmt war. Beispielsweise hemmten Alkane die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase in *Candida* sp. Stattdessen wurden die zum Wachstum verwendeten Kohlenwasserstoffe eindeutig als Vorläufer der Zellfettsäuren identifiziert. Entweder erfolgte ein direkter Einbau der durch Oxidation entstandenen Fettsäuren, oder die Kettenlänge wurde durch Verlängerung oder Verkürzung um C₂-Einheiten verändert. Beim Wachstum auf Kohlenwasserstoffen mit einer geraden Anzahl an C-Atomen wurden bei aeroben Mikroorganismen, die das Alkan durch Einführung einer endständigen OH-Gruppe aktivieren (Monooxygenase-Reaktion), daher vorwiegend Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen nachgewiesen. Beim Wachstum auf Alkanen mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen überwogen Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen (Rehm und Reiff, 1981).

Aufgrund der Erfahrungen mit aeroben Alkanabbauern wurden auch mit dem sulfatreduzierenden Isolat Hxd3 Fettsäureanalysen durchgeführt. Hier zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den aeroben Alkanverwertern, daß beim Wachstum auf Hexadecan 94 % der analysierten Zellfettsäuren eine ungerade Anzahl an C-Atomen hatten, während bei Wachstum auf Heptadecan 95 % der Zellfettsäuren eine gerade Anzahl an C-Atomen hatten. Bei der Anzucht der Zellen auf langkettigen Fettsäuren oder 1-Alkenen hingegen hatten die Zellfettsäuren bei Substraten mit gerader bzw. ungerader Anzahl an C-Atomen auch hauptsächlich eine gerade bzw. ungerade Anzahl an C-Atomen. Dies wurde als Hinweis darauf gedeutet, daß die Aktivierung von Alkanen in diesem Bakterienstamm anders als bei aeroben Mikroorganismen über eine Verlängerung oder Verkürzung der Kettenlänge um eine C₁-Einheit verläuft. Eine Carbonylierung als initiale Aktivierungsreaktion ist also durchaus vorstellbar, wengleich sie stark endergon (18) wäre (Aeckersberg, 1994).



In der vorliegenden Arbeit wurden den Fettsäureanalysen mit Stamm Hxd3 entsprechende Versuche mit den neuen Isolaten durchgeführt. Dafür wurden die Stämme HdN1 und Pnd3 ausgewählt, da bei diesen beiden Stämmen die verwertbaren Alkane im Kettenlängenbereich um C₁₆ lagen, dem bevorzugten Bereich der eingebauten Zellfettsäuren. Die anderen Isolate TD3 und OcN1 bevorzugten den kürzerkettigen Bereich der Alkane. Beim Wachstum auf kürzerkettigen Alkanen ist die Wahrscheinlichkeit höher, daß die Zellfettsäuren *de novo* synthetisiert werden. Dies wurde bei *Candida lipolytica* gezeigt. Beim Wachstum dieser Hefe auf Undecan bzw. Dodecan dominierte die *de novo* Synthese der Fettsäuren, während beim Wachstum auf Alkanen von C₁₄ - C₁₈ die Zellfettsäuren aus den Oxidationsprodukten dieser Alkane stammten (Britton, 1984).

Sowohl in Stamm HdN1 als auch in Stamm Pnd3 wurde nach dem Wachstum der Zellen auf Fettsäuren oder Alkanen eine Abhängigkeit der Zellfettsäurezusammensetzung von dem jeweiligen Wachstumssubstrat festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde in Stamm HdN1 nach dem Wachstum

auf langkettigen Alkenen keine Abhängigkeit der Zellfettsäurezusammensetzung vom Wachstumssubstrat festgestellt. In beiden Stämmen zeigte sich desweiteren, daß, im Gegensatz zu den mit Stamm Hxd3 erzielten Ergebnissen, sowohl auf Monocarbonsäuren als auch auf Alkanen gewachsene Zellen vorwiegend solche Zellfettsäuren enthielten, die wie das jeweilige Substrat eine gerade oder ungerade Anzahl an C-Atomen in der Kette hatten. Für Stamm HdN1 galt dies sowohl für aerob als auch für anaerob auf Alkanen gewachsene Zellen. Stamm HdN1 zeigte als erstes Bakterienisolat anaerobes Wachstum auf einem langkettigen Phenylalkan mit ausschließlicher Verwertung der aliphatischen Seitenkette. In den Kulturen wurde nach Wachstum auf 1-Phenyltridecan Benzoat nachgewiesen. Bei einer hypothetischen Aktivierungsreaktion über die Verlängerung der aliphatischen Seitenkette um eine C₁-Einheit und anschließendem Abbau über die β -Oxidation wäre Phenylacetat als Endprodukt zu erwarten gewesen. Der Nachweis von Benzoat als Endprodukt ist ein weiterer Hinweis, daß die für Stamm Hxd3 postulierte terminale Verlängerung eines Alkans um eine C₁-Einheit bei der Aktivierung für Stamm HdN1 nicht zutrifft.

Die genannten Befunde könnten bedeuten, daß die Aktivierungsreaktion in den Stämmen HdN1 und Pnd3 verschieden von der in Stamm Hxd3 ist. Allerdings ist Stamm Pnd3 wie Stamm Hxd3 ein sulfatreduzierendes Bakterium und beide sind phylogenetisch relativ eng miteinander verwandt (vgl. C.4.1). Es wäre daher erstaunlich, wenn zwei derart eng verwandte Mikroorganismen mit einem so außergewöhnlichen Stoffwechsellyp wie der anaeroben Alkanoxidation zwei vollkommen verschiedene Aktivierungsmechanismen für ihre Substrate entwickelt hätten. Wollte man auch bei den Stämmen HdN1 und Pnd3 eine Aktivierung der Alkane durch Knüpfung einer neuen C-C-Bindung annehmen und dies mit den Ergebnissen der Fettsäureanalysen in Einklang bringen, so dürfte man keine terminale Addition postulieren, sondern beispielsweise eine Addition der C₁-Einheit am C-2-Atom des Alkans, so daß zunächst α -Methylfettsäuren entstehen würden (Abb. 44).

Der hypothetische Weg der Carbonylierung von Alkanen erfordert, wenn er nach ähnlichen Mechanismen wie die zuvor dargelegten bekannten Carbonylierungsreaktionen (vgl. D.4.2.1) oder als Umkehr der Decarbonylierungsreaktion in biologischen Systemen verlaufen würde, wahrscheinlich ungewöhnliche Enzyme mit besonderen prosthetischen Gruppen oder Coenzymen, wie beispielsweise Coenzym B₁₂. In Zellextrakten der Isolate Hxd3 und TD3 wurde CO-Dehydrogenase-Aktivität gemessen. Da der CO-Dehydrogenase-Weg in diesen Stämmen vermutlich zur vollständigen Oxidation der Substrate verwendet wird, ist der Nachweis von CO-Dehydrogenase-Aktivität nicht ungewöhnlich, zeigt aber, daß CO bereitgestellt werden könnte. Die Untersuchung der denitrifizierenden Neuisolate auf CO-Dehydrogenase-Aktivität oder die Existenz von Corrinoid-Proteinen in alkanverwertenden Zellen dieser Isolate konnte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Da denitrifizierende Bakterien, soweit bekannt, den Citratzyklus für die vollständige Oxidation ihrer Substrate verwenden (Thauer et al., 1989), wäre der Nachweis von CO-Dehydrogenase oder Corrinoid-Proteinen ein erster Hinweis auf die Möglichkeit einer Carbonylierung als Aktivierungsreaktion der anaeroben Alkanoxidation.

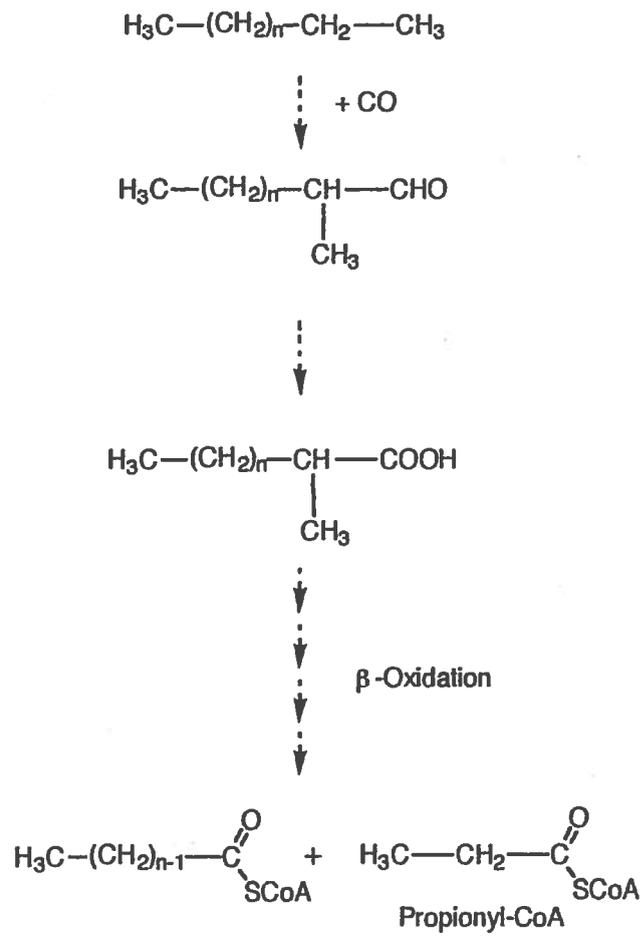


Abb. 44: Hypothetischer Aktivierungsmechanismus durch Addition einer C₁-Einheit am C-2-Atom des Alkans

D.5 Bedeutung des Wachstums von Stamm TD3 sowie von Stamm OcN1 auf Erdöl

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Wachstum einer sulfatreduzierenden Reinkultur mit Erdöl als einziger Quelle organischer Substrate gezeigt (Rueter et al., 1994). Stamm TD3 wuchs unter strikt anoxischen Bedingungen mit verschiedenen Rohölen unter Bildung von bis zu 15 mM Sulfid innerhalb von 3 Wochen. Analysen des Rohöls zeigten, daß während des Wachstums selektiv *n*-Alkane im Kettenlängenbereich der von diesem Stamm verwerteten Reinsubstrate aus dem Öl verwertet wurden. Die aromatische Fraktion des Öls blieb dagegen während des Wachstums unverändert. Dies war der erste Nachweis, daß Kohlenwasserstoffe von einer sulfatreduzierenden Reinkultur direkt aus Rohöl verwertet werden können. Parallele Arbeiten in unserem Labor mit einer mesophilen anaeroben Anreicherungskultur unter sulfatreduzierenden Bedingungen hatten gezeigt, daß bei deren Wachstum auf Erdöl ausschließlich C₁- bis C₄-Alkylbenzole aus dem Öl verbraucht wurden (Rabus, 1995; Rueter et al., 1994). Aus dieser mesophilen Anreicherungskultur wurde eine Reinkultur eines sulfatreduzierenden Bakteriums, Stamm oXyS1, gewonnen, die *ortho*-Xylol verwertete (F. Aeckersberg, pers. Mitteilung). Dieser Stamm wuchs anaerob mit Erdöl als einzigem Substrat, wobei selektiv Toluol, *o*-Xylol und *o*-Ethyltoluol verwertet wurden (Zengler, 1996). Diese Ergebnisse bestätigten die schon zuvor geäußerte Hypothese, daß anaerobe Bakterien direkt auf wesentlichen Bestandteilen von Erdöl wachsen können. Mangels experimenteller Daten war die in Erdölfeldern und Anlagen der Erdölindustrie auftretende Sulfidbildung bislang mit der Verwertung der löslichen Fettsäuren im Lagerstättenwasser oder der bei der Förderung zugesetzten Chemikalien durch sulfatreduzierende Bakterien erklärt oder auf indirekte Prozesse aufgrund aerober mikrobieller Abbauprozesse zurückgeführt worden (vgl. A.6.3.3). Der Nachweis des anaeroben Wachstums von sulfatreduzierenden Bakterien auf Erdöl unter Verwertung von *n*-Alkanen und aromatischen Kohlenwasserstoffen bietet eine gute Erklärungsmöglichkeit für die Sulfidbildung in solchen Erdölfeldern, in die weder Sauerstoff eingetragen noch Chemikalien eingeleitet wurden.

D.5.1 Betrachtungen zur Bedeutung von sulfatreduzierenden Bakterien, die zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl fähig sind

Die Beurteilung der Bedeutung der anaeroben Verwertung von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl durch sulfatreduzierende Bakterien beispielsweise in Erdöllagerstätten bedarf noch eingehender Untersuchungen und divergiert wahrscheinlich je nach untersuchtem Standort. Aufgrund der Hemmung anaerober Prozesse durch Sauerstoff werden aerobe Abbauprozesse beim Zutritt von Luft über das Injektionswasser sicherlich überwiegen. Aus solchen Erdölfeldern wurden bereits zahlreiche Sulfatreduzierer isoliert, die nicht auf Kohlenwasserstoffen, sondern wahrscheinlich auf

unvollständigen Oxidationsprodukten der Aerobier oder der abgestorbenen Zellmasse nach deren Abbau durch gärende Bakterien wachsen. Hingegen sind in ursprünglichen Erdöllagerstätten nur anaerobe Prozesse denkbar, so wie sie von Stamm TD3 und der mesophilen Anreicherung katalysiert werden (Rueter et al., 1994). Das thermophile Isolat TD3 hat sein Wachstumsoptimum bei Temperaturen um 60°C. Durch Vergleich von Ölanalysen wurde gezeigt, daß die festgestellte, wahrscheinlich mikrobielle Veränderung bis zu einer Temperatur in den Lagerstätten von etwa 60°C stattgefunden hat (Connan et al., 1994). Sulfatreduzierende Bakterien wie *Desulfotomaculum* sp. konnten unter simulierten Reservoirbedingungen bei Temperaturen bis zu 80°C und Drücken bis 300 bar weiterhin Sulfatreduktion betreiben. Sporen dieser Bakterien keimten noch nach 20 minütiger Inkubation bei 130°C aus (Rosnes et al., 1991a; Rosnes et al., 1991b). Ferner wurden auch hyperthermophile Archaeobakterien aus dem Formationswasser mehrerer Ölfelder isoliert (Beeder et al., 1994; Stetter et al., 1993). Mit einer Kultur von *Archaeoglobus fulgidus* TF2 aus einem Ölfeld wurde bei Temperaturen von 82°C und 90°C und sehr hohen Drücken von etwa 300 bar und 420 bar eine Zunahme der Zellmasse beobachtet (Stetter et al., 1993). Die sulfatreduzierenden Bakterienisolate *Archaeoglobus fulgidus* und *Thermodesulfobacterium commune* aus einem kontinentalen Erdölfeld zeigten bei *in situ* Temperaturen von 70°C sowohl bei 1 bar als auch bei hohen Drücken von 50 bar und 160 bar gutes Wachstum (L'Haridon et al., 1995). Dies zeigt, daß sulfatreduzierende Bakterien prinzipiell in der Lage sind, unter den extremen Bedingungen in Erdöllagerstätten zu überleben. Organismen wie Stamm TD3 könnten daher durchaus für die beobachtete, wahrscheinlich durch Mikroorganismen verursachte Veränderung von verschiedenen Rohölen in Erdöllagerstätten verantwortlich sein (Connan et al., 1994).

Die Untersuchung unterschiedlicher Standorte mit ihren diversen Bedingungen auf das Vorkommen und die Aktivität von sulfatreduzierenden kohlenwasserstoffverwertenden Bakterien wäre sicherlich eine interessante Arbeit, deren Ergebnisse gerade auch im Hinblick auf die mit der H₂S-Bildung verbundenen Probleme der Erdölindustrie (vgl. A.6.3.5) angewandte Bedeutung hätten. Modellorganismen wie Stamm TD3 könnten dabei für die Entwicklung von artspezifischen Oligonukleotidsonden dienen, mit deren Hilfe *in situ*-Hybridisierungen beispielsweise in Biofilmen in Erdölförderanlagen möglich wären. Auf diese Weise könnte die Bedeutung derartiger Organismen an diesen Standorten überprüft werden.

Wie bereits in Abschnitt A.6.3.1 dargelegt wurde, kann man die Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien daran erkennen, daß der gebildete Schwefelwasserstoff relativ zu Sulfat höhere Anteile des leichteren ³²S-Isotops enthält als durch abiotische Prozesse gebildeter Schwefelwasserstoff. Untersuchungen der Verteilung der Schwefelisotopen in H₂S in verschiedenen Erdöllagerstätten ergaben einen deutlichen Hinweis auf einen biogenen Ursprung des Sulfids hauptsächlich in Lagerstätten mit Temperaturen bis 60°C. Erdöllagerstätten sind häufig eng mit Schwefellagerstätten verknüpft, welche eine wichtige Quelle für die Gewinnung elementaren Schwefels darstellen. Etwa die Hälfte der weltweiten Produktion von etwa 32 Mio.t

pro Jahr stammen aus bioepigenetischen Schwefellagerstätten. Diese entstanden typischerweise an Orten, wo Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder Anhydrit (CaSO_4) über Erdölformationen vorkamen, und an Spalten, in denen Wasser Zutritt zu beidem hatte. Modelle zur Entstehung dieser Schwefellagerstätten gehen von einer mikrobiellen Oxidation von Substanzen aus dem Erdöl aus, gekoppelt mit der Reduktion von Sulfat zu Schwefelwasserstoff. Gips wurde durch den Verbrauch von Sulfat und das entstehende Carbonat zu Calcit (CaCO_3) umgesetzt und der entstehende Schwefelwasserstoff möglicherweise durch Sulfat oder durch Sauerstoff zu elementarem Schwefel oxidiert (Ruckmick et al., 1979). Durch Messung der Schwefelisotopen wurde eine deutliche Anreicherung des leichteren Isotops ^{32}S in diesen bioepigenetischen Schwefellagerstätten, also ein biogener Ursprung des Schwefels, gezeigt. Über die an diesem Prozeß möglicherweise beteiligten Mikroorganismen herrschten bislang allerdings nur sehr vage Vorstellungen. Der in dieser Arbeit isolierte Sulfatreduzierer, Stamm TD3, steht jetzt als ein Modellorganismus zur Verfügung, mit dem das Modell zur Entstehung der bioepigenetischen Schwefellagerstätten mit Kohlenwasserstoffen als organischen Substraten unterstützt werden kann.

Im Zusammenhang mit der anaeroben Verwertung von Rohöl stellt sich die Frage, warum Alkane und aromatische Kohlenwasserstoffe in den meisten Rohölen nach der Lagerung über geologische Zeiträume noch immer in signifikanten Mengen vorhanden sind. Dies liegt wahrscheinlich an den ungünstigen Wachstumsbedingungen in den Lagerstätten. Bakteriellles Wachstum erfolgt nur in einer ausreichenden Wasserphase im Kontakt zum Rohöl. Desweiteren muß eine ausreichende Versorgung mit Sulfat als Elektronenakzeptor gegeben sein. Die gemessenen Sulfatkonzentrationen im Formationswasser sind häufig sehr niedrig und liegen unter 1 mM (Barth, 1991; Belyaev et al., 1991). Die Diffusion von Substanzen im Rohöl ist häufig durch die Adsorption an poröses Gestein eingeschränkt und sie sind daher für einen bakteriellen Angriff weniger gut zugänglich. Außerdem ist zu vermuten, daß viele der seit der Bildung in den Lagerstätten lebenden Mikroorganismen aufgrund mangelnder Substrate (Elektronenakzeptoren) und der sich ändernden Temperaturen über geologische Zeiträume abgestorben sind (Rabus et al., 1996).

D.5.2 Hypothese der unterschiedlichen Zugänglichkeit verschiedener *n*-Alkane im Erdöl

Die Prüfung der weiteren anaeroben, alkanverwertenden Bakterienisolate auf ein Wachstum mit Rohöl ergab, daß Stamm Hxd3 nur sehr langsam unter Bildung von etwa 7 mM Sulfid innerhalb von 3 Monaten wuchs. Bei den Stämmen Pnd3 und HdN1 wurde kein Wachstum festgestellt, obwohl die verwendeten Rohöle nicht toxisch für diese Stämme waren (vgl. C.6.3.1 und C.6.3.2) und ausreichende Mengen an längerkettigen *n*-Alkanen vorhanden waren (siehe Abb. 29 und Abb. 32). Diese drei Bakterienstämme haben gemeinsam, daß sie nur auf längerkettigen *n*-Alkanen

wachsen. Stamm Hxd3 verwertet Alkane mit einer Kettenlänge von C₁₂ - C₂₀, die Stämme Pnd3 und HdN1 benötigen Alkane mit einer Kettenlänge von mindestens C₁₄. Eine Erklärung dafür, daß diese Stämme nicht auf Erdöl wachsen können, wäre, daß die längerkettigen Alkane in einem Substratgemisch wie Erdöl für die Bakterien schwerer zugänglich sind als die kurzkettigen. Mit Stamm Pnd3 wurde beobachtet, daß Hexadecan für die Bakterien in Kulturen mit Erdölszusatz schwerer zugänglich war als ohne Zusatz von Erdöl (vgl. C.6.3.1). Dies könnte neben der postulierten verminderten Zugänglichkeit zum Substrat allerdings auch mit einer toxischen Wirkung des Erdöls auf das Zellwachstum erklärt werden, da die Zellen bei der Verwertung von unlöslichen Substraten auf die direkte Anheftung an das Rohöl angewiesen sind. Bei den Stämmen TD3 und OcN1 konnte allerdings keine derartige Giftigkeit des Rohöls festgestellt werden.

Ein weiteres Indiz für die schlechtere Zugänglichkeit von langkettigen Substanzen in unlöslichen Trägerphasen ergab sich aus Versuchen mit Stamm HdN1. Durch Verdünnung der langkettigen Substrate Hexadecan und 1-Phenyltridecan in HMN war das Wachstum von Stamm HdN1 stark verlangsamt im Vergleich zum Wachstum auf den Reinsubstanzen (vgl. C.6.1.2, C.6.2). Das Wachstum auf den kürzerkettigen unlöslichen Substraten Decanal oder 1-Octanol, die ebenfalls in HMN verdünnt wurden, war demgegenüber relativ schnell.

Die Vermutung, daß Alkane mit kürzeren Kettenlängen als etwa C₁₃ generell für Mikroorganismen in Erdöl leichter zugänglich sind als längerkettige, wird auch durch Experimente mit dem denitrifizierenden Stamm OcN1 unterstützt, der anaerob *n*-Alkane im Bereich von C₈ - C₁₂ verwertet. Dieser Stamm zeigte, wie Stamm TD3, ebenfalls recht gutes Wachstum auf Erdöl. Gaschromatographische Untersuchungen des Erdöls nach Wachstum von Stamm OcN1 ergaben, daß *n*-Alkane von C₈ - C₁₀ fast vollständig verbraucht waren, während Undecan und Dodecan teilweise verschwunden waren. Stamm OcN1 ist das erste denitrifizierende Bakterium, das nachweislich *n*-Alkane unter anoxischen Bedingungen aus Rohöl verwerten kann.

E. Zusammenfassung

1. Aus einer Anreicherung mit Sediment aus dem Guaymas Becken (Golf von Kalifornien) als Inoculum und mit *n*-Decan als Substrat wurde eine Reinkultur eines bislang unbekanntes thermophilen sulfatreduzierenden Bakteriums, Stamm TD3, gewonnen. Dieser Stamm war zur vollständigen Oxidation von *n*-Alkanen der Kettenlängen C₆ - C₁₆ unter strikt anoxischen, moderat thermophilen Bedingungen (60 °C) mit Sulfat als Elektronenakzeptor fähig.

2. Die phylogenetische Einordnung von Stamm TD3 aufgrund der 16S rRNA-Sequenz ergab eine Zugehörigkeit zur δ -Gruppe der Proteobakterien. Es wird vorgeschlagen, dieses neue Bakterienisolat als *Desulfothermus naphthae* gen. nov., sp. nov. zu bezeichnen.

3. Ein neuer Stoffwechsellyp wurde durch zwei Neuisolate denitrifizierender Bakterien, die Stämme HdN1 und OcN1, beschrieben, die durch die anaerobe Oxidation von *n*-Alkanen mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor wuchsen. Unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat verwertete Stamm HdN1 Alkane mit einer Kettenlänge von C₁₄ - C₂₀. Stamm OcN1 wuchs unter anoxischen Bedingungen auf Alkanen mit einer Kettenlänge von C₈ - C₁₂. Eine Bilanzierung der Hexadecanverwertung von Stamm HdN1 unter strikt anoxischen, reduzierenden Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor ergab, daß nach der Inkubation 98 % des in limitierender Menge zugesetzten Hexadecans vollständig oxidiert worden waren; gleichzeitig wurde Nitrat reduziert.

4. Die Sequenzierung der 16S rRNA von Stamm HdN1 ergab eine Einordnung dieses Stammes in die γ -Gruppe der Proteobakterien. Zur Benennung dieses Stammes wird vorgeschlagen, es als *Oleomonas alkani* gen. nov., sp. nov. zu bezeichnen. Der Stamm OcN1 wurde aufgrund seiner 16S rRNA-Sequenz in die β -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet. Es wird vorgeschlagen, diesen Stamm als *Azoarcus petrolei* sp. nov. zu bezeichnen.

5. Alle in dieser Arbeit beschriebenen alkanabbauenden Neuisolate zeigten neben der anaeroben Oxidation von Alkanen ebenfalls gutes Wachstum auf Monocarbonsäuren. Stamm HdN1 wuchs desweiteren auf 1-Alkenen, primären und sekundären Alkoholen und Aldehyden. Stamm OcN1 wuchs auf primären Alkoholen und Aldehyden, jedoch nicht auf 1-Alkenen. Stamm TD3 verwertete weder 1-Alkene noch primäre Alkohole oder Aldehyde. 1-Alkene bewirkten in den Stämmen OcN1 und TD3 eine spezifische Hemmung der anaeroben Alkanverwertung.

6. Beide denitrifizierenden Isolate, die Stämme HdN1 und OcN1, konnten Alkane ebenfalls unter oxischen Bedingungen ohne Nitrat angreifen. Die Kettenlängenspezifität der verwertbaren Alkane unterschied sich bei beiden Isolaten unter oxischen und anoxischen Bedingungen.

7. Induktionsstudien ergaben, daß die Fähigkeit zur anaeroben Alkanoxidation in Stamm OcN1 und vermutlich auch in Stamm HdN1 beim Wachstum auf Monocarbonsäuren nicht exprimiert wurde. Es handelt sich demnach um ein induzierbares Enzymsystem.

8. Die Analyse der Zellfettsäuren von den Stämmen HdN1 und Pnd3 ergab, daß sowohl auf Monocarbonsäuren als auch auf Alkanen gewachsene Zellen vorwiegend solche Zellfettsäuren enthielten, die wie das jeweilige Substrat eine gerade oder ungerade Anzahl an C-Atomen in der Kette hatten. Die bei Stamm Hxd3 gefundenen Hinweise, daß spezifisch nach dem Wachstum auf Alkanen die C-Kette der Zellfettsäuren bezogen auf die Kettenlänge des Wachstumssubstrats terminal um eine C₁-Einheit verändert war, trafen für die Stämme HdN1 und Pnd3 nicht zu.

9. Stamm HdN1 zeigte als erstes Bakterienisolat anaerobes Wachstum auf einem langkettigen Phenylalkan mit ausschließlicher Verwertung der aliphatischen Seitenkette. Der Nachweis von Benzoat als Endprodukt ist ein weiterer Hinweis, daß die für Stamm Hxd3 postulierte terminale Verlängerung eines Alkans um eine C₁-Einheit bei der Aktivierung für Stamm HdN1 nicht zutrifft.

10. Erstmals wurde mit der Reinkultur eines sulfatreduzierenden Bakteriums, Stamm TD3, ein strikt anaerobes Wachstum durch eine Oxidation von *n*-Alkanen aus Erdöl gezeigt. Gaschromatographische Analysen des Rohöls nach Wachstum von Stamm TD3 ergaben, daß ausschließlich solche *n*-Alkane aus dem Öl abgebaut wurden, die von diesem Bakterienisolat auch als Reinsubstanzen in Substrattests verwertet wurden.

11. Der neu isolierte Denitrifizierer, Stamm OcN1, ist das erste Süßwasserisolat, welches *n*-Alkane aus Erdöl unter anoxischen Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor oxidiert. Die gaschromatographische Analyse des Rohöls nach Wachstum von Stamm OcN1 zeigte wiederum, daß spezifisch jene Alkane oxidiert wurden, die auch als Reinsubstanzen unter anoxischen Bedingungen verwertet wurden.

F. Literaturverzeichnis

- Abbott B. J. und L. E. Casida jr. (1968) Oxidation of alkanes to internal monoalkenes by a *Nocardia*. J. Bacteriol. 96: 925-930
- Aeckersberg F. (1989) Anaerober Abbau von Alkanen durch sulfatreduzierende Bakterien. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg
- Aeckersberg F. (1994) Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, ISBN 3-930911-15-9
- X Aeckersberg F., F. Bak und F. Widdel (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. 156: 5-14
- Al-Bashir B., R. Leduc, T. Cseh und R. Samson (1990) Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. Appl. Microbiol. Technol. 34: 414-419
- Altenschmidt U. und 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. I., W. Ludwig und K.-H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169
- Anders H. J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig und 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
- Atlas R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45: 180-209
- Azoulay E., J. Chouteau und G. Davidovics (1963) Isolement et caractérisation des enzymes responsables de l'oxydation des hydrocarbures. Biochim. Biophys. Acta 77: 554-567
- Bak F. und F. Widdel (1986) Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. Arch. Microbiol. 146: 177-180
- 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
- Bazylnski D. A., J. W. Farrington und H. W. Jannasch (1988) Hydrocarbons in surface sediments from a Guaymas Basin hydrothermal vent site. Org. Geochem. 12: 547-558
- Beeder J., R. K. Nilsen, J. T. Rosnes, T. Torsvik und T. Lien (1994) *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot north sea oil field waters. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1227-1231

- Beeder J., T. Torsvik und T. Lien (1995)** *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. Arch. Microbiol. 164: 331-336
- Belyaev S. S., E. P. Rozanova, I. A. Borzenkov, I. A. Charakhch'yan, Y. M. Miller, M. Y. Sokolov und M. V. Ivanov (1991)** Characteristics of microbiological processes in a water-flooded oilfield in the Middle Ob' region. Microbiology p. 754-759 (engl. Übersetzung von Mikrobiologiya, 1982, 51, p. 997-1001)
- Benedix E. H., S. J. Casper, S. Danert, P. Hübsch, K. E. Lindner, M. Schmiedeknecht, R. Schubert und W. Senge (1991)** Viren Bakterien Algen Pilze. Urania Verlag, Leipzig. pp. 311
- Bertrand J. C., P. Caumette, G. Mille, M. Gilewicz und M. Denis (1989)** Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. Sci. Prog., Oxf. 73: 333-350
- Beyer H. und W. Walter (1988)** Lehrbuch der organischen Chemie. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Bissaillon J.-G., F. Lepine, R. Beaudet und M. Sylvestre (1991)** Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2131-2134
- Blanc P. und J. Connan (1993)** Crude oils in reservoirs: the factors influencing their composition. In: M. L. Bordenave (ed.), Applied Petroleum Geochemistry, Editions Technip, Paris, pp. 151-174
- Bonin P., M. Gilewicz und J. C. Bertrand (1992)** Effects of oxygen on *Pseudomonas nautica* growth on *n*-alkane with or without nitrate. Arch. Microbiol. 157: 538-545
- Bradford M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
- Brink D. E., I. Vance und D. C. White (1994)** Detection of *Desulfobacter* in oil field environments by non-radioactive DNA probes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 469-475
- Britton L. N. (1984)** Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: T. D. Gibson (ed.), Microbial degradation of organic compounds, Marcel Dekker, New York Basel, pp. 98-129
- Bryant M. P. (1972)** Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr. 25: 1324-1328
- Bühler M. und J. Schindler (1984)** Aliphatic hydrocarbons. In: K. Kieslich (ed.), Biotechnology, Band 6a, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 329-385
- Canfield D. E., B. B. Jørgensen, H. Fossing, R. Glud, J. Gundersen, N. B. Ramsing, B. Thamdrup, J. W. Hansen, L. P. Nielsen und P. O. J. Hall (1993)** Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. Marine Geol. 113: 27-40

-
- Cartwright C. P., A. H. Rose, J. Calderbank und M. J. H. Keenan (1989)** Solute Transport. In: A. H. Rose und J. S. Harrison (ed.), *The Yeasts*, 2. Edition, Band 3, Academic Press, London, pp. 5-56
- Cashion P., M. A. Holder-Franklin, J. McCully und M. Franklin (1977)** A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* 81: 461-466
- Cassagne C. und D. Darriet (1977)** Evidence of alkane synthesis by the sciatic nerve of the rabbit. *FEBS Letters* 82: 51-54
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy (1984)** Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehydes catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6613-6617
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy (1988)** Microsomal preparation from an animal tissue catalyzes release of carbon monoxide from a fatty aldehyde to generate an alkane. *J. Biol. Chem.* 263: 2738-2743
- Chouteau J., E. Azoulay und J. C. Senez (1962)** Anaerobic formation of *n*-hept-1-ene from *n*-heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature* 194: 576-578
- Christen H. R. und F. Vögtle (1988)** *Organische Chemie. Von den Grundlagen zur Forschung.* Otto Salle Verlag, Verlag Sauerländer, Frankfurt am Main.
- Cline J. D. (1969)** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14: 454-458
- Connan J., D. Dessort und M. Magot (1994)** Advances in our knowledge of alteration of hydrocarbons in reservoirs. Gordon Research Conference, Organic Geochemistry. New Hampshire, pp. 11
- 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 und F. Widdel (1986)** Sulfatreduzierende Bakterien in einem Erdölfeld - Arten und Wachstumsbedingungen. *Erdöl Erdgas Kohle* 102. Jahrgang: 281-289
- Cord-Ruwisch R., W. Kleinitz und F. Widdel (1987a)** Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* Jan, 1987: 97-106
- Cord-Ruwisch R., F. Widdel und W. Kleinitz (1987b)** Sulfate-reducing bacteria in an oilfield - species and growth conditions. In: W. Ernst, J. H. Hohnholz, A. Bittner, K.-H. Jacob und S. v. Wahl (ed.), *Natural Resources and Development*, 26, Georg Hauser, Metzingen, pp. 106-126
- Crabtree R. H. (1985)** The organometallic chemistry of alkanes. *Chem. Rev.* 85: 245-269
- Crueger W. und A. Crueger (1989)** *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie.* R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- Daniels L., G. Fuchs, R. K. Thauer und J. G. Zeikus (1977)** Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 132: 118-126

- Davis J. B. und H. F. Yarbrough** (1966) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. Chem. Geol. 1: 137-144
- De Rosa M., A. Gambacorta, R. Huber, V. Lanzotti, B. Nicolaus, K. O. Stetter und A. Trincone** (1988) J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1300
- DeLaune R. D., G. A. Hambrick und W. H. Patrick** (1980) Degradation of hydrocarbons in oxidized and reduced sediments. Mar. Poll. Bull. 11: 103-106
- Dennis M. und P. E. Kolattukudy** (1992) A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5306-5310
- Dennis M. W. und P. E. Kolattukudy** (1991) Alkane biosynthesis by a decarbonylation of aldehyde catalyzed by a microsomal preparation from *Botryococcus braunii*. Arch. Biochem. Biophys. 287: 268-275
- DeSoete G.** (1983) A least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data. Psychometrika 48: 621-626
- Dolfing J., P. Zeyer, P. Binder-Eicher und R. P. Schwarzenbach** (1990) Isolation and characterisation of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Arch. Microbiol. 154: 336-341
- Domazetis G., B. Tarpey, D. Dolphin und B. R. James** (1980) Catalytic decarbonylation of aldehydes using ruthenium(II) porphyrin systems. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 939-940
- Donaldson E. C., R. M. Knapp, T. F. Yen und G. V. Chilingarian** (1989) The subsurface environment. In: E. C. Donaldson und G. V. Chilingarian (ed.), Microbial Enhanced Oil Recovery, Elsevier, Amsterdam, pp. 15-36
- Dowd P.** (1990) On the mechanism of action of vitamin B₁₂. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebman (ed.), Selective hydrocarbon activation: principles and progress, VCH Publishers, Inc., New York, pp. 265-304
- Einsele A.** (1983) Biomass from higher *n*-alkanes. In: H.-J. Rehm und G. Reed (ed.), Biotechnology, Band 3, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 43-81
- Ekzertsev V. A.** (1960) Production of methane by microorganisms in petroleum deposits. Geochem. 4: 432-442
- Evans P. J., D. T. Mang, K. S. Kim und L. Y. Young** (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1139-1145
- Fardeau M.-L., B. Ollivier, B. K. C. Patel, P. Dwivedi, M. Ragot und J.-L. Garcia** (1995) Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 218-221
- Fieser L. F. und M. Fieser** (1982) Organische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 125
- Finnerty W. R.** (1988) Lipids of *Acinetobacter*. Proceedings of the world conference on biotechnology for the fats and oils industry. Kraft Inc., Glenview/Illinois, pp. 184-188

- Fitz W. und D. Arigoni (1992)** Biosynthesis of 15,16-dimethyltriacontanedioic acid (diabolic acid) from [16-²H₃]- and [14-²H₂]-palmitic acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1533-1534
- Frey P. A. (1990)** Importance of organic radicals in enzymatic cleavage of unactivated C-H bonds. *Chem. Rev.* 90: 1343-1357
- Fries M. R., J. Zhou, J. Chee-Sanford und J. M. Tiedje (1994)** Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2802-2810
- Fulco A. J. (1974)** Metabolic alterations of fatty acids. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 215-241
- Galliker P. K. (1990)** Zur Biosynthese der Etherlipide aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Dissertation. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
- Ganahl P. und W. Kleinitz (1983)** Sulfatreduzierende Bakterien in der Rohölförderung: Auswirkung und betriebliche Maßnahmen. *Erdöl Erdgas Kohle* 99. Jahrgang: 241-251
- Gersberg R. M., W. J. Dawsey und H. F. Ridgway (1989)** Biodegradation of dissolved aromatic hydrocarbons in gasoline-contaminated groundwaters using denitrification. In: E. J. Calabrese und P. T. Kosteki (ed.), *Petroleum Contaminated Soils*, Band 2, Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, pp. 211-218
- Giger W., C. Schaffner und S. G. Wakeham (1980)** Aliphatic and olefinic hydrocarbons in recent sediments of Greifensee, Switzerland. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44: 119-129
- Gilewicz P., G. Monpert, A. Acquaviva, G. Mille und J.-C. Bertrand (1991)** Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 252-256
- Gill C. O. und C. Ratledge (1972)** Toxicity of *n*-alkanes, *n*-alk-1-enes, *n*-alkan-1-ols and *n*-alkyl-1-bromides towards yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 72: 165-172
- Griffin W. M. und R. W. Traxler (1981)** Some aspects of hydrocarbon metabolism by *Pseudomonas*. *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 425-434
- Groh S. E. und M. J. Nelson (1990)** Mechanisms of activation of carbon-hydrogen bonds by metalloenzymes. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebman (ed.), *Selective hydrocarbon activation: principles and progress*, VCH publishers, Inc., New York, pp. 305-378
- Hambrick G. A., R. D. DeLaune und W. H. Patrick (1980)** Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 365-369
- Hamilton W. A. (1985)** Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 195-217
- Hansen R. W. und R. E. Kallio (1957)** Inability of nitrate to serve as a terminal oxidant for hydrocarbons. *Science* 125: 1198-1199

- Henry E. A., R. Devereux, J. S. Maki, C. C. Gilmour, C. R. Woese, L. Mandelco, R. Schauder, C. C. Remsen und R. Mitchell (1994) Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 161: 62-69
- Huber R., P. Stoffers, J. L. Cheminee, H. H. Richnow und K. O. Stetter (1990) Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount. *Nature* 345: 179-182
- Hungate R. E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in microbiology*. Academic Press, New York, pp. 117-132
- Iizuka H., M. Iida und S. Fujita (1969) Formation of *n*-decene-1 from *n*-decane by resting cells of *Candida rugosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 9: 223-226
- Iizuka H., M. Iida, Y. Unami und Y. Hoshino (1968) *n*-Decane dehydrogenation by a cell-free extract of *Candida rugosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 8: 145-149
- Janssen P. H. und B. Schink (1995) Catabolic and anabolic enzyme activities and energetics of acetone metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus biacutus*. *J. Bacteriol.* 177: 277-282
- Jeanthon C., A.-L. Reysenbach, S. L'Haridon, A. Gambacorta, N. R. Pace, P. Glénat und D. Prieur (1995) *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch. Microbiol.* 164: 91-97
- Jobson A. M., F. D. Cook und D. W. S. Westlake (1979) Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chem. Geol.* 24: 355-365
- Jones W. D. (1990) Development of catalytic processes for the synthesis of organic compounds that involve C-H bond activation. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebman (ed.), *Selective Hydrocarbon Activation*, VCH Publishers, New York, pp. 113-148
- Jørgensen B. B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643-645
- Jukes T. H. und C. R. Cantor (1969) Evolution of protein molecules. In: H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, pp. 21-132
- Kawka O. E. und B. R. T. Simoneit (1987) Survey of hydrothermally-generated petroleums from the Guaymas Basin spreading center. *Org. Geochem.* 11: 311-328
- Kolattukudy P. E. (1976) *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
- L'Haridon S., A.-L. Reysenbach, P. Glenat, D. Prieur und C. Jeanthon (1995) Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir. *Nature* 377: 223-224
- Lovley D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55: 259-287
- Macy J. M. und D. G. Kirsch (1989) Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 195-198
- Malmström B. G. (1982) Enzymology of oxygen. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 21-59

-
- Marr I. L., M. S. Cresser und L. J. Ottendorfer (1988)** Umweltanalytik. Eine allgemeine Einführung. Thieme Verlag, Stuttgart.
- McKenna E. J. und R. E. Kallio (1965)** The Biology of Hydrocarbons. Ann. Rev. Microbiol. 19: 183-208
- Mesbah M., U. Premachandran und 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
- Michaelsen M., R. Hulsch, T. Höpner und L. Berthe-Corti (1992)** Hexadecane mineralization in oxygen-controlled sediment-seawater cultivations with autochthonous microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3072-3077
- Mille G., M. Mulyono, T. E. Jammal und J.-C. Bertrand (1988)** Effects of oxygen on hydrocarbon degradation studies *in vitro* in surficial sediments. Estuar. Coast. Shelf Science 27: 283-295
- Muller F. M. (1957)** On methane fermentation of higher alkanes. Ant. van Leeuwenhoek 23: 369-384
- Müller-Hurtig R. und F. Wagner (1990)** Mikrobieller Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen unter umweltrelevanten Aspekten. In: P. Präve, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer und F. Wagner (ed.), Jahrbuch Biotechnologie, Band 3, Carl Hanser Verlag, München, Wien, pp. 337-350
- Muyzer G., E. C. De Waal und A. G. Uitterlinden (1993)** Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700
- Muyzer G., S. Hottenträger, A. Teske und C. Wawer (1995a)** Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: A. D. L. Akkermans, J. D. v. Elsas und F. J. d. Bruijn (ed.), Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, im Druck
- Muyzer G., A. Teske, C. O. Wirsen und H. W. Jannasch (1995b)** 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. im Druck
- Nazina T. N., E. P. Rozanova und S. I. Kuznetsov (1985)** Microbial oil transformation processes accompanied by methane and hydrogen-sulfide formation. Geomicrobiol. J. 4: 103-130
- Nealson K. H. und D. Saffarani (1994)** Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation. Ann. Rev. Microbiol. 48: 311-343

- Nielsen H., J. Pilot, V. A. Grinenko, V. A. Lein, A. Yu, J. W. Smith und R. G. Pankina** (1991) Lithospheric sources of sulphur. In: H. R. Krouse und V. A. Grinenko (ed.), *Stable Isotopes: Natural and Anthropogenic Sulphur in the Environment*, Band 43, John Wiley & Sons, New York, pp. 65-132
- Novelli G. D. und C. E. ZoBell** (1944) Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 47: 447-448
- Nuhn P.** (1990) *Naturstoffchemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart. pp. 307-308
- Odom J. M.** (1993) Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und R. J. Singleton (ed.), *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*, Springer Verlag, Berlin, pp. 189-249
- Oremland R. S.** (1988) Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons, New York, pp. 641-705
- Orr W. L.** (1974) Changes in sulfur content and isotopic ratios of sulfur during petroleum maturation - study of Big Horn basin Paleozoic oils. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* 58: 2295-2318
- Parekh V. R., R. W. Traxler und J. M. Sobeck** (1977) *n*-Alkane oxidation enzymes of a *Pseudomonad*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 881-884
- Petrov A. A.** (1987a) Sources and reactions of petroleum hydrocarbon formation. In: *Petroleum hydrocarbons*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 165-196
- Petrov A. A.** (1987b) Transformations of petroleum hydrocarbons in nature. In: *Petroleum Hydrocarbons*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 197-236
- Pini A.** (1991) Bakterieller Abbau von Xanthan unter strikt anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Platen H., A. Temmes und B. Schink** (1990) Anaerobic degradation of acetone by *Desulfococcus biacutus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 154: 355-361
- Poremba K. und W. Gunkel** (1994) Ölabbauende Bakterien - Leben in hydrophober Umgebung. In: K. Hausmann und B. P. Kremer (ed.), *Extremophile*, VCH, Weinheim, pp. 211-228
- 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. In: *Microbial Control of Pollution*. University Press, Cambridge, pp. 19-34
- Rabus R.** (1995) Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, ISBN 3-930911-89-2
- Rabus R., M. Fukui, H. Wilkes und F. Widdel** (1996) Degradative capacities and whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. Eingereicht

- Rabus R., R. Nordhaus, W. Ludwig und 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. und F. Widdel (1995)** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 96-103
- Radke M., H. Willsch und D. H. Welte (1980)** Preparative hydrocarbon group type determination by automated medium pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.* 52: 406-411
- Ragsdale S. W. (1991)** Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 261-300
- Rainey F. A., M. Dorsch, H. W. Morgan und E. Stackebrandt (1992)** 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: position and implications for the systematics of the order *Spirochaetales*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 197-202
- Rainey F. A. und E. Stackebrandt (1993)** 16S rDNA analysis reveals phylogenetic diversity among the polysaccharolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Lett.* 113: 125-128
- Ramanand K. und J. M. Suflita (1991)** Anaerobic degradation of *m*-cresol in anoxic aquifer slurries: carboxylation reactions in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1689-1695
- Ravot G., M.-L. Fardeau, B. K. C. Patel, G. Prensier, A. Egan, J.-L. Garcia und B. Ollivier (1995)** *Thermotoga elfii* sp. nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 308-314
- Rees G. N., G. S. Grassia, A. J. Sheehy, P. P. Dwivedi und B. K. C. Patel (1995)** *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 85-89
- Rehm H.-J. (1988)** Mikrobiologie und Biochemie der Kohlenwasserstoffe. In: R. Schweisfurth (ed.), *Angewandte Mikrobiologie der Kohlenwasserstoffe in Industrie und Umwelt*, Exper Verlag, Ehningen, pp. 1-16
- Rehm H.-J. und I. Reiff (1981)** Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv. Biochem. Eng.* 19: 175-215
- Reinhold-Hurek B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters und 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
- Rheinheimer G. (1991)** Mikrobiologie der Gewässer. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 213-214
- Roberts D. J., P. M. Fedorak und S. E. Hrudey (1990)** CO₂ incorporation and 4-hydroxy-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of *m*-cresol by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 472-478

- Rosenberg E.** (1992) The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2. Edition, Springer Verlag, New York, pp. 446-459
- Rosenfeld W. D.** (1947) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 54: 664-665
- Rosnes J. T., A. Graue und T. Lien** (1991a) Activity of sulfate-reducing bacteria under simulated reservoir conditions. *SPE Production Engineering* Mai 1991: 217-220
- Rosnes J. T., T. Torsvik und T. Lien** (1991b) Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2303-2307
- Rozanova E. P. und T. N. Nazina** (1982) Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil pools. *Microbiology* 51: 287-293 (engl. Übersetzung von *Mikrobiologiya*)
- Ruckmick J. C., B. H. Wimberly und A. F. Edwards** (1979) Classification and genesis of biogenic sulfur deposits. *Econom. Geol.* 74: 469-474
- Rudolphi A., A. Tschsch und G. Fuchs** (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155: 238-248
- Rueter P., R. Rabus, H. Wilkes, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch und F. Widdel** (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458
- Saillard J.-Y.** (1990) Theoretical aspects of alkane C-H activation by organometallics. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebmann (ed.), *Selective hydrocarbon activation*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 207-239
- Sakakura T. und M. Tanaka** (1987) Efficient catalytic C-H activation of alkanes: regioselective carbonylation of the terminal methyl group of *n*-pentane by $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2$. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 758-759
- Sasser M.** (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Newsletter U. S. Fed. Cul. Coll.* 20: 1-6
- Schauder R., B. Eikmanns und B. Thauer** (1986) Acetate oxidation to CO_2 in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.* 145: 162-172
- Schidlowski M., J. M. Hayes und I. R. Kaplan** (1983) Isotopic inferences of ancient biochemistries: carbon, sulfur, hydrogen and nitrogen. In: J. W. Schopf (ed.), *Earth's Earliest Biosphere*, Princeton University Press, Princeton, pp. 149-186
- Schink B.** (1985) Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 69-77
- Schink B.** (1988) Principles and limits of anaerobic degradation - environmental and technological aspects. In: A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons, New York, pp. 771-846

- Schnell S., F. Bak und 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
- Schnell S. und B. Schink** (1991) Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch. Microbiol. 155: 183-190
- Schocher R. J., B. Seyfried, F. Vazquez und J. Zeyer** (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 157: 7-12
- Schulz-Berendt V.** (1993) Biologische Reinigung ölkontaminierter Böden. Spektrum der Wissenschaft Oktober 1993: 93-97
- Schweizer E.** (1989) Biosynthesis of fatty acids and related compounds. In: Microbial Lipids, Band 2, Academic Press, pp. 3-50
- Schwoerbel J.** (1984) Einführung in die Limnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 68-69
- Senez J. C. und E. Azoulay** (1961) Deshydrogenation d'hydrocarbures paraffiniques par les suspensions non-proliférantes et les extraits de *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta 47: 307-316
- Shelton T. B. und J. H. Hunter** (1975) Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. Journal WPCF 47: 2256-2270
- Simoneit B. R. T. und P. F. Lonsdale** (1982) Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. Nature 295: 198-202
- Spormann A. M. und R. K. Thauer** (1988) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans*. Arch. Microbiol. 150: 374-380
- Stetter K. O.** (1992) The genus *Archaeoglobus*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (ed.), The Prokaryotes, 2. Edition, Band 4, Springer Verlag, New York, pp. 707-711
- Stetter K. O., R. Huber, E. Blöchl, M. Kurr, R. D. Eden, M. Fielder, H. Cash und I. Vance** (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. Nature 365: 743-745
- Swain H. M., H. J. Somerville und J. A. Cole** (1978) Denitrification during growth of *Pseudomonas aeruginosa* on octane. J. Gen. Microbiol. 107: 103-112
- Synowietz C.** (1983) D'Ans-Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 997-1038
- Tanaka A. und S. Fukui** (1989) Metabolism of *n*-alkanes. In: A. H. Rose und J. S. Harrison (ed.), The yeasts, Band 3, Academic Press, London, pp. 261-287
- Thauer R. K.** (1989) Carbonylierungs-Chemie in anaeroben Bakterien. In: P. Präve, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer und F. Wagner (ed.), Jahrbuch Biotechnologie, Band 2, Carl Hanser Verlag, München Wien, pp. 49-64

- Thauer R. K., K. Jungermann und K. Decker (1977)** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 100-180
- Thauer R. K., D. Möller-Zinkhan und A. Spormann (1989)** Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 43: 43-67
- Tissot B. P. und D. H. Welte (1984)** *Petroleum Formation and Occurrence.* Springer Verlag, New York.
- Traxler R. W. und J. M. Bernard (1969)** The utilization of *n*-alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* under conditions of anaerobiosis. I. Preliminary observation. *Int. Biodet. Bull.* 5: 21-25
- Tschech A. und 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
- Updegraff D. M. und G. B. Wren (1954)** The release of oil from petroleum-bearing materials by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 2: 309-322
- Vaz A. H., R. A. Jurenka, G. J. Blomquist und R. C. Reitz (1988)** Tissue and chain length specificity of the fatty acyl-CoA elongation system in the American Cockroach. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 551-557
- Voordouw G., V. Niviere, F. G. Ferris, P. M. Fedorak und 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 und 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
- Voordouw G., J. K. Voordouw, T. R. Jack, J. Foght, P. M. Fedorak und 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., J. K. Voordouw, R. R. Karkhoff-Schweizer, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake (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
- Wagner F., W. Zahn und U. Buhning (1967)** 1-Hexadecene, an intermediate in the microbial oxidation of *n*-hexadecane *in vivo* and *in vitro*. *Angew. Chem. Internat. Edit.* 6: 359-360
- X **Ward D. M. und T. D. Brock (1978)** Anaerobic metabolism of hexadecane in sediments. *Geomicrobiol. J.* 1: 1-9
- X **Widdel F. (1980)** Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation. Universität Göttingen

-
- Widdel F.** (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A. J. B. Zehnder (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*, John Wiley & Sons, New York, pp. 469-585
- Widdel F.** (1990) Mikrobielle Korrosion. In: P. Präve, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer und F. Wagner (ed.), *Jahrbuch Biotechnologie*, Band 3, Carl Hanser Verlag, München, pp. 277-318
- Widdel F.** (1992a) The genus *Desulfotomaculum*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2. Edition, Band 2, Springer Verlag, New York, pp. 1792-1799
- Widdel F.** (1992b) The genus *Thermodesulfobacterium*. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2. Edition, Band 4, Springer Verlag, New York, pp. 3390-3392
- Widdel F. und F. Bak** (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2. Edition, Band 4, Springer Verlag, New York, pp. 3352-3378
- Yoder J. A., D. L. Denlinger, M. W. Dennis und P. E. Kolattukudy** (1992) Enhancement of diapausing flesh fly puparia with additional hydrocarbons and evidence for alkane biosynthesis by a decarbonylation mechanism. *Biochem. Molec. Biol.* 22: 237-243
- Zeikus J. G., G. Fuchs, W. Kenealy und R. K. Thauer** (1977) Oxidoreductase involved in cell carbon synthesis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* 132: 604-613
- Zengler K.** (1996) Anaerobe Oxidation von Xylolen, anderen Alkylbenzolen und Erdöl. Diplomarbeit. Georg-August-Universität Göttingen
- Zeyer J.** (1993) Biologische Sanierung - Illusionen und Realitäten. *Spektrum der Wissenschaft* Oktober 1993: 90-93
- Zhang Y. und R. M. Miller** (1995) Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2247-2251
- ZoBell C. E. und J. F. Prokop** (1966) Microbial oxidation of mineral oils in Barataria Bay bottom deposits. *Z. Allg. Mikrobiol.* 6: 143-162

G. Anhang: Vorschlag zur Beschreibung der Neuisolate

G.1 Description of *Desulfothermus naphthae* gen. nov., sp. nov. (suggested)

Description of *Desulfothermus* gen. nov.

De.sul.fo.ther'mus. L. pref. *de* from; L. n. *sulfur* sulfur; Gr. adj. *thermus* hot; M.L. masc. n. *Desulfothermus* sulfate reducer living in hot places.

Cells forming slightly curved rods that are slowly motile. Strictly anaerobic, sulfate reducing bacteria growing at moderately thermophilic conditions.

Desulfothermus belongs to the delta subgroup of Proteobacteria.

Description of *Desulfothermus naphthae* sp. nov.

naph'thae Gr. fem. *naftha* naphtha, crude oil; M.L. n. *naphthae* meant to indicate the ability to oxidize crude oil

Cells are slightly curved, slowly motile rods, about 2 - 3.5 μm in length and 0.8 - 1 μm in width. Multiplication occurs by binary fission. May grow as individual cells or as compact clumps. Cells tend to stick at hydrophobic surfaces.

Obligately chemotrophic and strictly anaerobic. Grows chemoheterotrophically by using *n*-alkanes from C₆ to C₁₆ or monocarboxylic acids from C₄ to C₁₈. Sulfate and thiosulfate are used as electron acceptors.

Optimum pH, 6.5 - 6.8. Optimum growth temperature, 60 - 65 °C. The G+C content of the DNA is 37.4 mol%.

Habitat: Type strain was isolated from sediment of Guaymas Basin / Gulf of California.

G.2 Description of *Oleomonas alkani* gen. nov., sp. nov. (suggested)

Description of *Oleomonas* gen. nov.

O.le.o'mo.nas L. n. *oleum* oil; Gr. fem. n. *monas* unit, monad, cell; M.L. fem. n. *oleomonas* oil utilizing cell.

Rod-shaped motile cells. Facultatively anaerobic bacteria; nitrate can be used as electron acceptor. Catalase positive. Accumulate storage compounds, probably long chain carbon compounds. Cells do not contain poly- β -hydroxyalkanoates.

Oleomonas belongs to the gamma subdivision of Proteobacteria.

Description of *Oleomonas alkani* sp. nov.

al.ka.ni L. n. *alkanum* alkane; M.L. n. *alkani* because the organism was isolated with *n*-alkanes as sole electron donors and carbon sources.

Cells are rod-shaped, about 1.5 - 2.5 μm in length and 0.5 μm in width. Cells are motile. May grow as individual cells or as compact clumps.

Obligately chemotrophic and facultatively anaerobic. No vitamins are required. Molecular oxygen, nitrate, nitrite and dinitrogen oxide are used as electron acceptors. Cells are catalase positive. Anaerobic growth with nitrate as electron acceptor was observed on *n*-alkanes from C₁₄ to C₂₀, 1-alkenes, 1-phenyl-tridecane, primary and secondary alcohols, aldehydes, monocarboxylic acids and pyruvate.

Optimum pH, 6.8 - 7.2. Optimum growth temperature, 28 - 30°C. The G+C content of the DNA is 53.8 mol%.

Habitat: Type strain was isolated from a municipal sewage plant (Lintel / region of Bremen).

G.3 Description of *Azoarcus petrolei* sp. nov. (suggested)

pe'tro.le.i Gr. n. *petreleo* petroleum, crude oil; M.L. n. *petrolei* indicating that the organism is able to grow on crude oil

Cells are curved, highly motile rods, about 1 - 2 μm in length and 0.5 μm in width. May grow as individual cells or as compact clumps. Cells tend to stick at hydrophobic surfaces.

Obligately chemotrophic and facultatively anaerobic. Molecular oxygen, nitrate, nitrite and dinitrogen oxide are used as electron acceptors. Cells are catalase positive. Anaerobic growth with nitrate as electron acceptor was observed on *n*-alkanes from C₈ to C₁₂, primary alcohols, aldehydes and monocarboxylic acids. In addition, growth occurs with lactate, pyruvate, fumarate and malate under anoxic conditions in the presence of nitrate.

Optimum pH, 7.2 - 7.8. Optimum growth temperature, 30 - 32°C. The G+C content of the DNA is 63.1 mol%.

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

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. F. Widdel einerseits für die Überlassung des interessanten Themas, das rege Interesse und die häufig tatkräftige Hilfe im Verlauf der Arbeit bedanken, zum anderen aber ganz besonders für sein Verständnis für die spezielle Situation gegen Ende dieser Arbeit, so daß mir eine Beendigung der Dissertation möglich war.

Ich danke meinen Eltern dafür, daß sie mich stets meinen eigenen Weg gehen ließen und mich dabei auch in schwierigen Situationen immer ermuntert und unterstützt haben.

Meinem Mann Armin danke ich für zahlreiche fachliche Tips und Hilfen, für seinen Beistand beim Umgang mit "Kollege Computer", fürs Korrekturlesen dieser Arbeit, aber vor allem für die "Wissenschaftsbegeisterung", die mir oft über die unvermeidlichen "Labor-Tiefs" hinweggeholfen hat.

Bei meinem Vorgänger auf dem "Alkanthema", Dr. Frank Aeckersberg, möchte ich mich für die vielen wertvollen Vorarbeiten bedanken, durch die ich so gut weiterarbeiten konnte. Dr. J. Harder danke ich für die Überlassung einer denitrifizierenden Anreicherungskultur. Meiner Nachfolgerin Astrid Behrends wünsche ich ein "geschicktes Händchen", damit unsere "Kleinen" weiterhin gut gedeihen, ... und vielleicht kommen ja noch ein paar neue dazu!

Dr. Fred Rainey von der DSM in Braunschweig danke ich für die prompte Sequenzierung der 16S rRNA der neuen Isolate.

Bei Herrn Dr. H. Wilkes von der KFA in Jülich bedanke ich mich für die sorgfältige Durchführung der Erdölanalysen.

Dr. A. Steinbüchel von der Universität in Göttingen gilt mein Dank für die Untersuchungen zu den Speicherstoffen von Stamm HdN1.

Cathrin Wawer danke ich für die Durchführung der DGGE-Analyse und für zahlreiche "zwischen doktorandliche" Plaudereien.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, die für eine gute Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre gesorgt haben. Besonders Christina Probian wünsche ich weiterhin genügend "Schlagkraft", um sich gegen kommende Generationen durchzusetzen ...

Nicht zuletzt gebührt Klein-Tanja ein großes "Dankeschön" - obwohl ihr eine große Flasche Milch sicher lieber wäre!, - für die vielen Stunden am Computer, die sie (meistens) mehr oder (manchmal) weniger geduldig mit mir verbracht hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Petra Ehrenreich, geb. Rueter
Geburtstag: 8. September 1965
Geburtsort: Manila (Philippinen)
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter (geb. 10.10.1995)
Eltern: Ingrid Rueter, geb. Gastmann und
Hans-Jörg Rueter

Ausbildung:

1971-1973 Grundschule in Bredenbeck (bei Hannover)
1973-1975 Grundschule in Neubrichhausen (bei Syke)
1975-1976 Orientierungsstufe Syke
1976-1977 Orientierungsstufe Ganderkesee
1977-1984 Gymnasium Ganderkesee
19.06.1984 Abitur
1984-1985 Höhere Handelsschule Delmenhorst
1985-1987 Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Deutsche Bank AG,
Filialen Bremen und Delmenhorst
1987-1992 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
10.12.1992 Diplom
01.93-04.93 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte an der Universität Osnabrück
05.93-06.96 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut
für marine Mikrobiologie, Bremen, unter der Leitung von Herrn
Professor Dr. F. Widdel