

**Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl
durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

am Fachbereich für Biologie / Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
RALF RABUS
aus München

1995

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter Anleitung von Professor Dr. F. Widdel in der Zeit von Oktober 1992 bis Dezember 1994 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 1995

Erstgutachter: Prof. Dr. F. Widdel

Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Fischer

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Rabus, Ralf:

Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch
nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien / Ralf

Rabus. - Aachen : Mainz, 1995

Zugl. : Bremen, Universität, Diss., 1995

ISBN 3-930911-89-2

1. Auflage 1995

© Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen
Herstellung: Fotodruck Mainz GmbH
Süsterfeldstr. 83, 52072 Aachen
Tel. 0241/87 34 34

ISBN 3-930911-89-2

Für meinen Vater

"Liebe Seele, trachte nicht nach dem ewigen
Leben, sondern schöpfe das Mögliche aus."

PINDAR, *Dritte Phytische Ode*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
A Einleitung	1
1. Vorkommen und Eigenschaften von Alkylbenzolen	1
2. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Gegenwart von Sauerstoff	5
3. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Abwesenheit von Sauerstoff	6
3.1. Aktivierungsreaktionen an polaren aromatischen Verbindungen	8
3.2. Kenntnisstand zum Mechanismus der anaeroben Oxidation von Toluol	10
3.3. Abbau von Benzoyl-CoA zu zentralen Metaboliten	12
4. Bedeutung der anaeroben Verwertung von Erdöl durch sulfatreduzierende Bakterien	15
4.1. Bedeutung des anaeroben Alkylbenzolabbaus für Erdöllagerstätten und die Erdölindustrie	15
4.2. Entstehung von Schwefellagerstätten	21
5. Bedeutung der anaeroben Verwertung von Erdöl durch nitratreduzierende Bakterien	21
6. Zielsetzung der Arbeit	23
B Material und Methoden	24
1. Chemikalien und Gase	24
2. Mikrobiologische Methoden	24
2.1. Probenmaterial und Organismen	24
2.2. Nährmedien	25
2.2.1. Herstellung von Stammlösungen für Grundmedien	25
2.2.2. Herstellung von Grundmedien	28
2.2.3. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen	30
2.2.4. Sonstige Zusätze	35
2.3. Anreicherung und Isolierung von Bakterien	37

2.4.	Kultivierungsmethoden und Gewinnung von Zellmasse	39
2.4.1.	Stammkulturen	39
2.4.2.	Wachstumsversuche	39
2.4.3.	Bilanzierung der anaeroben Ethylbenzoxidation und Bestimmung von anderen Wachstumsparametern	40
2.4.4.	Anaerobe Wachstumsversuche mit Rohöl	41
2.4.5.	Massenanzuchten	43
2.5.	Zellsuspensionsversuche	45
3.	Analytische Methoden	46
3.1.	Qualitativer Schnellnachweis von Schwefelwasserstoff	46
3.2.	Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff	47
3.3.	Bestimmung von Nitrat und Nitrit durch Ionenchromatographie	48
3.4.	Photometrische Bestimmung von Ammonium	49
3.5.	Bestimmung von Distickstoffoxid durch Gaschromatographie	49
3.6.	Bestimmung von aromatischen Verbindungen mit Reversed-Phase-Chromatographie	50
3.7.	Photometrische Bestimmung von Ethylbenzol	51
3.8.	Bestimmung von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Rohöl	51
3.8.1.	Fraktionierung von Rohöl mit Medium-Pressure-Liquid-Chromatographie	51
3.8.2.	Bestimmung von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie	53
3.9.	Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA	53
4.	Biochemische Methoden	54
4.1.	Proteinbestimmung nach Bradford	54
4.2.	Herstellung von Rohextrakten unter anoxischen Bedingungen	54
4.3.	Bestimmung von Enzymaktivitäten unter anoxischen Bedingungen	55
4.4.	2-Dimensionale Gelelektrophorese	56
4.4.1.	Stammlösungen	57
4.4.2.	Probenaufbereitung	58
4.4.3.	Proteintrennung in der ersten Dimension	59
4.4.4.	Proteintrennung in der zweiten Dimension	61
4.4.5.	Silberfärbung	63
5.	Molekularbiologische Methoden	63
5.1.	Bestimmung der 16S rDNA Sequenz	63
5.2.	<i>In situ</i> -Hybridisierung	64

5.2.1. Fixierung von Bakterienzellen	64
5.2.2. <i>In situ</i> -Hybridisierung mit fluoreszierenden Oligonukleotidsonden	66
5.2.3. Fluoreszenzmikroskopie	67
C Ergebnisse	68
Teil I - Untersuchungen zum anaeroben Toluolabbau von <i>Desulfobacula toluolica</i> Stamm Tol2	68
1. Bestimmung von Spurenelement- und Vitaminabhängigkeit	68
2. Spezifische Hemmung der Toluoloxidation durch Benzylalkohol	69
3. Inhibitoren der anaeroben Toluoloxidation in Stamm Tol2	72
4. Bestimmung von Dead-End-Metaboliten in Zellsuspensionen	74
5. Nachweis induzierbarer Proteine mit 2-dimensionaler Gelelektrophorese	79
Teil II - Anaerober Abbau von Ethylbenzol und Propylbenzol durch neue denitrifizierende Bakterien	82
1. Anreicherung und Isolierung von Alkylbenzol abbauenden nitrat-reduzierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen	82
2. Phylogenetische Verwandtschaft der Neuisolate mit <i>Thauera selenatis</i> und <i>Azoarcus</i> spp.	83
3. Morphologische, physiologische und andere Eigenschaften der Neuisolate	85
4. Bilanzierung des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und Bestimmung des Wachstumsertrags von Stamm EbN1	89
5. Messung des Abbaus verschiedener aromatischer Substrate in Zellsuspensionen von Stamm EbN1	92
6. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm EbN1	95
7. Hemmung des Wachstums von Stamm mXyN1 auf Toluol und <i>m</i> -Xylol durch aromatische Alkohole	96
8. Aerobe Wachstumsexperimente	96
9. Wachstum auf Rohöl	98

Teil III - Anaerobe Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch eine Anreicherung sulfatreduzierender Bakterien	104
1. Anreicherung von marinen, mesophilen sulfatreduzierenden Bakterien auf Rohöl	104
2. Wachstumsversuche mit Rohöl als einzigem organischen Substrat	105
3. Zählung von sulfatreduzierenden Bakterien	107
4. Analyse von Rohöl aus den Wachstumsversuchen	109
5. Einsatz von fluoreszierenden Oligonukleotidsonden	116
5.1. Herstellung und Überprüfung einer spezifischen Sonde für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer	117
5.2. <i>In situ</i> -Hybridisierung der ölabbauenden β 4-Anreicherung	126
6. Isolierung von <i>o</i> -Xylol abbauenden sulfatreduzierenden Bakterien aus der ölabbauenden β 4-Anreicherung	128
D Diskussion	130
1. Nachweis des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und anderen Alkylbenzolen durch neue nitratreduzierende Bakterien	130
2. Taxonomische Einordnung der neu isolierten Nitratreduzierer	132
3. Nachweis des anaeroben Abbaus von <i>o</i> -Xylol durch den sulfatreduzierenden Stamm oXyS1	132
4. Betrachtungen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen	133
4.1. Anaerobe Oxidation von Toluol im sulfatreduzierenden Stamm Tol2	136
4.2. Anaerobe Oxidation von Ethylbenzol und Propylbenzol in den nitratreduzierenden Stämmen EbN1 und PbN1	142
5. Bedeutung der Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch sulfatreduzierende und nitratreduzierende Bakterien	146
E Zusammenfassung	150
F Literaturverzeichnis	153
G Anhang	166

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylole
CCD	charge-coupled-device
cm	Centimeter
d	Tag
DAB	Deutsches Arzneimittelbuch
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
2D-Gelelektrophorese	2-Dimensionale Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EbN1	auf Ethylbenzol isoliertes nitratreduzierendes Bakterium
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Gramm
GC	Gaschromatograph(ie)
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mol	Mole
MPa	Mega Pascal
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatographie
MS	Massenspektromet(er)(ie)
mXyN1	auf <i>m</i> -Xylol isoliertes nitratreduzierendes Bakterium
N	Normal

NAD(P)	oxidiertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid(-phosphat)
OD	optische Dichte
PbN1	auf Propylbenzol isoliertes nitratreduzierendes Bakterium
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
ppm	parts per million
psi	Pounds per square inch
rDNA	DNA-Bereiche, die für die ribosomale Ribonucleinsäure kodieren
rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tol2	<i>Desulfobacula toluolica</i> : ein Toluol oxidierendes sulfat-reduzierendes Bakterium
ToN1	auf Toluol isoliertes nitratreduzierendes Bakterium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS	Visuelles Licht
Vol	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent, bezogen auf Volumen
w/w	Gewichtsprozent

A Einleitung

Das Interesse am anaeroben, mikrobiellen Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen hat in den letzten Jahren aus verschiedenen Gründen stark zugenommen. Erstens sind aromatische Kohlenwasserstoffe giftige Substanzen, die durch menschliche Aktivitäten in der Natur zunehmend verbreitet werden. Durch Kontamination z.B. von anoxischen Grundwasserleitern mit diesen Substanzen entsteht an manchen Orten bereits eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit. Demzufolge gewinnt die Einschätzung der anaeroben mikrobiellen Abbaubarkeit von aromatischen Kohlenwasserstoffen als chemische Produkte bzw. als Komponenten von Rohöl immer mehr an Bedeutung. Zweitens sind viele grundlegende Fragen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung dieser reaktionsträgen aromatischen Verbindungen und zur möglichen Vielfalt anaerober Bakterien mit der Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Alkylbenzole noch nicht beantwortet, da der mikrobielle Abbau solcher Substanzen unter anoxischen Bedingungen erst seit wenigen Jahren bekannt ist. Drittens käme einem anaeroben Abbau von Alkylbenzolen als Erdölbestandteilen durch sulfatreduzierende Bakterien in Ölförderanlagen eine angewandte Bedeutung zu. Die Bildung von Schwefelwasserstoff in Ölfeldern durch sulfatreduzierende Bakterien kann zur Korrosion von Eisen und Stahl in Ölförderanlagen und zur Kontamination von Erdöl und Erdgas (Souring) im Zuge der sekundären Erdölförderung beitragen. Viertens hätte die Aktivität von Alkylbenzol verwertenden Sulfatreduzierern in Ölfeldern auch einen geologischen Aspekt, denn die Bildung von Schwefelwasserstoff könnte zur Bildung von Schwefellagerstätten an Erdölreservoirs beitragen.

1. Vorkommen und Eigenschaften von Alkylbenzolen

Vorkommen und Herkunft in der Umwelt

Aromatische Verbindungen sind als wichtige Bestandteile aller lebenden Organismen in der Natur weit verbreitet. So ist der Benzolring neben dem Glucosylrest in der Natur die dominante chemische Struktur (Smith 1994). In der pflanzlichen Biomasseproduktion ($1,3 \cdot 10^{17}$ g Kohlenstoff pro Jahr; Böger 1975) beträgt der Anteil der aromatischen Verbindungen 30-40 %,

größtenteils in Form von polymerem Lignin (Schink et al. 1992). Andere aromatische Verbindungen sind einige Aminosäuren und Produkte des pflanzlichen und mikrobiellen Sekundärstoffwechsels. Aromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. Toluol können zwar in geringen Mengen in anaeroben Habitaten durch Transformationsreaktionen von aromatischen Ligninderivaten (Grbic-Galic 1986) oder von aromatischen Aminosäuren (Jüttner und Henatsch 1986) entstehen, zum überwiegenden Teil gelangen sie jedoch als chemische Produkte oder Erdölbestandteile durch anthropogene Aktivitäten in die Umwelt.

Die aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole werden gewöhnlich unter der Abkürzung BTEX zusammengefaßt; Toluol, Ethylbenzol und die Xylole werden auch als Alkylbenzole bezeichnet. BTEX sind vor allem wegen ihrer großen industriellen Bedeutung und ihrer toxikologischen Eigenschaften bekannt. Die wichtigsten organischen Rohstoffquellen zur Gewinnung von BTEX sind Kohle und Erdöl (Morrison und Boyd 1986). Der Anteil der einzelnen aromatischen Kohlenwasserstoffe im Rohöl kann maximale Werte von 1,8 % (w/w) für Toluol, 1,6 % (w/w) für Ethylbenzol und 1,0 % (w/w) für *m*-Xylol bzw. Benzol erreichen (Hunt 1979). Als häufig verwendete Lösungsmittel und Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von organischen Syntheseprodukten werden BTEX weltweit in großem Maßstab produziert; nämlich ca. $15 \cdot 10^6$ t Benzol, ca. $5 \cdot 10^6$ t Toluol, ca. $13 \cdot 10^6$ t Ethylbenzol und ca. $7 \cdot 10^6$ t Xylole (Koch und Wagner 1989). Damit gehören die BTEX-Substanzen zu den 50 industriell am meisten produzierten Chemikalien (Fishbein 1985).

Die zunehmend globale Kontamination von Luft, Boden und Wasser mit BTEX neben anderen Kohlenwasserstoffen beruht auf unterschiedlichen anthropogenen Aktivitäten. Untersuchungen der Atmosphäre über Florida (USA) und Sydney (Australien) zeigten, daß die Verbrennung fossiler Energieträger insbesondere beim Automobilverkehr wesentlich zur Belastung der Luft mit BTEX beitrug (Lonneman et al. 1978, Nelson und Quigley 1982). Rohöl und Rohölprodukte werden weltweit in großem Maßstab transportiert und gelagert. Als Folge von Transportunfällen und Undichtigkeiten in Pipelines und Lagertanks gelangt Öl in die Umwelt. So wurden 1972 in Westeuropa von den insgesamt $433 \cdot 10^6$ m³ in Pipelines transportierten Öls 2720 m³ freigesetzt (Vanlooche et al. 1975). Eine Studie der amerikanischen Umweltbehörde zeigte, daß ca. 35 % der 796.000 unterirdischen Treibstofftanks in den USA undicht waren und demzufolge Böden mit Kohlenwasserstoffen kontaminiert wurden (U.S. Environmental Protection Agency 1986). Aufgrund einer gewissen Wasserlöslichkeit können BTEX aus solchen ölverschmutzten Böden ins Grundwasser transportiert werden (Koch und Wagner 1989). Die Tatsache, daß beispielsweise in den USA 50 % des Trinkwassers aus Grundwasserleitern stammt (Pye und Patrick 1983), verdeutlicht das Gefahrenpotential im Falle einer Grundwasserverschmutzung durch BTEX. Meere werden regional durch Havarien großer Tanker mit Öl verschmutzt. Nachdem der Supertanker *Amoco Cadiz* im März 1978 vor der Küste Alaskas auf Grund gelaufen war, floß die gesamte Ölfracht

von 223.000 metrischen Tonnen ins Meer (Gundlach et al. 1983). Bei Untersuchungen von Meerwasser vor der Küste Perus, im Golf von Mexiko und vor Vineyard (Massachusetts, USA) wurden BTEX in niedrigen bis toxikologisch relevanten Konzentrationen von ca. 50 ng/l festgestellt. Hauptquellen für einen weiteren Eintrag der BTEX in das Meerwasser waren je nach Standort der Zulauf aus Flüssen oder der Gasaustausch mit der Atmosphäre (Gschwend et al. 1980 und 1982, Mantoura et al. 1982, Sauer 1980). Bei rezenten marinen Ölbildungsstätten, z.B. im Guaymas Basin (Golf von Kalifornien, Mexiko), kommt es zu einer natürlichen Freisetzung von Rohöl (Bazylnski et al. 1988, Simoneit und Lonsdale 1982).

Toxikologische Bedeutung

Alle BTEX-Substanzen können über die Atemwege, die Haut und den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Aufgrund ihres lipophilen Charakters können sich die BTEX-Substanzen in Lipiden und Fetten des Körpers anreichern und damit chronische Erkrankungen hervorrufen. Benzol führt zu einer Schädigung des blutbildenden Systems, insbesondere des Knochenmarks und des Kapillarsystems, und wird als carcinogene Substanz mit der Entstehung von Leukämie in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus belegen Untersuchungen, die *in vitro* und *in vivo* eine Interaktion von Metaboliten der Benzoltransformation mit der DNA zeigten, daß Benzol potentiell mutagen ist. Für die anderen BTEX-Substanzen konnte bislang keine experimentelle Evidenz für eine mutagene Wirkung erbracht werden. Toluol, Ethylbenzol und die Xylole können allgemein das zentrale Nervensystem schädigen, wobei die neurotoxische Wirkung bei den Xylole am stärksten ist. In hohen Konzentrationen wirken Toluol und die Xylole schädigend auf das blutbildende System und die inneren Organe (Dean 1985, Fishbein 1985, Koch und Wagner 1989).

Chemische Eigenschaften

Aromatische Kohlenwasserstoffe gehören neben den Alkanen zu den reaktionsträgsten chemischen Verbindungen. Das chemische Verhalten von Alkylbenzolen wird wesentlich durch die Stabilität des aromatischen Systems bestimmt. Diese Stabilität beruht auf der planar-trigonalen Anordnung der sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome und der Aufnahme der 6 π -Elektronen in die cyclisch-delokalisierten π -Molekülorbitale des Benzolringes (Sykes 1988). Aliphatische Seitenketten beeinflussen die Reaktivität aromatischer Verbindungen, und zwar die Reaktionen an der Seitenkette selbst und die Orientierung von Reaktionen am Ring. Aufgrund des induktiven Effekts der aliphatischen Seitenkette entstehen am Alkylbenzol Dipolmomente. So besitzt die Methylgruppe des Toluols relativ zum aromatischen Ring ein positives Dipolmoment (March 1985). Dieses Dipolmoment ist zwar wesentlich schwächer als

bei polaren aromatischen Verbindungen, bewirkt jedoch, daß Toluol reaktiver als Benzol ist. Häufig verlaufen Reaktionen an der Seitenkette der Alkylbenzole über Benzylradikale oder Benzylkationen. Stabilisiert werden sowohl Radikal als auch Kation durch Ausweitung des konjugativen Effekts des aromatischen Systems auf das Benzyl-Kohlenstoffatom der Seitenkette (Morrison und Boyd 1986). Durch Hyperkonjugation können die aliphatischen Seitenketten den konjugativen Effekt des aromatischen Systems erweitern (Sykes 1988) und damit Reaktionen an der Seitenkette, die über ein Carbanion verlaufen, begünstigen. Aufgrund der hohen Ladungsdichte im aromatischen System sind die häufigsten Reaktionen am aromatischen Ring elektrophile Substitutionen. Als Erstsustituenten steuern dabei die induktiv schiebenden Seitenketten der Alkylbenzole die Zweitsubstitution in *ortho* und *para* Richtung. Das quantitative Verhältnis von *ortho*- zu *para*-substituierten Produkten ist dabei abhängig von der sterischen Beeinflussung durch die Seitenkette und damit von deren Größe (Sykes 1988).

Untersuchungen zur oxidativen Substitution von Toluol mit den starken ein- bzw. zwei-Elektronen übertragenden Oxidationsmitteln Co(III)-Trifluoracetat bzw. Pb(IV)-Trifluoracetat zeigten, daß die oxidative Substitution in Abhängigkeit vom beteiligten Metallion entweder über einen Elektronen-Transfer Mechanismus an der Methylgruppe oder über einen elektrophilen Mechanismus am Ring verläuft (Kochi et al. 1973, Schlesener et al. 1984). Im ersten Mechanismus wird zunächst ein Arylkationradikal durch einen Elektronen-Transfer von Toluol auf Co(III) gebildet. Durch Deprotonierung der Methylgruppe entsteht dann ein Benzylradikal. Das Benzylradikal reagiert schließlich mit der nukleophilen Trifluoressigsäure unter Bildung eines Esters (Abb. 1A). Beim nicht-radikalischen, zweiten Mechanismus verläuft die Initialreaktion über eine elektrophile Addition des stark elektrophilen Pb(IV)-Metallions an den aromatischen Ring bevorzugt in *para*-Position zur Methylgruppe. Anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff von Trifluoressigsäure und einer reduktiven Eliminierung des reduzierten Metallions (Abb. 1B).

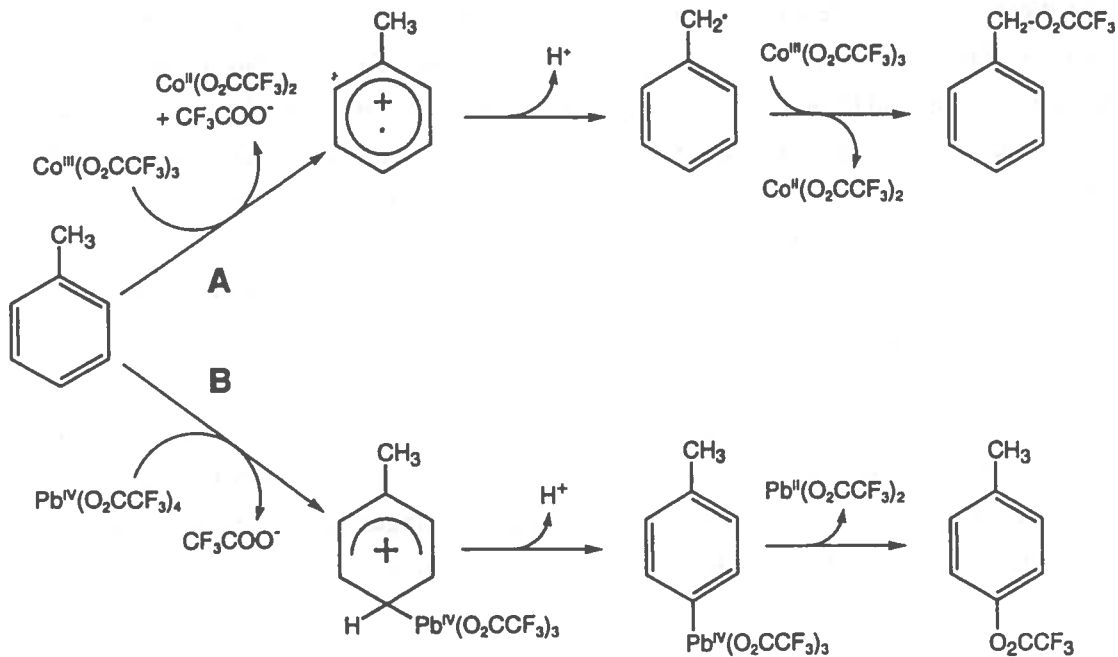


Abb. 1: Oxidative Substitution von Toluol mit Trifluoressigsäure. In Gegenwart von Co(III) erfolgt die oxidative Substitution an der Methylgruppe (A). Dagegen erfolgt die Substitution unter Beteiligung von Pb(IV) in *para*-Position am Ring (B).

2. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Gegenwart von Sauerstoff

Schlüsselenzyme aerober Mikroorganismen für Aktivierungs- und Spaltungsreaktionen an aromatischen Verbindungen sind Mono- und Dioxygenasen. Bei den Oxygenasen dient molekularer Sauerstoff als Co-Substrat. Die zentrale Rolle des molekularen Sauerstoffs im aeroben Aromatenabbau wurde bereits in den 50er und 60er Jahren von R. Stanier und S. Dagley erkannt (Schink et al. 1992).

Monoxygenasen inkorporieren eine Hydroxyl-Gruppe in das aromatische Substrat. Da dabei die beiden Atome des molekularen Sauerstoffs unter gleichzeitiger Oxidation von NAD(P)H zu einer Hydroxyl-Gruppe und einem H_2O Molekül reduziert werden, bezeichnet man die Monoxygenasen auch als mischfunktionelle Oxygenasen. Monoxygenasen dienen auch zur Aktivierung von aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Dioxygenasen inkorporieren dagegen beide Atome des molekularen Sauerstoffs in das aromatische Substrat. Es gibt zwei Typen von Dioxygenasen. Die ringaktivierenden Dioxygenasen führen mit Hilfe von molekularem Sauerstoff und NAD(P)H zwei Hydroxyl-Gruppen in den aromatischen Ring ein.

Auf diese Weise entstehen die zentralen Intermediate Brenzkatechin, Protocatechuat und Gentisat. Die ringspaltenden Dioxygenasen fügen zwei Sauerstoffatome in die zentralen Intermediate ein und öffnen so die aromatischen Ringe durch Intradiol- bzw. Extradiolspaltung. Durch weiteren Abbau der Spaltungsprodukte werden schließlich zentrale Metabolite des Intermediärstoffwechsels gebildet (Gottschalk 1988, Harayama et al. 1992, Smith 1994).

Im aeroben Alkylbenzol-Abbau können sowohl Mono- als auch Dioxygenasen die Startreaktionen durchführen. Die auf dem TOL-Plasmid von *Pseudomonas putida* kodierte Xylol-Monooxygenase oxidiert Toluol und die Xylole zu Benzylalkohol bzw. Methylbenzylalkoholen (Smith 1994); in *Pseudomonas fluorescens* wird Ethylbenzol zu 2-Phenylethanol oxidiert (Corkery et al. 1994, Utkin et al. 1991). In *Pseudomonas* sp. NCIB 10643 dagegen verläuft die Startreaktion im aeroben Abbau von *n*-Alkylbenzolen (C₂-C₇) nicht über einen Angriff an der Seitenkette, sondern über eine ringaktivierende Dioxygenaseaktivität zu den entsprechenden 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxyalkylbenzolen (Smith and Ratledge 1989).

3. Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Abwesenheit von Sauerstoff

Der Beitrag anaerober Mikroorganismen zur Remineralisierung organischer Substanzen im globalen Kohlenstoffkreislauf wurde bislang unterschätzt. In küstennahen marinen Sedimenten mit hohem Eintrag an organischen Verbindungen konnte gezeigt werden, daß durch die Reduktion von NO₃⁻, Mn(IV), Fe(III) und SO₄²⁻ sowie über die Methanogenese zusammen mehr Kohlenstoff oxidiert wurde als durch die O₂-Atmung (Canfield et al. 1993a). Die anteilige Bedeutung dieser anaeroben reduktiven Prozesse an der gesamten anaeroben Remineralisierung ist allerdings stark vom untersuchten Standort abhängig (Canfield 1993b). Im allgemeinen ist die Sulfatreduktion der wichtigste Prozeß bei der Remineralisierung von Kohlenstoff im anaeroben marinen Sediment (Jørgensen 1977, 1982). In einzelnen Sedimenten im Skagerrak kann jedoch die Mn(IV)-Reduktion für bis zu 90 % der Kohlenstoffoxidation verantwortlich sein (Canfield et al. 1993c). Im Shelf-Sediment vor der Mündung des Amazonas wird die Fe(III)-Reduktion als der wichtigste anaerobe Prozeß betrachtet (Lovley 1991). In einer flachen Meeresbucht an der Ostküste Dänemarks (Norsminde Fjord) erreicht die Nitratreduktion während ihres Frühjahrsmaximums den gleichen Stellenwert wie die O₂-Atmung und SO₄²⁻-Reduktion (Jørgensen und Sørensen 1985).

Der mikrobielle anaerobe Abbau einfacher aliphatischer Verbindungen, z.B. von organischen Säuren und Alkoholen aus dem Gärungsstoffwechsel, mit externen

Elektronenakzeptoren (NO_3^- , Fe(III) , SO_4^{2-} oder HCO_3^-) ist als wichtiger Bestandteil des Kohlenstoffkreislaufs seit langem bekannt (Zehnder und Stumm 1988). Im Gegensatz dazu war der Abbau aromatischer Verbindungen unter anoxischen Bedingungen lange Zeit umstritten, da eine Aktivierung aromatischer Verbindungen bzw. eine Spaltung des aromatischen Rings ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff unmöglich erschien. Allerdings war bereits 1934 gezeigt worden, daß aromatische Verbindungen vollständig zu CO_2 , CH_4 und Zellmaterial metabolisiert werden konnten, wenn man sie anaerob mit Klärschlamm inkubierte (Travin und Buswell 1934). Die Arbeit fand erst wieder Beachtung, als gegen Ende der 70er und zu Beginn der 80er Jahre etliche phototrophe, nitratreduzierende oder sulfatreduzierende Bakterien isoliert wurden, die zum Wachstum auf aromatischen Verbindungen wie Benzoat (Cord-Ruwisch und Garcia 1985, Pfennig 1978), Phenol (Bak und Widdel 1986a, Tschech und Fuchs 1987), Anilin (Schnell et al. 1989), Catechol (Szewzyk und Pfennig 1987, Kuever et al. 1993), 2-Aminobenzoat (Braun und Gibson 1984) und Indol (Bak und Widdel 1986b) befähigt waren. Charakteristisch für all diese aromatischen Verbindungen war, daß sie durch funktionelle Gruppen oder ein Heteroatom bereits polarisiert waren. Der anaerobe Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen wurde wegen ihres unpolaren Charakters bis in die Mitte der 80er Jahre nicht für möglich gehalten (Gibson und Subramanian 1984, Postgate 1984). Kurze Zeit später wurde jedoch bereits mit anaeroben Anreicherungskulturen gezeigt, daß die aromatischen Kohlenwasserstoffe Toluol und *m*-Xylol ohne molekularen Sauerstoff abgebaut werden konnten (Kuhn et al. 1988, Zeyer et al. 1986) und daß der Sauerstoff in phenolischen Zwischenprodukten aus dem Wasser stammte (Vogel und Grbic-Galic 1986). In den letzten Jahren wurden Toluol abbauende Reinkulturen von nitratreduzierenden (Altenschmidt und Fuchs 1991, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Fries et al. 1994 und Schocher et al. 1991), eisenreduzierenden (Lovley und Lonergan 1990) oder sulfatreduzierenden (Rabus et al. 1993) Bakterien beschrieben. Zwei der Toluol abbauenden nitratreduzierenden Reinkulturen, Stamm T (Dolfing et al. 1990) und Stamm Td15 (Fries et al. 1994), waren auch in der Lage *m*-Xylol anaerob abzubauen. Der Abbau von anderen Alkylbenzolen oder Benzol durch Reinkulturen anaerober Bakterien wurde bislang noch nicht beschrieben. In Anreicherungskulturen bzw. Sedimentversuchen wurde allerdings der anaerobe Abbau von Benzol unter methanogenen (Grbic-Galic und Vogel 1987, Edwards und Grbic-Galic 1992), eisenreduzierenden (Lovley et al. 1994) und sulfatreduzierenden (Lovely et al. 1995) Bedingungen bereits beobachtet.

Mechanistische Untersuchungen mit einigen der zuvor genannten Reinkulturen zeigten, daß der anaerobe Abbau von monocyclischen aromatischen Verbindungen prinzipiell in drei Stufen verläuft (Evans und Fuchs 1988, Fuchs et al. 1994, Grbic-Galic 1990, Schink et al. 1992): (a) Zunächst werden die diversen aromatischen Ausgangssubstrate durch einleitende Aktivierungsreaktionen in die zentralen Intermediate Benzoyl-CoA (A. 3.1. und 3.2.), Resorcin

oder Phloroglucin überführt. Benzoyl-CoA ist das häufigste und wichtigste Intermediat des anaeroben Aromatenabbaus. (b) Danach werden die zentralen Intermediate zu alicyclischen Verbindungen reduziert, die weiter zu offenkettigen CoA-Estern hydrolysiert werden. (c) Aus diesen nicht-cyclischen Verbindungen werden schließlich durch konventionelle Reaktionen, z.B. β -Oxidation, zentrale Metabolite gebildet. In den folgenden Abschnitten sollen die einleitenden Aktivierungsreaktionen und die reduktive Ringspaltung genauer dargestellt werden.

3.1. Aktivierungsreaktionen an polaren aromatischen Verbindungen

Durch die Untersuchung der einleitenden Aktivierungsreaktionen beim Abbau von polaren aromatischen Verbindungen, d.h. solche mit funktionellen Gruppen, wurde eine Reihe von neuartigen anaeroben Katalysemechanismen gefunden (Fuchs et al. 1994). Diese Aktivierungsreaktionen sind z.T. miteinander vernetzt und führen zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA. Exemplarisch sollen hier (a) die Carboxylierung von Phenol bzw. Anilin, (b) die reduktive Dehydroxylierung bzw. Desaminierung von 4-Hydroxybenzoyl-CoA bzw. 4-Aminobenzoyl-CoA und (c) die Methylhydroxylierung von *p*-Cresol beschrieben werden (Abb. 2).

(a) Die Carboxylierung des aromatischen Rings in *para*-Position ist der erste Schritt im anaeroben Abbau von Phenol beim nitratreduzierenden Stamm K172 und führt zur Bildung von 4-Hydroxybenzoat. Dies wurde zunächst an Hand eines Isotopenaustausches zwischen $^{14}\text{CO}_2$ und der Carboxylgruppe des 4-Hydroxybenzoats gezeigt (Dangel et al. 1991, Tschsch und Fuchs 1987 und 1989). In Folgeexperimenten wurde gefunden, daß der eigentlichen Carboxylierungsreaktion eine Phosphorylierung der phenolischen Gruppe vorausgeht (Lack und Fuchs 1992 und 1994). Beim anaeroben Abbau von Anilin im sulfatreduzierenden *Desulfobacterium anilini* wird ebenfalls eine Carboxylierung des aromatischen Rings in *para*-Position zu 4-Aminobenzoat als Startreaktion angenommen (Schnell et al. 1989, Schnell und Schink 1991).

(b) 4-Hydroxybenzoat ist ein Intermediat des anaeroben Abbaus von Phenol und *p*-Cresol. 4-Hydroxybenzoat wird zunächst mit einer CoA-Ligase zu 4-Hydroxybenzoyl-CoA aktiviert. Durch reduktive Dehydroxylierung entsteht dann aus dem 4-Hydroxybenzoyl-CoA das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA (Glöckler et al. 1989). 4-Aminobenzoat ist ein Intermediat des anaeroben Abbaus von Anilin. Die Bildung von Benzoyl-CoA aus 4-Aminobenzoat verläuft analog zu der aus 4-Hydroxybenzoat. Zunächst wird in einer CoA-Ligase-Reaktion 4-Aminobenzoyl-CoA gebildet, das anschließend reduktiv zu Benzoyl-CoA desaminiert wird (Lochmeyer et al. 1992).

(c) Eine Aktivierung von *p*-Cresol durch anaerobe Methylhydroxylierung zu *p*-Hydroxybenzylalkohol und anschließende Oxidation über *p*-Hydroxybenzaldehyd zu *p*-Hydroxybenzoat ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff wurde bereits Ende der 70er Jahre von Hopper (1976 und 1978) in *Pseudomonas putida* gezeigt. Diese Methylhydroxylierung wurde als Startreaktion des Abbaus von *p*-Cresol in aeroben und anaeroben Bakterien gefunden (Bossert et al. 1989, Hopper et al. 1991, Rudolphi et al. 1991, Smolenski und Suflita 1987).

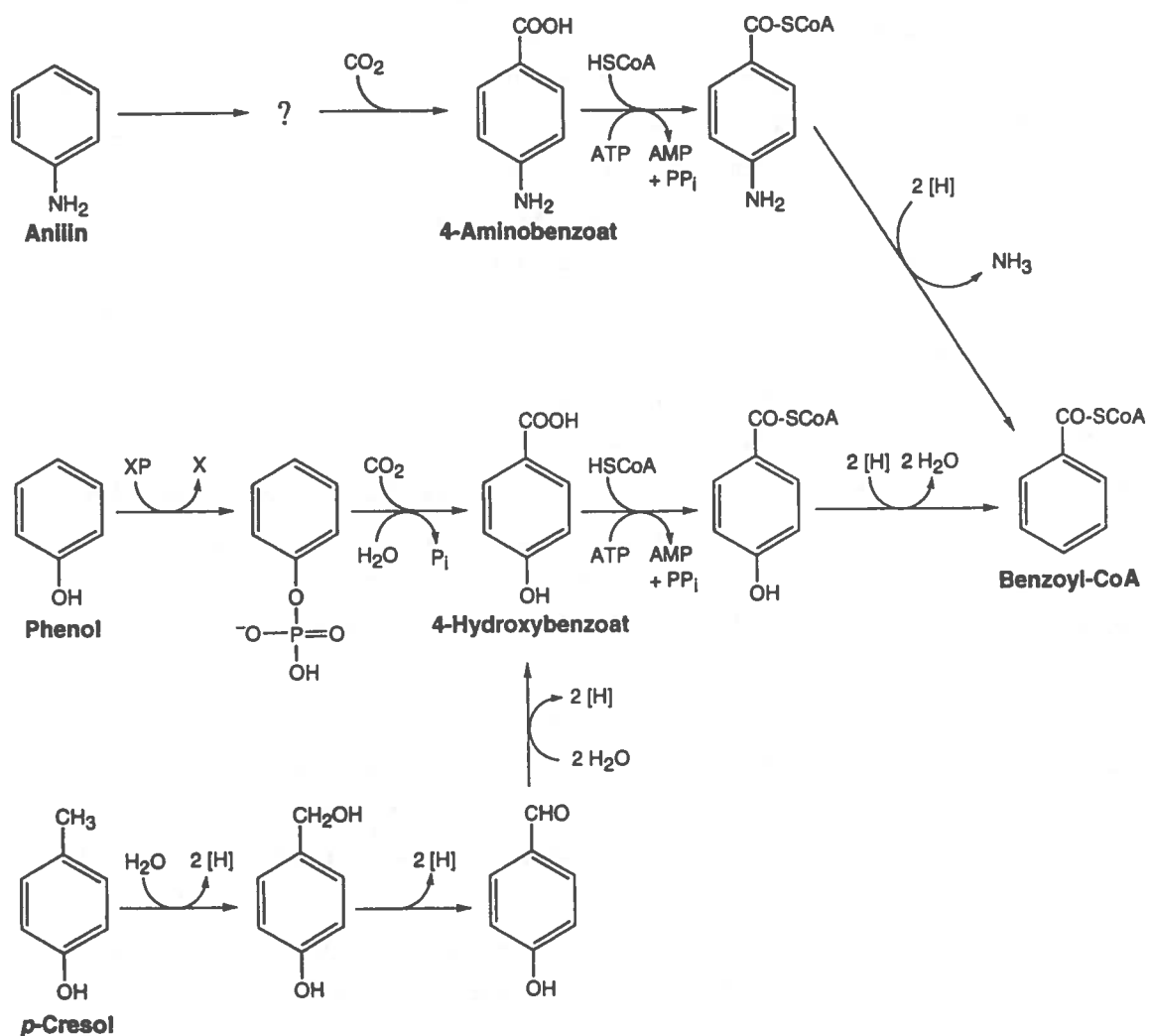


Abb. 2: Einleitende Aktivierungsreaktionen beim anaeroben Abbau von aromatischen Verbindungen (modifiziert nach Fuchs et al. 1994, Lack und Fuchs 1994, Schnell und Schink 1991).

3.2. Kenntnisstand zum Mechanismus der anaeroben Oxidation von Toluol

Die zuvor (A. 3.1.) dargestellten Aktivierungsreaktionen wurden an aromatischen Verbindungen beobachtet, die bereits durch den Besitz von funktionellen Gruppen polarisiert waren. Da aromatische Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Toluol, dagegen nur die nahezu unpolaren C-H-Bindungen besitzen, sind sie chemisch wesentlich reaktionsträger. Bislang ist keine biochemische Reaktion bekannt, die eine Aktivierung von C-H-Bindungen in aromatischen Kohlenwasserstoffen unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff erlaubt.

Denkbare Aktivierungsreaktionen in der anaeroben Oxidation von Toluol sind eine Carboxylierung der Methylgruppe bzw. des aromatischen Rings, eine Hydroxylierung der Methylgruppe bzw. des aromatischen Rings sowie eine oxidative Kondensation der Methylgruppe mit Acetyl-CoA (Abb. 3). Aufgrund von Wachstums- und Zellsuspensionsversuchen mit nitrat- und sulfatreduzierenden Bakterien (Altenschmidt und Fuchs 1991, Rabus et al. 1993, Schocher et al. 1991) wurden eine Carboxylierung der Methylgruppe bzw. des aromatischen Rings sowie eine Hydroxylierung des aromatischen Rings als Startreaktionen bei der anaeroben Oxidation von Toluol ausgeschlossen. Interessanterweise gibt es dagegen bei der anaeroben Oxidation des aliphatischen Kohlenwasserstoffs Hexadecan durch den sulfatreduzierenden Stamm Hxd3 (Aeckersberg et al. 1991) erste experimentelle Hinweise auf eine Aktivierung des Alkans durch eine terminale Kettenverlängerung mit einer C₁-Einheit (Aeckersberg 1994). Dabei wird vermutlich das erste Aktivierungsprodukt von Hexadecan durch eine Carboxylierung oder Carbonylierung in Heptadecanat oder Heptadecanal überführt.

Beim anaeroben Abbau von Toluol durch nitratreduzierende Bakterien werden gegenwärtig (a) eine Methylhydroxylierung von Toluol zu Benzylalkohol (Altenschmidt und Fuchs 1991, 1992) und (b) eine Kondensation der Methylgruppe mit Acetyl-CoA zu Phenylpropionyl-CoA (Evans et al. 1992) als alternative Aktivierungsreaktionen diskutiert (Abb. 4).

(a) Der von Altenschmidt und Fuchs vorgeschlagene Abbauweg im *Pseudomonas* Stamm K172 stellt die experimentell am besten geprüfte Reaktionssequenz von Toluol zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA dar. In Markierungsexperimenten mit [¹⁴C]-Toluol konnten in zeitlicher Abfolge zuerst [¹⁴C]-Benzylalkohol und danach [¹⁴C]-Benzaldehyd in Zellsuspensionen nachgewiesen werden. Desweiteren konnten in Rohextrakten die enzymatischen Aktivitäten der Benzylalkohol-Dehydrogenase und der Benzaldehyd-Dehydrogenase (120 bzw. 74 nmol·min⁻¹·mg⁻¹Protein) bestimmt werden. Die Aktivität der

postulierten anaeroben Toluol-Methylhydroxylase wurde bislang noch nicht gefunden. Beim eisenreduzierenden *Geobacter metallireducens* Stamm GS15 (Lovley et al. 1993) scheint eine

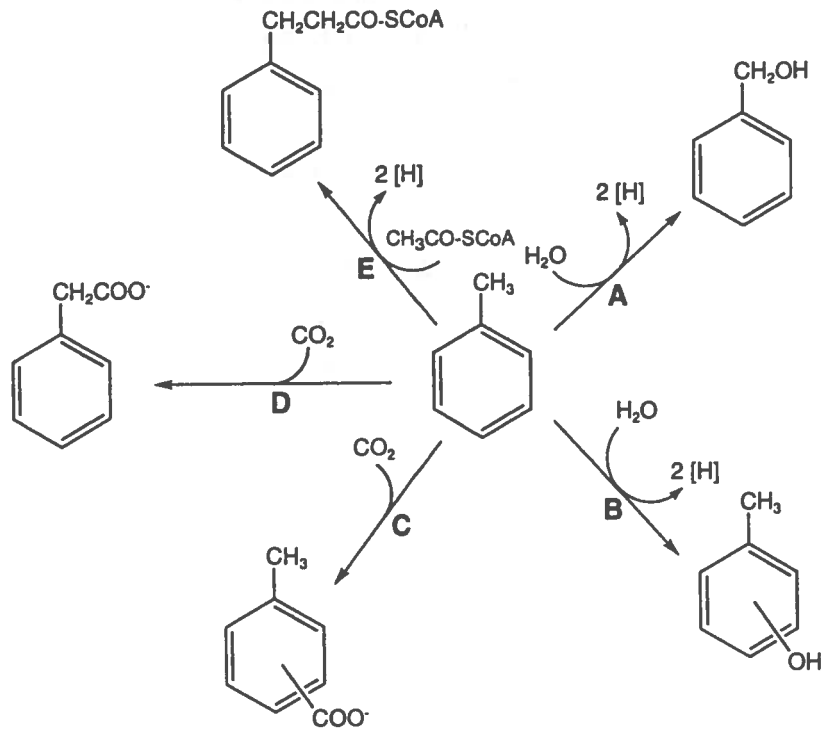


Abb. 3: Denkbare Startreaktionen der anaeroben Oxidation von Toluol. Diskutiert werden bisher eine Hydroxylierung zu Benzylalkohol (A) oder Cresolen (B), eine Carboxylierung zu Methylbenzoaten (C) oder Phenylacetat (D) oder eine oxidative Kondensation mit Acetyl-CoA zu Phenylpropionyl-CoA (E). Modifiziert nach Altenschmidt und Fuchs (1991).

Oxidation von Toluol über Benzylalkohol und Benzaldehyd ebenfalls denkbar, da diese Verbindungen auch von diesem Bakterium als Wachstumssubstrate verwertet wurden (Lovley und Lonergan 1990). Im Gegensatz dazu konnten die nitratreduzierenden Stämme T1 (Evans et al. 1991) und T (Schocher et al. 1991) sowie der sulfatreduzierende Stamm Tol2 (Rabus et al. 1993) nicht mit Benzylalkohol wachsen. Benzylalkohol war darüber hinaus beim sulfatreduzierenden Stamm Tol2 ein spezifischer Inhibitor der Toluoloxidation (Rabus et al. 1993). Demnach liefern die Substrattests mit Benzylalkohol kein einheitliches Bild der Aktivierungsreaktion von Toluol.

(b) Untersuchungen von Evans et al. (1992) mit dem nitratreduzierenden Stamm T1 deuteten auf eine zur Methylhydroxylierung alternative Aktivierungsreaktion hin. Beim anaeroben Wachstum von Stamm T1 auf Toluol wurden zwei Dead-End-Metabolite gebildet, die massenspektrometrisch als Benzylsuccinat und Benzylfumarat identifiziert wurden. Mit *o*-Xylol als Co-Substrat wurden außerdem *o*-Methylbenzylsuccinat und *o*-Methylbenzylfumarat

gefunden (Evans et al. 1992). Evans vermutete, daß Benzylsuccinat durch Addition aktivierten Succinats an Toluol entstanden war und daß diese Reaktion lediglich einen Nebenweg der Toluoloxidation darstellte. Für den eigentlichen Weg der anaeroben Toluoloxidation wurde ein analoger Mechanismus postuliert, nämlich eine oxidative Kondensation von Acetyl-CoA mit der Methylgruppe des Toluols. Das dabei gebildete Phenylpropionyl-CoA könnte dann durch einen β -Oxidationsschritt in den zentralen Metaboliten Benzoyl-CoA überführt werden. Die beiden Dead-End-Metabolite Benzylsuccinat und Benzylfumarat wurden ebenfalls in einer sulfatreduzierenden Anreicherung (Beller et al. 1992) und in den nitratreduzierenden Stämmen T und K172 (Seyfried et al. 1994) während des anaeroben Abbaus von Toluol angehäuft.

Die bisherigen Befunde sprechen somit dafür, daß es bei der anaeroben Oxidation von Toluol in verschiedenen anaeroben Bakterien unterschiedliche Aktivierungsreaktionen gibt.

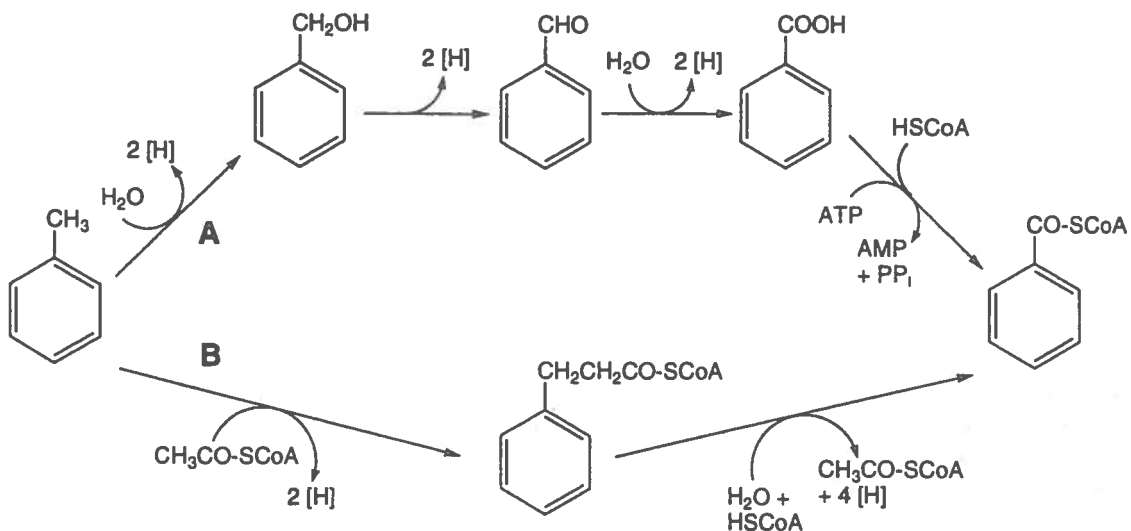


Abb. 4: Gegenwärtig am stärksten favorisierte Aktivierungsreaktionen bei der anaeroben Oxidation von Toluol mit Folgereaktionen. (A) Methylhydroxylierung zu Benzylalkohol mit anschließender Oxidation zu Benzaldehyd und Benzoesäure, sowie (B) oxidative Kondensation von Acetyl-CoA mit der Methylgruppe des Toluols zu Phenylpropionyl-CoA und anschließender β -Oxidation zu Benzoyl-CoA.

3.3. Abbau von Benzoyl-CoA zu zentralen Metaboliten

Wie zuvor dargestellt (A. 3.1. und 3.2.), werden die meisten aromatischen Verbindungen durch einleitende Aktivierungsreaktionen in Benzoyl-CoA, das zentrale Intermediat des anaeroben Aromatenabbaus, überführt. Der erste Schritt beim anaeroben Abbau von Benzoyl-CoA ist eine partielle Reduktion des aromatischen Rings. Dabei wird sowohl für das photosynthetische

Bakterium *Rhodopseudomonas palustris* (Perrotta und Harwood 1994) als auch für den nitratreduzierenden Stamm K172 (Koch und Fuchs 1992 und 1993) eine reduktive Reaktionssequenz über die beiden alicyclischen Verbindungen Cyclohex-1-encarboxyl-CoA und 2-Oxocyclohexancarboxyl-CoA vorgeschlagen. In den nachfolgenden Schritten wird zunächst 2-Oxocyclohexancarboxyl-CoA hydrolytisch am aktivierten C-Atom des alicyclischen Rings in das offenkettige Pimelyl-CoA gespalten. Pimelyl-CoA wird letztlich durch β -Oxidation zu Acetyl-CoA Molekülen abgebaut; als Besonderheit wird dabei Glutaconyl-CoA gebildet und decarboxyliert (Abb. 5 A). Statt aus Benzoyl-CoA kann die alicyclische Verbindung mit einem durch Carbonylfunktionen aktivierten C-Atom auch direkt aus der partiellen Reduktion des Ausgangssubstrats hervorgehen, wie z.B. beim Abbau von Resorcin und Phloroglucin (Abb. 5 B, Gorny et al. 1992, Fuchs et al. 1994, Schink et al. 1992).

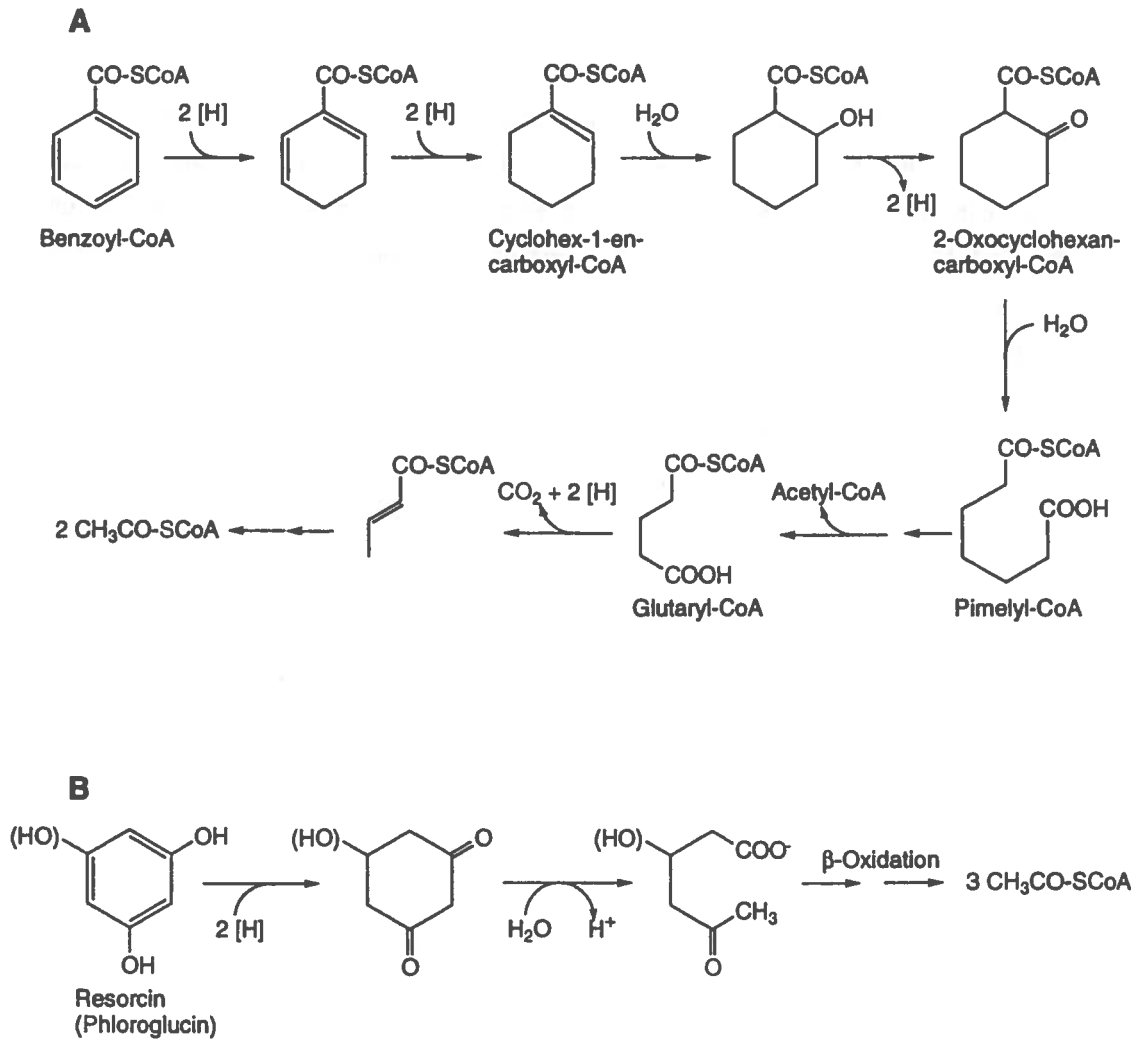


Abb. 5: Anaerober Abbau von Benzoyl-CoA und Resorcin bzw. Phloroglucin als zentralen Intermediaten des anaeroben Aromatenabbaus. (A) Benzoyl-CoA wird zunächst zu alicyclischen Verbindungen reduziert. Durch anschließende Ringspaltung wird das offenkettige Pimelyl-CoA gebildet, das über Glutaryl-CoA zu Acetyl-CoA Molekülen abgebaut wird (modifiziert nach Fuchs et al. 1994 und Schink et al. 1992). (B) Reduktiver Abbau der 1,3-dihydroxylierten Aromaten Resorcin und Phloroglucin mit anschließender Ringspaltung und β -Oxidation zu Acetyl-CoA (modifiziert nach Fuchs et al. 1994 und Schink et al. 1992).

4. Bedeutung der anaeroben Verwertung von Erdöl durch sulfatreduzierende Bakterien

4.1. Bedeutung des anaeroben Alkylbenzolabbaus für Erdöllagerstätten und die Erdölindustrie

Die Bildung von H_2S in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen ist ein Prozeß von technischer und wirtschaftlicher Bedeutung. Als Hauptverursacher der H_2S -Bildung werden sulfatreduzierende Bakterien betrachtet. Das gebildete H_2S stellt die Erdölindustrie vor eine Reihe von Problemen. So ist das gasförmige H_2S giftig, es beschleunigt die anaerobe Korrosion in Förderanlagen, Pipelines und Lagertanks und führt in Form von unlöslichen Metallsulfiden zur Verstopfung von Formationsgestein und zur Stabilisierung von Erdöl-Wasser-Emulsionen (Parks and Maxwell 1993, Postgate 1984, Tiller 1988). Die Herkunft der für die Bildung von H_2S benötigten Elektronendonatoren in den Erdöllagerstätten bzw. Erdölförderanlagen ist bislang unbekannt. Denkbare Elektronendonatoren könnten neben organischen Säuren und Ölfeldchemikalien auch Bestandteile des Rohöls selbst sein. In Erdöllagerstätten könnte die Aktivität von Alkylbenzol abbauenden Sulfatreduzierern auch eine wichtige Rolle bei der mikrobiellen Veränderung des Erdöls (Blanc und Connan 1993, Tissot und Welte 1984a) spielen. Um die Bedeutung von Alkylbenzol abbauenden Sulfatreduzierern in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen einschätzen zu können, ist es notwendig zunächst auf die Zusammensetzung von Erdöl und die Reservoirbedingungen einzugehen.

Zusammensetzung von Rohöl

Rohöle sind sehr komplexe Substanzgemische und können aus bis zu ca. 600 verschiedenen Kohlenwasserstoffen und Heteroverbindungen bestehen (Abb. 6). Die Hauptbestandteile des Rohöls lassen sich in drei Substanzgruppen einteilen (Tissot und Welte 1984b):

(a) *Gesättigte Kohlenwasserstoffe*: Diese umfassen *n*-Alkane, verzweigte Alkane und Cycloalkane (Naphthene); ihr durchschnittlicher Anteil in 517 untersuchten Rohölen beträgt 57,2 %; die häufigsten Verbindungen sind die leichtflüchtigen *n*-Alkane bis zu einer Kettenlänge von C_{10} .

(b) *Aromatische Kohlenwasserstoffe*: Diese Gruppe enthält vor allem reine Aromaten und polycyclische Kohlenwasserstoffe mit mindestens einem aromatischen Ring (aromatische Naphthene). Sie sind mit durchschnittlich 28,6 % die zweithäufigste Substanzgruppe im Rohöl.

Die häufigsten Verbindungen sind die leichtflüchtigen Monoaromaten Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol (BTEX).

(c) *Harze und Asphaltene*: Hier sind die hochmolekularen, polycyclischen Verbindungen, die N-, S- und O-Atome enthalten, zusammengefaßt. Der durchschnittliche Anteil dieser Gruppe im Rohöl liegt bei 14,2 %. In Schwerölen kann dieser Anteil aufgrund von mikrobiellem Abbau, Water-Washing und oxidativen Prozessen jedoch bis zu 60 % betragen.

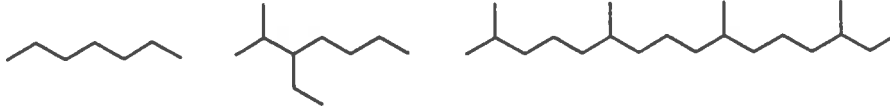
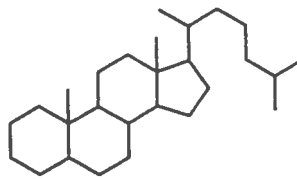
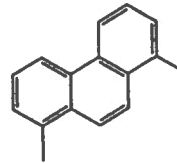
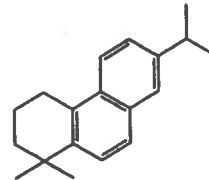
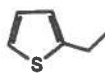
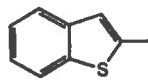
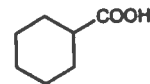
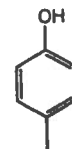
(d) *Niedermolekulare N-, O- und S-Verbindungen*: Neben diesen Hauptbestandteilen (a-c) enthält das Rohöl auch geringe Mengen an niedermolekularen N-, O- und S-haltigen Verbindungen. Beispiele für diese Heterokomponenten sind Alkylpyridine (N-haltig), gesättigte Fettsäuren, Cycloalkansäuren und phenolische Verbindungen (O-haltig) sowie Thiole, Alkylthiophene und Alkylbenzothiophene (S-haltig).

Reservoirbedingungen

Erdölreservoirs stellen aufgrund der vorherrschenden Temperatur-, Druck-, Salz- und Redoxverhältnisse einen extremen Lebensraum für Bakterien dar. In Lagerstätten in 2-4 km Tiefe herrscht durchschnittlich eine Temperatur von 60-120 °C, ein Druck von 20-59 MPa und eine Salzkonzentration von meistens über 100 g/l NaCl (Donaldson 1989). In Lagerstätten ist normalerweise kein molekularer Sauerstoff vorhanden. Im Zuge der sekundären Ölförderung gelangt mit dem eingeleiteten Injektionswasser Sauerstoff nur in begrenztem Umfang in die Lagerstätte. Häufig ist Sulfat vorhanden, das dann den wichtigsten potentiellen Elektronenakzeptor für eine mikrobielle Oxidation von organischem Material unter Reservoirbedingungen darstellt.

Aktivitäten anaerober Bakterien in Erdöllagerstätten und Ölförderanlagen

Obwohl in Erdöllagerstätten extreme Lebensbedingungen herrschen, gibt es mehrfache Hinweise auf eine Aktivität anaerober Bakterien an solchen Standorten. In Ölfeldern wurde eine Bildung von Methan (Ekzertsev 1960, Nazina et al. 1985) und von Sulfid (Cord-Ruwisch et al. 1986a, Ganahl und Kleinitz 1983, Rozanova und Nazina 1982) beobachtet. Durch Zählung von methanogenen (Ekzertsev 1960, Nazina et al. 1985) und sulfatreduzierenden Bakterien (Cord-Ruwisch et al. 1987, Ganahl und Kleinitz 1983, Kleinitz und Bak 1991, Postgate 1984, Rosnes et al. 1991a und 1991b, Rozanova und Nazina 1982) in Ölfeldern bzw. in von dort gewonnenen Anreicherungen konnte die beobachtete Bildung von Methan und Sulfid auf die Aktivität der entsprechenden anaeroben Bakterien zurückgeführt werden. Das Vorkommen von sulfatreduzierenden Bakterien in Ölförderanlagen und Ölfeldern wurde von Voordouw et al.

Gesättigte Kohlenwasserstoffe**n-Heptan****2-Methyl-3-ethylheptan****Phytan****Cyclohexan****Cholestan****Aromatische Kohlenwasserstoffe****Benzol****Toluol****1,8-Dimethylphenanthren****Tetrahydronaphthalin****Alkyltetrahydrophenanthren****N-, S- und O-haltige Verbindungen****3-Methylpyridin****2-Butanethiol****2-Ethylthiophen****2-Methylbenzothiophen****Cyclohexan-carbonsäure****p-Cresol****Abb. 6:** Beispiele für Verbindungen der wichtigsten im Rohöl vorkommenden Stoffklassen.

(1990, 1991, 1992, 1993) mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Durch den Nachweis von Hydrogenasegenen mit spezifischen DNA-Sonden konnten verschiedene *Desulfovibrio* spp. in Öltanks und Ölpipelines identifiziert werden (Voordouw et al. 1990). Mit Hilfe des Reverse Sample Genome Probing (RSGP) konnten vor allem *Desulfovibrio* spp., aber auch einige vollständig oxidierende Sulfatreduzierer im Produktionswasser aus Ölfeldern nachgewiesen werden (Voordouw et al. 1991, 1992 und 1993). Das RSGP ist eine DNA-Hybridisierungsmethode. Im Gegensatz zu den üblichen Methoden wird bei der RSGP allerdings die aus der Probe extrahierte und denaturierte DNA markiert. Diese markierte DNA wird auf Filter gegeben, auf die zuvor denaturierte chromosomale DNA bekannter Bakterien in Form von Spots aufgetragen wurde. Nach der Hybridisierungsreaktion kann dann in den Proben vorhandene DNA bekannter Bakterien identifiziert werden.

Die anaerobe Korrosion von Eisen und Stahl in Offshore-Ölförderanlagen wird wesentlich von sulfatreduzierenden Bakterien verursacht (Hamilton et al. 1988). Als Hauptursache der anaeroben mikrobiellen Korrosion wird die kathodische Depolarisierung betrachtet. Unter kathodischer Depolarisierung versteht man den Verbrauch der Elektronen, die bei der Auflösung von Eisen frei werden. Dabei könnte atomarer Wasserstoff als Elektronenakzeptor dienen (Widdel 1990). *Desulfovibrio* Stamm LaViS kann korrodierendes Eisen als Wasserstoffquelle verwenden (Cord-Ruwisch und Widdel 1986b). Tatsächlich konnten in den Wasserphasen von korrodierenden Ölpipelines Titer von bis zu 10^5 wasserstoffverwertende Sulfatreduzierer pro ml nachgewiesen werden (Bak et al. 1990). Darüber hinaus beschleunigt mikrobiell gebildetes Sulfid indirekt die Korrosion, indem es in Form von präzipitiertem FeS ähnlich einem Edelmetall die kathodische Depolarisierung verstärkt (Hamilton 1985, Widdel 1990). Kolloidales FeS und andere unlösliche Sulfide können die Permeabilität des öltragenden Gesteins und letztlich die Förderausbeute erniedrigen (Ganahl und Kleinitz 1983). Teilweise löst sich der gebildete Schwefelwasserstoff im Rohöl und verursacht dadurch das sogenannte Souring, was zu einer Wertminderung des Rohöls führt (Odom 1993, Scott et al. 1993). Schließlich gefährdet der leicht flüchtige Schwefelwasserstoff aufgrund seiner stark toxischen Wirkung auf den Blutfarbstoff Hämoglobin (Falbe und Regitz 1992) die Gesundheit des Personals in Ölförderanlagen.

Mehrere Untersuchungen mit Formationswasser aus Ölquellen zeigten, daß sulfatreduzierende Bakterien tatsächlich unter den extremen Lebensbedingungen der Erdöllagerstätten lebensfähig sind. Thermophile, sporenbildende Sulfatreduzierer der Gattung *Desulfotomaculum* wurden aus Ölreservoirs in der Nordsee mit *in situ*-Temperaturen von 60 bis 120 °C und *in situ*-Drücken von 20 bis 50 MPa isoliert. Unter simulierten Reservoirbedingungen konnten die isolierten Arten bei Temperaturen bis zu 80 °C und Drücken bis zu 30 MPa Sulfid bilden (Rosnes 1991a). Die isolierten *Desulfotomaculum* Arten überlebten außerdem große Temperaturschwankungen, da ihre Sporen auch nach einer Inkubationszeit von

20 min bei 130 °C noch auskeimten (Rosnes 1991b). Hyperthermophile sulfatreduzierende Bakterien, wie z.B. das Archaeobakterium *Archaeoglobus fulgidus*, konnten bei 85 und 102 °C aus Ölfeldern in der Nordsee und Alaska angereichert werden (Stetter et al. 1993). Bei 75 °C wurde *Archaeoglobus fulgidus* aus dem Formationswasser einer Nordsee-Ölquelle isoliert (Beeder et al. 1994).

In vielen Ölfeldern setzt eine signifikante Sulfidbildung durch sulfatreduzierende Bakterien erst im Zuge der sekundären Erdölförderung ein. In manchen Erdöllagerstätten wirkt die ursprüngliche hohe Salzkonzentration (max. 350.000 ppm, Donaldson 1989) hemmend auf die Aktivität sulfatreduzierender Bakterien. Durch das Einleiten von Injektionswasser wird die Salzkonzentration in solchen Lagerstätten soweit verdünnt, daß ein Wachstum sulfatreduzierender Bakterien möglich wird (Odom 1993, Postgate 1984). In vielen Ölfeldern in der Nordsee limitiert dagegen häufig eine zu niedrige Sulfatkonzentration im Porenwasser die bakterielle Sulfatreduktion. Die Erhöhung der Sulfatkonzentration durch eingeleitetes Meerwasser (28 mM Sulfat) führt dann zur bakteriellen Sulfidbildung (Rosnes et al. 1991a).

Die zuvor dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sulfatreduzierende Bakterien in der Lage sind, unter Reservoirbedingungen bei Temperaturen bis 102 °C Schwefelwasserstoff zu bilden. Bei weit höheren Temperaturen (ab ca. 150 °C) kann Schwefelwasserstoff in den Lagerstätten auch chemisch gebildet werden. Dabei entsteht elementarer Schwefel durch Komproportionierung von Sulfat und Sulfid. Der gebildete Schwefel reagiert vermutlich mit Kohlenwasserstoffen unter Bildung von CO₂ und H₂S (Orr 1974). Eine weitere mögliche chemische Quelle von Schwefelwasserstoff ist die thermische Spaltung von S-haltigen Komponenten des Rohöls (Orr 1974). Mit Hilfe der Isotopenfraktionierung des Schwefels ($\delta^{34}\text{S}$ Werte) kann jedoch zwischen bakteriell und chemisch gebildetem Schwefelwasserstoff unterschieden werden. Während die Isotopenfraktionierung bei der chemischen Bildung von Sulfid gering ist, findet bei der bakteriellen Sulfatreduktion eine deutliche Diskriminierung gegen das schwerere Isotop des Schwefels (³⁴S) statt, d.h. im Sulfid reichert sich das leichtere Isotop ³²S an (Schidlowski et al. 1983). Tatsächlich wurde eine starke Isotopenfraktionierung in Erdöllagerstätten mit *in situ*-Temperaturen bis max. 60 °C gemessen (Nielsen et al. 1991). Der Befund spricht dafür, daß sulfatreduzierende Bakterien wesentlich zur Sulfidbildung in Erdöllagerstätten oder während der Reifung des Öls beitragen können.

Welche Substanzen den sulfatreduzierenden Bakterien in Erdöllagerstätten und Ölförderanlagen als Elektronendonatoren zur Sulfidbildung dienen, ist bislang ungeklärt. Als Substratquellen werden (a) organische Säuren im Formationswasser, (b) bei der Förderung zugesetzte Ölfeldchemikalien, (c) Produkte des aeroben Abbaus von Erdölbestandteilen und (d) Bestandteile des Erdöls diskutiert.

(a) *Organische Säuren*: Im Formationswasser verschiedener Ölfelder wurden aliphatische Fettsäuren von C₂ bis C₆ sowie geringe Mengen an Benzoat gefunden (Barth 1991,

Means und Hubbard 1987). Tatsächlich verwerteten aus Ölfeldern in der Nordsee isolierte *Desulfotomaculum* Arten kurzkettige Fettsäuren (Rosnes et al. 1991a und 1991b). In der Wasserphase eines Ölseparators konnten Benzoat bzw. Acetat verwertende sulfatreduzierende Bakterien mit einem Titer von $6 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml nachgewiesen werden (Cord-Ruwisch et al. 1986a).

(b) *Ölfeldchemikalien*: Während der Ölförderung werden Chemikalien als Korrosionsinhibitoren, Biozide, Demulgatoren oder zur Erhöhung der Viskosität des Injektionswassers eingesetzt. Die meisten dieser Substanzen können zwar nicht direkt durch sulfatreduzierende Bakterien abgebaut werden, aber durch fermentative Umsetzung entstehen aus ihnen Produkte, die sulfatreduzierenden Bakterien als Substrate dienen. Methanol, das als Lösungsmittel für viele Ölfeldchemikalien dient, wird von einigen Sulfatreduzierern direkt verwertet, aber auch durch acetogene Bakterien zusammen mit CO_2 zu Acetat umgesetzt (Bache und Pfennig 1981). Acetat wird von vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern, insbesondere von *Desulfobacter* Arten, verwertet. Das Biopolymer Xanthan, das zur Erhöhung der Viskosität des Injektionswassers bei der sekundären Ölförderung eingesetzt wird, kann von gärenden Bakterien anaerob zu Acetat, H_2 und CO_2 abgebaut werden (Pini 1992). Ebenso ist der fermentative Abbau von Polyethylenglycol, der polaren Seitenkette von nichtionischen Tensiden, zu Ethanol und Acetat gezeigt worden (Schink und Stieb 1983).

(c) *Produkte des aeroben Abbaus von Erdölbestandteilen*: Sauerstoff gelangt in die von Natur aus anoxischen Öllagerstätten erst durch das Einleiten von sauerstoffhaltigem Injektionswasser (Tissot und Welte 1984). Entsprechend wurden aerobe Kohlenwasserstoff oxidierende Bakterien hauptsächlich im Injektionsbereich von Lagerstätten gefunden (Nazina et al. 1985). Unvollständig oxidierte Produkte des aeroben Abbaus von Kohlenwasserstoffen, wie z.B. Fettsäuren, Aldehyde und Alkohole, können unter anaeroben Bedingungen als Substrate für sulfatreduzierende Bakterien dienen (Cord-Ruwisch et al. 1986a und 1987, Jobson et al. 1979, Nazina et al. 1985, Rozanova und Nazina 1982, Shelton und Hunter 1975).

(d) *Bestandteile des Erdöls*: Hinweise auf eine anaerobe Verwertung von Rohöl unter methanogenen bzw. sulfatreduzierenden Bedingungen wurden mehrfach berichtet. Bei der anaeroben Inkubation von Rohöl mit anoxischen Schlämmen oder zerkleinertem ölhaltigen Gestein wurde sowohl eine Bildung von Methan (Ekzertsev 1960, Muller 1957) als auch eine Bildung von Sulfid (ZoBell und Prokopp 1966) beobachtet. Aus Öltanks bzw. Offshore-Ölfeldern wurden mit rohölhaltigen Harzen bzw. mit Rohöl allein als einzigem organischen Substrat Anreicherungen mesophiler (Cord-Ruwisch et al. 1986a und 1987) bzw. hyperthermophiler (Stetter et al. 1993) Sulfatreduzierer erhalten. Allerdings konnte in keinem der genannten Fälle geklärt werden, welche Bestandteile des Rohöls unter anoxischen Bedingungen als Substrate verwertet wurden. Von Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien ist bekannt, daß sie eine Reihe von Reinsubstanzen verwerten können, die auch Bestandteile

des Rohöls sind, wie z.B. *n*-Fettsäuren (Widdel 1980), Cyclohexancarbonsäure (Widdel 1988), Hexadecan (Aeckersberg et al. 1991), *p*-Cresol, Phenol (Bak und Widdel 1986a) und Toluol (Rabus et al. 1993). Aufgrund der Verwertung von Toluol ist zu erwarten, daß sulfatreduzierende Bakterien neben polaren Verbindungen auch Alkylbenzole aus dem Rohöl verwerten können.

4.2. Entstehung von Schwefellagerstätten

Weltweit werden pro Jahr ca. $32 \cdot 10^6$ t elementarer Schwefel produziert. Allein die Hälfte davon stammt aus bioepigenetischen Schwefellagerstätten. In diesen Lagerstätten ist der Schwefel von Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder Anhydrit (CaSO_4), Calcit (CaCO_3) und Erdöl umgeben. Die Anreicherung des leichten ^{32}S -Isotops im elementaren Schwefel relativ zu dem ihn umgebenden Gips oder Anhydrit zeigte, daß diese Lagerstätten biogenen Ursprungs sind (Thode et al. 1954). Nach der gegenwärtigen Vorstellung entstanden diese bioepigenetischen Schwefellagerstätten infolge der Aktivität sulfatreduzierender Bakterien, denen organisches Material aus dem Erdöl als Elektronendonator für die Bildung von Sulfid diente. Das dabei entstandene CO_2 lagerte sich als Calcit ab. Das gebildete Sulfid wurde entweder durch Sulfat oder durch Sauerstoff zu elementarem Schwefel oxidiert (Ruckmick et al. 1979). Die Anreicherung von sulfatreduzierenden Bakterien aus Salzstöcken in der Nachbarschaft von Schwefellagerstätten wird als Bestätigung dieser Modellvorstellung betrachtet (Butlin 1953, Davis und Bray 1969). Die Verwertung von Kohlenwasserstoffen durch sulfatreduzierende Bakterien (Aeckersberg et al. 1991, Rabus et al. 1993) zeigt, daß wichtige Komponenten des Rohöls prinzipiell als Elektronendonatoren bei der biogenen Schwefelbildung dienen können.

5. Bedeutung der anaeroben Verwertung von Erdöl durch nitratreduzierende Bakterien

Bakterien, die unter anoxischen Bedingungen dissimilatorisch Nitrat reduzieren, sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen im Boden, Süßwasser, Meerwasser und in Kläranlagen vor, wobei *Pseudomonas* und *Alcaligenes* Arten am häufigsten sind (Tiedje 1988, Zumpft 1992). In Meerwasser (28 mM Sulfat) und marinen Sedimenten ist die Sulfatreduktion der wichtigste anaerobe Redoxprozeß (Jørgensen 1977) und die dissimilatorische Nitratreduktion an den

meisten Standorten quantitativ weniger bedeutend (Canfield 1993a). In Böden und Süßwasser, das meist weniger als 1 mM Sulfat enthält, ist dagegen die Nitratreduktion neben der Eisenreduktion der wichtigste anaerobe Redoxprozeß bei der Remineralisierung von organischem Material. Das Ausmaß der dissimilatorischen Nitratreduktion wird in den Habitaten vor allem durch die Verfügbarkeit von Sauerstoff reguliert (Tiedje 1988). In stark mit organischem Material belasteten Böden und Grundwasserleitern sowie in eutrophierten Gewässern stellen sich durch den raschen Verbrauch des Sauerstoffs schnell anoxische Bedingungen ein, so daß Nitratreduktion möglich wird.

Häufig führt die Kontamination von Böden und Grundwasser mit Öl und Treibstoffen zu einer Belastung von Trinkwasser mit den toxischen BTEX-Verbindungen (A. 1.). In Feldstudien wurde bereits mehrfach beobachtet, daß BTEX in anoxischen Grundwasserleitern biologisch abgebaut wurden (Cozzarelli et al. 1990 und 1994, Wilson et al. 1990). Laboruntersuchungen mit Anreicherungen aus solchen kontaminierten Grundwasserleitern zeigten, daß Alkylbenzole anaerob durch nitratreduzierende Bakterien oxidiert wurden (Hutchins et al. 1991, Zeyer et al. 1986). Auf der Basis dieser Untersuchungen soll zur Beschleunigung der *in situ*-Sanierung von Öl-Kontaminationen dem belasteten Grundwasser Nitrat beigegeben werden (Zeyer 1993). Bisläng ist jedoch nicht bekannt, ob Reinkulturen nitratreduzierender Bakterien mit Rohöl als einzigem organischen Substrat wachsen können bzw. welche Substanzen gegebenenfalls aus dem Rohöl abgebaut werden.

B Material und Methoden

1. Chemikalien und Gase

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse" bzw. "reinst" und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Aldrich (Steinheim) und Riedel de Haën (Seelze) bezogen. Dickflüssiges und dünnflüssiges Paraffinöl mit DAB9 Qualität stammten von der Firma Henry Lamotte (Bremen) und 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan von Aldrich (Steinheim). Rohöl aus Nordsee-Quellen wurde von der β -Raffinerie (Wilhelmshaven) zur Verfügung gestellt. Biochemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (München), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Die folgenden Gase der Firma Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) wurden verwendet: N_2 (99,999 %), CO_2 (99,995 %), N_2/CO_2 -Gemisch (90/10, vol/vol), H_2 (99,995 %) und He (99,999 %).

2. Mikrobiologische Methoden

2.1. Probenmaterial und Organismen

Als Inokulum für die Anreicherung von Ethylbenzol abbauenden sulfatreduzierenden Bakterien wurde ein Gemisch anaerober Schlämme aus dem Jadebusen und der ostfriesischen Nordseeküste verwendet.

Zur Anreicherung von sulfatreduzierenden Bakterien mit Rohöl als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Proben von der Wasserphase eines großen Rohöltanks der β -Raffinerie (Wilhelmshaven) verwendet.

Als Inokulum für die Anreicherung von nitratreduzierenden Bakterien auf diversen Alkylbenzolen wurde ein homogenisiertes Gemisch aus Schlämmen aus verschiedenen Gräben und der Weser in Bremen eingesetzt.

6. Zielsetzung der Arbeit

1. In dem zuvor isolierten sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 (Rabus et al. 1993) sollte die Toluoloxidation eingehender untersucht werden. Hinweise auf die initiale Aktivierung von Toluol sollten mit Hilfe eines HPLC-analytischen Nachweises von Metaboliten, die Stamm Tol2 beim Zusatz von Strukturanaloga ausscheidet, gewonnen werden. Darüber hinaus sollte die spezifische Hemmwirkung von Benzylalkohol auf die Toluoloxidation genauer untersucht werden. Schließlich sollten Proteine, die spezifisch beim Wachstum auf Toluol exprimiert werden, mit Hilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese nachgewiesen werden.
2. In neuen Anreicherungen mit anschließender Isolierung sollte geprüft werden, ob auch Ethylbenzol als höhere homologe Verbindung des Toluols anaerob abbaubar ist. Als Elektronenakzeptor sollte hier Nitrat verwendet werden, da es bisherigen Erfahrungen nach mit nitratreduzierenden Bakterien ein schnelleres Wachstum auf aromatischen Kohlenwasserstoffen möglich ist, als mit sulfatreduzierenden Bakterien. Zum Vergleich sollten ferner mit *n*-Propylbenzol, *m*-Xylol und Toluol Reinkulturen gewonnen werden. Die erhaltenen Isolate sollten dann charakterisiert und mit wachstumsphysiologischen Untersuchungen und Zellsuspensionsversuchen vergleichend auf mögliche Abbauewege geprüft werden.
3. Neben definierten Alkylbenzolen sollte auch Rohöl als natürliches Gemisch aromatischer und aliphatischer Kohlenwasserstoffe als Wachstumssubstrat unter anoxischen Bedingungen mit Sulfat oder Nitrat als Elektronenakzeptor in Anreicherungen und Reinkulturen geprüft werden. Die Abbaubarkeit von aromatischen Kohlenwasserstoffen im Rohöl sollte analytisch nachgewiesen werden. Anreicherungen auf Rohöl sollten durch Zählverfahren und den Einsatz spezifischer Oligonukleotidsonden bakteriologisch untersucht werden.

Versuche zum anaeroben Toluolabbau wurden mit dem Sulfatreduzierer *Desulfobacula toluolica*, DSM Nr. 7467, (Rabus et al. 1993) durchgeführt.

Für vergleichende Hybridisierungen mit DNA wurden Reinkulturen folgender Bakterien verwendet:

<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DSM 1924
<i>Desulfovibrio gigas</i>	DSM 1382 ^T
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 644 ^T
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	DSM 2555
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	DSM 2554
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	DSM 2055
<i>Desulfobacter postgatei</i>	DSM 2553
<i>Desulfobacter latus</i>	DSM 3381 ^T
<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	DSM 3385 ^T
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	DSM 3382 ^T
<i>Desulfococcus multivorans</i>	DSM 2059 ^T
<i>Desulfonema magnum</i>	DSM 2077 ^T
<i>Desulfonema limicola</i>	DSM 2076 ^T
<i>Desulfonema</i> sp. Jade 02*	
<i>Desulfonema</i> sp. Tokyo 01*	
Sulfatreduzierer Stamm Hxd3	DSM6200
<i>Beggiatoa alba</i>	DSM ****
<i>Myxococcus xanthus</i>	DSM 435
<i>Photobacterium</i> sp. FW	
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	DSM 2167
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	DSM 467 ^T
<i>Comamonas testosteroni</i>	DSM 50244 ^T
<i>Escherichia coli</i>	DSM 498
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10 ^T
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030 ^T
<i>Halobacterium halobium</i>	DSM 670
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70449 ^T

* isoliert von Dr. Manabu Fukui

2.2. Nährmedien

2.2.1. Herstellung von Stammlösungen für Grundmedien

a) Spurenelementlösung I

Der Reihe nach wurden folgende Salze in einer bereits vorgegebenen Menge an bidest. H₂O (ca. 800 ml) unter Erwärmen gelöst.

Na ₂ -EDTA	5,2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2100,0 mg
H ₃ BO ₃	30,0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100,0 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190,0 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24,0 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2,0 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144,0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36,0 mg

Mit NaOH wurde der pH auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde mit bidest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in festverschlossenen Schraubdeckelflaschen mit Luftraum autoklaviert.

b) Spurenelementlösung II

In einer zweiten Spurenelementlösung, die für Denitrifizierer verwendet wurde, war im Unterschied zur Spurenelementlösung I der Cu-Gehalt erhöht. Statt 2,0 mg CuCl₂·2H₂O wurden 29 mg CuSO₄·5H₂O pro l zugegeben. Die Lösung wurde in festverschlossenen Schraubdeckelflaschen mit Luftraum autoklaviert.

c) Selenit-Wolframat-Lösung

NaOH	400,0 mg
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	6,0 mg
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	8,0 mg
bidest. H ₂ O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde in festverschlossenen Schraubdeckelflaschen mit Luftraum autoklaviert.

d) Vitamingemisch

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 25 mM, pH 7,1	100,0 ml
4-Aminobenzoesäure	4,0 mg
D(+)-Biotin	1,0 mg
Nicotinsäure	10,0 mg
Calcium-D(+)-Pantothenat	5,0 mg
Pyridoxin · 2 HCl	15,0 mg
Liponsäure	1,5 mg
Folsäure	4,0 mg
2-Mercaptoethansulfonsäure, Natriumsalz	25,0 mg

Die Lösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell) sterilfiltriert und bei 4 °C in Schraubdeckelflaschen dunkel gelagert.

e) Thiaminlösung

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 50 mM, pH 3,7	100,0 ml
Thiamin · 2 HCl	10,0 mg

Die Lösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 μm , Schleicher und Schuell) sterilfiltriert und bei 4 °C in Schraubdeckelflaschen dunkel gelagert.

f) Riboflavinlösung

bidest. H_2O	100,0 ml
Essigsäure	0,1 ml
Riboflavin	2,5 mg

Die Lösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 μm , Schleicher und Schuell) sterilfiltriert und bei 4 °C in Schraubdeckelflaschen dunkel gelagert.

g) Vitamin-B₁₂-Lösung

Cyanocobalmin	5,0 mg
bidest. H_2O	ad 100,0 ml

Die Lösung wurde über Membranfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 μm , Schleicher und Schuell) sterilfiltriert und bei 4 °C in Schraubdeckelflaschen dunkel gelagert.

h) Natriumbicarbonatlösung

NaHCO_3	84,0 g
bidest. H_2O	ad 1000,0 ml

Die Lösung wurde mit CO_2 gesättigt und in Portionen zu 30 ml unter CO_2 -Atmosphäre in Serumflaschen (50 ml) autoklaviert. Die Verschlüsse wurden mit Aluminiumfolie gegen Staub geschützt.

i) Natriumsulfidlösung

$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	240,0 g
bidest. H_2O	ad 1000,0 ml

Zur Herstellung der Natriumsulfidlösung wurden möglichst große und klare Kristalle von $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ verwendet. Diese wurden vor dem Wiegen kurz auf einem Kunststoffsieb mit dest. H_2O gespült, um Oxidationsprodukte des Sulfids von der Oberfläche zu entfernen. Die gewogenen Kristalle wurden in dest. H_2O unter N_2 -Atmosphäre gelöst. Danach wurde die Lösung in 30 ml-Portionen auf Serumflaschen (50 ml) verteilt und sofort unter N_2 -Begasung

mit Butylstopfen verschlossen. Die Gefäße wurden dann autoklaviert. Durch Reaktion der alkalischen Lösung mit Glas können Ausfällungen entstehen, die die Verwendbarkeit der Natriumsulfidlösung jedoch nicht beeinträchtigen.

j) Ascorbatlösung

11,6 g Ascorbinsäure in 100 ml bidest. H₂O wurden im Eisbad mit 2 M NaOH neutralisiert. Danach wurde die Lösung über einen Sterilfilter aus Nitrocellulose (Porengröße 0,2 µm) direkt in ein begasbares Spezialgefäß (B. 2.2.3. Abb. 7) gegeben und in diesem unter N₂-Atmosphäre bei 4 °C dunkel aufbewahrt.

k) Salzkonzentrat

NaCl	286,4 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	44,7 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,2 g
bidest. H ₂ O	ad 1000,0 ml

Das autoklavierte Salzkonzentrat wurde zur Herstellung von Brackwassermedium aus Süßwassermedium verwendet.

2.2.2. Herstellung von Grundmedien

Je nach Herkunft und Salzbedürfnis der Bakterien wurden Grundmedien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mineralsalzen und Spurenelementen hergestellt. Die hitzestabilen Salze wurden in bidest. H₂O gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert (Widdel 1980). Nach dem Abkühlen des Mediums unter einer Atmosphäre von N₂/CO₂ (90/10, v/v) wurden die hitzelablen Komponenten des Mediums aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler 1 M H₂SO₄ oder 2 M HCl bzw. 1 M Na₂CO₃-Lösung auf 7,0 bis 7,3 eingestellt. Das Abfüllen des Mediums in autoklavierte Schraubdeckelflaschen (50 ml) erfolgte bei schwachem Überdruck mit Hilfe einer Abfüllglocke (Widdel und Bak 1992).

a) Grundmedien für sulfatreduzierende Bakterien

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien an Mineralsalzen. Den autoklavierten Lösungen wurden nach dem Abkühlen Spurenelemente, Vitamine, Bicarbonat und Natriumsulfid (B. 2.2.1.) zugesetzt.

	Süßwasser- medium ^a [g/l]	Salzwasser- medium [g/l]	synthetisches Meer- wassermedium [g/l]
Na ₂ SO ₄	4,0	4,0	-
KH ₂ PO ₄	0,2	0,2	0,2 ^b
NH ₄ Cl	0,25	0,25	0,25 ^b
NaCl	1,0	20,0	26,4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4	3,0	5,7 ^c
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	6,8 ^c
KCl	0,5	0,5	0,66
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15	0,15	1,47
KBr	-	-	0,09
NaHCO ₃	-	-	0,19

^a Brackwassermedium wurde hergestellt, indem aseptisch 1 ml Salzkonzentrat (B. 2.2.1.) zu 50 ml Süßwassermedium gegeben wurde.

^b Um Ausfällungen zu vermeiden wurden diese Salze bei der Herstellung von künstlichem Meerwassermedium separat in 50 ml bidest. H₂O autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

^c In Versuchen ohne Sulfat wurde MgSO₄ weggelassen; stattdessen wurden insgesamt 11,4 g MgCl₂·6H₂O/l zugesetzt.

Dem autoklavierten und abgekühlten Medium für sulfatreduzierende Bakterien wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen (B. 2.2.1.) zugesetzt:

Spurenelementlösung I	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Vitamin-B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
NaHCO ₃ -Lösung	
Süß- und Salzwassermedium	30 ml/l
synthetisches Meerwassermedium	20 ml/l
Na ₂ S-Lösung	1 ml/l

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl bzw. 1 M Na₂CO₃ auf 7,0 bis 7,3 eingestellt. Bei einzelnen Versuchen wurde die Zusammensetzung von Spurenelementen und Vitaminen verändert.

b) Grundmedium für nitratreduzierende Bakterien

Für nitratreduzierende Bakterien wurde nur ein Medientyp verwendet.

KH_2PO_4	0,50 g/l
NH_4Cl	0,30 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,10 g/l
NaNO_3	0,85 g/l

Dem autoklavierten und abgekühlten Medium für nitratreduzierende Bakterien wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen (B. 2.2.1.) zugesetzt:

Spurenelementlösung II	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Vitamin-B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
NaHCO_3 -Lösung	40 ml/l
2M HCl bzw. 1M Na_2CO_3 zum Einstellen des pH-Wertes auf 7,2	
Ascorbat-Lösung (1 M)	4 ml/l

Für die Anreicherungen wurde keine Ascorbatlösung zugesetzt.

Aufbewahrung der Grundmedien

Mit den Grundmedien wurden Schraubdeckelflaschen (50 ml) luftblasenfrei gefüllt. Größere Kulturgefäße für Massenanzuchten (500 ml, 2 l) wurden nicht vollständig gefüllt. In diesen wurde ein Gasraum von 1/4 bis 1/5 des Gesamtvolumens belassen, der mit N_2/CO_2 (90/10, v/v) begast wurde. Der Gehalt an CO_2 diente der Aufrechterhaltung des pH-Wertes.

Organische Substrate und weitere Substanzen wurden den Kulturgefäßen je nach Bedarf oder Versuch einzeln vor dem Beimpfen zugesetzt (B. 2.2.3.).

2.2.3. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen

Beim aseptischen Zusatz von organischen Substraten und anderen Supplementen zu den Grundmedien wurde darauf geachtet, daß die Kulturgefäße entweder luftblasenfrei oder unter Begasung mit N_2/CO_2 (90/10, v/v) nach der Hungate-Technik (Bryant 1972) wieder verschlossen wurden.

a) Lösliche organische Substrate

Die wasserlöslichen organischen Substrate wurden den Ansätzen direkt aus konzentrierten

sterilen Stammlösungen zugesetzt. Temperaturempfindliche Substanzen wurden über Nitrocellulose-Membranen (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Alle übrigen Stammlösungen wurden in dicht verschlossenen Flaschen mit Luftraum (ca. 1/3 des Flaschenvolumens) autoklaviert. Lichtempfindliche Substanzen wurden bei 4 °C dunkel aufbewahrt.

Tabelle 2: Stammlösungen der wasserlöslichen organischen Substrate und die jeweils in Versuchen eingesetzten Endkonzentrationen.

Substanz	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration [mM]
Carbonsäuren^a		
Aromatische Carbonsäuren		
Benzoat	1,0	1,0 - 4,0
<i>o</i> -Methylbenzoat	1,0	1,0 - 4,0
<i>m</i> -Methylbenzoat	1,0	1,0 - 4,0
<i>p</i> -Methylbenzoat	1,0	1,0 - 4,0
<i>p</i> -Ethylbenzoat	1,0	0,5 - 2,0
Phenylacetat	1,0	1,0 - 4,0
3-Phenylpropionat	1,0	1,0 - 4,0
4-Phenylbutyrat	1,0	1,0 - 4,0
Mandelat	1,0	0,5 - 2,0
Benzylsuccinat	1,0	1,0 - 4,0
Phenylalanin ^b	0,01	0,5 - 2,0
Tryptophan ^b	0,01	0,5 - 2,0
Tyrosin ^b	0,01	0,5 - 2,0
Aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren, Aminosäuren		
Palmitat	0,1	0,5 - 1,0
Caprylat	0,2	1,0 - 2,0
Valerianat	1,0	1,0 - 5,0
Capronat	1,0	1,0 - 5,0
Butyrat	1,0	5,0 - 10,0
Propionat	1,0	5,0 - 10,0
Lactat	1,0	5,0 - 10,0
Pyruvat	1,0	1,0 - 5,0
Acetat	1,0	5,0 - 10,0
Formiat	2,0	10,0 - 20,0
Malat	1,0	1,0 - 5,0
Citrat	1,0	1,0 - 5,0
Succinat	1,0	1,0 - 5,0
Alanin	1,0	1,0 - 5,0
Aspartat	1,0	1,0 - 5,0
Glutamat	1,0	1,0 - 5,0
Glycin	1,0	1,0 - 5,0
Serin	1,0	1,0 - 5,0
Alkohole		
Benzylalkohol	0,2	0,5 - 2,0
R-1-Phenylethanol	0,1	0,5 - 2,0
S-1-Phenylethanol	0,1	0,5 - 2,0

R,S-1-Phenylethanol	0,1	0,5 - 2,0
2-Phenylethanol	0,1	0,5 - 2,0
Methanol	2,0	5,0 - 10,0
Ethanol	2,0	1,0 - 5,0
Propanol	2,0	1,0 - 5,0
Isopropanol	1,0	5,0 - 10,0
1-Butanol	2,0	1,0 - 5,0
2-Butanol	0,8	1,0 - 5,0

Aldehyde und Ketone^b

Benzaldehyd	0,025	0,5 - 2,0
Phenylacetaldehyd	0,025	0,5 - 2,0
Aceton	0,05	0,5 - 2,0
2-Butanon	0,05	0,5 - 2,0
3-Pentanon	0,05	0,5 - 2,0

Phenole

Phenol	0,25	0,5 - 2,0
<i>o</i> -Cresol	0,1	0,5 - 2,0
<i>m</i> -Cresol	0,1	0,5 - 2,0
<i>p</i> -Cresol	0,2	0,5 - 2,0

Monosaccharide

Glucose	1,0	1,0 - 5,0
Fructose	1,0	1,0 - 5,0
Mannose	1,0	1,0 - 5,0

^a Die freien Carbonsäuren wurden durch Zugabe einer nahezu äquivalenten Menge an 5 M NaOH in Lösung gebracht. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M NaOH zwischen 8 und 9 eingestellt. Danach wurde mit bidest. H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt.

^b Die Stammlösungen der Aldehyde, Ketone und aromatischen Aminosäuren wurden in anoxischem bidest. H₂O hergestellt und unter N₂-Atmosphäre aufbewahrt.

b) Unlösliche organische Substrate

Den Kulturen wurden wasserunlösliche organische Substrate (Tabelle 3 und 4) als verdünnte Lösungen in einer inerten Trägerphase zugegeben, um toxische Effekte aufgrund zu hoher Substratkonzentrationen zu vermeiden (Rabus et al. 1993, Rabus und Widdel 1995). Als inerte Trägerphasen wurden dickflüssiges Paraffin (Paraffinum subliquidum, in DAB9 Qualität, Henry Lamotte, Bremen) und 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (Aldrich, Steinheim) eingesetzt. Dickflüssiges Paraffin und 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan wurden in Spezialgefäßen (Aeckersberg et al. 1991, Abb. 7) entgast und unter N_2 -Atmosphäre autoklaviert und aufbewahrt. Die wasserunlöslichen organischen Substrate wurden unverdünnt über eine gegen Lösungsmittel resistente Membran (regenerierte Cellulose, Porengröße $0,2 \mu m$) sterilfiltriert und in Schraubdeckelflaschen (25 ml) mit Teflondichtung bei $4 \text{ }^\circ C$ dunkel aufbewahrt.

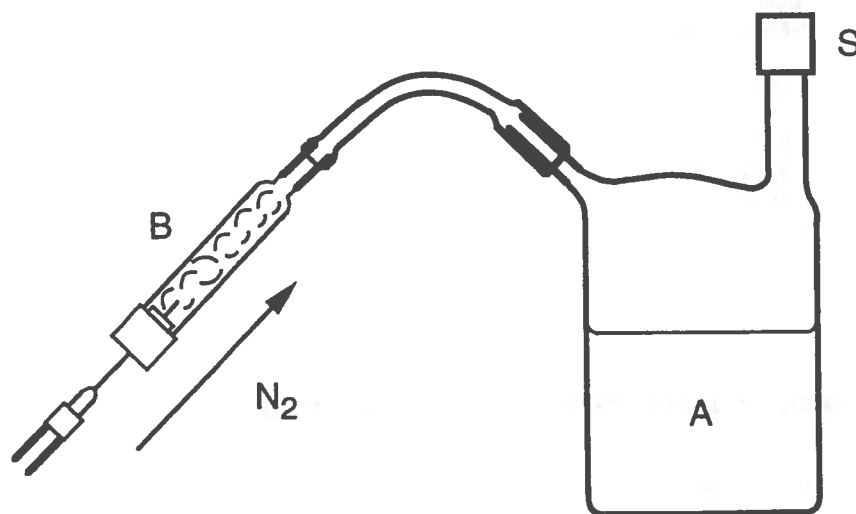


Abb. 7: Spezialgefäß zur anoxischen Lagerung von sauerstofffreiem, sterilem Paraffin bzw. Heptamethylnonan (A). Der mit Watte gestopfte Begasungsaufsatz (B) wurde mit einem Butylstopfen verschlossen, der mit einem Schraubdeckel mit Öffnung gesichert war. So konnte das Gefäß über eine Nadel mit Stickstoff (N_2) begast werden. Die Öffnung des Spezialgefäßes war mit einem Schraubdeckel mit Teflondichtung (S) verschlossen. Paraffin bzw. Heptamethylnonan wurde in das Gefäß gefüllt und durch mehrmaliges Evakuieren unter Umschwenken und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Unter N_2 -Atmosphäre wurde dann das gefüllte Gefäß autoklaviert. Proben wurden durch die Öffnung unter einem ständigen Strom von N_2 anaerob entnommen. Dieses Spezialgefäß wurde auch zur Lagerung von steriler anoxischer Ascorbat-Stammlösung und unsterilem anoxischem Rohöl eingesetzt.

Aromatische Verbindungen

Tabelle 3: Aromatische Kohlenwasserstoffe und polare aromatische Verbindungen.

Substanz	Endkonzentration in Heptamethylnonan [%, v/v]
aromatische Kohlenwasserstoffe	
Benzol	1,0
Toluol	2,0
Ethylbenzol	5,0
Propylbenzol	5,0
Isopropylbenzol	2,0 - 5,0
Butylbenzol	5,0
<i>o</i> -Xylol	2,0
<i>m</i> -Xylol	2,0
<i>p</i> -Xylol	2,0
<i>o</i> -Ethyltoluol	2,0 - 5,0
<i>m</i> -Ethyltoluol	2,0 - 5,0
<i>p</i> -Ethyltoluol	0,5 - 2,0
Mesitylen	2,0 - 5,0
Styrol	2,0
Naphthalin	20,0 mg/ml Paraffin
1-Methylnaphthalin	2,0 - 5,0
polare aromatische Verbindungen	
<i>o</i> -Ethylphenol	0,5 - 2,0
<i>m</i> -Ethylphenol	0,5 - 2,0
1-Phenyl-1-propanol	0,5 - 2,0
2-Phenyl-1-propanol	0,5 - 2,0
Acetophenon	0,5 - 2,0
Propiophenon	0,5 - 2,0

Aliphatische und alicyclische Kohlenwasserstoffe

Tabelle 4: Aliphatische und alicyclische Kohlenwasserstoffe

Substanz	Endkonzentration in Heptamethylnonan [%, v/v]
Hexan	2,0 - 5,0
Decan	5,0 - 10,0
Hexadecan	20,0 - unverdünnt
Cyclohexan	2,0
Methylcyclohexan	2,0
Ethylcyclohexan	2,0

Rohöl

Unsteriles Rohöl für Anreicherungen wurde in Spezialgefäßen (Abb. 7) durch Schwenken unter N₂-Atmosphäre bei wiederholtem Austausch der N₂-Atmosphäre anaerobisiert. Aufbewahrt wurde das unsterile, anoxische Rohöl bei 4 °C im Dunkeln.

Das Rohöl für Versuche mit Reinkulturen wurde in einem anderen Spezialgefäß mit einem Teflonspindelhahn (Abb. 8) auf die gleiche Weise anaerobisiert. Anschließend wurde das anoxische Rohöl durch Autoklavieren unter N₂-Atmosphäre sterilisiert. Das sauerstofffreie, sterile Rohöl wurde den Wachstumsansätzen entweder direkt oder in Paraffin verdünnt zugesetzt.

2.2.4. Sonstige Zusätze

a) Suppline

Hefeextrakt wurde als konzentrierte Stammlösung (100 g/l) angesetzt, in verschlossenen Schraubdeckelflaschen (50 ml) autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Endkonzentration in Wachstumsansätzen betrug 0,5 g/l.

b) Natriumdithionit

Dithionit (Na₂S₂O₄) diente für Stammkulturen, Wachstumsversuche, Massenanzuchten und Versuche mit Zellsuspensionen von *Desulfobacula toluolica* als zusätzliches Reduktionsmittel. Dithionit wurde den Ansätzen erst unmittelbar vor dem Beimpfen bzw. vor der Inkubation als 5 %ige Stammlösung (0,6 ml/l Medium) oder als pulverförmige Festsubstanz (ca. 20 mg/l Medium) aseptisch zugegeben.

Da gelöstes Dithionit durch Luftkontakt schnell oxidiert wird, wurde die Stammlösung in einem Spezialgefäß (Widdel und Bak 1992) unter N₂-Atmosphäre hergestellt. Unter diesen Bedingungen war die Stammlösung im Dunkeln bei 4 °C ca. eine Woche haltbar.

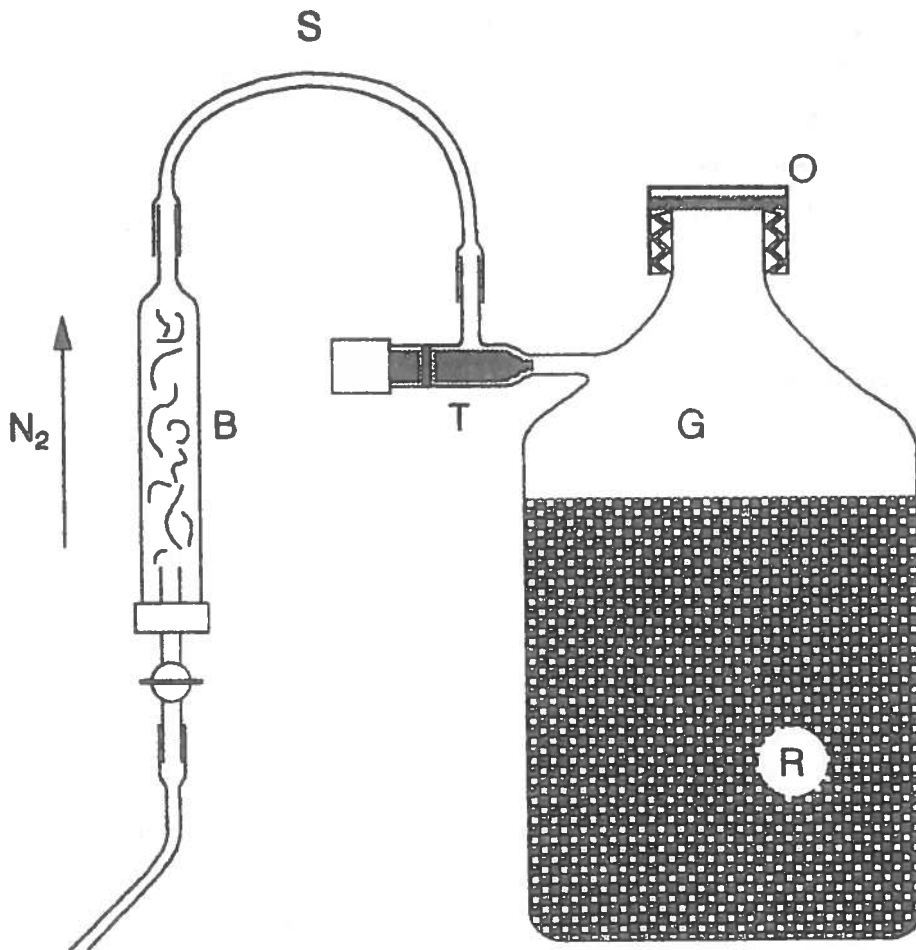


Abb. 8: Spezialgefäß zur anoxischen Lagerung von sauerstofffreiem, sterilem Rohöl (R). Der mit Watte gestopfte Begasungsaufsatz (B) wurde mit einem Butylstopfen verschlossen, der mit einem Schraubdeckel mit Öffnung gesichert war. Über eine Kanüle und den Begasungsaufsatz konnte der Gasraum (G) bei geöffnetem Teflonspindelhahn (T) und offener Öffnung (O) mit N_2 gespült werden. Die Öffnung wurde mit einem Schraubdeckel mit Teflondichtung verschlossen. Der Gasraum über dem Rohöl konnte mit dem Teflonspindelhahn gasdicht von dem Begasungsaufsatz getrennt werden. Auf diese Weise konnte der Kontakt zwischen den flüchtigen Kohlenwasserstoffen aus dem Rohöl und dem Butylschlauch (S) vermieden werden. Das Rohöl wurde durch die Öffnung in das Spezialgefäß gefüllt und durch häufiges Schwenken unter N_2 -Atmosphäre und wiederholten Austausch der N_2 -Atmosphäre anaerobisiert. Sterilisiert wurde das anoxische Rohöl durch Autoklavieren unter N_2 -Atmosphäre. Proben wurden durch die Öffnung unter einem schwachen ständigen Strom von N_2 anaerob entnommen.

2.3. Anreicherung und Isolierung von Bakterien

Anreicherung

Sulfatreduzierende Bakterien wurden in flachen Glasflaschen (125 ml) angereichert, die zu 4/5 gefüllt und mit einem Butylstopfen und einem Schraubdeckel mit Öffnung verschlossen waren (Rabus et al. 1993). Aromatische Kohlenwasserstoffe wurden als verdünnte Lösungen in dickflüssigem Paraffin den Ansätzen direkt zugesetzt. Sauerstofffreies, unsteriles Rohöl wurde unverdünnt eingesetzt. Während der Inkubation wurde der Kontakt zwischen den aromatischen Kohlenwasserstoffen bzw. dem Rohöl und den Butylstopfen durch Schrägstellung der Kulturflaschen vermieden.

Die ersten Anreicherungen von nitratreduzierenden Bakterien wurden in speziellen 1 l Glasflaschen (Abb. 9) durchgeführt. Diese Anreicherungsansätze enthielten die aromatischen Kohlenwasserstoffe als verdünnte Lösungen in dickflüssigem Paraffin in vertikalen, die Glasflaschen durchspannenden Silikonschläuchen. Die aromatischen Kohlenwasserstoffe konnten permanent aus dem Silikonschlauch in das Medium diffundieren, während das Paraffin größtenteils zurückgehalten wurde. Folgepassagen wurden in flachen Glasflaschen (125 ml) mit dickflüssigem Paraffin als Trägerphase für die aromatischen Kohlenwasserstoffe durchgeführt. Während der Anreicherungsphase der nitratreduzierenden Bakterien wurde kein Ascorbat zugesetzt, da dieses als zusätzliches leicht abbaubares Anreicherungssubstrat das Wachstum unerwünschter Bakterien gefördert hätte.

Isolierung

Zur Isolierung von Alkylbenzol-abbauenden nitratreduzierenden Bakterien wurden Agarverdünnungsreihen (Widdel und Bak 1992) mit Ascorbat (4 mM) als Reduktionsmittel verwendet. Die Agarverdünnungsreihen wurden mit den entsprechenden in Paraffin verdünnten Alkylbenzolen (2 %, v/v) überschichtet (Rabus et al. 1993).

Die Reinheit der Isolate wurde regelmäßig durch Phasenkontrast-Mikroskopie überprüft. Als zusätzliche Reinheitskontrolle wurde den Kulturen Hefeextrakt (0,5 g/l) und Glucose oder Pyruvat (5 mM) zugesetzt. Anschließend wurden die Kulturen wieder mikroskopiert.

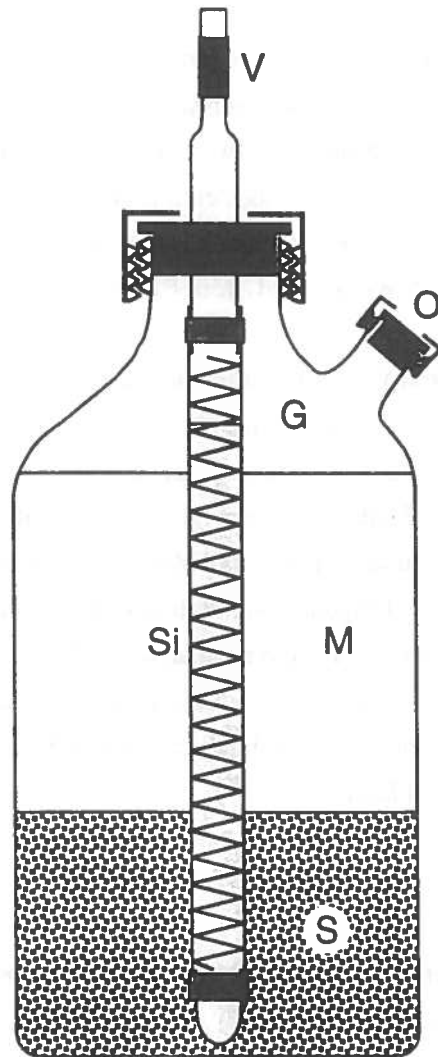


Abb. 9: Spezielle Glasflasche für die anaerobe Anreicherung von Alkylbenzol-abbauenden nitratreduzierenden Bakterien. Die Flaschen wurden mit ca. 400 ml Sediment (S) aus Süßwasser-Standorten und 600 ml Mineralmedium (M) gefüllt. Der Gasraum (G) enthielt eine sauerstofffreie Atmosphäre aus N_2/CO_2 (90/10, v/v). Zum Verschließen dienten Stopfen aus Butylgummi. Alkylbenzole wurden als 2 %ige Lösung in dickflüssigem Paraffin (30 ml) in einen großen (innerer Durchmesser, 18 mm), dünnwandigen (1 mm) und am unteren Ende mit einer Glaskappe verschlossenen Silikonschlauch (Si) gegeben. Eine rostfreie Stahlspirale wurde in den Silikonschlauch eingesetzt, damit dieser während der Inkubation nicht kollabieren konnte. Das obere Ende des Silikonschlauches war mit einer Glasöffnung verbunden, die mit einem kurzen Stück Viton-Schlauch (V) und einem kurzen Glasstab verschlossen war. Die Probenahmen für die chemische Analyse und die Freisetzung von gebildetem N_2 erfolgte mit einer Spritze durch den Stopfen an der seitlichen Öffnung (O) der Glasflasche.

2.4. Kultivierungsmethoden und Gewinnung von Zellmasse

Als Maß für das Wachstum wurden die Zunahme der optischen Dichte bei 660 nm und die H₂S-Bildung bzw. Nitratreduktion herangezogen.

2.4.1. Stammkulturen

Die routinemäßige Anzucht von *Desulfobacula toluolica* wurde in Schraubdeckelflaschen (50 ml) durchgeführt. Nachdem das Grundmedium mit organischem Substrat (4 mM Benzoat) und Dithionit versetzt worden war, wurde mit ca. 5 % (v/v) einer gut gewachsenen Stammkultur beimpft. Danach wurden die Schraubdeckelflaschen luftblasenfrei verschlossen. Die Stammkulturen wurden ca. alle 4 bis 6 Wochen in neues Medium übertragen.

2.4.2. Wachstumsversuche

Wachstumsversuche mit *Desulfobacula toluolica* erfolgten in 20 ml Schraubdeckelröhrchen. Aus den Vorratsflaschen (B. 2.2.2.) wurden jeweils 15 ml des Grundmediums mit Glaspipetten in die sterilen Röhrchen gefüllt. Beim Auslaufen des Mediums wurde die Spitze der Glaspipette immer knapp unter der ansteigenden Flüssigkeitsoberfläche mitgeführt, um den Kontakt mit Luft so gering wie möglich zu halten. Danach wurden Dithionit, die jeweils benötigten Elektronendonatoren und weitere Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Anschließend wurden die Röhrchen sofort nach der Hungate-Technik (Bryant 1972) mit N₂/CO₂ (90/10, v/v) steril begast und mit Butylsepten und Gewinde-Lochkappen anoxisch verschlossen. Beimpft wurden die Ansätze durch die Injektion von 5 % (v/v) dichtgewachsener Stammkultur mit einer sterilen, mit N₂-gespülten Spritze. Wurde Rohöl oder ein wasserunlösliches Substrat in einer inerten Trägerphase eingesetzt, wurden die Röhrchen schrägliegend mit der Öffnung nach unten auf einem Schüttler (70 rpm) inkubiert (Abb. 10). Dabei wurde einerseits der Kontakt zwischen Kohlenwasserstoffen und Butylsepten vermieden und andererseits eine optimale Diffusion der Substrate aus der Trägerphase in das Medium gewährleistet. Ansätze mit wasserlöslichen Substraten wurden aufrecht stehend inkubiert.

Routinemäßige Anzucht und anaerobe Wachstumsversuche wurden bei den Alkylbenzol abbauenden nitratreduzierenden Isolaten in 20 ml Schraubdeckelröhrchen durchgeführt. Die Röhrchen wurden wie zuvor bereits für *Desulfobacula toluolica* beschrieben anoxisch mit Grundmedium befüllt, das diesmal Ascorbat enthielt. Dann wurde das Medium mit Substraten supplementiert, anoxisch unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre verschlossen und inkubiert.

Stammkulturen wurden alle 3 bis 4 Wochen transferiert.

Aerobe Wachstumsversuche erfolgten in Schraubdeckelflaschen (50 ml), deren Schraubdeckel Gummidichtungen mit Teflonbeschichtung enthielten. Die Flaschen wurden mit ascorbatfreiem Grundmedium ohne oder mit Nitrat (10 mM) gefüllt. Das Medium wurde mit anaerob gewachsenen Kulturen (5 %, v/v) beimpft. Aromatische Kohlenwasserstoffe und andere Substrate wurden auf die gleiche Weise zugegeben, wie für anaerobe Wachstumsansätze bereits beschrieben wurde. Der Gasraum enthielt sterile Luft mit 10 % (v/v) CO₂. Die Menge an Sauerstoff im Gasraum (40 ml) genügte für die vollständige Oxidation der eingesetzten Substrate.

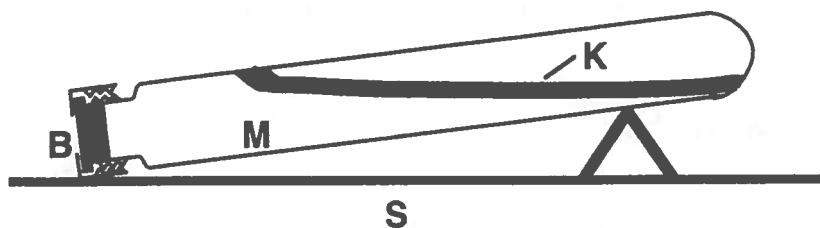


Abb. 10: Wachstumsansätze von *Desulfobacula toluolica* und nitratreduzierenden Isolaten auf Kohlenwasserstoffen, die in einer lipophilen Trägerphase gelöst waren. Die Schraubdeckelröhrchen wurden mit den Butylsepten (B) nach unten inkubiert, so daß die über dem Medium (M) liegende Kohlenwasserstoffphase (K) nicht mit den Septen in Berührung kommen konnte. Die Röhrchen wurden bei niedriger Umdrehungszahl (70 rpm) auf einem Schüttler (S) inkubiert.

2.4.3. Bilanzierung der anaeroben Ethylbenzoxidation und Bestimmung von anderen Wachstumsparametern

Die Bilanz des anaeroben Ethylbenzolabbaus beim nitratreduzierenden Stamm EbN1 wurde in flachen Glasflaschen (500 ml) bestimmt. Unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre (90/10, v/v) wurden die Flaschen mit Grundmedium (390 ml) und Inokulum (10 ml) gefüllt und mit Butylstopfen und Schraubdeckeln mit Öffnung anoxisch verschlossen. Die Flaschen wurden dann mit dem Flaschenhals nach unten gelegt. Anoxisches, steriles Heptamethylnonan (10 ml) wurde mit sterilen, mit N₂-gespülten Plastikspritzen durch die Butylstopfen zugegeben. Danach wurden definierte Mengen an sterilem Ethylbenzol mit einer sterilen, mit N₂-gespülten Mikroliterspritze zugegeben. Auf diese Weise konnte sich das Ethylbenzol in der Heptamethylnonanphase lösen, ohne mit den Butylstopfen in Kontakt zu kommen. Die Kulturen wurden auf die gleiche Weise

auf einem Schüttler inkubiert, wie für Routineanzuchten beschrieben wurde (B. 2.4.2.). Proben für chemische Analysen und die Bestimmung der optischen Dichte wurden mit sterilen, mit N₂-gespülten Plastikspritzen entnommen.

Die Trockenmasse der Zellen wurde bestimmt, indem die Zellen zentrifugiert, mit Ammoniumacetat (20 mM) gewaschen und bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden. Die optische Dichte wurde bei 660 nm bestimmt. Das Verhältnis von optischer Dichte zu Zellmasse pro Volumen wurde einmal für ein definiertes Kulturvolumen bestimmt.

2.4.4. Anaerobe Wachstumsversuche mit Rohöl

Bei allen Wachstumsversuchen mit sulfatreduzierenden oder nitratreduzierenden Bakterien auf Rohöl wurden Rohöl und reduziertes Medium über Nacht zusammen unbeimpft inkubiert, um im Rohöl eventuell noch vorhandene Spuren von Sauerstoff durch Reduktion zu entfernen.

Die anaerobe Verwertung von Rohöl durch *Desulfobacula toluolica* und *Desulfococcus multivorans* wurde in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) getestet (B. 2.4.2.). Das Rohöl wurde dabei sowohl unverdünnt als auch in Paraffin (1:10) verdünnt eingesetzt.

Die H₂S-Bildung der sulfatreduzierenden β 4-Anreicherung in Abhängigkeit von der eingesetzten Ölmenge bzw. dem Vorhandensein von Sulfat wurde in flachen Spezialgefäßen (Abb. 11) untersucht. Diese Kulturgefäße (ca. 120 ml) erlaubten aufgrund ihres günstigen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen eine optimale Substratversorgung aus der Ölphase. Die Ansätze wurden mit Kulturen, die unter Sulfatlimitierung (10 mM) gewachsen waren, beimpft, um mit dem Inokulum kein Sulfat zu verschleppen. Den Wachstumsansätzen wurden verschiedene Rohölmengen (0,1; 0,5; 1,0 und 4,0 ml) zugegeben. Folgende Kontrollansätze wurden hergestellt: unbeimpftes Medium mit 2 ml Rohöl; beimpftes Medium; beimpftes, sulfatfreies Medium mit 2 ml Rohöl; beimpftes, sulfatfreies Medium. Die Ansätze wurden 59 Tage ruhig liegend bei 28 °C inkubiert. Während der Inkubation wurden mit einer mit N₂-gespülten Mikroliterspritze regelmäßig Proben für die quantitative Sulfidbestimmung entnommen. Am Ende der Inkubation wurde das Öl für die spätere Analyse der aromatischen bzw. aliphatischen Fraktion gewonnen.

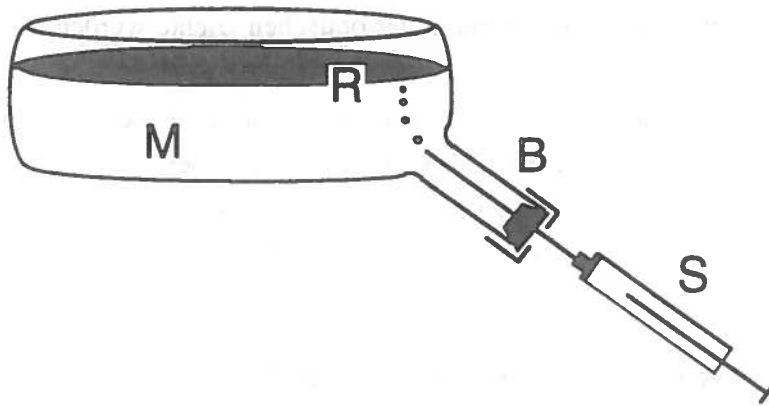


Abb. 11: Wachstumsansätze der sulfatreduzierenden β 4-Anreicherung auf Rohöl. Das Rohöl (R) wurde mit einer mit N_2 -gespülten Mikroliterspritze (S) in flache Spezialgefäße (Durchmesser: 84 mm; Höhe: 33 mm) mit 115 ml Medium (M) unter einer kleinen Gasphase aus N_2/CO_2 (90/10, v/v) gegeben. Die schmale Öffnung (innerer Durchmesser: 9,5 mm) der Kulturgefäße war mit einem Butylseptum (B) und Schraubdeckel mit Loch verschlossen. Nach Vorinkubation über Nacht wurden die Ansätze durch anoxisches Einspritzen von 5 ml einer dicht gewachsenen Kultur beimpft. Proben für die quantitative Sulfidbestimmung wurden mit einer mit N_2 -gespülten Mikroliterspritze durch die Butylsepten entnommen.

Der zeitliche Verlauf der Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch die β 4-Anreicherung wurde in Flachflaschen (250 ml), die mit Butylstopfen und Schraubdeckeln mit Öffnung verschlossen waren, durchgeführt. Die Ansätze bestanden aus je 200 ml Medium mit bzw. ohne Sulfat, 7 ml sauerstofffreiem Rohöl und 12 ml sulfatfreiem Inokulum. Die Ansätze wurden liegend mit dem Flaschenhals nach unten inkubiert. Während der Inkubation und der Probenahme wurde darauf geachtet, daß die Ölphase nicht mit den Butylstopfen in Berührung kam. Für die Entnahme von Ölproben wurden die Ansätze unter kräftigem Schütteln aufrecht hingestellt. Nachdem sich Öl- und Wasserphase vollständig getrennt hatten, wurden die Ölproben (1 ml) mit sterilen, mit N_2 -gespülten Plastikspritzen mit langen Kanülen (0,8 x 120 mm) über das Septum entnommen.

Versuche mit den nitratreduzierenden Isolaten EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 zur Bestimmung der Ölmengen, die jeweils zur Reduktion von 10 mmol Nitrat pro l Medium nötig waren, wurden in Schraubdeckelröhrchen (20 ml) durchgeführt.

Wachstum und Nitratreduktion der Isolate mit Rohöl als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wurden in Flachflaschen (500 ml), die mit Butylstopfen und Schraubdeckeln verschlossen waren, untersucht. Anaerobe Wachstumsansätze enthielten 400 ml Medium, 20 ml Inokulum und 9 ml (für Stamm ToN1), 6 ml (für Stamm EbN1), 15 ml (für Stamm PbN1) bzw. 6 ml (für Stamm mXyN1) steriles, sauerstofffreies Öl. Als Kontrollen dienten die gleichen Ansätze, hier allerdings mit nitratfreiem Medium, sowie ein steriler Ansatz mit unbeimpftem, nitrathaltigem Medium und 7 ml sterilem, sauerstofffreiem Öl. Die Ansätze

wurden mit dem Flaschenhals nach unten auf dem Schüttler (70 rpm) inkubiert, ohne daß das Rohöl mit dem Butylstopfen in Berührung kam. Proben (0,5 ml) für die Bestimmung der optischen Dichte und der Konzentration von Nitrat und Nitrit wurden mit sterilen, N₂-gespülten Plastikspritzen entnommen. Ölproben (1 ml) wurden, wie oben beschrieben, mit N₂-gespülten Plastikspritzen mit langen Kanülen (0,8 x 120 mm) steril entnommen.

2.4.5. Massenanzuchten

Für die Anzucht von Zellmasse des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfobacula toluolica* bzw. des nitratreduzierenden Stammes EbN1 für Zellsuspensionsversuche (B. 2.5.) oder für die Gewinnung von Rohextrakten (B. 4.2.) wurden 2 l Steilbrustflaschen mit Spezialaufsatz (Abb. 12) verwendet. Die Grundmedien (B. 2.2.2.) wurden bereits in den Kulturgefäßen hergestellt. Über den Begasungsschlauch konnte der Gasraum über einen Niederdruckregler (bis 150 mbar) mit N₂/CO₂ (90/10, v/v) begast werden. Das Medium wurde mit Dithionit (für *Desulfobacula toluolica*), in Heptamethylnonan (20 ml) gelöstem Toluol (für *Desulfobacula toluolica*) bzw. Ethylbenzol (für Stamm EbN1) oder Benzoat versetzt und aus Vorkulturen mit 5 % (v/v) beimpft. Während der Inkubation wurde das Kulturmedium mit Hilfe eines Magnetrührers ständig durchmischt. Für die anaerobe Ernte der Massenanzuchten konnten die 2 l Kulturgefäße direkt in das Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, Michigan, USA) eingeschleust werden. Dann wurde bei Anzuchten auf Toluol bzw. Ethylbenzol der gesamte Flascheninhalt in einen Scheidetrichter gefüllt, um die Kulturflüssigkeit von der Kohlenwasserstoffphase abzutrennen.

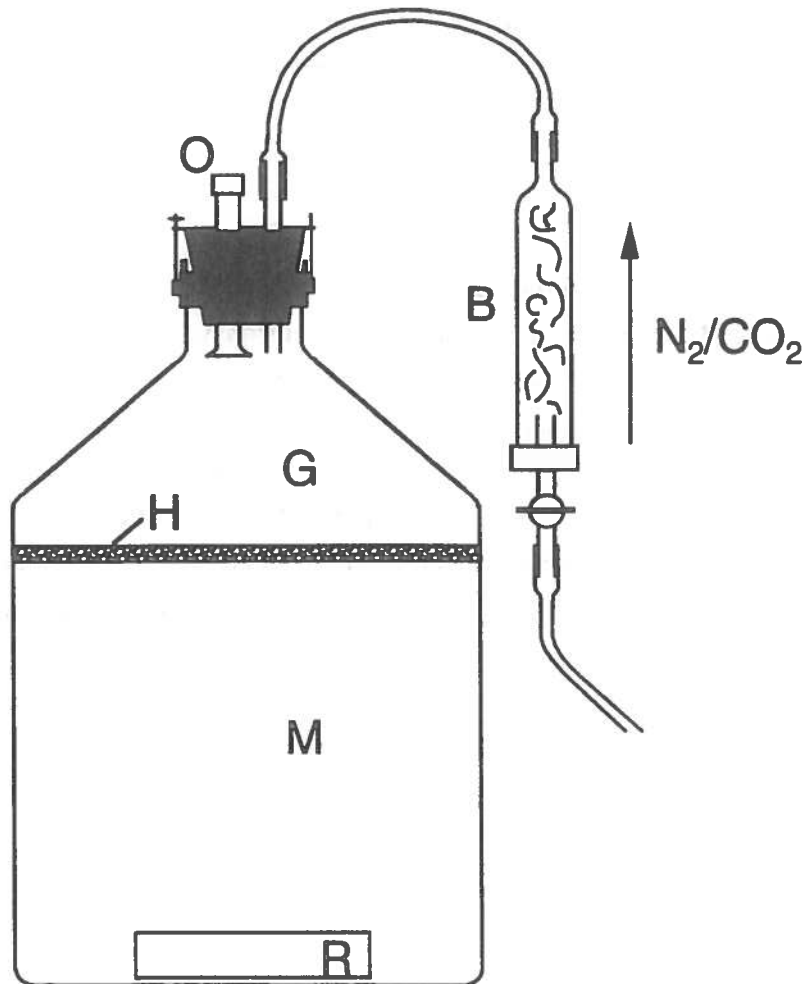


Abb. 12: 2 l Steilbrustflasche mit Spezialaufsatz für die Massenzuchten von *Desulfobacula toluolica* und Stamm EbN1. Der Gasraum (G) konnte über den Begasungsschlauch (B) mit N_2/CO_2 (90/10, v/v) begast werden. Über die Öffnung (O) wurde das Medium (M) mit Substraten etc. versetzt und beimpft. Die Kulturflüssigkeit und die inerte Trägerphase aus Heptamethylnonan (H) wurden während der Inkubation mit einem Magnetrührer (R) sanft gerührt.

2.5. Zellsuspensionsversuche

Zellsuspensionsversuche mit *Desulfobacula toluolica*

Die Zellsuspensionsversuche für Aktivitätsbestimmungen mit dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfobacula toluolica* wurden unter strikt anoxischen Bedingungen durchgeführt. Frisch geerntete (B. 2.4.5.), nicht-stationäre Kulturen ($OD_{660} = 0,2$) wurden in einem Anaerobenzelt in gasdicht verschließbare Zentrifugenbecher (500, Nalgene) überführt und bei 6000 rpm (JA10 Rotor, Beckmann) in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckmann, Palo Alto, Californien, USA) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/40 des Ausgangsvolumens in Salzwassermedium (B. 2.2.2.) resuspendiert. Im Anaerobenzelt wurde die nun 40-fach konzentrierte Kulturflüssigkeit in Portionen von 10 ml auf Schraubdeckelröhrchen verteilt und mit Dithionit (50 μ l 50 mg/ml $Na_2S_2O_4$) und organischem Substrat (2 mM Benzaldehyd bzw. 2 % (v/v) Toluol in 0,5 ml Heptamethylnonan) versetzt. Danach wurden die Röhrchen mit Butylsepten und Schraubdeckeln gasdicht verschlossen. Die verwendeten Butylsepten und Zentrifugenbecher waren mindestens einen Tag lang in dem Anaerobenzelt inkubiert worden, um Reste von Sauerstoff zu entfernen. Außerhalb des Anaerobenzeltes wurde dann der N_2 -Gasraum in den Röhrchen gegen eine N_2/CO_2 (90/10, v/v) Atmosphäre ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellsuspensionen wie Wachstumsansätze (B. 2.4.2.) in Schräglage bei 70 rpm auf dem Schüttelbrett für ca. 30 h inkubiert. Während der Inkubation wurde einzelnen Ansätzen einmalig nach 3 Stunden 100 μ M Benzylalkohol bzw. in Intervallen von 30 Minuten 5, 20 oder 50 μ M Benzylalkohol durch das Butylseptum mit einer Mikroliterspritze zugegeben. Die Probenahme für die quantitative H_2S -Bestimmung erfolgte durch die Butylsepten mit einer Mikroliterspritze. Proben für die quantitative Bestimmung von Benzylalkohol wurden am Ende der Inkubation mit einer Plastikspritze durch das Butylseptum entnommen.

Für die Bildung von Dead-End-Produkten aus *o*-Xylol oder *p*-Xylol bzw. *p*-Fluortoluol wurden Zellsuspensionen genau wie zuvor für die Aktivitätsbestimmungen beschrieben hergestellt. *o*-Xylol bzw. *p*-Xylol wurden zusammen mit Toluol als verdünnte Lösung in Heptamethylnonan (*o*-Xylol oder *p*-Xylol und Toluol jeweils 1 %, v/v) den Zellsuspensionen zugesetzt. Aufgrund seiner Giftigkeit wurde *p*-Fluortoluol nur in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) zusammen mit 2,0 % (v/v) Toluol in Heptamethylnonan zugegeben. Nach 3 Stunden bzw. am Ende der Inkubation wurden über mit N_2 -gespülten Plastikspritzen Proben für die chemische Analyse entnommen.

Zellsuspensionsversuche mit dem nitratreduzierenden Stamm EbN1

Bei der anaeroben Herstellung und Inkubation von Zellsuspensionen aus frisch geernteten, nicht-stationären ($OD_{660} = 0,2$) Anzuchten des nitratreduzierenden Stammes EbN1 wurde prinzipiell genauso verfahren wie bei *Desulfobacula toluolica* (B. 2.5.). Allerdings wurden die Zellpellets nach der Zentrifugation in einem größeren Suspensionsvolumen, nämlich der Hälfte des Ausgangsvolumens an nitratfreiem Grundmedium (B. 2.2.2.) resuspendiert; in dichteren Zellsuspensionen ($OD_{660} > 0,4$) machte sich die nitratreduzierende Aktivität mit endogenen Elektronendonatoren in der Negativkontrolle ohne organisches Substrat bereits störend bemerkbar. Die Zellsuspensionen wurden in Portionen von 50 ml auf Serumflaschen (60 ml) verteilt, mit 5 % (v/v) Ethylbenzol, 1 % (v/v) Acetophenon, 2 mM 1-Phenylethanol, 1 mM Benzylalkohol, 1 mM Benzaldehyd oder 3 mM Benzoat versetzt und mit Septen und Alukappen verschlossen. Gestartet wurde die Inkubation der Zellsuspensionen nach anoxischer Zugabe von Nitrat (10 mM). Während der Inkubation wurden zu den entsprechenden Ansätzen zweimal je 1 mM Benzylalkohol bzw. Benzaldehyd gegeben. Proben für die Bestimmung von Nitrat und Nitrit wurden mit anoxischen Plastikspritzen entnommen.

3. Analytische Methoden

3.1. Qualitativer Schnellnachweis von Schwefelwasserstoff

Als Reagenz für den schnellen, einfachen Nachweis von Sulfid diente eine 5 mM $CuSO_4$ -Lösung in 50 mM HCl. Von der zu prüfenden Kultur wurden 0,25 ml in 1 ml Reagenz pipettiert. Dabei mußte die Pipettenspitze in das Reagenz eintauchen, um Verluste des flüchtigen H_2S zu vermeiden. Sofort nach Zugabe der Probe wurde der Ansatz durch Schütteln gemischt. Als Reaktionsprodukt entstand braunes, anfangs kolloidales CuS , das nach einigen Minuten in Form brauner Flocken ausfiel. Anhand der Intensität der Braunfärbung war eindeutig zu erkennen, ob in einem Ansatz im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle viel, wenig oder kein Schwefelwasserstoff gebildet worden war.

3.2. Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff

Die quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff wurde nach einem von Cline (1969) beschriebenen und von Aeckersberg (1989) modifizierten Verfahren wie folgt durchgeführt.

Reagenzien

Lösung A: Zinkacetat-Lösung

$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20,0 g
Essigsäure (100 %)	1,0 ml
dest. H_2O	ad 1000,0 ml

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

Unter Rühren im Eisbad wurden 200 ml konz. H_2SO_4 langsam in 500 ml dest. H_2O gegeben. Der abgekühlten verdünnten Schwefelsäure wurden 2 g Dimethyl-*p*-phenylendiammonium-dichlorid zugesetzt. Danach wurde in einem Meßzylinder mit dest. H_2O auf 1000 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4 °C dunkel aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung 1:2,5 mit dest. H_2O verdünnt. Ein Kontakt dieser Lösung mit der Haut sollte vermieden werden, da die Lösung stark sauer und das Reagenz carcinogen ist.

Lösung C:

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3\cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10,0 g
konz. H_2SO_4	2,0 ml
dest. H_2O	ad 1000,0 ml

Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung 1:50 mit dest. H_2O verdünnt.

Durchführung

In ein kleines Reagenzglas (120 x 11 mm) wurde wie folgt zusammengegeben:

- 1 ml Lösung A
- 2-20 μl Probe (10-100 nmol H_2S pro Ansatz)
- 1 ml dest. H_2O
- 1 ml Lösung B, 1:2,5 verdünnt
- 1 ml Lösung C, 1:50 verdünnt

Die Proben wurden den verschlossenen Kulturgefäßen durch die Stopfen mit Mikroliterspritzen (10 oder 50 μl) entnommen und in die Zinkacetatlösung pipettiert. Dabei wurde die Spitze der Mikroliterspritze in die Lösung getaucht. Nachdem 1 ml dest. H_2O und 1 ml der verdünnten

Lösung B zugegeben worden waren, wurde der Reaktionsansatz auf einem Reagenzglasschüttler (Reax 2000, Heidolph) durchmischt. Unmittelbar danach wurde 1 ml der verdünnten Lösung C zugesetzt und ein weiteres Mal durchmischt. Die Ansätze wurden im Dunkeln und bei Raumtemperatur ca. 20 min inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 670 nm mit einem UV-VIS Spektralphotometer (Modell UV-1202, Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen.

Zur Eichung der quantitativen Sulfidbestimmung wurde ein Na_2S -Standard hergestellt. Ein farbloser klarer Kristall $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ wurde auf einem Sieb mit dest. H_2O abgespült, um Oxidationsprodukte zu entfernen. Durch Abtupfen des Siebes von unten mit Zellstoff wurde der Kristall dann von anhängenden Tropfen befreit. Danach wurde der Kristall gewogen und sofort in einen 1 l Meßkolben, der ca. 900 ml sauerstofffreies dest. H_2O enthielt, gegeben. Der Meßkolben wurde mit dest. H_2O auf 1000 ml aufgefüllt, mit N_2 begast und mit einem Stopfen verschlossen. Nachdem das Na_2S durch Schwenken gelöst und vermischt worden war, wurde die Na_2S -Lösung über einen Schlauch unter Begasung mit N_2 auf 100 ml Serumflaschen verteilt. Diese wurden mit N_2 begast, mit einem Butylseptum und Alukappen verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt. Die mit Hilfe des Standards erstellte Eichkurve (G. Abb. 1) war nur bis zu einer Extinktion von ca. 0,6 linear. Der Extinktionskoeffizient nahm bei zu hohen Konzentrationen von Na_2S ab.

3.3. Bestimmung von Nitrat und Nitrit durch Ionenchromatographie

Die quantitative Bestimmung von Nitrat und Nitrit erfolgte an einer HPLC-Anlage der Firma Sykam (Gilching/München, Deutschland) mit einer A09 Mikro-Anionenaustauschersäule (125 x 3 mm). Als Laufmittel wurde eine 70 mM Lösung von NaCl in bidest. H_2O bei einer Flußrate von 1 ml/min verwendet. Die Säulentemperatur lag konstant bei 65 °C. Nitrat (Retentionszeit: 2,5 min) und Nitrit (Retentionszeit: 1,8 min) wurden bei 220 nm mit einem Spektralphotometer (Modell S 3200, Sykam, Gilching/München, Deutschland) detektiert (G. Abb. 2). Die Proben aus den Kulturansätzen wurden vor der Injektion zentrifugiert (14.000 rpm, Centrifuge 5415C, Eppendorf, Deutschland), filtriert (0,45 µm, Nylon Arcodisc 4, GelmanSciences, Michigan, USA) und 1:10 in bidest. H_2O verdünnt. Die aufbereiteten Proben wurden mit Hilfe eines Autosamplers (Modell 851-AS, Jasco, Tokyo, Japan) injiziert. Die Datenaufnahme und Datenbearbeitung wurde mit der Pyramid[®]-Software (Axxiom Chromatography, Moorpark, Californien, USA) durchgeführt. Für die Eichung der quantitativen Nitrat- und Nitrit-Bestimmung wurde eine Lösung von KNO_3 und KNO_2 (je 10 mM) und Verdünnungen dieser Lösungen in bidest. H_2O verwendet. Der

Konzentrationsbereich der Eichung lag zwischen 0,001 und 1,0 mM (G. Abb. 3).

3.4. Photometrische Bestimmung von Ammonium

Ammonium wurde mit der Bildungsreaktion von Indophenol bestimmt (Marr et al. 1988).

Reagenzien

Lösung A: 3 g Phenol und 0,003 g Na-Nitroprussid wurden in 100 ml dest. H₂O gelöst.

Lösung B: 2 g NaOH wurden in 80 ml dest. H₂O gelöst. Danach wurden 2 ml einer 13 %igen NaClO-Lösung zugegeben. Mit dest. H₂O wurde auf 100 ml aufgefüllt.

Beide Lösungen wurden in dunklen Flaschen aufbewahrt und vor jeder Bestimmung neu hergestellt.

Durchführung

In einem großen Reagenzglas (160 x 11 mm) wurden wie folgt zusammengegeben:

dest. H ₂ O	10,0 ml
10-50 µl Probe (NH ₄ ⁺ -Konzentration < 0,1 mM)	
Lösung A	1,0 ml
Lösung B	1,0 ml

Nach Zugabe von dest. H₂O, Probe und Lösung A wurde der Ansatz auf einem Reagenzglasschüttler durchmischt. Nach anschließender Zugabe von Lösung B wurde erneut durchmischt. Der fertige Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die Absorption wurde dann bei 635 nm gemessen. Mit Verdünnungen von 0,001-0,1 mM (NH₄)₂SO₄ wurde eine Eichung vorgenommen.

3.5. Bestimmung von Distickstoffoxid durch Gaschromatographie

N₂O wurde an einem Gaschromatographen (GC-8A, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt. Die Trennung erfolgte auf einer Poraplot Q-Säule (3 mm x 2 m) bei einer Temperatur von 40 °C. Als Trägergas wurde N₂ mit einer Flußrate von 32 ml/min eingesetzt. Die Analyse wurde von Dr. Jens Harder durchgeführt.

3.6. Bestimmung von aromatischen Verbindungen durch Reversed-Phase-Chromatographie

Trennmethode

Die Trennung aromatischer Verbindungen erfolgte an einer HPLC-Anlage (Sykam, Gilching/München, Deutschland) unter isokratischen Bedingungen auf einer OD S2 Reversed-Phase-Säule (5 x 250 mm). Die Bestimmung von Ethylbenzol (Retentionszeit: 5,9 min) wurde mit einem Laufmittel aus 80 % Acetonitril in bidest. H₂O durchgeführt. Zur Eluierung polarer aromatischer Verbindungen wurde ein Laufmittel aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in bidest. H₂O verwendet. Die Trennung der aromatischen Verbindungen erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 25 °C. Die Detektion wurde mit einem Hochgeschwindigkeits-Vielkanal-UV/VIS-Detektor (Modell S 3206, Linear Instruments Cor., Nevada, USA) in einem Wellenlängenbereich von 195 bis 360 nm durchgeführt. Für die Datenaufnahme und Datenbearbeitung wurde die UVIS-206 Software (Sykam, Gilching/München, Deutschland) eingesetzt. Mit diesem System konnten während eines Laufes gleichzeitig Retentionszeit und UV-Spektren der getrennten Substanzen erfaßt werden (G. Abb. 4). Standards wurden in den entsprechenden Laufmitteln verdünnt. Unter den beschriebenen Bedingungen konnten (Retentionszeiten sind in Klammern angegeben) *p*-Hydroxybenzylalkohol (3,7 min), *p*-Hydroxybenzoat (4,3 min), *p*-Hydroxybenzaldehyd (5,6 min), Ethylbenzol (5,9 min), Benzylalkohol (6,4 min), Benzylsuccinat (6,7 min), Benzoat (7,5 min), *p*-Fluorbenzoat (8,5 min), *p*-Cresol (10,6 min), *p*-Methylbenzoat (11,0 min), und Benzaldehyd (11,6 min) getrennt werden (G. Abb. 5).

Probenvorbereitung

Proben aus Kulturansätzen wurden vor der Injektion aufbereitet. Bei der Bestimmung von Ethylbenzol in Wachstumsansätzen von Stamm EbN1 (B. 2.4.3.) sollten während der Probenahme und Injektion Abdampfverluste aufgrund der Flüchtigkeit von Ethylbenzol vermieden werden. Deshalb wurden mit N₂-gespülte Plastikspritzen (1 ml) mit aufgesetzten, gegen Lösungsmittel resistenten Membranfiltern (0,2 µm) verwendet, um bereits bei der Probenahme zellfreie Überstände zu erhalten. Die Proben wurden anschließend mit einer Mikroliterspritze (100 µl) aus den Plastikspritzen entnommen und direkt injiziert.

Für die Bestimmung von Metaboliten in Zellsuspensionen von *Desulfobacacula toluolica* wurde die von Evans et al. (1992) beschriebene Methode zur Gewinnung von Überständen und Zellextrakten modifiziert. Zur Analyse von Substanzen im Überstand wurden Proben (5 ml) bei 20.000 rpm (JA-21 Rotor, Beckmann) in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckmann, Palo Alto,

Californien, USA) zentrifugiert. Die Überstände wurden filtriert (0,2 µm Membranen) und in Glasfläschchen bei 4 °C gelagert. Vor der Injektion wurden diese Überstände mit Acetonitril (Endkonzentration: 35 %, v/v) und H₃PO₄ (Endkonzentration: 45 mM) versetzt. Für die Analyse von Substanzen in den Zellen wurden Bakterien aus Zellsuspensionen (B. 2.5.) abzentrifugiert und in 0,5 ml 5 M H₃PO₄ aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation bei 20.000 rpm (JA-21 Rotor, Beckmann) in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckmann) und Filtration (0,2 µm Membran) wurde der Überstand 2 mal mit je 2 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und anschließend im N₂-Strom abgeblasen. Die Rückstände wurden durch kräftiges Schütteln in je 1 ml 1 M HCl resuspendiert und in Glasfläschchen bei 4 °C aufbewahrt. Diese Lösungen wurden direkt auf die HPLC-Säule injiziert.

3.7. Photometrische Bestimmung von Ethylbenzol

Die quantitative Bestimmung von in Heptamethylnonan gelöstem Ethylbenzol aus Wachstumsansätzen von Stamm EbN1 wurde photometrisch durchgeführt. Die Probe wurde in reinem Heptamethylnonan 1:10 bis 1:80 verdünnt und deren Absorption bei 254 nm bestimmt. Die Eichung erfolgte mit definierten, frisch hergestellten Verdünnungen von Ethylbenzol in Heptamethylnonan.

3.8. Bestimmung von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Rohöl

3.8.1. Fraktionierung von Rohöl durch Medium-Pressure-Liquid-Chromatographie

Die Fraktionierung von bis zu 20 Rohölproben in Serie wurde nach der von Radke et al. (1980) beschriebenen Methode mit einer automatischen MPLC-Anlage im Forschungszentrum Jülich (KfA Jülich, Deutschland) durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Rohölproben wurden in Portionen à 50 mg in Schraubdeckelfläschchen abgewogen und mit

1 ml *n*-Hexan verdünnt. Über ein Injektionsventil wurden diese Proben mit hexangespülten Mikroliterspritzen auf Probenschleifen aufgegeben. Pro aufgetragener Probe wurde mit 1 ml dest. *n*-Hexan nachgespült.

Fraktionierung durch MPLC

Die MPLC-Anlage bestand aus Einzelteilen verschiedener Hersteller. Die Anlage ist in der verwendeten Zusammenstellung bei M. Köhnen und H. Willsch, Jülich, kommerziell erhältlich.

Die Trennung an der MPLC-Anlage wurde mit dest. *n*-Hexan als Laufmittel bei einer Flußrate von 3-4 ml/min, einem Druck von 1 MPa und Raumtemperatur durchgeführt. An der Vorsäule wurden polare Verbindungen, nicht aber aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe, zurückgehalten. Die Vorsäule (10 x 100 mm) enthielt am Säuleneingang eine dünne Schicht groben Kieselgels, das dazu diente, Schwebstoffe zurückzuhalten. Der Hauptteil der Säule wurde mit feinem Kieselgel 100 gefüllt, das zur Adsorption polarer Substanzen diente. Die Kieselgelpackungen der Vorsäulen wurden nach jedem Lauf erneuert. Aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe gelangten gemeinsam auf die Hauptsäule (250 x 10 mm; Aluminiumoxid). Aromaten wurden im oberen Teil der Hauptsäule zurückgehalten, während die Aliphaten nach ca. 2 min eluierten. Detektiert wurde die Aliphatenfraktion mit Hilfe eines differentiellen Refraktometers. Nach vollständiger Elution der Aliphatenfraktion wurde die Laufrichtung des *n*-Hexans über ein Backflush-Ventil umgekehrt. Dadurch wurde die zurückgehaltene Aromatenfraktion entgegengesetzt zur bisherigen Laufrichtung von der Hauptsäule eluiert. Die Detektion der Aromatenfraktion erfolgte während der rückläufigen Elution mit einem UV-Detektor bei 254 nm. Die einzelnen Fraktionen (Aliphaten 32 ml, Aromaten 72 ml, beide in *n*-Hexan; Heterokomponenten nach *off line*-Rückspülung in 50 ml Ethanol) wurden in einem Fraktionskollektor gesammelt.

Nach der Fraktionierung der aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffe konnten die N-, S- und O-haltigen polaren Verbindungen durch Spülen der Vorsäulen mit Ethanol gewonnen werden.

Entfernung des Lösungsmittels

n-Hexan wurde aus jeder der Fraktionen (15-50 ml) in einem speziellen Konzentrator (Modell Turbo Vap 500, Zymark, Hopkinton, Massachusetts, USA) soweit entfernt, daß nur noch Rückstände von ca. 1 ml zurückblieben. Die eingeeengten Fraktionen wurden mit Pasteurpipetten in Schraubdeckelfläschchen überführt und bei 4 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

3.8.2. Bestimmung von aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Aromatische Kohlenwasserstoffe

Die Identifizierung von *m*-Propyltoluol beruhte auf massenspektrometrischen Daten und dem Vergleich von relativen GC-Retentionszeiten mit Literaturangaben (Hartgers et al. 1992). Alle anderen Alkylbenzole wurden durch den Vergleich mit authentischen Standards identifiziert. Die gaschromatographischen Analysen wurden an einem HP 5890 GC (Hewlett Packard, Waldbronn) auf einer Ultra 2 Fused Silica Kapillarsäule (50 m; innerer Durchmesser 0,21 mm; Filmdicke 0,33 μm) mit Helium als Trägergas durchgeführt. Der Temperaturgradient verlief von 90 °C (4 min isotherm) bis 120 °C mit 50 °C/min und dann weiter von 120 °C (1 min isotherm) bis 310 °C, mit 3 °C/min. *m*-Xylol und *p*-Xylol koeluierten unter diesen Bedingungen und wurden deshalb mit einer zweiten Trennmethode bestimmt. Diese wurde an einem GC der Firma Varian (Modell 3700) auf einer FFAP Fused Silica Kapillarsäule (50 m; innerer Durchmesser 0,2 mm; Filmdicke 0,22 μm) mit Helium als Trägergas durchgeführt. Der Temperaturgradient verlief von 70 °C (5 min isotherm) bis 200 °C mit 3 °C/min. Zur Quantifizierung der Alkylbenzole wurden deren relative Mengen im Vergleich zu Naphthalin, das in allen Experimenten unverändert blieb, bestimmt.

Aliphatische Kohlenwasserstoffe

Aliphatische Kohlenwasserstoffe wurden mit einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) auf einer Ultra 1 Fused Silica Kapillarsäule (50 m, innerer Durchmesser 0,21 mm, Filmdicke 0,33 μm) bestimmt. Der Temperaturgradient verlief von 90 °C (4 min isotherm) bis 310 °C, mit 3 °C/min. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch (KfA Jülich) durchgeführt.

3.9. Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA

Für die Bestimmung des G+C-Gehaltes wurde DNA nach der von Cashion et al. (1977) beschriebenen Methode chromatographisch über Hydroxylapatit isoliert. Der G+C-Gehalt der DNA wurde entsprechend der Methode von Mesbah et al. (1989) mittels HPLC bestimmt. Die Bestimmung des G+C-Gehaltes der DNA wurde von Dr. Fred Rainey (DSM, Braunschweig) durchgeführt.

4. Biochemische Methoden

4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration in Zellextrakten wurde nach der von Bradford (1976) entwickelten Methode bestimmt. Dazu wurden 0,8 ml einer verdünnten Proben- oder Standardlösung mit 0,2-ml Farbreagenz (BioRad, München, Deutschland) auf einem Reagenzglasschüttler gut durchmischt und anschließend für ca. 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Standardisierung wurde Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µg/ml eingesetzt.

4.2. Herstellung von Rohextrakten unter anoxischen Bedingungen

Frische, nicht stationäre ($OD_{660} = 0,2$) 2 l Kulturen der Stämme Tol2 bzw. EbN1 (B. 2.4.5.) wurden im Anaerobenzelt mittels eines Scheidetrichters von der lipophilen Trägerphase getrennt, in gasdicht verschließbare Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 bis 9000 rpm (JA 10 Rotor, Beckmann, Palo Alto, Californien, USA) für 30 min in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckmann) zentrifugiert. Die Pellets wurden im Anaerobenzelt in insgesamt 30 ml Grundmedium für sulfatreduzierende bzw. nitratreduzierende Bakterien (B. 2.2.2.) resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 10.000-15.000 rpm (JA 20 Rotor, Beckmann) für 30 min abzentrifugiert und im Anaerobenzelt in 2-4 ml reduziertem Aufschlußpuffer I oder II resuspendiert.

Aufschlußpuffer I:

Tris/HCl, pH 7,5	100,0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mM
DTE	2,5 mM

Aufschlußpuffer II:

Imidazol/HCl, pH 7,0	50,0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mM
DTE	2,5 mM

Nachdem der Druckzylinder der French-Press (American Instruments Co. Inc., Silver Spring, USA) im Anaerobenzelt mit der hochkonzentrierten Zellsuspension beschickt und verschlossen worden war, erfolgte der Zellaufschluß bei 900 psi. Die Zellen beider Stämme waren nach

einem Durchgang vollständig aufgeschlossen. Für Enzymtests wurden die Rohextrakte im Anaerobenzelt in gasdicht verschließbare Spezialgefäße (Abb. 13) überführt und bis zum Gebrauch unter N_2 -Atmosphäre im Eisbad aufbewahrt. Rohextrakte für die 2D-Gelelektrophorese wurden in kleine Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 ml, Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

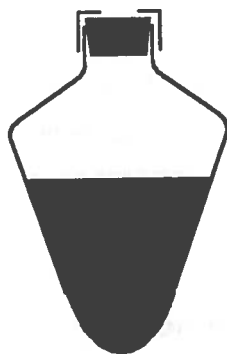


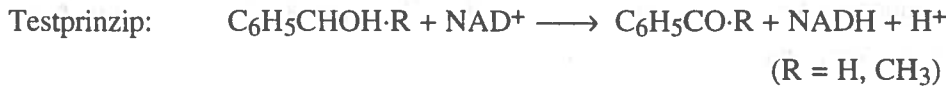
Abb. 13: Spezialgefäß mit Butylseptum und Drehverschluss zur anaeroben Aufbewahrung von Rohextrakten.

4.3. Bestimmung von Enzymaktivitäten unter anoxischen Bedingungen

Es wurden ausschließlich frisch hergestellte und auf Eis aufbewahrte anaerobe Rohextrakte für die Enzymtests eingesetzt. Alle Enzymtests wurden photometrisch in einem Spektralphotometer (Modell U1100, Shimadzu) bei $23\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Stammlösungen wurden durch mehrmaliges Evakuieren unter Rühren und Begasen mit N_2 anaerobisiert und in verschlossenen Serumflaschen bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ unter N_2 -Atmosphäre aufbewahrt. Die Messungen wurden in 1,5 ml Glasküvetten mit Schliff durchgeführt. Nachdem diese mit einem Gummistopfen verschlossen worden waren, wurde der Gasraum für ca. 1 min mit N_2 durchspült. In den nun anaeroben Küvettenraum wurde mit einer N_2 -gespülten Spritze ca. 1 ml anoxischer Puffer gegeben. Lösliche Substrate und andere Zusätze wurden mit anaerobisierten Mikroliterspritzen zugesetzt.

Alkohol-Dehydrogenase

Die Reaktion wurde in beiden Richtungen gemessen.



Testansatz (1 ml):

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH 7,0 oder Tris/HCl, pH 9,0	50,0 mM
NAD(P) oder NAD(P)H	0,2 mM
Alkohol oder Aldehyd	1,0 mM

Die Reaktionen wurden in der Regel durch Zugabe von 10-80 µl Rohextrakt gestartet. In Kontrollansätzen wurde auch mit Zugabe des organischen Substrates gestartet. Die Reaktion wurde photometrisch bei 365 nm verfolgt.

4.4. 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Zellproteinen des Stammes Tol2 wurde nach der von Görg et al. (1988 und 1991) beschriebenen Methode mit dem horizontalen Multiphor® II Elektrophorese-System (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Für die isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension wurde ein Gel mit immobilisiertem pH-Gradienten verwendet. In der zweiten Dimension wurde ein SDS-Gel mit einem Polyacrylamidgradienten (12-15 %) eingesetzt. Die Gele für beide Dimensionen wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers in einer Vertikalkassette auf Gelbond PAGfilm® gegossen. Die Verwendung immobilisierter pH-Gradienten erlaubte eine hohe Reproduzierbarkeit der Spotpositionen im 2D-Muster. Auch ist keine Vorfokussierung wie bei der O'Farrell-Technik (O'Farrell 1975 und 1977) nötig. Die Gele waren nur 0,5 mm dick, was eine sehr effektive Kühlung und somit ein Anlegen hoher Spannungen erlaubte, welche eine scharfe Trennung ermöglichte. Allerdings waren dabei zur Stabilisierung der Gele Trägerfolien erforderlich. Eine Einführung in diese gelelektrophoretische Trenntechnik wurde von Dr. Armin Ehrenreich gegeben.

4.4.1. Stammlösungen

Solubilisierungspuffer:

Harnstoff	9,0 M
Triton X-100	20,0 g/l
DTT	10,0 g/l
Ampholine, pH 3,5-10	8,0 g/l
Prefabloc SC	8,0 mM

Aceton/Mercaptoethanol:

Mercaptoethanol in Aceton (Lagerung der Lösung bei -20 °C)	10,0 mM
---	---------

Rehydratisierungslösung:

Harnstoff	8,0 mM
Triton X-100	5,0 g/l
DTT	10,0 mM

Anodenlösung:

Glutaminsäure	10,0 mM
---------------	---------

Kathodenlösung:

Lysin	10,0 mM
-------	---------

Ultradox Suspension:

Ultradox	30,0 g/l (in Solubilisierungslösung)
----------	--------------------------------------

Die Ultradox Suspension wurde zum Quellen für 10 h bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Acrylamidlösung:

Acrylamid	288,0 g/l
Methylenbisacrylamid	12,0 g/l

Bei der Lagerung der gelösten Substanzen können durch Hydrolyse Acrylsäure und Ammoniumionen entstehen. Um diese Hydrolyseprodukte zu entfernen, wurden zwei Spatelspitzen Serdolit MB-3 zum Ansatz zugegeben und für 15 min gerührt. Dann wurde das Ionenaustauscherharz über einen Faltenfilter abfiltriert und die Lösung in einem Exsikkator entgast.

Äquilibrierungspuffer:

Tris/HCl, pH 8,8	50,0 mM
------------------	---------

Harnstoff	6,0 mM
Glycerin	300,0 g/l
SDS	20,0 g/l

Unmittelbar vor der Äquilibration wurden noch 30 µl Bromphenolblau-Lösung und 65 mM DTT oder 260 mM Jodacetamid zugegeben.

Bromphenolblau-Lösung:

Sammelgelpuffer	10,0 ml
Bromphenolblau	30,0 mg

Sammelgelpuffer:

SDS	4,0 g/l
Tris/HCl, pH 6,8	1,5 M

Trenngelpuffer:

SDS	4,0 g/l
Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M

Thiosulfatlösung:

Natriumthiosulfat	0,2 g/l
-------------------	---------

Silbernitratlösung:

Silbernitrat	2,0 g/l
Formaldehydlösung (37 %ig)	0,5 ml/l
Natriumthiosulfat	4,0 mg/l

Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	30,0 g/l
Formaldehydlösung (37 %ig)	0,5 ml/l
Natriumthiosulfat	4,0 mg/l

Stoplösung:

Glycin	5,0 g/l
--------	---------

4.4.2. Probenaufbereitung

Die Rohextrakte (100 µl mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml) von Stamm Tol2 (B. 4.2.) wurden durch 5 minütige Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge von Zelltrümmern befreit. Der Überstand wurde in ein neues Plastikreaktionsgefäß transferiert und mit 100 µl Aceton/Mercaptoethanol und 100 µl 10 % TCA versetzt. Dieser Ansatz wurde 30

min im Eisbad inkubiert, damit die Proteine präzipitieren konnten. Danach wurde 10 min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in Aceton/Mercaptoethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde schließlich in 1 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und ca. 10 h gelöst. Diese Lösung wurde schließlich mit der Ultrodex[®]-Suspension 1:1 verdünnt, so daß die Proben zum Auftragen auf die IPG-Streifen der ersten Dimension eine Endkonzentration von ca. 0,5 mg/ml hatten.

4.4.3. Proteintrennung in der ersten Dimension

Herstellung des pH-Gradientengels

Das Gel (110 x 250 x 0,5 mm) für die erste Dimension hatte einen immobilisierten pH-Gradienten von 4 bis 7 und enthielt 4 % Acrylamid, 8 M Harnstoff, 0,5 % Triton X-100 und 10 mM DTT. Zur Herstellung des pH-Gradientengels wurden die einzelnen Komponenten entsprechend der Tabelle 5 eingesetzt.

Tabelle 5: Komponenten zur Herstellung eines pH-Gradientengels für die Proteintrennung in der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese.

Komponente	saure, schwere Lösung pH 4,0 (10 ml)	basische, leichte Lösung pH 7,0 (10 ml)
Immobilin pK 3,6	385,0 µl	201,1 µl
Immobilin pK 4,6	73,0 µl	492,0 µl
Immobilin pK 6,2	300,0 µl	101,0 µl
Immobilin pK 7,0	-	179,0 µl
Immobilin pK 9,3	-	584,0 µl
dest. H ₂ O	5,9 ml	7,1 ml
Acrylamidlösung (28,8 %)	1,3 ml	1,3 ml
Glycerin (100 %)	2,5 g	-
TEMED	6,0 µl	6,0 µl
APS (40 %)	10,0 µl	10,0 µl

Das spezifische Gewicht der sauren Lösung wurde durch Zugabe von Glycerin erhöht, damit sich der gegossene Gradient bis zum Auspolymerisieren nicht vermischte. Vor Zugabe von Acrylamid und Glycerin wurde die saure Lösung mit ca. 3 Tropfen 1 N NaOH auf ca. pH 7,0 eingestellt. Dadurch wurde die Effektivität der pH-abhängigen Polymerisation von Acrylamid erhöht. Der pH-Wert der basischen Lösung lag bereits richtig bei 7,0. Jeweils 7,5 ml saure bzw. basische Lösung wurden in die entsprechende Kammer eines Gradientenmischers (Pharmacia) gegeben und das Gel in einer senkrecht stehenden Gießkassette, die einen Gelbond

PAGfilm® enthielt, gegossen. Nachdem das Gel bis zu einer Endhöhe von 11 cm gegossen worden war, wurde die Gelkassette 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sich der Gradient horizontal ausrichten konnte. Dann wurde 1 h bei 50 °C im Trockenschrank auspolymerisiert. Anschließend wurde das polymerisierte Gel aus der Gießkassette genommen und durch vorsichtiges Schütteln (6 x 10 min in je 0,5 l deion. H₂O) auf einem Wippschüttler (GFL, Burgwedel) von nicht polymerisierten Bestandteilen befreit. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich das gequollene Gel nicht vom Gelbond PAGfilm® löste. Anschließend wurde das Gel auf einem Wippschüttler 30 min in 2 %iger Glycerinlösung gewaschen und in einem staubfreien Schrank bei Raumtemperatur mit einem Ventilator für 16 h getrocknet. Längeres Trocknen verschlechterte die Quellfähigkeit und Haltbarkeit der trockenen Gele. Die getrockneten Gele wurden durch Auflegen einer Plastikfolie geschützt und mit Hilfe einer Papierschneidvorrichtung in 5 mm breite Streifen geschnitten. Die auf diese Weise erhaltenen Streifen mit einem im Polymer fixiertem pH-Gradienten werden als IPG-Streifen bezeichnet. Die IPG-Streifen wurden portionsweise in Plastikfolie eingeschweißt und waren so bei -20 °C für ca. 2 Monate haltbar.

Isoelektrische Fokussierung der Proteine

Die bei -20 °C aufbewahrten IPG-Streifen wurden in einer speziellen Rehydratisierungskassette (Pharmacia) über Nacht mit Rehydratisierungslösung in die funktionsfähige Form gebracht und sofort für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Die Rehydratisierungslösung enthielt zur vollständigen Denaturierung und Solubilisierung der Proteine, die im elektrischen Feld nicht wandernden Agenzien 8 M Harnstoff, 0,5 % (w/v) Triton X-100 und 10 mM DTT. Die Rehydratisierungskassette enthielt keinen Gelbond PAGfilm® und wurde zusätzlich zur Silikondichtung mit einer zweilagigen Parafilmdichtung ausgerüstet, damit die Polyacrylamidschicht auf den IPG-Streifen vollständig bis zu einer Dicke von 0,5 mm rehydratisieren konnte. Die gequollenen IPG-Streifen wurden der Rehydratisierungskassette entnommen und mit einem feuchten Filterpapier vorsichtig abgetupft, um ein Auskristallisieren des Harnstoffes infolge der Wasserverdunstung zu vermeiden. Danach wurden die Streifen luftblasenfrei in 1 cm Abständen voneinander auf den auf 15 °C temperierten Kühlblock gelegt. Zuvor war ein dünner Film aus einigen Tropfen Kerosin als Kontaktflüssigkeit auf den Kühlblock aufgebracht worden, um einen optimalen Wärmeaustausch zu gewährleisten. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit 6 IPG-Streifen gleichzeitig durchgeführt. Auf die Enden der Gelschicht wurden Elektrodenstreifen aus Filterpapier, die mit Anoden- bzw. Kathodenlösung getränkt waren, gelegt. Die Proben (20 µl) wurden in spezielle Silikonrähmchen (5 x 10 x 1 mm), die mit 2 cm Abstand von der Anode plaziert waren, aufgetragen. Der Probeneinlauf erfolgte 2 h bei 150 V. Dann wurden die Silikonrähmchen

entfernt und eine Spannung von 300 V für weitere 3 h angelegt. Die eigentliche isoelektrische Fokussierung bei 3500 V dauerte 15-18 h. Die Stromstärke wurde über das Netzgerät (Pharmacia, Freiburg) stets auf 2 mA und die Leistung auf 5,0 W begrenzt. Nach beendeter Fokussierung konnten die IPG-Streifen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

4.4.4. Proteintrennung in der zweiten Dimension

Herstellung des SDS-Porengradientengels

Das SDS-Gel (190 x 250 x 0,5 mm) für die Trennung in der zweiten Dimension bestand aus einem Sammelgel (6 % Polyacrylamid) und einem Trenngel mit Polyacrylamidgradienten (12-15 %); letzteres wird auch als SDS-Porengradientengel bezeichnet. Zur Herstellung des SDS-Gels wurden die einzelnen Komponenten entsprechend der Tabelle 6 zusammengegeben.

Tabelle 6: Komponenten zur Herstellung eines SDS-Porengradientengels für die Proteintrennung in der zweiten Dimension der 2D-Gelelektrophorese.

Komponenten	Sammelgel (6 %)		schwere Trenngellösung (12 %)		leichte Trenngellösung (15 %)	
Acrylamidlösung (28,8 %)	2,0	ml	6,0	ml	7,5	ml
Sammelgelpuffer	2,5	ml	-		-	
Trenngelpuffer	-		3,75	ml	3,75	ml
Glycerin (100 %)	3,75	g	3,75	g	-	
dest. H ₂ O	2,5	ml	2,25	ml	3,75	ml
TEMED	5,0	µl	7,5	µl	7,5	µl
APS (40 %)	10,0	µl	15,0	µl	15,0	µl

Jeweils 10 ml der schweren bzw. leichten Trenngellösung wurden in die entsprechenden Kammern eines Gradientenmischers (Pharmacia, Freiburg) gegeben. Nun wurden zunächst 6 ml Sammelgellösung in die senkrecht stehende Gießkassette, die einen Gelbond PAGfilm[®] enthielt, gegossen. Anschließend wurde das Gradientengel mit Hilfe des Gradientenmischers auf die Sammelgellösung gegossen und die Gelkammer dann bei Raumtemperatur für 15 min stehengelassen, damit sich der Gradient horizontal ausrichten konnte. Nachdem das Gradientengel dann in 30 min bei 50 °C auspolymerisiert war, wurde es in der Gießkassette über Nacht im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt oder sofort in die Gelelektrophorese eingesetzt. In Plastikfolie eingeschweißt konnte das SDS-Porengradientengel auch mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Trennung der fokussierten Proteine im SDS-Porengradientengel

Bevor die fokussierten Proteine von den IPG-Streifen auf die SDS-Porengradientengele transferiert werden konnten, mußten die IPG-Streifen aus dem nichtionischen System in das anionische System der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese überführt werden. Dazu wurden die IPG-Streifen zunächst in einem Reagenzglas für 15 min in 10 ml Äquilibriumspuffer mit 65 mM DTT auf einem Wippschüttler leicht geschwenkt. Da die zur vollständigen Reduktion der Proteine notwendigen hohen DTT Konzentrationen die spätere Silberfärbung gestört hätten, mußte das DTT in einem zweiten Äquilibriumsschritt mit einem Überschuß von Jodacetamid wieder entfernt werden; durch Jodacetamid wird auch die freie SH-Gruppe von Cystein im Polypeptid blockiert, so daß eine Reoxidation nicht mehr möglich ist. Dazu wurden die IPG-Streifen in 10 ml Äquilibriumspuffer, der 260 mM Jodacetamid enthielt, überführt und für 15 min geschwenkt. Der Äquilibriumspuffer enthielt 30 µl Bromphenolblau-Lösung, um später bei der Gelelektrophorese eine sichtbare Lauffront zu erhalten.

Während des Äquilibriumierens der IPG-Streifen wurde das SDS-Porengradientengel auf den auf 15 °C temperierten Kühlblock der Multiphor®-Kammer gelegt. Der Kühlblock war, wie bei der isoelektrischen Fokussierung, zuvor mit einem Kerosinfilmm als Kontaktflüssigkeit überzogen worden. Als Pufferreservoir wurden ExelGel® SDS-Anoden- und Kathoden-Polyacrylamid Pufferstreifen (Pharmacia, Freiburg) auf die Ränder des Gels gelegt. Den Pufferstreifen wurden dann die gleichen Elektroden wie bei der isoelektrischen Fokussierung aufgesetzt.

Die IPG-Streifen wurden nach dem Äquilibriumieren mit einem feuchten Filterpapier abgetupft und luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten am Kathodenstreifen entlang auf das Sammelgel gelegt. Für das Einlaufen der Proteine aus dem IPG-Streifen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 200 V (ca. 20 mA pro SDS-Gel) angelegt. Nach 45 min waren die Proteine vollständig eingelaufen und eine scharfe Lauffront auf dem Gel sichtbar geworden. Nach dieser Einlaufphase mußte der IPG-Streifen entfernt werden, da er sich aufgrund osmotischer Effekte in das SDS-Gel einbohrte. Das ungleichmäßige Einbohren des IPG-Streifens hätte im Verlauf der weiteren Elektrophorese zu einer Verzerrung der Lauffront geführt. Deshalb wurde der Kathoden-Pufferstreifen auf die Linie des entfernten IPG-Streifens verschoben. Dabei wurden das Gel und die Unterseite des Kathoden-Pufferstreifens mit einem Filterpapier von Feuchtigkeit befreit, damit der Pufferstreifen nicht während des Laufes durch den Druck der Elektrode wegrutschen konnte. Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde dann sofort mit 500 ml eines Gemisches aus 40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig in deion. H₂O für mindestens 1 h in einer flachen Färbewanne fixiert.

4.4.5. Silberfärbung

Die Silberfärbung der erhaltenen Chromatogramme wurde nach einem modifizierten Protokoll von Blum et al. (1987) durchgeführt. Die Färbeschritte wurden unter leichtem Schütteln auf einem Wippschüttler mit jeweils 500 ml der Färbelösungen durchgeführt. Für die Färbung wurde das in Methanol/Eisessig fixierte Gel für dreimal 20 min in 30 % (v/v) Methanol gewaschen. Nach 1 min in Thiosulfatlösung wurde das Gel dreimal kurz mit bidest. H₂O abgespült und für 20 min zur Färbung in die Silbernitratlösung gelegt. Danach wurde das Gel dreimal mit bidest. H₂O gewaschen und für maximal 5 min in die Entwicklerlösung gelegt. Dabei wurden die Proteine als braun-schwarze Flecken sichtbar. Das entwickelte Gel wurde dann zweimal kurz mit bidest. H₂O gewaschen und dann für 5 min in die Stopplösung gelegt. Abschließend wurde das Gel ohne Schütteln über Nacht in bidest. H₂O gewaschen.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Bestimmung der 16S rDNA-Sequenz

Die Extraktion genomischer DNA und die Amplifikation der 16S rDNA mittels PCR wurde von Dr. F. Rainey (DSM, Braunschweig) nach der von Rainey et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden entsprechend der Anweisung des Herstellers direkt mit dem Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequenzierungskit (Applied Biosystems, Warrington, UK) sequenziert. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte der Sequenzierungsreaktion wurde mit dem 373 DNA Sequenzierer von Applied Biosystems durchgeführt. Die Sequenzen der 16S rDNA wurden manuell mit den gegenwärtig verfügbaren Sequenzen aus den öffentlichen Datenbanken verglichen. Die phylogenetischen Distanzen, die nach der Methode von Jukes und Cantor (1969) berechnet wurden, wurden mit Hilfe des Algorithmus von DeSoete (1983) bei der Konstruktion eines Stammbaumes eingesetzt. Die Berechnungen wurden ebenfalls von Dr. F. Rainey (DSM, Braunschweig) durchgeführt.

5.2. *In situ*-Hybridisierung

5.2.1. Fixierung von Bakterienzellen

Reagenzien

1xPBS, pH 7,2 (für marine Bakterien):

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2	10,0 mM
NaCl	20,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3,0 g
deion. H ₂ O	ad 1000,0 ml

1xPBS, pH 7,2 (für Süßwasserbakterien):

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2	10,0 mM
NaCl	8,5 g
deion. H ₂ O	ad 1000,0 ml

4 %iger Paraformaldehyd:

Paraformaldehyd	2,0 g
1xPBS	ad 50,0 ml

Die PBS-Puffer wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 60 min sterilisiert. Ethanol wurde sterilfiltriert (0,2 µm Filter).

Durchführung

Zellen für die Fixierung wurden aus frischen, auf Rohöl gewachsenen β4-Kulturen gewonnen. Die Kulturflaschen (250 ml) wurden unter kräftigem Schütteln mit dem Flaschenhals nach unten gedreht, so daß an den Glaswänden haftende Zellen resuspendiert wurden und gleichzeitig der Butylstopfen von Öltropfen frei blieb. Nachdem sich Öl- und Wasserphase vollständig voneinander getrennt hatten, wurde das Medium durch schwachen Überdruck in Zentrifugenbecher überführt. Dazu wurde mit einer 50 ml Plastikspritze N₂ durch eine der zwei Öffnungen in die Kulturflasche gedrückt. So wurde ein Überdruck erzeugt, der die Kulturflüssigkeit durch die zweite Öffnung aus der Flasche drückte (Abb. 14). Mit Hilfe dieser Methode konnte die Kulturflüssigkeit frei von Rohöl geerntet werden. Die Zellen wurden bei 6000 rpm (JA 10 Rotor, Beckmann) für 30 min in einer Kühlzentrifuge (J2-MC, Beckmann, Palo Alto, Calif., USA) zentrifugiert. Das kompakte Pellet wurde in 10 ml synthetischem Meerwassermedium (B. 2.2.2.) resuspendiert. Referenzorganismen wurden frisch kultiviert oder wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Ökologie (MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen) aus einer bei -20 °C gelagerten Stammsammlung zur Verfügung gestellt.

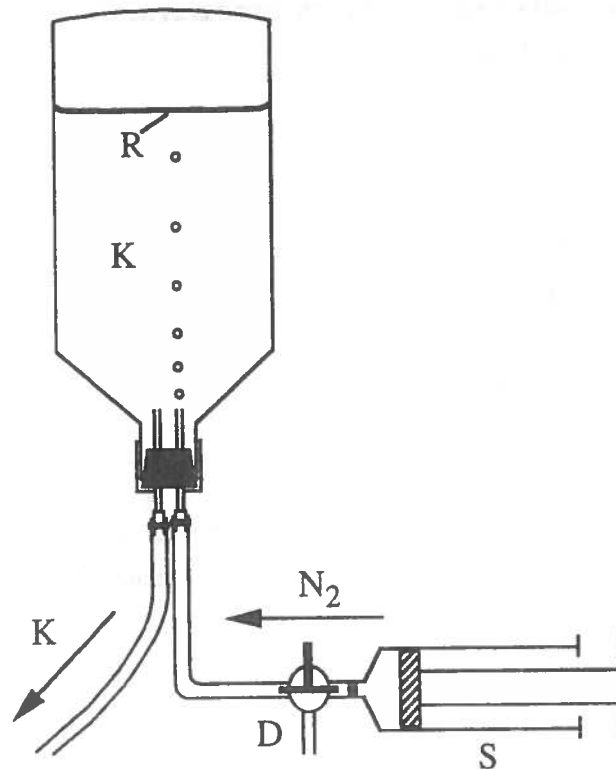


Abb. 14: Ernte von β 4-Kulturen nach Wachstum auf Rohöl. Nach vollständiger Trennung von Rohöl- (R) und Wasserphase, wurde über eine Plastikspritze (S) und einen Dreiwegehahn (D) ein Überdruck an N_2 in der Kulturflasche aufgebaut. Durch den N_2 -Überdruck wurde die Kulturflüssigkeit (K) aus der Kulturflasche gedrückt. So konnten die β 4-Kulturen frei von Rohöl geerntet werden.

Zur Fixierung wurde die Zellsuspension (10 ml) in Plastikzentrifugenröhrchen mit konischem Boden (50 ml, Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit 30 ml 4 %igem Paraformaldehyd versetzt, vorsichtig geschüttelt und für ca. 5 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde bei 5000 rpm für 10 min in einer Tischzentrifuge (Modell 5416, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes mit Pasteurpipetten wurde das Pellet in 1 ml 1xPBS-Puffer resuspendiert und in Plastikzentrifugenröhrchen (10 ml, Sarstedt) überführt. Nach diesem Arbeitsschritt mußte zügig gearbeitet werden, da die RNA ohne das Fixierungsagens schnell abgebaut werden konnte. Die Zellsuspension wurde bei 5000 rpm für 3 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette entfernt, das Pellet nochmals in 1 ml 1xPBS resuspendiert und langsam mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt. In dieser PBS/Ethanol-Lösung konnten die Zellen bei -20 °C für mindestens

6 Monate gelagert werden.

5.2.2. *In situ*-Hybridisierung mit fluoreszierenden Oligonukleotidsonden

Reagenzien

Hybridisierungs-Puffer

NaCl, 4,5 mM, steril	10,0 ml
Tris-Puffer, 1 M, pH 7,2	5,0 ml
SDS, 10 % (w/v)	0,5 ml
Formamid (unverdünnt)	10,0 ml

Oligonukleotidsonden:

Die als Sonden eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Biometra (Göttingen) synthetisiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin und FITC modifiziert.

Durchführung

Die aufgetauten Zellsuspensionen in PBS/Ethanol-Lösung wurden auf einem Reagenzglasschüttler kräftig geschüttelt, um die Zellaggregate aufzulösen. Je 2-5 µl dieser Zellsuspensionen wurden auf je 1 Fenster spezieller Diagnostik-Objektträger (IDL GmbH, Niederau, Deutschland) aufgetragen. Diese waren mit einer Teflonschicht überzogen, die 10 kreisförmige Aussparungen (Fenster) enthielt. Die Fenster waren mit Gelatine beschichtet. Die Zellsuspensionen wurden nun für 2 h unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Proben dehydriert. Dazu wurden die Objektträger für je 3 min in sterilen Glaskammern zunächst in 50 %, dann in 75 % und schließlich in 100 % (v/v) Ethanol inkubiert. Nach der Dehydratisierung wurden die Proben unter dem Abzug getrocknet. Währenddessen wurden die Hybridisierungskammern vorbereitet. Ein 4-fach gefaltetes Zellstofftuch (Kimwipe[®], Kimberly-Clark) wurde mit 2 ml Hybridisierungspuffer getränkt, in eine Petrischale gelegt, und bei 37 °C vorinkubiert. Auf die nun getrockneten Zellen wurden jeweils 8 µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Oligonukleotidsonde pipettiert. Die Objektträger wurden dann waagrecht in die Hybridisierungskammern gelegt (1 Objektträger pro Petrischale). Die Petrischalen wurden mit Parafilm abgedichtet, damit der Hybridisierungspuffer während der Inkubation nicht verdunsten konnte. Inkubiert wurde für 2-5 h bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden die Objektträger in mit Hybridisierungspuffer gefüllte Plastikröhrchen (50 ml, Sarstedt)

gelegt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Mit diesem Waschschrift wurden nicht hybridisierte Sonden entfernt. Danach wurden die Objektträger kurz mit deion. H₂O abgespült, um Salze zu entfernen, und unter dem Abzug getrocknet. Auf jedes Fenster der getrockneten Objektträger wurde ein kleiner Tropfen Citifluor (Citifluor Ltd., London, GB) als Bleichschutz gegeben. Schließlich wurden große Deckgläser auf die Objektträger gelegt und mit Nagellack an den Rändern versiegelt. Diese Präparate waren im Dunkeln bei 4 °C für mindestens 6 Monate haltbar. Die *in situ*-Hybridisierungen wurden im wesentlichen von Dr. Manabu Fukui (NIRE, Japan) durchgeführt.

5.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Hybridisierung wurden die Zellen an einem Fluoreszenz-Mikroskop (Modell Axioplan, Zeiss, Oberkochen) entsprechend der von Ramsing et al. (1993) beschriebenen Methode untersucht. Die Fluoreszenzausrüstung des Mikroskops bestand aus einer Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (Modell HBO 50W, Zeiss) und je einer Filterkombination für die Detektion von roter (TRITC-Selektivbeobachtung mit Filtersatz 15: grüne Anregung bei 541 nm, rote Emission bei 572 nm) bzw. grüner (FITC-Selektivbeobachtung mit Filtersatz 10: blaue Anregung bei 489 nm, grüne Emission bei 514 nm) Fluoreszenzemission. Aufnahmen wurden mit einem 100x Plan-NEOFLUAR Ölimmersionsoberktiv von Dr. Manabu Fukui (NIRE, Japan) durchgeführt.

Für die Aufnahme digitaler Bilder war das Fluoreszenz-Mikroskop zusätzlich mit einer CCD-Kamera von Photometrics (Tucson, Arizona, USA), das über ein Peltier-Element (Modell LC200, Photometrics) gekühlt wurde, ausgerüstet. Die CCD-Kamera enthielt einen Metachrome™ II erweiterten UV CCD Chip (KAF 1400; 1317 x 1035 Pixel, 500-kHz Transferrate, Pixelgröße 6,8 x 6,8 µm). Die Steuerung der Kamera erfolgte mit einem Macintosh Quadra 700 Computer und einer Photometrics Steuereinheit für die CCD-Kamera. Die digitalen Aufnahmen wurden als 12-bit Bilder im Nu 200 Programm (Photometrics) gespeichert. Die Umwandlung der digital gespeicherten Fluoreszenzintensitäten in den Farbbildern und deren weitere Bearbeitung wurde mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, California, USA) durchgeführt. Die Farbabzüge der Bilder wurden von der Firma Winkler-Studios (Bremen) hergestellt.

C Ergebnisse

Teil I - Untersuchungen zum anaeroben Toluolabbau durch *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2

Das Toluol abbauende sulfatreduzierende Bakterium *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 wurde unter strikt anoxischen Bedingungen aus einem marinen Sediment isoliert. Das ovale Isolat hatte beim Wachstum auf Toluol eine Generationszeit von 27 h. Durch Messung der Abbaubilanz konnte gezeigt werden, daß Stamm Tol2 Toluol vollständig zu CO₂ oxidierte. Das Vorhandensein von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und Formiat-Dehydrogenase sprach für eine Endoxidation von Acetyl-CoA über den CO-Dehydrogenase Weg. Stamm Tol2 konnte Benzylalkohol nicht als Wachstumssubstrat verwerten. Außerdem war Benzylalkohol ein starker und spezifischer Inhibitor des Toluolabbaus; die Verwertung von Benzoat dagegen wurde durch Benzylalkohol nicht beeinträchtigt. Sequenzdaten der 16S rRNA zeigten eine Zugehörigkeit von *Desulfobacula toluolica* zu der phylogenetischen Gruppe aus den Gattungen *Desulfobacter* und *Desulfobacterium* (Rabus et al. 1993).

1. Bestimmung der Spurenelement- und Vitaminabhängigkeit

Das Wachstum und die Sulfidbildung von Stamm Tol2 mit Toluol und Benzoat wurden durch die Komplexierung von Spurenelementen mit EDTA gefördert. In Wachstumsansätzen (15 ml) wurden Kulturen von Stamm Tol2 über 5 Passagen auf das Bedürfnis für einzelne Spurenelemente geprüft. Stamm Tol2 wuchs unbeeinträchtigt ohne die Spurenelemente Co, Mo, Zn, Ni und Cu. Dagegen war das Wachstum auf Toluol von Se abhängig. Eine Vitaminabhängigkeit von Stamm Tol2 beim Wachstum auf Toluol wurde nicht beobachtet.

2. Spezifische Hemmung der Toluoloxidation durch Benzylalkohol

Vorausgegangene Untersuchungen hatten die spezifische Hemmung der anaeroben Toluoloxidation durch Benzylalkohol in Stamm Tol2 gezeigt. In Zellsuspensionen wurde die Toluoloxidation bereits durch 0,5 mM Benzylalkohol vollständig gehemmt, während die Verwertung von Benzoat nicht beeinflusst wurde. Ebenfalls in Zellsuspensionen konnte gezeigt werden, daß Benzaldehyd keine inhibitorische Wirkung auf den Abbau von Toluol hatte. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß der physiologisch aktive Inhibitor der Toluoloxidation nicht Benzylalkohol selbst, sondern der sekundär durch Dehydrogenierung aus ihm entstandene Benzaldehyd war (Rabus et al. 1992 und 1993). Diese inhibitorische Wirkung von Benzylalkohol stand im Widerspruch zu den Erkenntnissen, die zum anaeroben Toluolabbau im denitrifizierenden Stamm K172 gewonnen worden waren (Tschech und Fuchs 1987, Altenschmidt und Fuchs 1992). Benzylalkohol war nicht nur Wachstumssubstrat für Stamm K172, sondern konnte in Kulturen mit Zusatz von Jodacetamid sogar als erstes Intermediat der anaeroben Toluoloxidation nachgewiesen werden. Die besondere Wirkung des Benzylalkohols auf den anaeroben Toluolstoffwechsel des sulfatreduzierenden Stammes Tol2 sollte hier eingehender untersucht werden.

Spezifität von Benzylalkohol im Vergleich zu anderen Verbindungen mit OH-Gruppen

In Wachstumsansätzen auf Toluol (2 %, v/v) wurde der Effekt von weiteren Hydroxyverbindungen, die größtenteils eine dem Benzylalkohol ähnliche Molekülstruktur aufwiesen, untersucht. Eingesetzt wurden Phenol (0,02-4 mM), 1-Phenylethanol (0,02-4 mM), 2-Phenylethanol (0,02-4 mM), Isoamylalkohol (0,02-4 mM). In einer früheren Arbeit wurden bereits *o*-Cresol (0,02-4 mM), *m*-Cresol (0,02-4 mM), *p*-Cresol (0,02-4 mM), *o*-Xylol (0,001-1 %, v/v), *m*-Xylol (0,001-1 %, v/v), *p*-Xylol (0,001-1 %, v/v) und Ethylbenzol (0,001-1 %, v/v) getestet (Rabus 1992). Keine dieser Substanzen hemmte das Wachstum. Damit konnte gezeigt werden, daß für die beobachtete Hemmung der Toluoloxidation die exakte Struktur des Benzylalkohols notwendig war.

Zielort der Inhibierung durch Benzylalkohol

Der physiologische Zielort der Inhibierung durch Benzylalkohol konnte entweder die Initialreaktion der anaeroben Toluoloxidation oder eine der nachfolgenden Reaktionen sein. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde der Effekt von Benzylalkohol

auf die Verwertung von Benzaldehyd als möglichem Zwischenprodukt vor der Bildung von Benzoat untersucht. Dazu wurden aus Kulturen von Stamm Tol2, die auf Benzaldehyd gewachsen waren, Zellsuspensionen ($OD_{660} = 2,0$) hergestellt und mit Benzaldehyd (1 mM) als Elektronendonator versetzt. Nach einer Vorinkubation von 3 h wurde Benzylalkohol (0,1 mM) zugegeben. Benzylalkohol hemmte die Oxidation von Benzaldehyd nicht (Abb. 15). Somit konnte der Zielort der Inhibierung durch Benzylalkohol auf die Startreaktion der anaeroben Toluoloxidation eingengt werden.

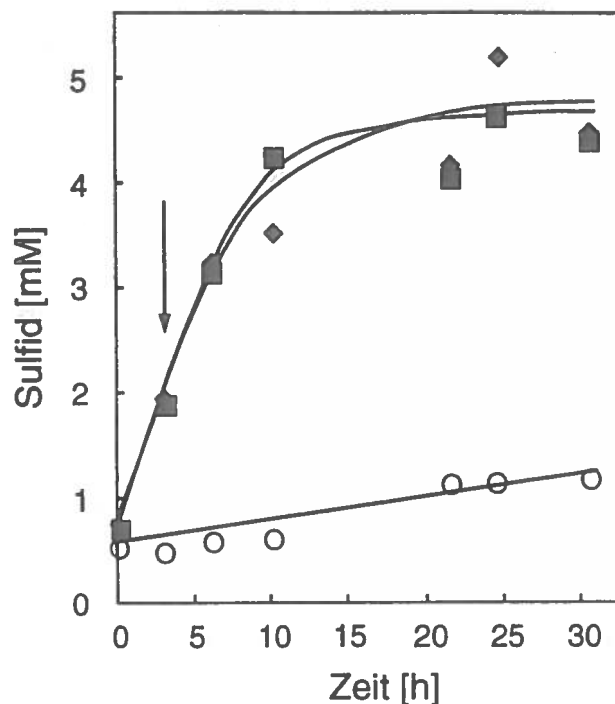


Abb. 15: Prüfung des Einflusses von Benzylalkohol auf die Sulfatreduktion mit Benzaldehyd (1 mM) als Elektronendonator in Zellsuspensionen von Stamm Tol2. Die Zellsuspensionen wurden aus Kulturen, die auf Benzaldehyd gewachsen waren, hergestellt. Benzylalkohol (0,1 mM) wurde nach 3 h (Pfeil) zugegeben. Sulfatreduktion mit Benzaldehyd ohne weitere Zusätze (■); Sulfatreduktion mit Benzaldehyd und Benzylalkohol (◆); eine Kontrolle (O) wurde ohne organische Substrate durchgeführt.

Benzylalkohol wirkt nicht als Feedback-Inhibitor

Nimmt man an, daß Benzylalkohol trotz seiner spezifischen Hemmwirkung ein Intermediat der Toluoloxidation ist, müßte man eine effektive Feedback-Inhibierung der Bildung von Benzylalkohol durch diesen selbst in der Startreaktion der Toluoloxidation, sowie eine Hemmung der Weiterreaktion zum Benzaldehyd fordern. Im Falle einer solchen Inhibierung

müßte man eine Verwertung von Benzylalkohol nur dann erkennen können, wenn dieser in einer Konzentration unterhalb der Hemmkonzentration vorliegt. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Sulfidbildung bei der Toluoloxidation durch 50 µM Benzylalkohol stark, jedoch nicht vollständig, und durch 10 µM Benzylalkohol nur noch schwach gehemmt wurde (Rabus 1992). Die minimale Hemmkonzentration von Benzylalkohol wurde mit Hilfe dieser Daten auf ca. 100 µM geschätzt.

Um das Vorliegen einer Feedback-Inhibierung zu prüfen, wurde Benzylalkohol in kurzen Zeitintervallen in kleinen, nicht inhibierenden Portionen zwei parallelen Zellsuspensionen als einzige Elektronenquelle zugesetzt. Die Zellsuspensionen ($OD_{660} = 6,5$) wurden aus Kulturen von Stamm Tol2 hergestellt, die auf Toluol gewachsen waren. Die Portionen an Benzylalkohol in den beiden Ansätzen lagen mit 5 bzw. 20 µM weit unterhalb dessen minimaler Hemmkonzentration. Unter der Annahme, daß die Oxidation von Benzylalkohol mit der gleichen Rate wie die des Toluols verläuft, wurden die Zeitintervalle von 30 min gewählt; in diesen Zeitintervallen hätte der bereits zugegebene Benzylalkohol vor jeder weiteren Zugabe vollständig verbraucht werden müssen. Benzylalkohol wurde auf diese Weise 22 mal pro Ansatz zugegeben, um insgesamt genügend Benzylalkohol (110 µM bzw. 440 µM) für eine signifikante Bildung von Sulfid (ca. 0,5 mM bzw. 1,9 mM) bereitzustellen.

Während der gesamten Inkubation konnte jedoch keine an eine Oxidation von Benzylalkohol gekoppelte Bildung von Sulfid gemessen werden. Außerdem wurden am Ende des Experiments 100 % bzw. 98 % des zugegebenen Benzylalkohols in den beiden Ansätzen wiedergefunden. Die Prozentangaben beziehen sich auf zellfreie Kontrollansätze, denen Benzylalkohol genauso zugegeben worden war wie den Zellsuspensionen. Demzufolge wurde Benzylalkohol unter den beschriebenen Bedingungen nicht verwertet (Abb. 16). Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß die anaerobe Oxidation von Toluol in *Desulfobacula toluolica* über Benzylalkohol als freies Intermediat verläuft.

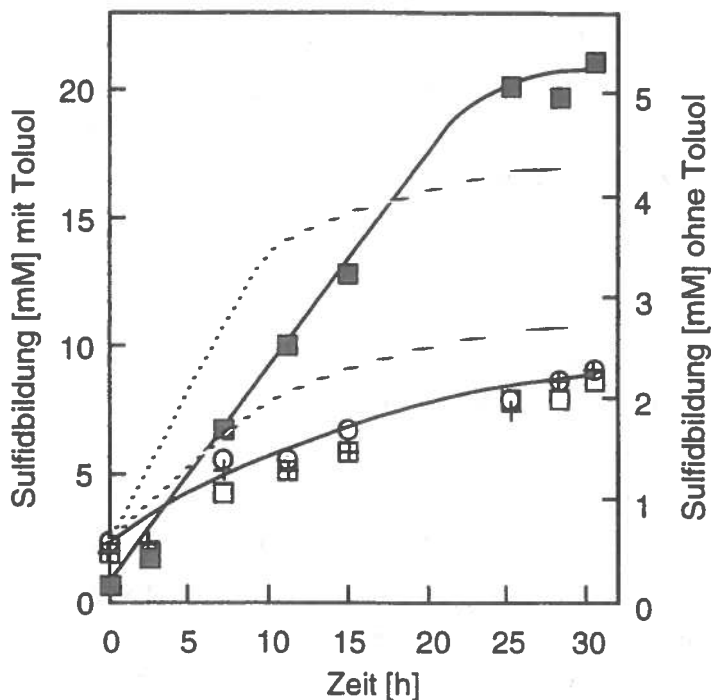


Abb. 16: Sulfidbildung in Zellsuspensionen von Stamm Tol2 mit Toluol (■) oder Benzylalkohol (+ und □) und in einer Kontrolle (○) ohne Zusatz einer organischen Elektronenquelle. Benzylalkohol wurde in kurzen Zeitintervallen (30 min) in kleinen Portionen von 5 µM (+) bzw. 20 µM (□) während der Inkubation von 0 h bis 11 h zugegeben. Die gestrichelten Linien geben die Sulfidbildung an, die man erwartet hätte, wenn der zugesetzte Benzylalkohol oxidiert worden wäre. Toluol wurde als 2 %ige Lösung in Heptamethylnonan (0,5 ml) als Trägerphase zugegeben.

3. Inhibitoren der anaeroben Toluoloxidation in Stamm Tol2

Eine Möglichkeit, Metabolite des anaeroben Toluolabbaus anzuhäufen, ist der Einsatz von Hemmstoffen zur Ausscheidung von Zwischenprodukten. Eine zweite Möglichkeit ist die Verwendung von Strukturanaloga des Toluols zur Bildung von Dead-End-Produkten; solche Dead-End-Produkte können Hinweise auf die wirklichen Zwischenprodukte geben. In Wachstumsversuchen (15 ml) wurden unterschiedliche Strukturanaloga des Toluols und bekannte Enzyminhibitoren auf eine wachstumshemmende Wirkung untersucht. Substanzen, die sich als Inhibitoren des Wachstums auf Toluol erwiesen, wurden in Folgeversuchen nicht nur Wachstumsansätzen auf Toluol, sondern auch solchen auf Benzoat und Malat zugesetzt

(Tab. 7). Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob inhibierende Substanzen spezifisch auf die Toluolaktivierung, auf den gesamten Aromatenstoffwechsel oder unspezifisch auf den Gesamtstoffwechsel wirken.

Tabelle 7: Prüfung der hemmenden Wirkung von Strukturanaloga des Toluols und einiger Enzyminhibitoren auf das Wachstum von Stamm Tol2 mit Toluol, Benzoat oder Malat. Die Testsubstanzen wurden mit den in Klammern angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Alle Konzentrationsangaben (außer solche in Prozent) sind in mM. Konzentrationen in % (v/v) beziehen sich auf Verdünnungen von schlecht wasserlöslichen Verbindungen in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase. +, Hemmung, d.h. kein Wachstum; -, keine Hemmung, d.h. Wachstum; nb, Wirkung nicht bestimmt.

Testsubstanz	Wachstumssubstrat		
	Toluol (1 %)	Benzoat (4)	Malat (5)
<i>o</i> -Xylol (1 %) ^a	-	nb	nb
<i>m</i> -Xylol (1 %) ^a	-	nb	nb
<i>p</i> -Xylol (1 %) ^a	-	nb	nb
2-Fluortoluol (1 %)	+	-	nb
3-Fluortoluol (1 %)	+	-	nb
4-Fluortoluol (1 %)	+	-	nb
Benzylamin (1)	-	nb	nb
Benzylbromid (1 %)	+	+	+
Benzylchlorid (1 %)	+	+	+
2-Methylbenzoat (1)	_b	nb	nb
3-Methylbenzoat (1)	_b	nb	nb
4-Methylbenzoat (1)	_b	nb	nb
2-Fluorbenzoat (1)	+	_b	nb
3-Fluorbenzoat (1)	+	_b	nb
4-Fluorbenzoat (1)	+	_b	nb
Cyanid (1)	+	+	+
Iodacetamid (5)	+	+	+
Semicarbazid (1)	-	nb	nb
Azid (1)	-	nb	nb
Pyrazol (1)	-	nb	nb
4-Methylpyrazol (1)	-	nb	nb
CO (10 %) ^c	+	+	+

^a Keines der drei Isomere des Xylols war Wachstumssubstrat für Stamm Tol2 (Rabus et al. 1993)

^b Stamm Tol2 konnte keines der Isomere von Fluorbenzoat oder Methylbenzoat als Wachstumssubstrat verwenden, wenn diese in Konzentrationen von 1-4 mM als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle angeboten wurden.

^c CO-Gas wurde dem Gasraum von Wachstumskulturen mit einer Plastikspritze anoxisch und steril zugesetzt. Die Angabe % (v/v) bezieht sich hier auf das Volumen des Gasraumes (5 ml).

Alle drei Isomere des Xylols bzw. des Methylbenzoats waren keine Wachstumssubstrate für Stamm Tol2 und inhibierten das Wachstum auf Toluol nicht. Damit sollten die Xylole geeignete Substanzen für Versuche zur Anhäufung von Dead-End-Metaboliten aus Strukturanaloga des Toluols sein. Die Isomere des Fluortoluols und des Fluorbenzoats inhibierten das Wachstum auf Toluol, nicht aber auf Benzoat. Bei niedrigeren, für den

Toluolmetabolismus nicht toxischen Konzentrationen könnten die Fluortoluole ebenfalls als Strukturanaloga für die Bildung von Dead-End-Produkten dienen.

4. Bestimmung von Dead-End-Metaboliten in Zellsuspensionen

Um Hinweise auf die Startreaktionen der anaeroben Toluolaktivierung zu erhalten, wurden Überstände von Wachstumsansätzen und Zellsuspensionen durch HPLC-Analyse auf mögliche Intermediate der Toluoloxidation geprüft. Weder durch Inhibierung des Wachstums und der Sulfatreduktion nach Zugabe von Benzylalkohol noch durch Sulfatlimitierung konnten Zellen des Stamms Tol2 zum Ausscheiden von frühen Intermediaten oder dem zentralen Intermediat Benzoat gebracht werden.

Daraufhin wurden verschiedene Strukturanaloga des Toluols eingesetzt, um eine Anhäufung von Dead-End Metaboliten zu erreichen. Die Dead-End-Metabolite sollten schließlich Rückschlüsse über die Startreaktion zulassen.

p-Xylol war kein Wachstumssubstrat (Rabus et al. 1993) und hemmte weder das Wachstum auf Toluol (Rabus 1992) noch die Toluoloxidation in Zellsuspensionen (Abb. 17). Aus frischen, nicht-stationären Massenanzuchten ($OD_{660} = 0,2$) von Stamm Tol2 auf Toluol bzw. Benzoat wurden dichte Zellsuspensionen ($OD_{660} = 8,0$) hergestellt. Diese Suspensionen aus Zellen von Toluol- bzw. Benzoat-Anzuchten wurden mit Heptamethylnonan überschichtet und mit Toluol (1 %, v/v) oder einem Gemisch aus Toluol und *p*-Xylol (je 1 %, v/v) bzw. mit Benzoat (4 mM) und *p*-Xylol (1 %, v/v) als Elektronendonatoren versetzt. Danach wurden die Zellsuspensionen bei 28 °C inkubiert. Nach 3 h und am Ende der Inkubation (Abb. 17) wurden Proben zur Gewinnung von zellfreien Überständen für die HPLC-Analyse entnommen. Eine signifikante Bildung von *p*-Methylbenzoat wurde in toluoloxidierenden Zellen beobachtet, wenn zusätzlich zum Toluol auch noch *p*-Xylol vorhanden war (Abb. 18A); nach 3 h betrug die Konzentration von *p*-Methylbenzoat im zellfreien Überstand 40 µM und nach ca. 30 h 152 µM. In den Ansätzen mit Toluol (Abb. 18B) bzw. Benzoat und *p*-Xylol (Abb. 18C) wurden weniger als 5 µM *p*-Methylbenzoat gebildet. Demzufolge erfolgt die Oxidation von *p*-Xylol zu *p*-Methylbenzoat durch das toluolaktivierende Enzymsystem. *p*-Methylbenzoat wurde durch Standardaddition (G. Abb. 15) und Spektrenvergleich (G. Abb. 9) identifiziert. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve von *p*-Methylbenzoat (G. Abb. 12) im Probenmilieu erstellt. Dazu wurden die *p*-Methylbenzoat-Standards im filtrierten Überstand von Zellsuspensionen, denen nur Toluol als Elektronendonator zugesetzt worden war, hergestellt.

Im Probenmilieu lag die Retentionszeit von *p*-Methylbenzoat bei 10,6 min und nicht wie im Eluenten gelöst bei 11,0 min.

In Vorversuchen (C. II. 3.) wurde bereits gezeigt, daß *p*-Fluortoluol bei einer Konzentration von 1 % (v/v, in Heptamethylnonan) spezifisch das Wachstum auf Toluol inhibierte. In dichten Suspensionen ($OD_{660} = 8,0$) von toluoloxidierenden Zellen verminderte *p*-Fluortoluol die Sulfidbildung bereits deutlich (Abb. 19), wenn es in einer niedrigen Konzentration von 0,1 % (v/v) zusammen mit Toluol (1 %, v/v) als Elektronendonator eingesetzt wurde. Dennoch wurde in den Überständen solcher Suspensionen *p*-Fluorbenzoat (G. Abb. 16) nach 30 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 210 μM angehäuft. Die Identifizierung und Quantifizierung von *p*-Fluorbenzoat wurde analog zu der von *p*-Methylbenzoat durchgeführt.

In dichten Suspensionen ($OD_{660} = 8,0$) von Toluol oxidierenden Zellen wurde ein nicht identifizierbares Dead-End-Produkt (G. Abb. 17) gebildet, wenn *o*-Xylol und Toluol (je 1 %, v/v) gleichzeitig zugesetzt wurden. Die Sulfidbildung in den Zellsuspensionen wurde nicht durch *o*-Xylol beeinflusst. Der Metabolit war nicht mit *o*-Methylbenzoat identisch, denn er hatte relativ zur Standardsubstanz (10,4 min in der Probenmatrix) eine deutlich kürzere Retentionszeit (8,3 min) und ein völlig abweichendes UV-Absorptionsspektrum. Das UV-Absorptionsspektrum ähnelte sehr dem von *o*-Methylbenzylalkohol. Eine Standardaddition von *o*-Methylbenzylalkohol ergab allerdings zwei Peaks. Demzufolge war der Metabolit auch nicht mit *o*-Methylbenzylalkohol identisch. Mit Hilfe des bei der Standardaddition eingesetzten *o*-Methylbenzylalkohols (100 μM) wurde die Konzentration des Metaboliten im zellfreien Überstand auf ca. 200 μM geschätzt. Da *o*-Methylbenzylsuccinat nicht käuflich zu erwerben ist, konnte diese Substanz nicht zur Identifizierung des Metaboliten herangezogen werden. In Analogie zu Benzylalkohol und Benzylsuccinat, die mit 6,4 min bzw. 6,7 min ähnliche Retentionszeiten und darüberhinaus gleiche UV-Absorptionsspektren besitzen, könnte es sich bei dem nicht identifizierten Metaboliten um *o*-Methylbenzylsuccinat handeln. In späteren Versuchen könnte dieser Metabolit nach Derivatisierung zum Methylester durch GC/MS-Analyse identifiziert werden.

In Etherextrakten von dichten Zellsuspensionen ($OD_{660} = 8,0$), denen Toluol (2 %, v/v) als einziger Elektronendonator zugesetzt wurde, konnte ein Metabolit (G. Abb. 18) als Benzylsuccinat identifiziert werden. Das UV-Absorptionsspektrum des Metaboliten deckte sich mit dem von Benzylsuccinat und Benzylalkohol. Bei Standardadditionen coeluierte der Metabolit mit Benzylsuccinat (G. Abb. 19), während die Zugabe von Benzylalkohol zwei Peaks ergab (G. Abb. 20). Anhand der bei der Standardaddition eingesetzten Konzentration von Benzylalkohol (20 μM), konnte die Konzentration des Metaboliten im Extrakt auf ca. 10 μM geschätzt werden. Der Metabolit wurde nicht in Etherextrakten von Benzoat oxidierenden

Zellsuspensionen gefunden. Demnach ist die Bildung von Benzylsuccinat spezifisch für den Toluolmetabolismus.

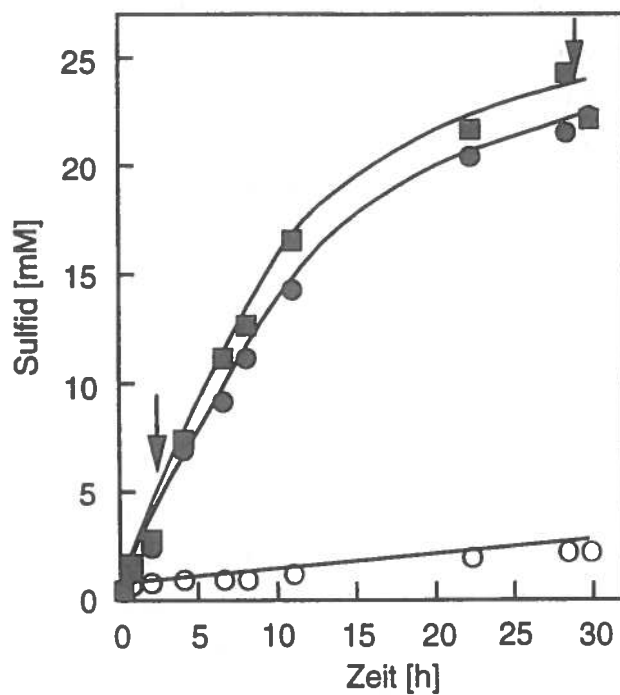


Abb. 17: Zellsuspensionen aus Toluolanzuchten von Stamm Tol2 zur Bildung von *p*-Methylbenzoat als Dead-End-Produkt aus *p*-Xylol: ■, mit Toluol (2 %, v/v); ●, mit einem Gemisch aus *p*-Xylol und Toluol (je 1 %, v/v); ○, ohne organisches Substrat; Pfeil, Zeitpunkt der Probenahme für HPLC-Analyse.

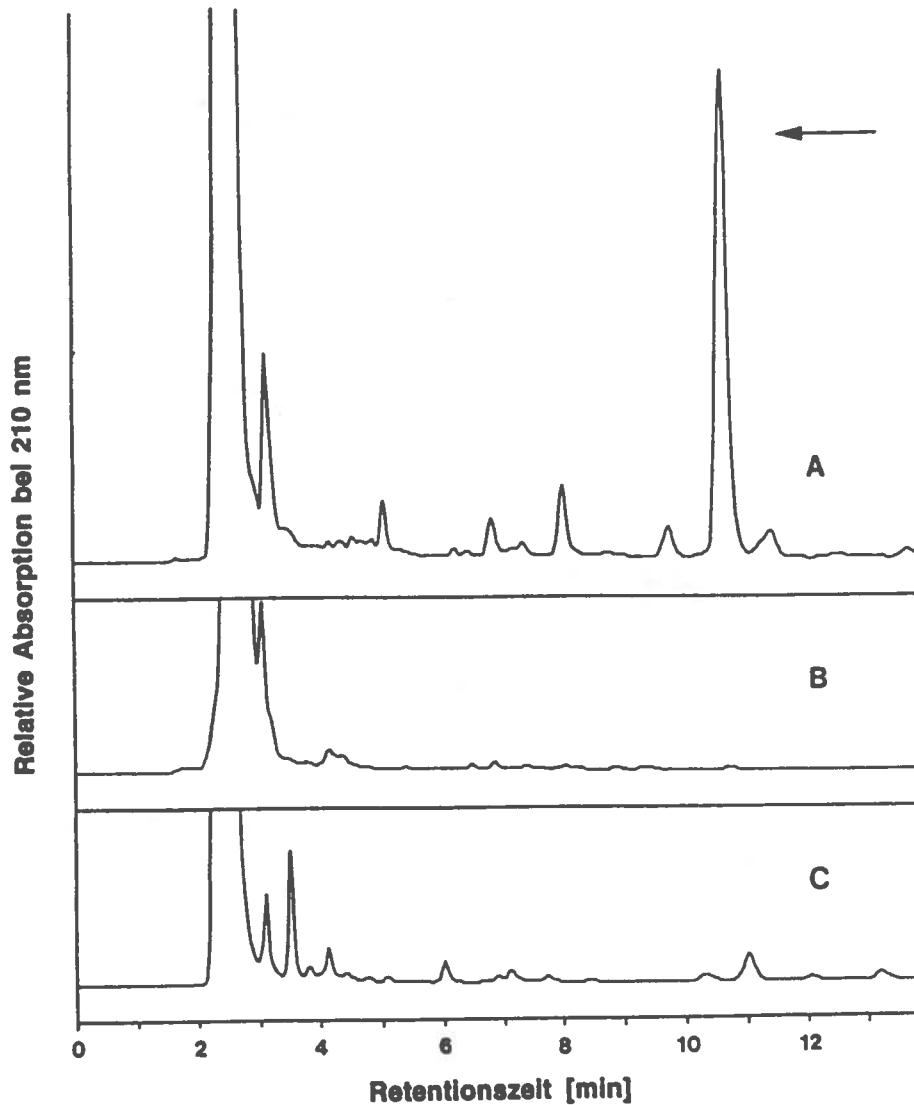


Abb. 18: HPLC Chromatogramme von zellfreien Überständen aus Zellsuspensionen von Stamm Tol2 zeigen die spezifische Bildung von *p*-Methylbenzoat als Dead-End-Produkt aus *p*-Xylol während der Toluoloxidation. **A** Zellsuspension aus einer Toluolanzucht, mit Toluol und *p*-Xylol als Elektronendonatoren; **B** Zellsuspension aus einer Toluolanzucht, mit Toluol als einzigem Elektronendonator; **C** Zellsuspension aus einer Benzoatanzucht, mit Benzoat und *p*-Xylol als Elektronendonatoren. Toluol und *p*-Xylol wurden als 1 %ige Lösungen in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase zugesetzt. Die Verbindung (Pfeil), die bei 10,6 min eluierte, wurde als *p*-Methylbenzoat identifiziert; ihre Konzentration im zellfreien Überstand betrug 152 μM .

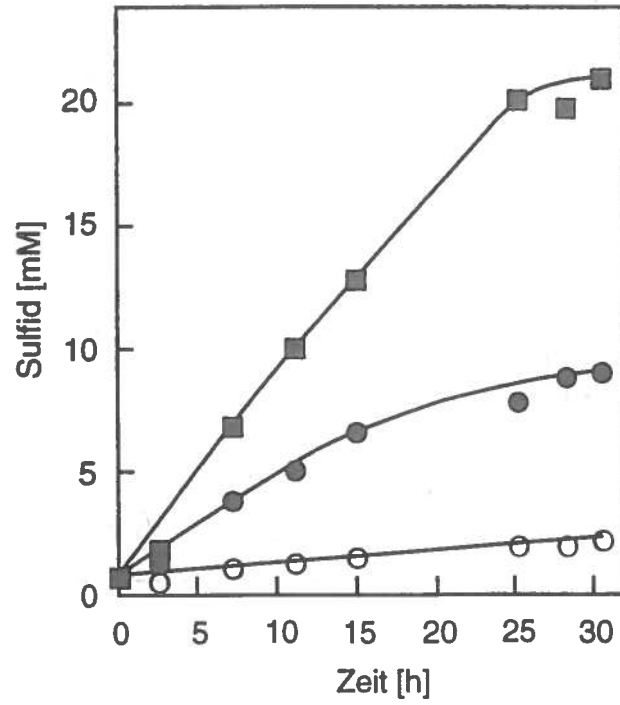


Abb. 19: Zellsuspensionen aus Toluolanzuchten von Stamm Tol2 zur Bildung von *p*-Fluorbenzoat als Dead-End-Produkt aus *p*-Fluortoluol: ■, mit Toluol (2 %, v/v); ●, mit einem Gemisch aus *p*-Fluortoluol und Toluol (je 1 %, v/v); ○, ohne organisches Substrat.

5. Nachweis induzierbarer Proteine mit 2-dimensionaler Gelelektrophorese

Proteine, die Stamm Tol2 spezifisch für den Toluolmetabolismus induziert, sollten mit Hilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Der Einsatz dieser Methode basierte auf der Überlegung, daß von den N-terminalen Sequenzen der gelelektrophoretisch getrennten Proteine, die mit Toluol als Substrat exprimiert werden, DNA Sequenzen abgeleitet werden könnten, die ihrerseits als DNA-Sonden verwendet den Zugang zu den Strukturgenen dieser Proteine ermöglichen könnten. Ein ähnliche experimentelle Vorgehensweise wurde beispielsweise bei der Untersuchung von Proteinen aus der Mausleber bereits beschrieben (Champion et al. 1994).

Aus einer früheren Arbeit war bekannt, daß die Fähigkeit zur Verwertung von Toluol in Zellen, die auf Benzoat gewachsen waren, nicht konstitutiv vorhanden war (Rabus et al. 1993). Deshalb sollten Proteine, die spezifisch für den Toluolmetabolismus waren, in Benzoat metabolisierenden Zellen nicht zu finden sein. Rohextrakte aus Anzuchten von Stamm Tol2 auf Toluol bzw. Benzoat wurden in die 2-dimensionale Gelelektrophorese eingesetzt (Abb. 20 und 21). Dabei wurden die Proteine in der Horizontalen (erste Dimension) durch isoelektrische Fokussierung und in der Vertikalen (zweite Dimension) durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese getrennt. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. In Zellen aus Toluol-Anzuchten konnte ein kleines Protein nachgewiesen werden (Abb. 20), das nicht in Zellen aus Benzoat-Anzuchten vorkam (Abb. 21). Die Molekülmasse des kleinen Proteins konnte mit Hilfe interner Standards auf 18 kDa geschätzt werden (Kathleen Champion, persönliche Mitteilung). Aufgrund seiner niedrigen Molekülmasse handelt es sich bei diesem kleinen Protein vermutlich um die Untereinheit eines größeren Proteins.

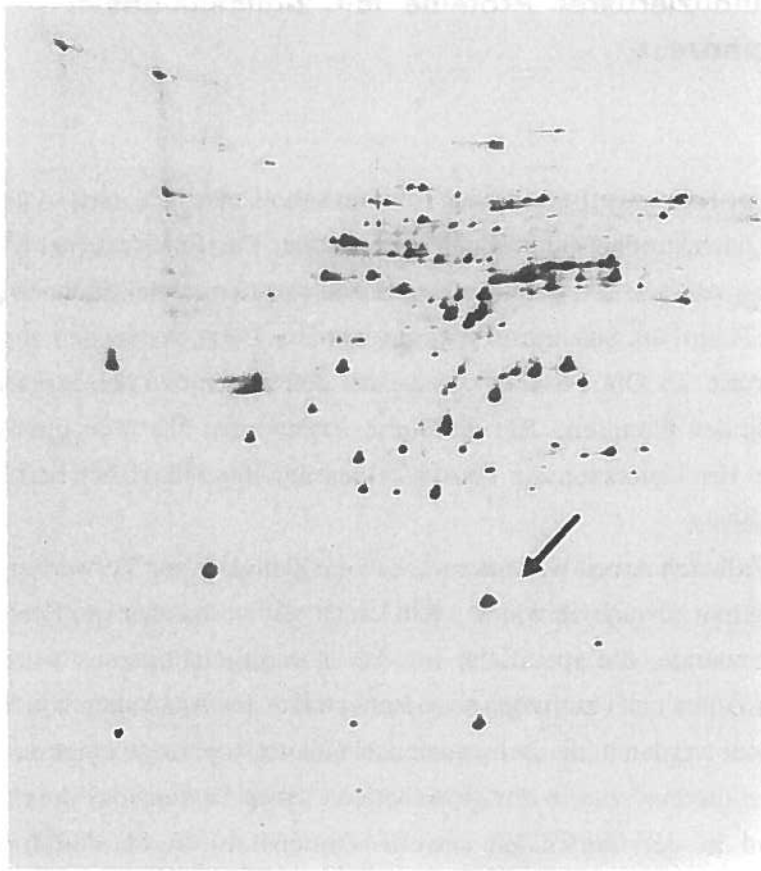


Abb. 20: 2-Dimensionales gelelektrophoretisches Proteinmuster von auf Toluol gewachsenen Zellen des Stammes Tol2. Nach Zellaufschluß in einer French-Press wurden die Proteine mit TCA gefällt und danach in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) verlief horizontal und die SDS-Gelelektrophorese (zweite Dimension) vertikal von oben nach unten. Die getrennten Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht. An der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle läuft ein Protein, das spezifisch für den Toluolmetabolismus ist. Das Protein ist in Rohextrakten von auf Benzoat gewachsenen Zellen nicht vorhanden (Abb. 21).

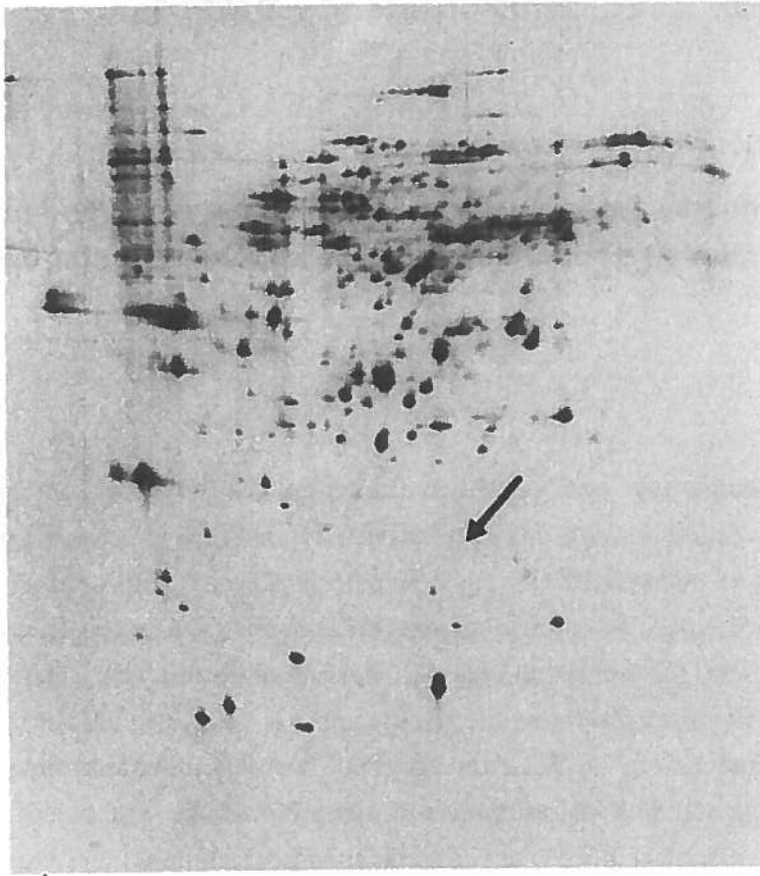


Abb. 21: 2-Dimensionales gelelektrophoretisches Proteinmuster von auf Benzoat gewachsenen Zellen des Stammes Tol2. Nach Zellaufschluß in einer French-Press wurden die Proteine mit TCA gefällt und danach in die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) verlief horizontal und die SDS-Gelelektrophorese (zweite Dimension) vertikal von oben nach unten. Die getrennten Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht. An der mit dem **Pfeil** gekennzeichneten Stelle ist hier kein Proteinspot zu erkennen. An dieser Stelle trat dagegen in Rohextrakten von auf Toluol gewachsenen Zellen ein deutlicher Proteinspot auf (Abb. 20).

Teil II - Anaerober Abbau von Ethylbenzol und Propylbenzol durch neue denitrifizierende Bakterien

1. Anreicherung und Isolierung von Alkylbenzol abbauenden nitratreduzierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen

Anreicherung

Versuche zur Anreicherung von anaeroben Bakterien, die Alkylbenzole mit Nitrat als Elektronenakzeptor oxidieren, wurden mit Ethylbenzol, *n*-Propylbenzol, Isopropylbenzol, *n*-Butylbenzol, *o*-Xylol und *p*-Xylol (jeweils 2 % in der Trägerphase) als einzigen Kohlenstoff- und Energiequellen versucht. Als Anreicherungsgefäße dienten spezielle 1 l Flaschen (B. 2.3. Abb. 9), die mit 400 ml Schlamm aus Süßwasserstandorten (B. 2.1.) und 600 ml Mineralmedium für nitratreduzierende Bakterien (B. 2.2.2.) befüllt wurden. Die Inkubationstemperatur betrug 28 °C. Zum Vergleich wurden außerdem nitratreduzierende Bakterien mit Toluol und *m*-Xylol angereichert. Über den Abbau von Toluol und *m*-Xylol durch Reinkulturen anaerober Bakterien wurde bereits mehrfach berichtet (Altenschmidt und Fuchs 1991, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Fries et al. 1994, Lovley und Lonergan 1990, Rabus et al. 1993, Schocher et al. 1991). Die Nitratreduktion wurde regelmäßig mit HPLC-Analyse (B. 3.3.) gemessen. 2 bis 5 mal pro Woche wurde der Überdruck infolge starker N₂-Produktion durch Einstechen einer Kanüle aus der Anreicherungsflasche entlassen. Die Messung des Gasvolumens erfolgte mit Hilfe eines in Wasser getauchten Spritzenzylinders; der Spritzenzylinder war über einen Schlauch und eine Kanüle mit dem Gasraum der Anreicherungsflasche verbunden. Die Anreicherungen wurden 1 bis 2 mal täglich kräftig geschüttelt. Wenn Nitrat und Nitrit vollständig verbraucht waren, wurden erneut 10 mM des Elektronenakzeptors zugegeben. In einer Kontrolle, der kein Substrat zugegeben worden war, verlief die Denitrifikation durch Elektronendonatoren aus dem Schlamm anfangs fast genauso schnell wie in den Ansätzen mit aromatischen Substraten. Nach 2 Wochen begann die Anreicherung mit Toluol Nitrat schneller zu reduzieren als die Kontrolle. Die Nitratreduktionsrate in den Ansätzen mit Ethylbenzol und *m*-Xylol nahm im Vergleich zur Kontrolle nach 6 Wochen zu, mit Propylbenzol nach 14 Wochen. Innerhalb von 14 Wochen wurde 12 mal Nitrat zugegeben. Parallel zur zunehmenden Nitratreduktion entwickelte sich auf der Oberfläche des Silikonschlauches in der Anreicherungsflasche ein dichter Biofilm aus Bakterien und Protozoen. Proben von diesem Biofilm und dem Schlamm dienten als Inokulum

für Folgekulturen (40 ml). Die Folgekulturen wurden in kleinen Glasflaschen (50 ml), die einen 10 ml Gasraum aus N₂/CO₂ (90/10, v/v) enthielten und mit Butylstopfen verschlossen waren, mit in Heptamethylnonan gelösten aromatischen Kohlenwasserstoffen durchgeführt. Mit zunehmender Inkubationsdauer entwickelten sich in den Anreicherungen bakterienfressende Flagellaten. Um ein Überhandnehmen der Flagellaten zu verhindern, wurden die Anreicherungen häufig in frisches Medium übertragen und bald über Verdünnungsreihen gereinigt.

Mit Isopropylbenzol, Butylbenzol, *o*-Xylol und *p*-Xylol konnten keine nitratreduzierenden Bakterien angereichert werden.

Isolierung

Aliquots aus den vierten Folgepassagen wurden als Startinokuli für Agarverdünnungsreihen (B. 2.3.) eingesetzt. Innerhalb von 1 bis 2 Wochen entstanden weiße und ockerfarbene Kolonien bis zur sechsten Verdünnungsstufe. Direkt unterhalb der Kohlenwasserstoffphase waren die ockerfarbenen Kolonien am häufigsten und am größten. Die weißen Kolonien waren deutlich kleiner als die ockerfarbenen Kolonien. Die Zellen in den ockerfarbenen Kolonien waren coccoid bis stäbchenförmig und entsprachen damit morphologisch den Zellen, die in den Anreicherungen dominierten. Daher wurden aus der sechsten Verdünnungsstufe freiliegende ockerfarbene Kolonien isoliert und in eine weitere Agarverdünnungsreihe übertragen. Aus den jeweils zweiten Agarverdünnungsreihen wurden dann vier nitratreduzierende Reinkulturen mit den Stammbezeichnungen EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 auf den Substraten Ethylbenzol, Propylbenzol, Toluol bzw. *m*-Xylol isoliert. Bei den Reinheitskontrollen (B. 2.3.) mit verschiedenen organischen Substraten wurde im mikroskopischen Bild immer der gleiche Zelltyp beobachtet.

2. Phylogenetische Verwandtschaft der Neuisolate mit *Thauera selenatis* und *Azoarcus* spp.

Mit den Sequenzdaten der 16S rDNA ließen sich alle vier Neuisolate in die β-Gruppe der Proteobakterien einordnen (Abb. 22). Innerhalb der β-Gruppe zeigten die Isolate eine Zugehörigkeit zu der phylogenetischen Gruppe, die *Thauera selenatis* (Macy et al. 1993), *Azoarcus* spp. (Reinhold-Hurek et al. 1993) und vor kurzem beschriebene Toluol abbauende nitratreduzierende Bakterien (Altenschmidt und Fuchs 1991, Fries et al. 1994) umfaßt.

Die GC-Gehalte der DNA der Neuisolate waren mit 65 mol% (Stamm EbN1), 66,8 mol% (Stamm PbN1), 66,9 mol% (Stamm mXyN1) und 66,0 mol% (Stamm ToN1) denen von *Thauera selenatis* (66,0 mol%; Macy et al. 1993) und *Azoarcus indigens* (66,6 mol%; Reinhold-Hurek et al. 1993) auffallend ähnlich und bestätigten das aus der 16S rDNA Sequenz abgeleitete Verwandtschaftsverhältnis.

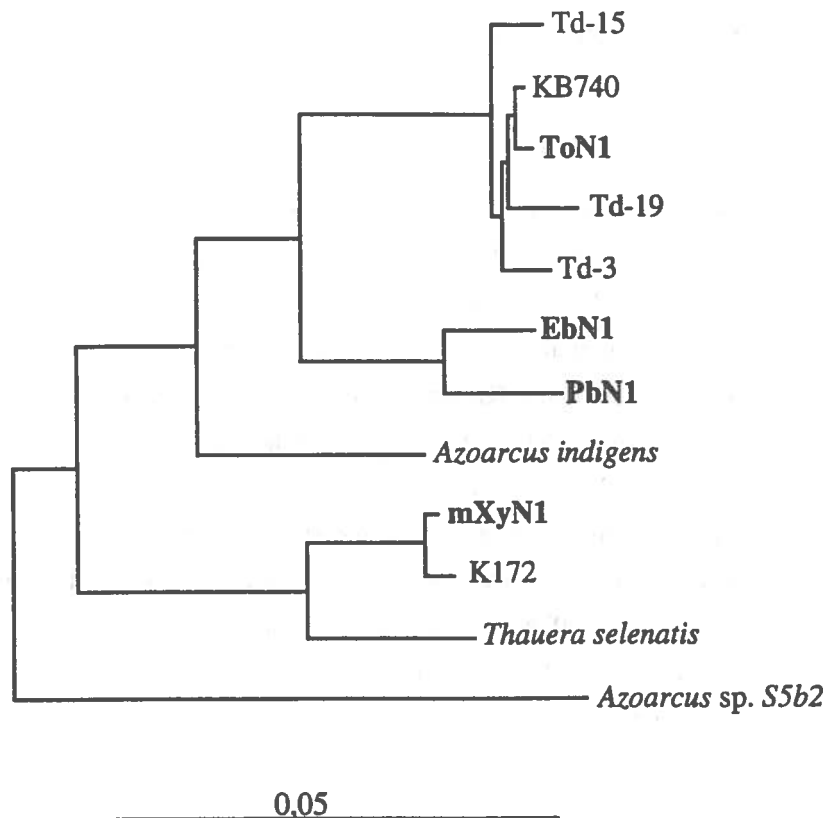


Abb. 22: Phylogenetische Verwandtschaft der neu isolierten Alkylbenzol abbauenden nitratreduzierenden Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 zu *Thauera selenatis*, *Azoarcus* spp. und bekannten Toluol und *m*-Xylol abbauenden Denitrifizierern. Die in dem Stammbaum aufgeführten Bakterien gehören alle zur β -Gruppe der Proteobakterien. Bei den Stämmen K172 (Tschech und Fuchs 1987, Altenschmidt und Fuchs 1991), Td-3, Td-15 und Td-19 (Fries et al. 1994) handelt es sich um Toluol verwertende Denitrifizierer aus anderen Arbeitsgruppen. Stamm KB740 ist ein 2-Aminobenzoat verwertender Denitrifizierer (Braun und Gibson 1984). Der Maßstab entspricht 5 ausgetauschten Nukleotiden pro 100 Nukleotiden. Der phylogenetische Stammbaum wurde von Dr. Fred Rainey erstellt.

3. Morphologische, physiologische und andere Eigenschaften der Neuisolate

Morphologische Eigenschaften

Alle vier Isolate waren morphologisch einander ähnliche, ovale bis stäbchenförmige Zellen mit Abmessungen von 0,6-0,8 x 1,5-2,5 μm (Stamm EbN1; Abb. 23A), 1 x 1,5-2,5 μm (Stamm PbN1; Abb. 23B), 0,6-0,8 x 1-2 μm (Stamm ToN1; Abb. 23C) und 0,5-1 x 1,5-3 μm (Stamm mXyN1; Abb. 23D). Die Zellen aller vier Stämme waren beweglich. Unter aeroben Wachstumsbedingungen veränderte sich die Morphologie aller vier Stämme. Die Zellen wurden ca. 2-3 mal so groß wie unter anaeroben Wachstumsbedingungen und bildeten ausgeprägte Ketten.

Temperatur- und pH-Optima

Das Wachstum von Stamm EbN1 wurde bei Temperaturen von 17, 24, 28, 31, 35, 40, 45 und 50 °C untersucht. Dabei zeigte sich ein Wachstum in einem Temperaturbereich von 17 bis 40 °C mit einem Optimum bei 31 °C. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener pH-Werte (10 Werte zwischen pH 5,6 und 9,0) auf das Wachstum von Stamm EbN1 getestet. Stamm EbN1 wuchs in einem pH-Bereich von 6,4 bis 8,1 und hatte ein Optimum zwischen 7,1 und 7,4. Die anderen drei Stämme, PbN1, ToN1 und mXyN1, zeigten bei der für Stamm EbN1 optimalen Temperatur und dem optimalen pH-Wert ebenfalls ein gutes Wachstum.

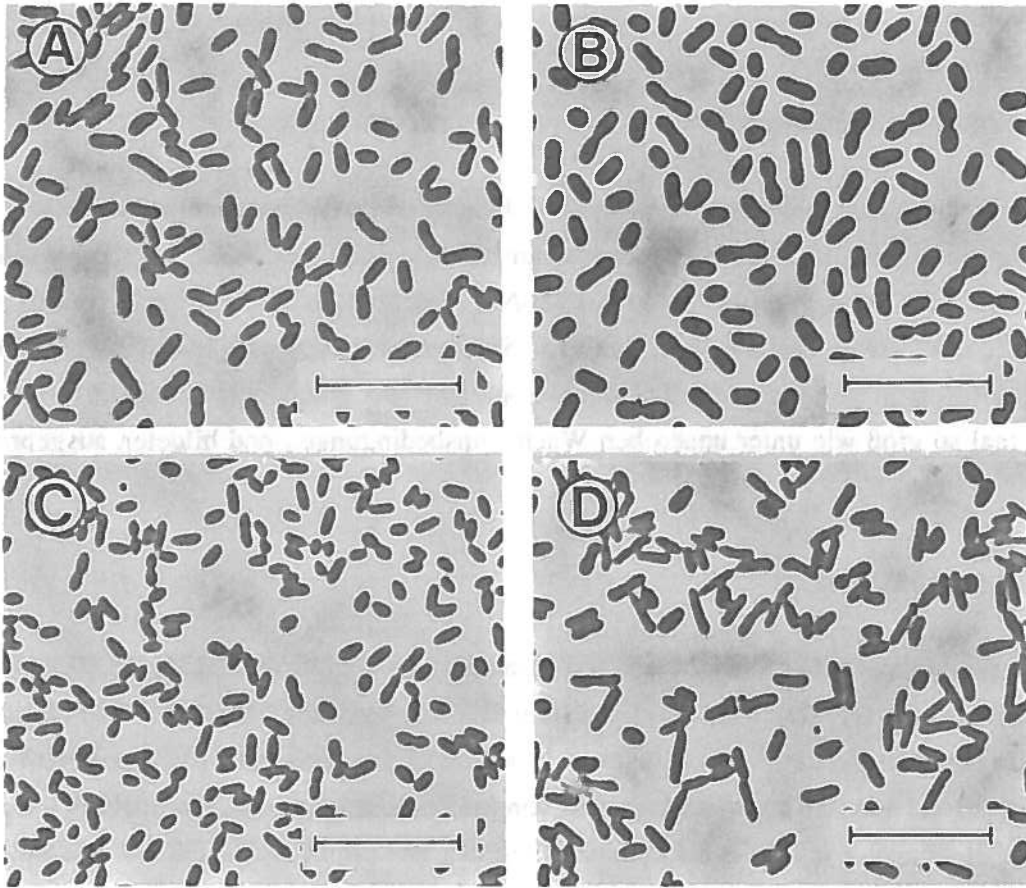


Abb. 23: Phasenkontrastaufnahmen der Alkylbenzol abbauenden nitratreduzierenden Neuisolate. **A** Stamm EbN1 auf Ethylbenzol; **B** Stamm PbN1 auf Propylbenzol; **C** Stamm ToN1 auf Toluol; **D** Stamm mXyN1 auf *m*-Xylol. Der Balken entspricht 10 μm .

Wachstum auf Alkylbenzolen und sonstigen organischen Verbindungen

Beim Wachstum auf Ethylbenzol lag die kürzeste Verdopplungszeit von Stamm EbN1 bei 11 h. Kulturen von Stamm EbN1, die mit 5 % (v/v) beimpft wurden, waren beim Wachstum auf Ethylbenzol innerhalb von 2 Tagen ausgewachsen. Stamm ToN1 dagegen war bei derselben Größe des Inokulums bereits nach 1 Tag auf Toluol ausgewachsen. Der *m*-Xylol verwertende Stamm mXyN1 wuchs fast so schnell wie Stamm EbN1, während Stamm PbN1 für ein vollständiges Wachstum auf Propylbenzol 3-4 Tage benötigte.

Für die schnelle, routinemäßige Anzucht von Stamm EbN1 wurde die Konzentration von Ethylbenzol in Heptamethylnonan von 2 auf 5 % (v/v) erhöht. Bei dieser erhöhten Konzentration in der Trägerphase betrug die Gleichgewichtskonzentration von Ethylbenzol in der wässrigen Phase 0,29 mM. Für die routinemäßige Kultivierung der Stämme PbN1, ToN1 bzw. mXyN1 wurden Propylbenzol, Toluol bzw. *m*-Xylol in Konzentrationen von 5, 2 bzw. 2 % (v/v) in Heptamethylnonan eingesetzt.

Alle vier Isolate zeigten gegenüber Alkylbenzolen eine hohe Substratspezifität. Ein Wachstum wurde mit Stamm EbN1 nur auf Ethylbenzol und Toluol, mit Stamm PbN1 nur auf Propylbenzol und Ethylbenzol, mit Stamm ToN1 nur auf Toluol und mit Stamm mXyN1 nur auf *m*-Xylol und Toluol beobachtet. Keiner der Stämme war in der Lage, Benzol oder Butylbenzol als Wachstumssubstrat zu verwerten. Alle Stämme konnten außer auf den Alkylbenzolen noch auf verschiedenen anderen aromatischen Verbindungen anaerob wachsen. Als Besonderheit zeigte sich hier die Verwertung von aromatischen Ketonen und aromatischen sekundären Alkoholen mit der OH-Gruppe am Benzyl-Kohlenstoffatom in Ringnachbarschaft (1-Phenyl-*n*-alkyl-alkohole) durch die Stämme EbN1 und PbN1 (Tab. 8).

Stamm EbN1 häufte während des Wachstums auf Ethylbenzol im zellfreien Überstand vorübergehend Nitrit an (Abb. 24). Eine Bildung von N₂O oder NH₄⁺ wurde nicht nachgewiesen. Demnach reduzierte Stamm EbN1 Nitrat zu molekularem Stickstoff.

Tabelle 8: Anaerobe Wachstumsversuche mit den denitrifizierenden Stämmen EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 auf aromatischen Kohlenwasserstoffen und polaren Verbindungen. Jede Substanz wurde zweimal mit den in Klammern angegebenen Konzentrationen getestet. Alle Konzentrationsangaben (außer denen in Prozent) sind in mM. Konzentrationen in % (v/v) beziehen sich auf Verdünnungen von schlecht wasserlöslichen Verbindungen in Heptamethylnonan (0,5 ml) als inerte Trägerphase. ++, gutes Wachstum innerhalb von maximal 4 Tagen (bei 5 % Inokulum); +, langsames Wachstum, d.h. Wachstumszeit länger als 4 Tage; -, kein Wachstum; **nb**, nicht bestimmt.

Substrat ^a	Stamm			
	EbN1	PbN1	ToN1	mXyN1
Aromatische Kohlenwasserstoffe				
Benzol (1 %)	-	-	-	-
Toluol (2 %)	++	-	++	++
Ethylbenzol (2 %)	++	++	-	-
<i>n</i> -Propylbenzol (2 %)	-	++	-	-
<i>n</i> -Butylbenzol (2 %)	-	-	-	-
<i>o</i> -Xylol (2 %)	-	-	-	-
<i>m</i> -Xylol (2 %)	-	-	-	++
<i>p</i> -Xylol (2 %)	-	-	-	-
Phenolische Substanzen				
Phenol (0,5; 2)	-	+	+	-
<i>p</i> -Cresol (0,5; 2)	-	-	+	+
Alkohole, Aldehyde und Ketone				
Benzylalkohol (0,5; 2)	++	+	++	-
1-Phenylethanol (0,5; 2)	++	+	-	-
2-Phenylethanol (0,5; 2)	-	nb	nb	nb
1-Phenyl-1-propanol (0,5; 2)	-	+	-	-
1-Phenyl-2-propanol (0,5; 2)	nb	-	nb	nb
3-Phenyl-1-propanol (0,5; 2)	nb	-	nb	nb
<i>m</i> -Methylbenzylalkohol (0,5; 2)	-	-	-	-
Benzaldehyd (0,5; 2)	++	+	++	+
Acetophenon (1 %)	++	++	-	-
Propiophenon (1 %)	-	++	-	-
Aceton (0,5; 2)	++	++	+	-
2-Butanon (0,5; 2)	++	++	+	-
3-Pentanon (0,5; 2)	-	-	-	-
Carbonsäuren				
Benzoat (1; 4)	++	++	++	++
Phenylacetat (1; 4)	++	++	++	++
<i>m</i> -Methylbenzoat (1; 4)	-	-	-	++
Acetat (1; 5)	++	++	++	++
Pyruvat (1; 5)	++	++	++	++

^a Weitere Wachstumssubstrate von Stamm EbN1: Phenylalanin (0,5; 2), Succinat (1; 5), Malat (1; 5), Valerianat (1; 5), Capronat (1; 5), Butyrat (5; 10), Propionat (5; 10), Lactat (5; 10), 1-Butanol (1; 5), 2-Butanol (1; 5), Propanol (1; 5), Isopropanol (5; 10), Ethanol (1; 5).

Substanzen, die Stamm EbN1 nicht als Wachstumssubstrate verwenden konnte: Isopropylbenzol (2; 5 %), 4-Ethyltoluol (0,5; 2 %), Styrol (2 %), Naphthalin (20 mg/ml in Heptamethylnonan), 1-Methylnaphthalin (2; 5 %), 2-Ethylphenol (0,5; 2 %), 3-Ethylphenol (0,5; 2 %), 2-Phenyl-2-propanol (0,5; 2 %), Cyclohexan (2 %), Methylcyclohexan (2 %), Ethylcyclohexan (2 %), Hexan (2; 5 %), Decan (5; 10 %), Hexadecan (20 %; unverdünnt), *o*-Cresol (0,5; 2), *m*-Cresol (0,5; 2), *o*-Methylbenzoat (1; 4), *p*-Methylbenzoat (1; 4), 4-Ethylbenzoat (0,5; 2), Mandelat (0,5; 2), 3-Phenylpropionat (1; 4), 4-Phenylbutyrat (1; 4), Tryptophan (0,5; 2), Tyrosin (0,5; 2), Methanol (5; 10), Formiat (10; 20), Caprylat (1; 2), Palmitat (0,5; 1), Glucose (1; 5), Fructose (1; 5), Mannose (1; 5), Citrat (1; 5), Glycin (1; 5), Serin (1; 5), Alanin (1; 5), Aspartat (1; 5), Glutamat (1; 5).

4. Bilanzierung des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und Bestimmung des Wachstumsertrags von Stamm EbN1

Zur Bestimmung der Abbaubilanz von Ethylbenzol in Stamm EbN1 (Tab. 9) wurden Wachstumsversuche in anoxischen flachen Glasflaschen mit einem Kulturvolumen von 400 ml durchgeführt. Jede Kulturflasche enthielt eine Gesamtmenge an Nitrat von 4,0 mmol (Konzentration: 10 mM). Das Medium wurde mit 10 ml Heptamethylnonan als Trägerphase für Ethylbenzol überschichtet. Im Verhältnis zum verfügbaren Elektronenakzeptor wurde eine begrenzte (0,25 mmol) und eine überschüssige (1,23 mmol) Menge an Ethylbenzol eingesetzt. Während der Inkubation wurden die Zunahme der optischen Dichte, der Verbrauch von Nitrat, sowie die intermediäre Bildung von Nitrit gemessen (Abb. 24). Am Ende der Inkubation wurde Ethylbenzol in der wässrigen Phase und der Trägerphase quantitativ bestimmt. Im Ansatz mit einer begrenzten Menge an Ethylbenzol war dieses vollständig verschwunden, während Nitrat und Nitrit noch vorhanden waren. War Ethylbenzol im Überschuß zugegeben worden, konnte noch ein Drittel davon wiedergefunden werden, während der Elektronenakzeptor vollständig verbraucht war. In einer sterilen Kontrolle wurde während der gesamten Inkubation kein Verlust an Ethylbenzol beobachtet. Diese Kontrolle zeigte, daß die Stopfen im Verlauf des Experimentes kein Ethylbenzol adsorbierten. Der durchschnittliche molare Wachstumsertrag von Stamm EbN1 betrug 114 g Zelltrockenmasse pro Mol oxidierten Ethylbenzols.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde der Einfluß des Reduktionsmittels Ascorbat auf die Nitrat- bzw. Nitritkonzentration untersucht. In sterilen, anoxischen Ansätzen wurde Ascorbat (4 mM) in Gegenwart von Nitrat (10 mM) oder Nitrit (10 mM) für 2 Wochen bei 28 °C inkubiert. Proben zur Analyse wurden mit sterilen, mit N₂ gespülten Spritzen entnommen. Während des gesamten Inkubationszeitraumes blieben die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit unverändert. Zusammen mit der Kontrolle ohne Zellen aus dem Stöchiometrieversuch (Tab. 9) zeigte dies, daß weder Nitrat noch Nitrit durch Ascorbat chemisch reduziert wurde.

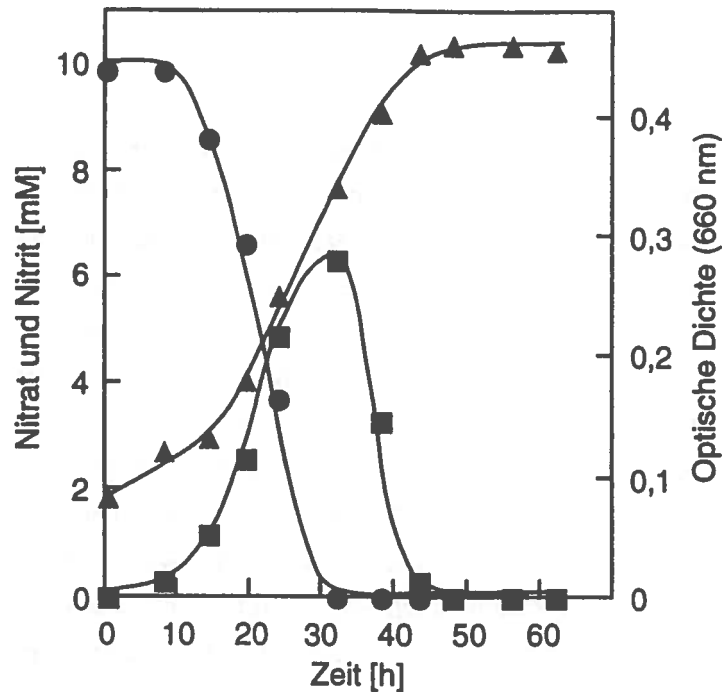


Abb. 24: Anaerobes Wachstum von Stamm EbN1 auf Ethylbenzol und Nitrat (10 mM). Das Wachstumsexperiment (Tabelle 9, Ansatz mit einem Überschuß an Ethylbenzol) wurde in flachen Glasflaschen, die mit Butylsepten verschlossen waren und horizontal inkubiert wurden, durchgeführt: 400 ml Medium, die mit Ascorbat reduziert worden waren, wurden mit 10 ml Heptamethylnonan als inerte Trägerphase überschichtet; 1,23 mmol (0,15 ml) Ethylbenzol wurden der Trägerphase mit einer Mikroliterspritze zugegeben; ein Kontakt der Trägerphase mit dem Butylstopfen wurde vermieden. Die Probenahme erfolgte mit anoxischen Spritzen. Während des Wachstums wurden die optische Dichte bei 660 nm (▲) und die Konzentrationen von Nitrat (●) und Nitrit (■) bestimmt.

Tabelle 9: Quantitative Bestimmung des Ethylbenzolverbrauchs und der Nitratreduktion von Stamm EbN1.

	Experiment			
	Zellen mit begrenzter Menge an Ethylbenzol	Zellen mit überschüssiger Menge an Ethylbenzol	Zellen ohne Ethylbenzol (Kontrolle)	Steriles Medium ohne Zellen (Kontrolle)
Ethylbenzol gegeben [mmol]	0,25	1,23	0,00	1,23
Ethylbenzol verschwunden ^a [mmol]	0,25	0,80	0,00	0,00
NO ₃ ⁻ nach Versuchsende [mmol]	2,5	0,0	4,0	4,0
NO ₂ ⁻ nach Versuchsende [mmol]	0,4	0,0	0,0	0,0
Trockenmasse gebildet ^b [mg]	22	57	0	
Ethylbenzol dissimiliert ^c [mmol]	0,17	0,58		
Elektronen aus dissimiliertem Ethylbenzol ^d [mmol]	6,9	24,3		
Elektronen verbraucht durch Nitratreduktion ^e [mmol]	6,3	20,0	0,0	0,0

^a Angegeben ist die Differenz zwischen der Gesamtmenge an Ethylbenzol (in Trägerphase und wässriger Phase) vor und nach der Inkubation

^b Die Mengen an Trockenmasse, die durch die Inokula in die Wachstumsansätze eingebracht worden waren, wurden von den erzielten Trockenmassen am Versuchsende substrahiert

^c Angegeben ist die Differenz zwischen verschwundenem und assimiliertem Ethylbenzol. Die Menge an assimiliertem Ethylbenzol wurde unter Annahme der folgenden Gleichung berechnet:

$17 \text{ C}_8\text{H}_{10} + 32 \text{ HCO}_3^- + 32 \text{ H}^+ + 30 \text{ H}_2\text{O} \longrightarrow 42 \text{ C}_4\text{H}_7\text{O}_3$. Demnach wurden für die Bildung von 1 mg Zelltrockenmasse 0,00393 mmol Ethylbenzol benötigt.

^d Bei vollständiger Oxidation zu CO₂ werden aus 1 mol Ethylbenzol 42 mol Elektronen erhalten.

^e Elektronen verbraucht = $5 \cdot [\text{Nitrat zugegeben} - (\text{Nitrat gemessen} + \text{Nitrit gemessen})] + 2 \cdot [\text{Nitrit gemessen}]$

5. Messung des Abbaus verschiedener aromatischer Substrate in Zellsuspensionen von Stamm EbN1

Wachstumsversuche (C. II. 3. Tab. 8) hatten gezeigt, daß Stamm EbN1 die Alkylbenzole Ethylbenzol und Toluol als Substrate verwerten konnte. Die beiden Aromaten waren allerdings keine gleichwertigen Wachstumssubstrate. Während Kulturen, die mit Zellen aus Ethylbenzol-Anzuchten beimpft worden waren, auf Ethylbenzol ohne Verzögerung weiterwuchsen und nach ca. 2 Tagen ausgewachsen waren, benötigten sie für das Wachstum auf Toluol nach einer anfänglichen lag-Phase von 2-3 Tagen 4-5 Tage. Die lag-Phase auf letzterem Substrat legte die Vermutung nahe, daß Ethylbenzol metabolisierende Zellen nicht konstitutiv über die Enzymsysteme des Toluolabbaus verfügen und, daß Ethylbenzol und Toluol somit von unterschiedlichen Enzymsystemen aktiviert werden. Diese Induktion des Toluolmetabolismus sollte nochmals genau in Zellsuspensionen gezeigt werden.

Da Stamm EbN1 auch auf möglichen Zwischenprodukten des Ethylbenzol- bzw. Toluolabbaus, nämlich 1-Phenylethanol und Acetophenon bzw. Benzylalkohol und Benzaldehyd sowie auf Benzoat wuchs, sollten diese Substanzen ebenfalls in Suspensionsexperimenten getestet werden.

Die Messung der Substratoxidation in konzentrierten Zellsuspensionen bietet gegenüber Wachstumsversuchen den Vorteil höherer Umsatzraten und damit einer deutlicheren Unterscheidung zwischen vorhandenen und zu induzierenden Stoffwechselfähigkeiten. Anhand der Nitratreduktion in Gegenwart verschiedener Substrate wurde bestimmt, ob die bei Stamm EbN1 in Substrattests beobachteten Abbaufähigkeiten konstitutiv vorhanden waren oder erst induziert werden mußten. Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurden frische auf Ethylbenzol gewachsene Kulturen von Stamm EbN1 2-fach konzentriert, so daß sich eine Zelldichte von $OD_{660} = 0,4$ ergab. Vorversuche hatten nämlich gezeigt, daß Nitrat (10 mM) bei höheren Zelldichten, wie z.B. $OD_{660} = 2,0$, aufgrund einer hohen Aktivität mit endogenen Elektronendonatoren in der Negativkontrolle ohne organisches Substrat innerhalb von ca. 8 h vollständig reduziert wurde. Diese hohe Zelldichte hätte bei langen Induktionszeiten ein wiederholtes Nachfüttern von Nitrat erfordert. Während der Inkubation wurden regelmäßig Proben für die Nitratbestimmung entnommen. Am Ende der Inkubation wurde durch Messen der optischen Dichte bei 660 nm bestimmt, ob in den Zellsuspensionen ein Wachstum stattgefunden hatte. Benzylalkohol und Benzaldehyd wurden je dreimal in Portionen von 1 mM zugegeben, da sie in höheren Konzentrationen die Nitratreduktion verlangsamten.

Zellen, die auf Ethylbenzol gewachsen waren, reduzierten das Nitrat (10 mM) vollständig in Gegenwart von Ethylbenzol (2 %, v/v), Acetophenon (0,5 %, v/v), 1-Phenylethanol (3 mM), Benzoat (4 mM), Benzylalkohol (3 mM) und Benzaldehyd (3 mM)

ohne erkennbare Lag-Phase. Mit Toluol (2 %, v/v) setzte eine signifikante Nitratreduktion erst nach einer langen Lag-Phase von ca. 130 h ein. Zellen, die anaerob auf Ethylbenzol gewachsen waren, konnten somit sofort potentielle Intermediate des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol (Abb. 25) und Toluol (Abb. 26B) verstoffwechseln, nicht aber Toluol selbst (Abb. 26A). Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Aktivierung von Ethylbenzol und Toluol nicht mit dem gleichen Enzymsystem erfolgt. In allen Ansätzen mit aromatischen Substanzen war die Reduktion von Nitrat stets mit einem Wachstum verbunden. Folgende optische Dichten wurden am Ende der Inkubation bestimmt: 0,84 im Ansatz mit Ethylbenzol; 0,86 im Ansatz mit 1-Phenylethanol; 0,87 im Ansatz mit Acetophenon; 0,67 im Ansatz mit Benzylalkohol; 0,65 im Ansatz mit Benzaldehyd; 0,86 im Ansatz mit Benzoat; 0,56 im Ansatz mit Toluol; 0,28 im Ansatz ohne organisches Substrat.

Während der Oxidation von Toluol in den Zellsuspensionen aus Ethylbenzol-Anzuchten wurde das zugegebene Nitrat (10 mM) nicht vollständig reduziert. Nach ca. 105 h Inkubation war zwar kein Nitrat mehr nachweisbar, aber Nitrit war sogar noch nach einer Inkubationszeit von 193 h in einer Konzentration von 6,2 mM vorhanden. Im Vergleich dazu war bei der Oxidation von Ethylbenzol nach ca. 9,5 h weder Nitrat noch Nitrit nachweisbar. Darüber hinaus war in der HPLC Analyse (B. 3.6.) von Überständen aus Toluol oxidierenden Zellsuspensionen ein markanter Unterschied zu den Überständen aus Ethylbenzol oxidierenden Zellsuspensionen zu erkennen. Im Chromatogramm von Überständen aus Ethylbenzol oxidierenden Zellsuspensionen war lediglich ein Durchlaufpeak bei 2,1 min vorhanden. Im Chromatogramm von Überständen aus Toluol oxidierenden Zellsuspensionen war dieser Durchlaufpeak wesentlich kleiner, und zusätzlich war noch ein großer Peak bei 3,1 min vorhanden. Ein Zusatz von Standardlösungen zeigte, daß es sich bei diesem neuen Peak weder um Benzylalkohol noch um Benzylsuccinat handeln konnte. Dieser Peak war nicht nur in Suspensionsversuchen, sondern auch in Wachstumsansätzen auf Toluol zu finden. Interessanterweise sank der pH-Wert beim Wachstum von Stamm EbN1 auf Toluol trotz des Bicarbonat Puffers (44 mM) im Medium von 7,3 am Beginn der Inkubation auf 6,8 am Ende der Inkubation. Im Gegensatz dazu blieb der pH-Wert beim Wachstum auf Ethylbenzol oder Benzoat konstant bei 7,3. Demzufolge wurden beim Wachstum von Stamm EbN1 auf Toluol signifikante Mengen an Säuren ausgeschieden. Bei den weiteren Versuchen zur Identifizierung dieses Peaks mittels HPLC oder LC/GC-MS Analyse sollte nicht nur an aromatische Verbindungen, sondern auch an einfache aliphatische Säuren gedacht werden.

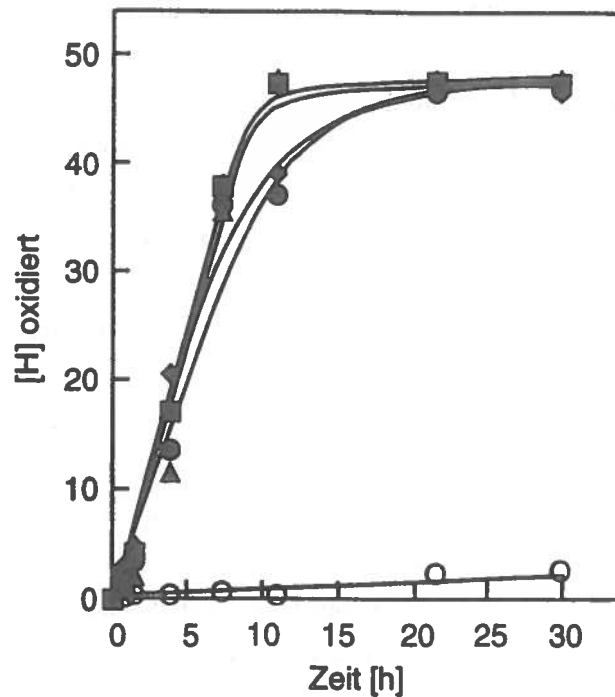


Abb. 25: Prüfung der Fähigkeit zur Oxidation von 1-Phenylethanol, Acetophenon und Benzoat in Zellsuspensionen aus einer Kultur von Stamm EbN1 mit Ethylbenzol und Nitrat (10 mM). Die Oxidation der aromatischen Verbindungen wurde über die Reduktion von Nitrat und intermediär gebildetem Nitrit bestimmt. Die oxidierten Reduktionsäquivalente aus dem Abbau von Ethylbenzol wurden nach folgender Gleichung berechnet: $[H] \text{ oxidiert} = 5 \cdot [\text{Nitrat zugegeben} - (\text{Nitrat bestimmt} + \text{Nitrit bestimmt})] + 2 \cdot [\text{Nitrit bestimmt}]$. Symbole der getesteten Substanzen (Konzentrationen sind in Klammern angegeben): ●, 1-Phenylethanol (3 mM); ▲, Acetophenon (1,0 %, v/v); ◆, Benzoat (4 mM); ■, Ethylbenzol (5,0 %, v/v); ○, ohne organisches Substrat. Die Konzentrationsangaben in % beziehen sich auf die Trägerphase aus Heptamethylnonan (2 ml pro 50 ml Kulturvolumen).

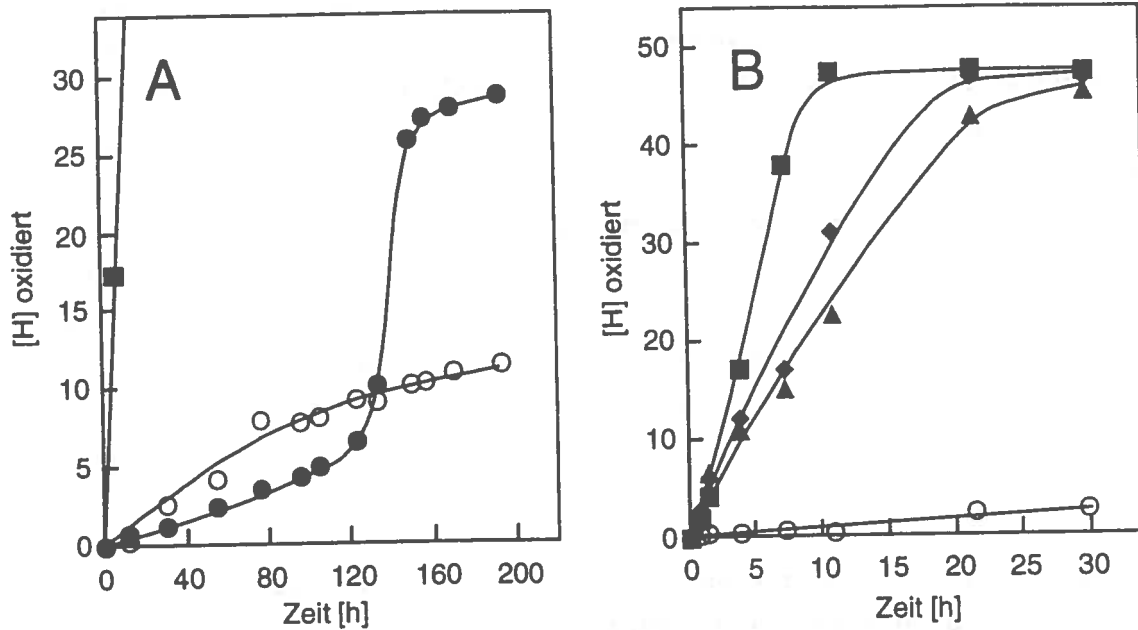


Abb. 26: Prüfung der Fähigkeit zur Oxidation von **A** Toluol und von **B** Benzylalkohol und Benzaldehyd in Zellsuspensionen aus einer Kultur von Stamm EbN1 mit Ethylbenzol und Nitrat (10 mM). Die Oxidation der aromatischen Verbindungen wurde über die Reduktion von Nitrat und intermediär gebildetem Nitrit bestimmt. Die oxidierten Reduktionsäquivalente aus dem Abbau von Ethylbenzol wurden nach folgender Gleichung berechnet: $[H] \text{ oxidiert} = 5 \cdot [\text{Nitrat zugegeben} - (\text{Nitrat bestimmt} + \text{Nitrit bestimmt})] + 2 \cdot [\text{Nitrit bestimmt}]$. Symbole der getesteten Substanzen (Konzentrationen sind in Klammern angegeben): ●, Toluol (2 %, v/v); ◆, Benzylalkohol (3 mM); ▲, Benzaldehyd (3 mM); ■, Ethylbenzol (5 %, v/v); ○, ohne organisches Substrat. Die Konzentrationsangaben in % beziehen sich auf die Trägerphase aus Heptamethylnonan (2 ml pro 50 ml Kulturvolumen).

6. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm EbN1

Versuche mit Zellsuspensionen von Stamm EbN1 hatten gezeigt, daß Zellen aus Ethylbenzol-Anzuchten konstitutiv über die Aktivitäten zur Verwertung von 1-Phenylethanol, Acetophenon, Benzylalkohol und Benzaldehyd verfügen. Falls die Oxidation von Ethylbenzol über 1-Phenylethanol und Acetophenon zu Benzoat bzw. die Oxidation von Toluol über Benzylalkohol und Benzaldehyd zu Benzoat verläuft, wäre neben den Enzymen zur Aktivierung von Ethylbenzol bzw. Toluol eine 1-Phenylethanol-Dehydrogenase bzw. eine Benzylalkohol-Dehydrogenase erforderlich.

Für die Enzymtests wurden anaerobe Rohextrakte aus frischen, nicht stationären Kulturen von Stamm EbN1 mit einer optischen Dichte von $OD_{660} = 0,2$ verwendet. Beide Enzyme, 1-Phenylethanol-Dehydrogenase und Benzylalkohol-Dehydrogenase, waren spezifisch für NAD^+ und NADH. Mit $NADP^+$ bzw. NADPH waren keine Enzymaktivitäten meßbar. Die Hinreaktion der Alkohol-Dehydrogenasen wurde bei pH 9,0, die Rückreaktion bei pH 7,0 gemessen. Bei der Benzylalkohol-Dehydrogenase war die Rückreaktion ($1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$) deutlich schneller als die Hinreaktion ($0,07 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$). Bei der 1-Phenylethanol-Dehydrogenase hatten Hin- und Rückreaktion die gleiche spezifische Aktivität von $0,03 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein}$. Alle gemessenen Aktivitäten waren sehr niedrig. In Kontrollen ohne Rohextrakt, die nur Substrat und Elektronenakzeptor bzw. Elektronendonator enthielten, fand keine Reaktion statt.

7. Hemmung des Wachstums von Stamm mXyN1 auf Toluol und *m*-Xylol durch aromatische Alkohole

Der *m*-Xylol abbauende Stamm mXyN1 war der einzige der neu isolierten Alkylbenzol abbauenden Nitratreduzierer, der nicht auf aromatischen Alkoholen (*m*-Methylbenzylalkohol und Benzylalkohol) wachsen konnte. Vom Toluol abbauenden, sulfatreduzierenden Stamm Tol2 war bereits bekannt, daß Benzylalkohol kein Wachstumssubstrat war; darüber hinaus war Benzylalkohol sogar ein spezifischer Inhibitor des Toluolstoffwechsels (Rabus et al. 1993). Deshalb wurde geprüft, ob *m*-Methylbenzylalkohol und Benzylalkohol auch einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Stamm mXyN1 auf *m*-Xylol und Toluol hatten. Tatsächlich hemmten beide aromatische Alkohole spezifisch das Wachstum auf *m*-Xylol und Toluol bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM. Dagegen wurde das Wachstum von Stamm mXyN1 auf *m*-Methylbenzoat und Benzoat nicht einmal durch 1,0 mM *m*-Methylbenzylalkohol oder Benzylalkohol gehemmt.

8. Aerobe Wachstumsexperimente

Die Fähigkeit zum aeroben Wachstum der Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 wurde mit aromatischen Kohlenwasserstoffen und davon abgeleiteten polaren aromatischen Verbindungen

getestet (Tab. 10). Keiner der neuen Stämme konnte aerob auf irgendeinem der aromatischen Kohlenwasserstoffe, die anaerob verwertet wurden, wachsen. Ebenso wenig wurden aromatische Kohlenwasserstoffe verwertet, wenn neben Sauerstoff noch zusätzlich 10 mM Nitrat vorhanden war. Im Gegensatz dazu war mit der Mehrzahl der polaren aromatischen Verbindungen, die unter anaeroben Bedingungen verwertet wurden, auch ein aerobes Wachstum möglich. In einem Kontrollversuch wurde das aerobe Wachstum auf Benzoat nicht durch die Überschichtung des Mediums (10 ml) mit Heptamethylnonan (0,5 ml) beeinträchtigt. Demzufolge wurde die Diffusion von Sauerstoff aus der Gasphase in die wässrige Phase durch die Trägerphase nicht behindert.

Die Versuche lassen vermuten, daß die Unfähigkeit zum aeroben Wachstum auf aromatischen Kohlenwasserstoffen auf einer Inhibierung der Startreaktionen durch Sauerstoff beruht.

Tabelle 10: Prüfung des aeroben Wachstums der Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 auf aromatischen Kohlenwasserstoffen und polaren aromatischen Verbindungen. Mit jedem Stamm wurden nur solche Verbindungen getestet, die unter anoxischen Bedingungen als Wachstumssubstrate dienen. Jede Verbindung wurde zweimal mit der in Klammern angegebenen Konzentration getestet. Alle Konzentrationsangaben (außer solche in Prozent) sind in mM. Konzentrationen in % (v/v) beziehen sich auf Verdünnungen von schlecht wasserlöslichen Verbindungen in Heptamethylnonan als inerte Trägerphase; ++, gutes Wachstum innerhalb von 2 Tagen; +, schlechtes Wachstum, Wachstumszeit 2-3 Wochen; -, kein Wachstum; nb, nicht bestimmt.

Substrat	Stamm			
	EbN1	PbN1	ToN1	mXyN1
Aromatische Kohlenwasserstoffe				
Toluol (2 %)	-	nb	-	-
Ethylbenzol (2 %)	-	-	nb	nb
Propylbenzol (2 %)	nb	-	nb	nb
<i>m</i> -Xylol (2%)	nb	nb	nb	-
Aromatische Alkohole, Aldehyde und Ketone				
Benzylalkohol (1)	++	nb	++	nb
1-Phenylethanol (1)	++	-	nb	nb
1-Phenylpropanol (1)	nb	-	nb	nb
Benzaldehyd (1)	++	nb	++	+
Acetophenon (0,5 %)	++	+	nb	nb
Propiophenon (0,5 %)	nb	-	nb	nb
Aromatische Carbonsäuren				
Benzoat (2)	++	++	++	++
Phenylacetat (1)	++	++	++	++
<i>m</i> -Methylbenzoat (1)	nb	nb	nb	-

9. Wachstum auf Rohöl

Wachstumsversuche

Alle vier Stämme, EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1, wuchsen anaerob mit sterilem, anoxischem Rohöl als einzigem organischen Substrat und Nitrat als Elektronenakzeptor. Das Wachstum auf Rohöl war fast so gut wie auf den definierten aromatischen Kohlenwasserstoffen, mit denen die Stämme isoliert worden waren. Zunächst wurde für jeden Stamm die minimale Menge an Rohöl bestimmt, die zur vollständigen Reduktion von 10 mM Nitrat benötigt wurde. Dazu wurden für jeden Stamm Wachstumsansätze (10 ml) mit steigenden Rohölmengen (0; 0,05; 0,1; 0,2, 0,5 und 1,0 ml) hergestellt. Während der Inkubation (230 h) wurde das Wachstum regelmäßig durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 660 nm kontrolliert. Für Stamm EbN1 waren ca. 0,2 ml Rohöl, für Stamm PbN1 ca. 0,6 ml Rohöl, für Stamm ToN1 ca. 0,2 ml Rohöl und für Stamm mXyN1 ca. 0,15 ml Rohöl zur vollständigen Reduktion von 10 mM Nitrat und intermediär gebildetem Nitrit in den Wachstumsansätzen (10 ml) notwendig.

Das so für jeden Stamm bestimmte Verhältnis des Volumens von Rohöl zum Volumen des Mediums wurde in größeren Anzuchten eingesetzt, mit denen Wachstumskurven erstellt und Ölproben für die spätere Analyse gewonnen werden sollten. Das schnellste Wachstum wurde mit Stamm ToN1 beobachtet. Stamm ToN1 war bei einem Kulturvolumen von 420 ml mit 9 ml Rohöl und 10 mM Nitrat in 3 Tagen vollständig gewachsen. Als einziger der 4 Isolate bildete Stamm ToN1 beim Wachstum auf Rohöl kein Nitrit (Abb. 27A). In einem Kulturvolumen von jeweils 420 ml mit 6 ml Rohöl benötigten die Stämme mXyN1 und EbN1 5 Tage zum vollständigen Wachstum, während Stamm PbN1 mit 15 ml Rohöl erst nach 6-7 Tagen vollständig gewachsen war (Abb. 27B-D). In einem nitratfreien Kontrollansatz war mit keinem der 4 Stämme ein Wachstum zu beobachten. Im sterilen Kontrollansatz blieb die Nitratkonzentration während der gesamten Inkubationszeit konstant bei 10 mM; Nitrit wurde nicht gebildet.

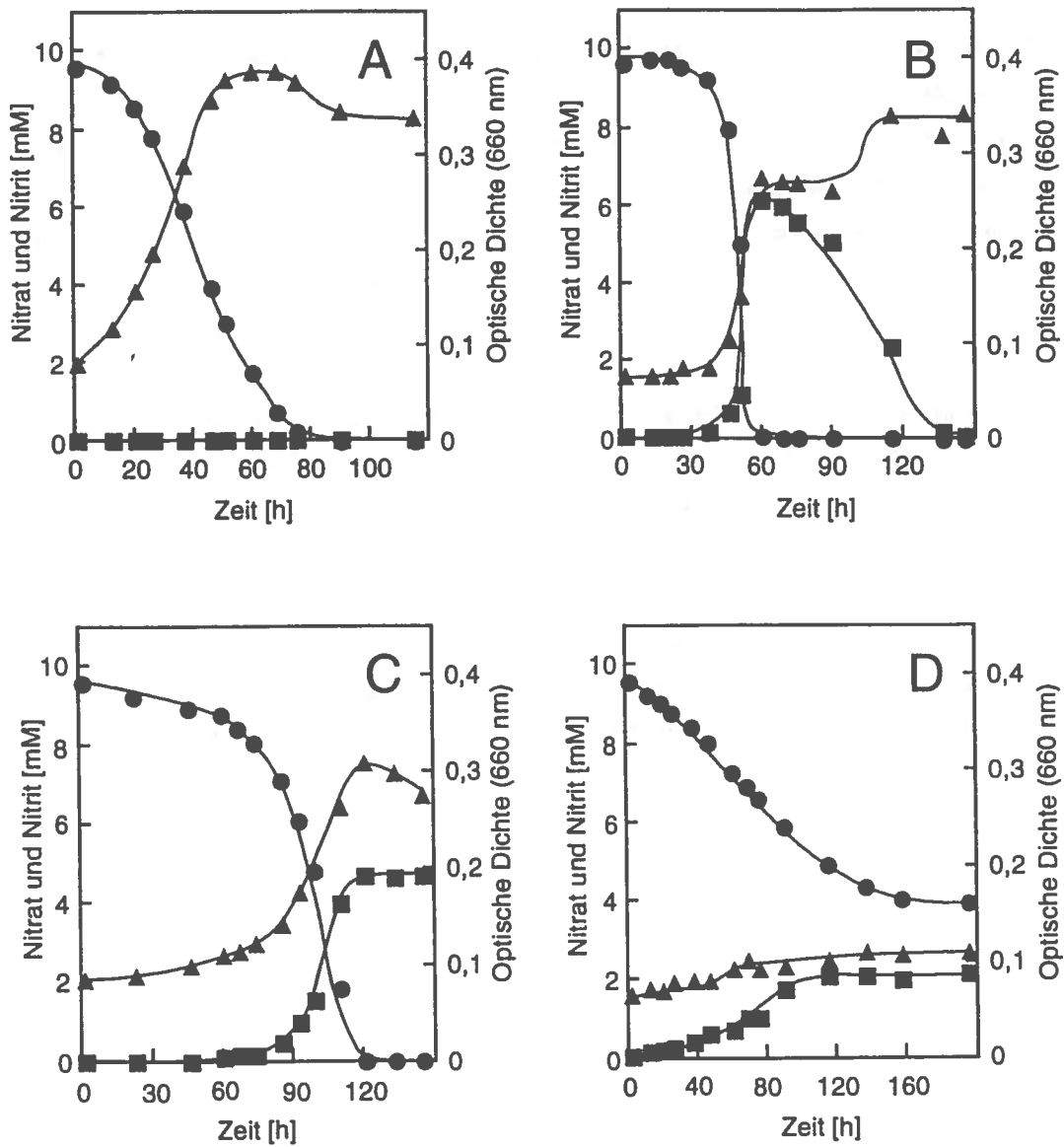


Abb. 27: Anaerobes Wachstum der Stämme ToN1 (A), mXyN1 (B), EbN1 (C) und PbN1 (D) mit Rohöl und Nitrat. Während des Wachstums wurden die optische Dichte bei 660 nm (▲) und die Konzentrationen von Nitrat (●) und Nitrit (■) bestimmt.

Ölanalyse

Die Ölproben aus den zuvor beschriebenen Wachstumsansätzen wurden mit Hilfe einer MPLC-Anlage fraktioniert und am Gaschromatographen auf Veränderungen im Peakmuster der Aromaten- und Alkanfraktion untersucht. Im Vergleich zum steril und anaerob inkubierten Rohöl wurde in allen Wachstumsansätzen eine Veränderung in der Aromatenfraktion (Abb. 28) festgestellt, während die jeweiligen Alkanfraktionen unverändert blieben (Abb. 29). Der Verbrauch der Aromaten aus dem Rohöl durch die Stämme ToN1 und EbN1 entsprach ihren jeweiligen Substratspektra. Stamm ToN1 verwertete Toluol aus dem Öl, während Stamm EbN1 neben Toluol auch noch Ethylbenzol verwertete. Eine gleichermaßen gute Übereinstimmung zwischen Abbaumuster und Substratspektrum war bei den Stämmen PbN1 und mXyN1 nicht gegeben. Während Stamm PbN1 mit Ethylbenzol und Propylbenzol als Reinsubstanzen wuchs, konnte er aus dem Rohöl lediglich Ethylbenzol verwerten. Stamm mXyN1 konnte Toluol und alle drei Isomere des Xylols (Abb. 30) aus dem Rohöl verwerten, obwohl bei Versuchen mit Reinsubstanzen nur ein Wachstum auf Toluol und *m*-Xylol möglich war. Die Verwertung von *o*- und *p*-Xylol aus dem Rohöl durch Stamm mXyN1 könnte analog zur Bildung von *p*-Methylbenzoat aus *p*-Xylol durch den sulfatreduzierenden Stamm Tol2 (C. I. 3.) auf einer unvollständigen Oxidation dieser Xylole zu den korrespondierenden Methylbenzoaten beruhen.

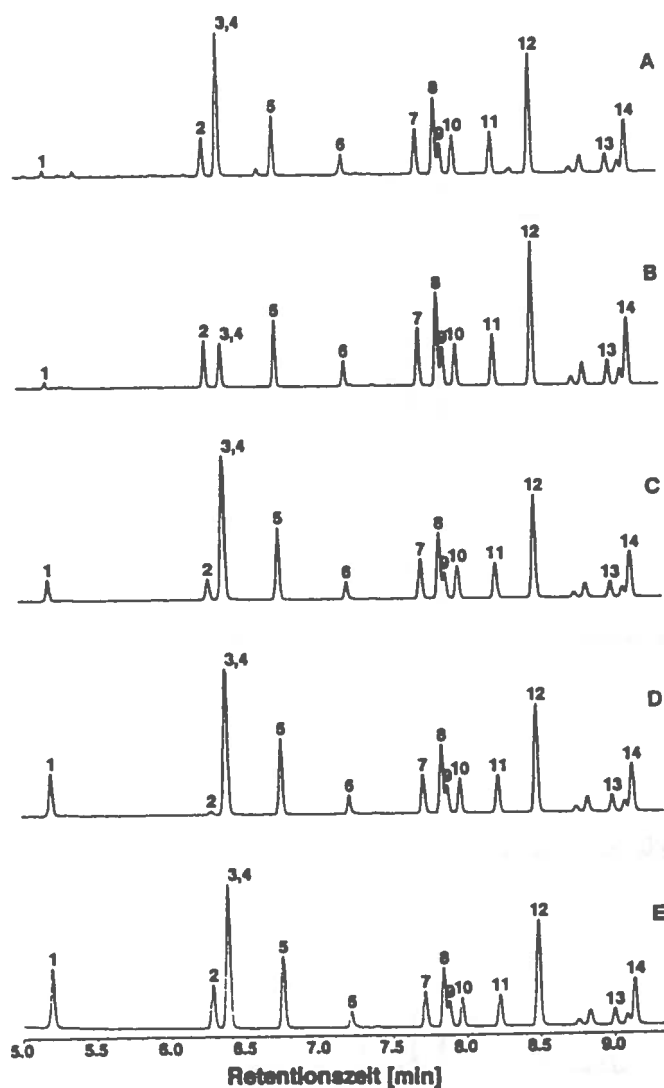


Abb. 28: Ausschnitt der gaschromatographischen Analyse der Aromatenfraktion nach dem Wachstum der Alkylbenzol abbauenden Nitratreduzierer auf Nordsee-Rohöl. Die Rohölproben wurden am Ende der Inkubation aus den in Abb. 27 dargestellten Wachstumsansätzen gewonnen. A, nach Wachstum (115 h) von Stamm ToN1 auf Rohöl; B, nach Wachstum (146 h) von Stamm mXyN1 auf Rohöl; C, nach Wachstum (145 h) von Stamm EbN1 auf Rohöl; D, nach Wachstum (195 h) von Stamm PbN1 auf Rohöl; E, steriles, anaerobes Originalöl. Die strukturelle Zuordnung der angegebenen Verbindungen erfolgte durch Vergleich ihres gaschromatographischen und massenspektrometrischen Verhaltens mit dem authentischer Substanzen: 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*-Cymen (*m*-Isopropyltoluol); 14, 1,2,3-Trimethylbenzol. Die Trennung von *m*- und *p*-Xylol wurde mit einem zweiten GC-Trennsystem durchgeführt und ist in Abb. 30 dargestellt. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dpl. Ing. Helmut Willisch durchgeführt.

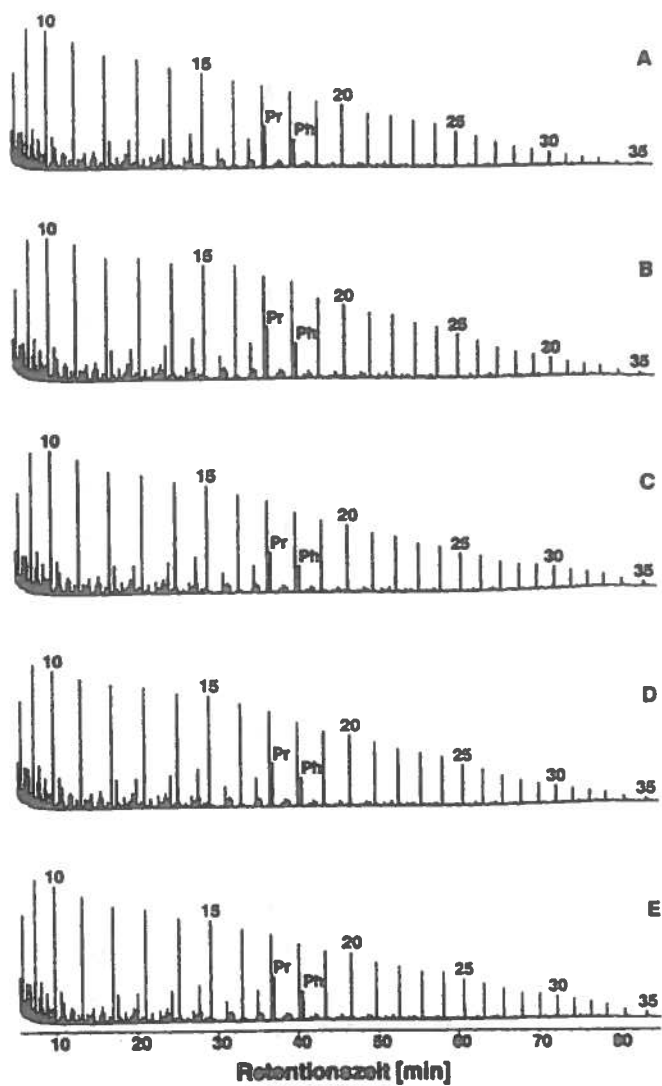


Abb. 29: Gaschromatographische Analyse der Alkanfraktion nach dem Wachstum der Alkylbenzol abbauenden Nitratreduzierer auf Nordsee-Rohöl. Die Rohölproben wurden am Ende der Inkubation aus den in Abb. 27 dargestellten Wachstumsansätzen gewonnen. A, nach Wachstum (115 h) von Stamm ToN1 auf Rohöl; B, nach Wachstum (146 h) von Stamm mXyN1 auf Rohöl; C, nach Wachstum (145 h) von Stamm EbN1 auf Rohöl; D, nach Wachstum (195 h) von Stamm PbN1 auf Rohöl; E, steriles, anaerobes Originalöl. Die Numerierung der Peaks entspricht der Kettenlänge der *n*-Alkane. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Wilsch durchgeführt.

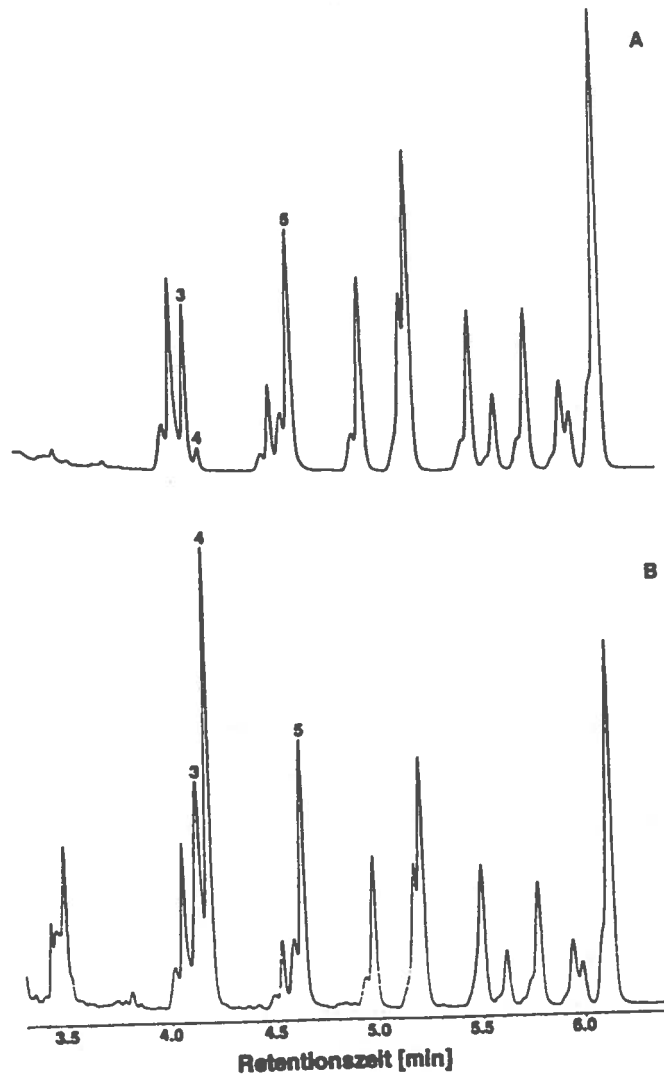


Abb. 30: Ausschnitt der gaschromatographischen Analyse der Aromatenfraktion nach dem Wachstum des Stammes mXyN1 auf Nordsee-Rohöl. Das hier verwendete gaschromatographische Trennsystem ermöglichte eine Trennung aller drei Isomere des Xylols (B. 3.8.2.). Die Rohölproben wurden am Ende der Inkubation aus dem in Abb. 27B dargestellten Wachstumsansatz gewonnen. A, nach Wachstum (146 h) von Stamm mXyN1 auf Rohöl; B, steriles, anaerobes Originalöl. Die strukturelle Zuordnung der angegebenen Verbindungen beruhte auf dem Vergleich ihres gaschromatographischen und massenspektrometrischen Verhaltens mit dem authentischer Substanzen: 3, *p*-Xylol; 4, *m*-Xylol; 5, *o*-Xylol. Die Numerierung der Peaks entspricht der in Abb. 28 verwendeten Numerierung. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

Teil III - Anaerobe Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch eine Anreicherung sulfatreduzierender Bakterien

1. Anreicherung von marinen, mesophilen sulfatreduzierenden Bakterien auf Rohöl

In der β -Raffinerie in Wilhelmshaven wird Rohöl aus Nordsee-Ölfeldern (Statoil u.a.) bis zur Verarbeitung in großen Schwimm tanks (Fassungsvermögen 60000 m³) gelagert. Bei der Lagerung separierte sich die Rohöl-Wasser-Emulsion in eine große Ölphase (einige 10000 m³) und eine kleine Wasserphase (ca. 150 m³). Zur Probenahme wurde ein Rohöltank (Werksbezeichnung: β 4) ausgewählt, in dem Rohöl bereits seit mehreren Monaten lagerte und deshalb vollständig von der Wasserphase getrennt war. Über einen Ablasshahn am Boden des Tanks wurden Proben der Wasserphase luftblasenfrei in Glasflaschen (2 l) gefüllt, die mit Schraubdeckeln verschlossen wurden. Die Proben rochen nur leicht nach Schwefelwasserstoff, waren aber reich an schwarzen Asphalt- und Metallsulfidausfällungen. Proben vom gesamten Querschnitt der Rohölphase (Höhe der Rohölphase ca. 15 m) wurden über eine Rohröffnung auf dem Schwimmdach des Tanks gewonnen.

Für erste Anreicherungen wurden die Wasserproben aus dem Rohöltank unverdünnt eingesetzt. Dazu wurden die Wasserproben durch anoxischen Zusatz von Mineralsalzen und Vitaminen an die Zusammensetzung des künstlichen Meerwassermediums (B. 2.2.2.) angepaßt. Durch Trocknung zur Gewichtskonstanz wurde ein Salzgehalt der Wasserproben von ca. 19,0 g/l bestimmt. Um den im Vergleich zum künstlichen Meerwassermedium (34,9 g/l) niedrigen Gehalt an Salzen zu erhöhen, wurde den Wasserproben zusätzlich CaCl₂·2H₂O (0,6 g/l), MgSO₄·7H₂O (2,6 g/l) und NaCl (10,2 g/l) zugegeben. Nach Zugabe von Vitaminen, Spurenelementen und Bicarbonat wurde der pH Wert auf 7,0 eingestellt; Na₂S wurde nicht zugesetzt. Für erste Anreicherungen wurden je 100 ml der supplementierten Wasserprobe und 5 ml sauerstofffreies Rohöl anoxisch in Glasflaschen (125 ml) gefüllt. Diese wurden dann unter einer N₂/CO₂-Atmosphäre mit Butylsepten und Schraubdeckeln verschlossen. Je ein Ansatz mit und ohne Zusatz von Rohöl wurde dann bei Temperaturen von 18 °C, 28 °C, 60 °C und 80 °C inkubiert. Dabei bestand kein Kontakt zwischen Rohöl und Butylsepten. Im Abstand von ein bis zwei Wochen wurde die Sulfidkonzentration in den Ansätzen bestimmt. Nach zwei Monaten wurde in den Ansätzen bei 18 °C und 28 °C eine

deutlich erhöhte Sulfidkonzentration (ca. 16 mM) gegenüber den Kontrollen ohne Zusatz von Rohöl gemessen. Außerdem wurde das ursprünglich klare Medium durch bakterielles Wachstum trüb. Im mikroskopischen Bild wurden ovale bis stäbchenförmige Zellen beobachtet, die teilweise Zellaggregate bildeten. In den Ansätzen bei 60 °C und 80 °C konnte während einer Inkubationszeit von 5 Monaten keine signifikante Zunahme der Sulfidkonzentration festgestellt werden. Die erfolgreiche Anreicherung bei 28 °C wurde in künstlichem Meerwassermedium mit 5 ml Rohöl pro 100 ml Medium weitergeführt. Sie wird im folgenden als β 4-Anreicherung bezeichnet. Beimpft wurden die Folgepassagen mit 5-10 % (v/v). Falls nicht anders vermerkt, wurde in den folgenden Wachstumsversuchen Nordsee-Rohöl eingesetzt.

2. Wachstumsversuche mit Rohöl als einzigem organischen Substrat

Prüfung der Abhängigkeit der Schwefelwasserstoffbildung von der eingesetzten Ölmenge und von Sulfat

Die Abhängigkeit der Schwefelwasserstoffbildung von der eingesetzten Rohölmenge und dem Vorhandensein von Sulfat sollte in Wachstumsversuchen in flachen Spezialgefäßen (B. 2.4.4.) untersucht werden. Dazu wurden je 115 ml Medium mit steigenden Mengen an Rohöl (0,5 ml, 1,0 ml und 4,0 ml) versetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Sulfat bzw. ohne Öl. Die Ansätze wurden mit sulfatbegrenzten (10 mM) Vorkulturen (5 ml) beimpft, um kein Sulfat mit dem Inokulum einzuschleppen. Die Ansätze wurde 59 Tage ohne Schütteln bei 28 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Sulfidbildung quantitativ bestimmt. Eine deutliche Sulfidbildung begann in allen Wachstumsansätzen erst nach 10 Tagen. Dann nahm die Konzentration des Sulfids umso stärker zu, je mehr Rohöl vorhanden war (Abb. 31). So wurden in 59 Tagen mit 0,5 ml Öl 5,3 mM Sulfid, mit 1,0 ml Öl 8,3 mM Sulfid und mit 4,0 ml Öl 16,4 mM Sulfid gebildet. Die Sulfidbildung nahm nicht ganz proportional mit der Menge an zugesetztem Öl zu. In den Kontrollansätzen ohne Sulfat bzw. ohne Öl wurde keine Sulfidbildung beobachtet. Demnach war die gemessene Sulfidbildung beim Wachstum auf Rohöl von dem Vorhandensein an Sulfat abhängig.

Am Ende der Inkubation wurden die Ölphasen aus dem Wachstumsansatz mit 4 ml Öl pro 120 ml Kulturvolumen und dem Kontrollansatz ohne Sulfat gewonnen und für die spätere Analyse aufbewahrt.

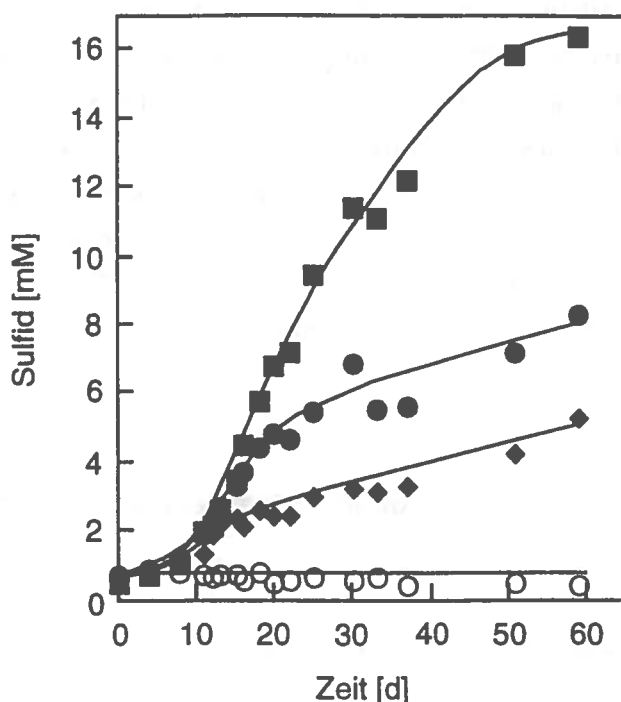


Abb. 31: Sulfidbildung durch die sulfatreduzierende β 4-Anreicherung mit verschiedenen Mengen an Rohöl als einzigem organischen Substrat. Steigende Mengen an anoxischem Rohöl wurden zu 115 ml Kulturvolumen gegeben: O, kein Öl; ◆, 0,5 ml Öl; ●, 1,0 ml Öl und ■, 4,0 ml Öl.

Untersuchungen zur Wachstumsoptimierung und zur Verwertbarkeit verschiedener Öle

Bei der Kultivierung des sulfatreduzierenden Stammes Tol2 und der nitratreduzierenden Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 (B. 2.4.2.) mit aromatischen Kohlenwasserstoffen, die in einer Trägerphase gelöst wurden, beschleunigte ein leichtes Schütteln der Kulturen die Substratversorgung und somit das Wachstum deutlich. Deshalb wurde auch das Wachstum der β 4-Anreicherung auf Öl in parallelen Ansätzen, die ohne Schütteln oder unter Schütteln (60 rpm auf einem Flachbrettschüttler) inkubiert wurden, untersucht. Während der ohne Schütteln inkubierte Ansatz 6 Wochen für das Wachstum und die Bildung von ca. 13 mM Sulfid benötigte, war der geschüttelte Ansatz bereits nach 3 Wochen ausgewachsen und hatte fast 20 mM Sulfid gebildet. Die anschließende Analyse (C. III. 4.) ergab bei dem Öl aus dem geschüttelten Ansatz einen höheren Verbrauch an Alkylbenzolen als bei dem Öl aus dem ruhig inkubierten Ansatz.

In vergleichenden Wachstumsexperimenten mit der β 4-Anreicherung wurde die Verwertbarkeit von Rohölen unterschiedlicher Herkunft und Konsistenz untersucht. Von den verwendeten Ölen war bereits bekannt, daß sie Alkylbenzole in ausreichenden Konzentrationen enthielten, um ein Wachstum der β 4-Anreicherung zu ermöglichen (Dr. Heinz Wilkes, persönliche Mitteilung). Ein Öl von sirupartiger Konsistenz stammte aus indonesischen Ölfeldern und ein Öl mit der Konsistenz von Schmierfett aus malaysischen Ölfeldern. Aufgrund ihrer zähflüssigen bis festen Konsistenz konnten diese beiden Öle nicht wie das flüssige Nordsee-Öl eine homogene Ölphase auf dem Medium bilden. Um in den Wachstumsansätzen dennoch ein möglichst großes Verhältnis der Oberfläche zum Volumen zu erreichen, wurden die Innenwände der Kulturflaschen (125 ml) mit den Ölen beschichtet. Dazu wurden Proben (ca. 2 g) der beiden Öle unter einer N_2 -Atmosphäre in den Kulturgefäßen durch Erwärmung im Wasserbad (60 °C) verflüssigt. Nachdem durch Drehen der Flaschen die gesamten Innenwände mit dem jeweiligen Öl beschichtet waren, wurden die Ölfilme durch Kühlen der Kulturflaschen unter fließendem Wasser wieder verfestigt. Dann wurden den Kulturflaschen unter einer N_2/CO_2 -Atmosphäre künstliches Meerwassermedium (100 ml) und Inokulum (5 ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte ohne Schütteln bei 28 °C. Als Kontrolle diente ein Wachstumsansatz mit dem flüssigen Nordsee-Öl. Nach 3 Wochen war der Ansatz mit dem zähflüssigen indonesischen Öl bereits dicht gewachsen und hatte 16 mM Sulfid gebildet. Demzufolge war das Wachstum der β 4-Anreicherung auf dem indonesischen Öl besser als auf dem ursprünglich verwendeten Nordsee-Öl. Mit dem malaysischen Öl war innerhalb von 6 Wochen weder Wachstum noch Sulfidbildung zu beobachten. Wurde der β 4-Anreicherung zusätzlich zum malaysischen Öl noch Benzoat (4 mM) als organisches Substrat angeboten, war ebenfalls kein Wachstum möglich. Folglich war das malaysische Öl für die β 4-Anreicherung toxisch. Am Ende der Inkubation wurden Proben von allen drei Ölen für die spätere Analyse gewonnen.

3. Zählung von sulfatreduzierenden Bakterien

Die vorausgegangenen Wachstumsversuche (C. III. 2.) ließen vermuten, daß die β 4-Anreicherung nur eine begrenzte Anzahl von Substanzen aus dem Rohöl abbauen konnte. Nach Übertragung der β 4-Anreicherung in Medien (15 ml Kulturvolumen) mit definierten Substanzen wurde mit den aromatischen Verbindungen Toluol (2 %, v/v) und Benzoat (4 mM) innerhalb von 3 Wochen dichtes Wachstum beobachtet. Mit dem aliphatischen Kohlenwasserstoff Hexadecan (200 μ l, unverdünnt) erfolgte kein Wachstum. Demnach waren in der ölabbauenden β 4-Anreicherung eher Aromaten verwertende als Alkan verwertende

sulfatreduzierende Bakterien zu erwarten. Durch Zählung in Agarverdünnungsreihen mit verschiedenen aromatischen and aliphatischen Substraten sollte deshalb geklärt werden, ob in der Population der β 4-Anreicherung tatsächlich aromatenabbauende Bakterien vorkamen. Dazu wurden Toluol (2 %, v/v), Benzoat (2 mM), Rohöl (0,5 ml unverdünnt), Acetat (10 mM), Lactat (10 mM), Ethanol (10 mM), Caprylat (2 mM) und Cyclohexancarboxylat (2 mM) jeweils als einziges organisches Substrat den Agarverdünnungsreihen zugesetzt. Eine Kontrolle enthielt kein organisches Substrat. Beimpft wurden die Agarverdünnungsreihen mit je 0,5 ml aus sterilen anaeroben Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-6}) der ölabbauenden Anreicherung in künstlichem Meerwassermedium. Die Agarverdünnungsreihen wurden für 2 Monate bei 28 °C inkubiert.

Während sich in der Kontrolle nur weiße Kolonien entwickelten, entstanden in den Ansätzen mit organischem Substrat neben diesen weißen auch die für sulfatreduzierende Bakterien typischen ocker bis braun gefärbten, linsenförmigen Kolonien. Nur diese braunen Kolonien wurden gezählt. In den Zählreihen (Tab. 11) wurden so mit den aromatischen Substraten Toluol und Benzoat Titer von $0,8 \cdot 10^7$ und $0,6 \cdot 10^7$ Zellen pro ml bestimmt. Lactat verwertende Bakterien waren ebenfalls mit einem Titer von $0,6 \cdot 10^7$ Zellen pro ml vorhanden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl durch Zählung in einer Thoma-Kammer ergab $4,7 \cdot 10^7$ Zellen pro ml. Demnach wurde mit den Zählungen in Agarverdünnungsreihen die tatsächliche Gesamtzahl an Bakterien in der β 4-Anreicherung nicht vollständig erfaßt. Ein Grund für die schlechtere Zählereffizienz in Agarverdünnungsreihen könnte sein, daß bestimmte Bakterien aus der β 4-Anreicherung nur schlecht oder gar nicht in Agar wachsen können.

Tabelle 11: Zählung von sulfatreduzierenden Bakterien in Agarverdünnungsreihen mit verschiedenen aromatischen und aliphatischen Substanzen und Rohöl als einzigem organischem Substrat. Die Konzentration der eingesetzten Substanzen ist in Klammern angegeben.

Substanz	Zellzahl pro ml
Rohöl (0,5 ml, unverdünnt)	$0,8 \cdot 10^7$
Toluol (2 %, v/v)	$0,8 \cdot 10^7$
Benzoat (4 mM)	$0,6 \cdot 10^7$
Acetat (10 mM)	$0,2 \cdot 10^7$
Lactat (10 mM)	$0,6 \cdot 10^7$
Ethanol (10 mM)	$0,2 \cdot 10^7$
Caprylat (2 mM)	$0,2 \cdot 10^7$
Cyclohexancarboxylat (2 mM)	$0,2 \cdot 10^7$

4. Analyse von Rohöl aus den Wachstumsversuchen

Die Ölproben aus einem ohne Schütteln und einem unter Schütteln inkubierten Wachstumsansatz sowie aus einer sulfatfreien Kontrolle wurden chemisch analysiert. Dazu wurden die Ölproben mittels einer MPLC-Anlage in Aromaten- und Alkanfraktionen getrennt und anschließend gaschromatographisch untersucht (B. 3.8.). Im Vergleich zur Kontrolle wurden im Öl aus den beiden Wachstumsansätzen spezifische Veränderungen in der Aromatenfraktion beobachtet. Toluol und *o*-Xylol waren vollständig aus dem Öl verschwunden. *m*-Xylol, *o*-Ethyltoluol und *m*-Ethyltoluol wurden teilweise verwertet. Im geschüttelten Wachstumsansatz wurde darüber hinaus noch eine partielle Verwertung von *m*-Propyltoluol und *m*-Cymol festgestellt. *p*-Xylol, *p*-Ethyltoluol und andere aromatische Kohlenwasserstoffe wurden nicht verwertet (Abb. 32). In der Alkanfraktion traten während des Wachstums keine Veränderungen auf (Abb. 33). Da die Zusammensetzung der Aromatenfraktion im Öl aus der sulfatfreien Kontrolle genau mit der des unbehandelten Öls übereinstimmte, konnten Abdampfverluste während der Inkubation ausgeschlossen werden. Somit verwertete die sulfatreduzierende β 4-Anreicherung neben Toluol selektiv in *ortho*- und *meta*-Position alkylsubstituierte Toluole.

In den geschüttelten Ansätzen erfolgte das Wachstum schneller und in einem quantitativ größerem Ausmaß als in den ruhig inkubierten Ansätzen (C. III. 2.). Außerdem wurde beim Schütteln *m*-Propyltoluol als zusätzliches Alkylbenzol abgebaut. Die gesteigerte Verwertung von Alkylbenzolen läßt sich allein durch die bessere Substratversorgung infolge der stärkeren Durchmischung erklären. Die Verwertung von Alkylbenzolen wurde auch nochmals durch Wachstumsversuche mit Reinsubstanzen bestätigt (C. III. 3.). Toluol, *o*- und *m*-Xylol waren gute Wachstumssubstrate und führten zur Bildung von hohen Sulfidkonzentrationen (14,3, 12,9 und 7,4 mM). Die β 4-Anreicherung wuchs schlecht auf *o*- und *m*-Ethyltoluol und bildete mit diesen Substraten nur geringe Sulfidkonzentrationen (4,0 und 2,6 mM). Mit *p*-Xylol und *p*-Ethyltoluol dagegen wurde weder Wachstum noch Sulfidbildung beobachtet.

Die Messung des zeitlichen Verlaufs der selektiven Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl sollte Aufschluß darüber geben, ob die abbaubaren Alkylbenzole alle gleichzeitig oder in einer bestimmten Reihenfolge verwertet wurden. Wachstumsansätze mit Sulfat und Kontrollen ohne Sulfat wurden in flachen Glasflaschen (250 ml Kulturvolumen) mit jeweils 7 ml Öl für 61 Tage bei 28 °C inkubiert. Während des Wachstums wurden bis zu 20 mM Sulfid gebildet. Im Abstand von durchschnittlich 8,6 Tagen wurden Ölproben unter anoxischen Bedingungen aus Wachstums- und Kontrollansätzen gewonnen. Vor der Probenahme wurden die Ansätze kräftig geschüttelt. In den Ölproben wurde der Verbrauch der einzelnen Alkylbenzole relativ zu ihrer jeweiligen Ausgangskonzentration quantifiziert. Es zeigte sich, daß Toluol und *o*-Xylol am

schnellsten verbraucht wurden. *m*-Xylol, *o*-Ethyltoluol, *m*-Ethyltoluol, *m*-Propyltoluol und *m*-Cymol wurden langsamer und mit ähnlichen Raten verbraucht (Abb. 34). Von den verwerteten Alkylbenzolen wurden am Ende des Wachstums durchschnittlich nur 6,1 % wiedergefunden (Tab. 12).

Analysen von indonesischem Öl aus Wachstumsansätzen und sulfatfreien Kontrollen zeigten wie beim Wachstum auf Nordsee-Öl eine selektive Verwertung von Alkylbenzolen (Abb. 35); die Alkanfraktion blieb unverändert (Abb. 36). Allerdings war die Zahl der aus dem indonesischen Öl verwerteten Alkylbenzole mit Toluol, *m*-Xylol, *o*-Xylol und *m*-Ethyltoluol (Abb. 35) geringer als beim Wachstum auf Nordsee-Öl (Abb. 32). Dies war vor allem deshalb unerwartet, weil das Wachstum der β_4 -Anreicherung auf dem indonesischen Öl deutlich besser war als auf dem Nordsee-Öl (C. III. 2.). Ein Grund dafür könnte sein, daß die Alkylbenzole im indonesischen Rohöl insgesamt in höherer Konzentration vorlagen und eine hemmende Sulfidkonzentration erreicht wurde, bevor ein merklicher Verbrauch der schlechter verwertbaren Alkylbenzole stattfinden konnte.

Nimmt man für das durchschnittliche C/H-Verhältnis im eingesetzten Rohöl (Dichte: 0,759 kg/l) das von Xylol (1:1,25) an, dann wurde für die Bildung von 16,4 mM Sulfid durch Sulfatreduktion im Wachstumsansatz mit 4 ml Öl pro 115 ml Kulturvolumen 1,4 % (w/w) des Rohöls als Elektronendonator verbraucht. Demzufolge konnte die sulfatreduzierende β_4 -Anreicherung nur eine begrenzte Anzahl an Substanzen aus dem Rohöl als Wachstumssubstrate verwerten.

Tabelle 12: Selektiver Verbrauch einzelner Alkylbenzole aus Rohöl durch die sulfatreduzierende β_4 -Anreicherung, am Ende des Wachstums nach einer Inkubationszeit von 61 Tagen. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

Quantifiziertes Alkylbenzol	wiederaufgefundene Menge [%]
Toluol	6,9
<i>o</i> -Xylol	0,0
<i>m</i> -Xylol	2,1
<i>o</i> -Ethyltoluol	18,9
<i>m</i> -Ethyltoluol	2,8
<i>m</i> -Propyltoluol	19,8
<i>m</i> -Cymol	49,4
Ethylbenzol	96,1
<i>p</i> -Xylol	94,3
<i>p</i> -Ethyltoluol	88,7

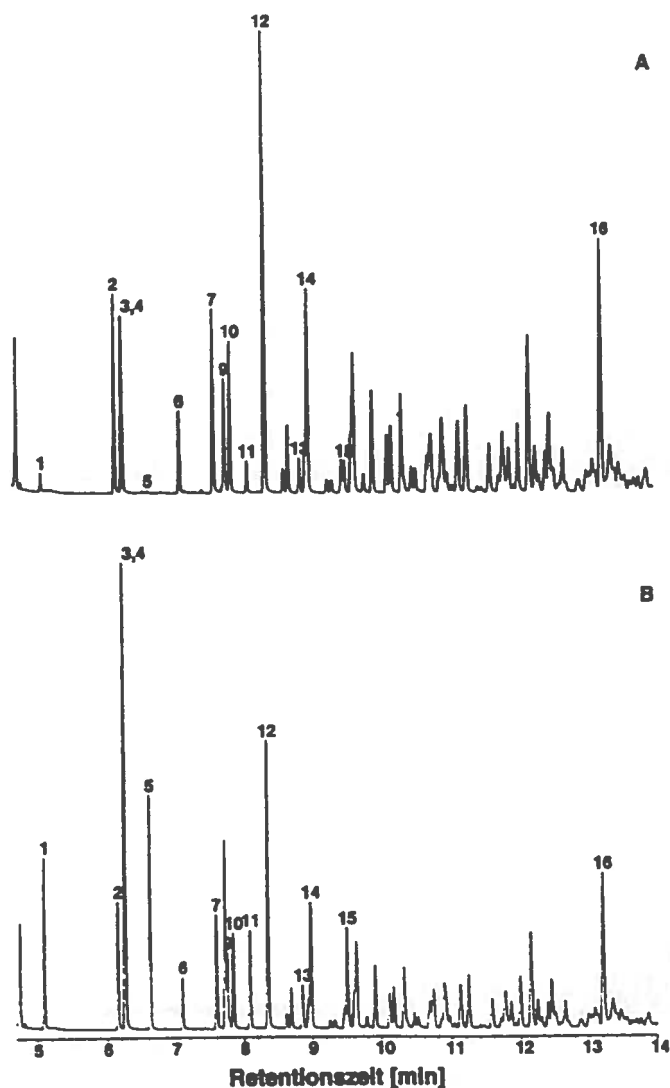


Abb. 32: Ausschnitt der gaschromatographischen Analyse der Aromatenfraktion von Rohöl nach Wachstum der sulfatreduzierenden β 4-Anreicherung auf Nordsee-Öl. A, Von einem Wachstumsansatz, der unter Schütteln inkubiert wurde; B, von einer sulfatfreien Kontrolle. Die strukturelle Zuordnung der angegebenen Verbindungen beruhte auf dem Vergleich ihres gaschromatographischen und massenspektrometrischen Verhaltens mit dem authentischer Substanzen: 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. Die Trennung von *m*- und *p*-Xylol wurde mit einem zweiten GC-Trennsystem durchgeführt (B. 3.8.2.). Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

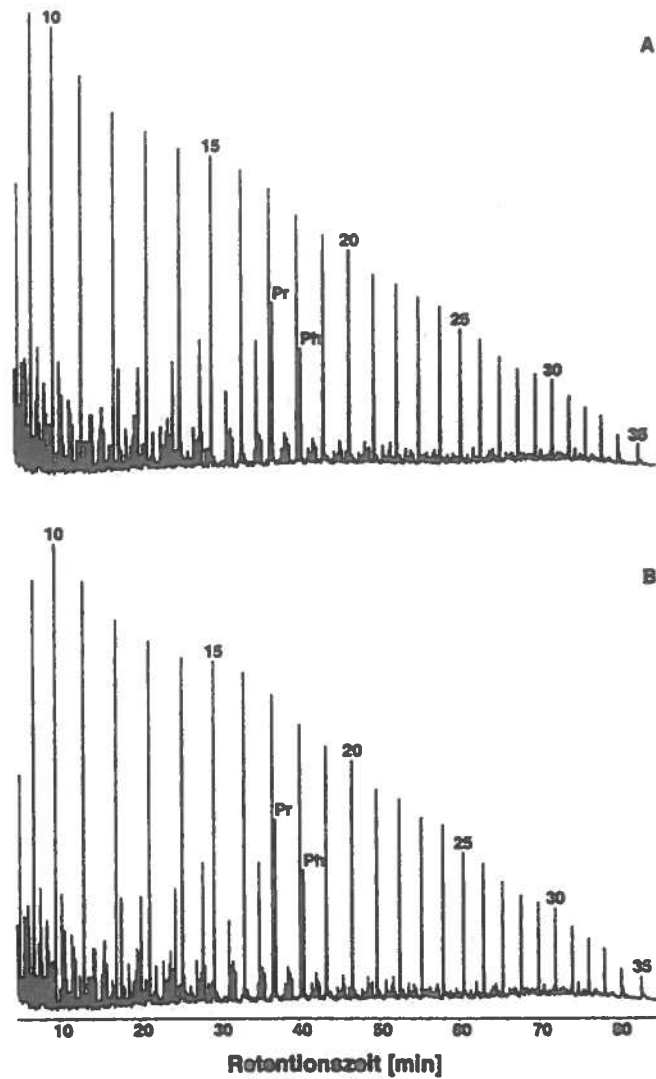


Abb. 33: Gaschromatogramm der Alkanfraktion von Rohöl nach Wachstum der sulfatreduzierenden β_4 -Anreicherung auf Nordsee-Öl. **A**, Von einem Wachstumsansatz, der unter Schütteln inkubiert wurde; **B**, von einer sulfatfreien Kontrolle. Die Numerierung der Peaks entspricht der Kettenlänge der *n*-Alkane. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

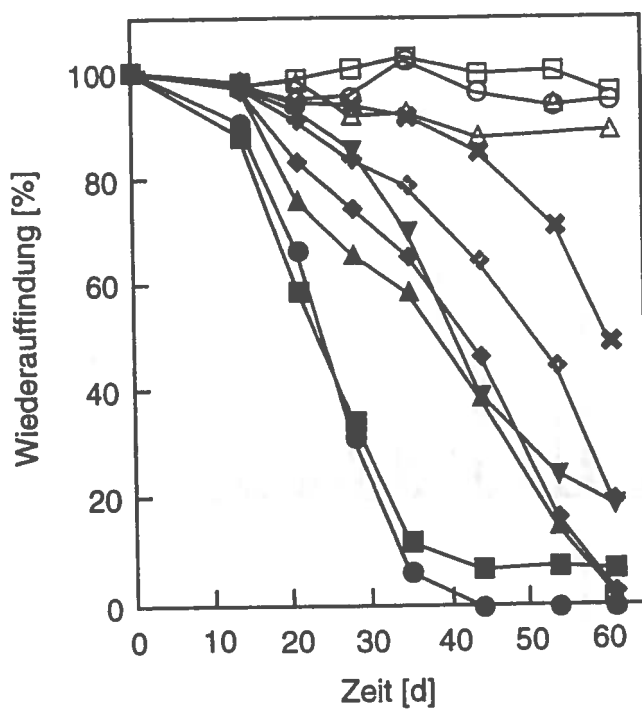


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der selektiven Verwertung einzelner Alkylbenzole aus Rohöl durch die sulfatreduzierende β_4 -Anreicherung. Als Maß für den Verbrauch ist die zu den einzelnen Meßzeitpunkten in der Aromatenfraktion des Öls verbliebene Menge der jeweiligen Alkylbenzole relativ (Wiederauffindung [%]) zu ihrer Ausgangskonzentration dargestellt. Symbole: ■, Toluol; ●, *o*-Xylol; ▲, *m*-Xylol; ▼, *o*-Ethyltoluol; ◆, *m*-Ethyltoluol; ◇, *m*-Propyltoluol; ×, *m*-Cymol; □, Ethylbenzol; O, *p*-Xylol; Δ, *p*-Ethyltoluol. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

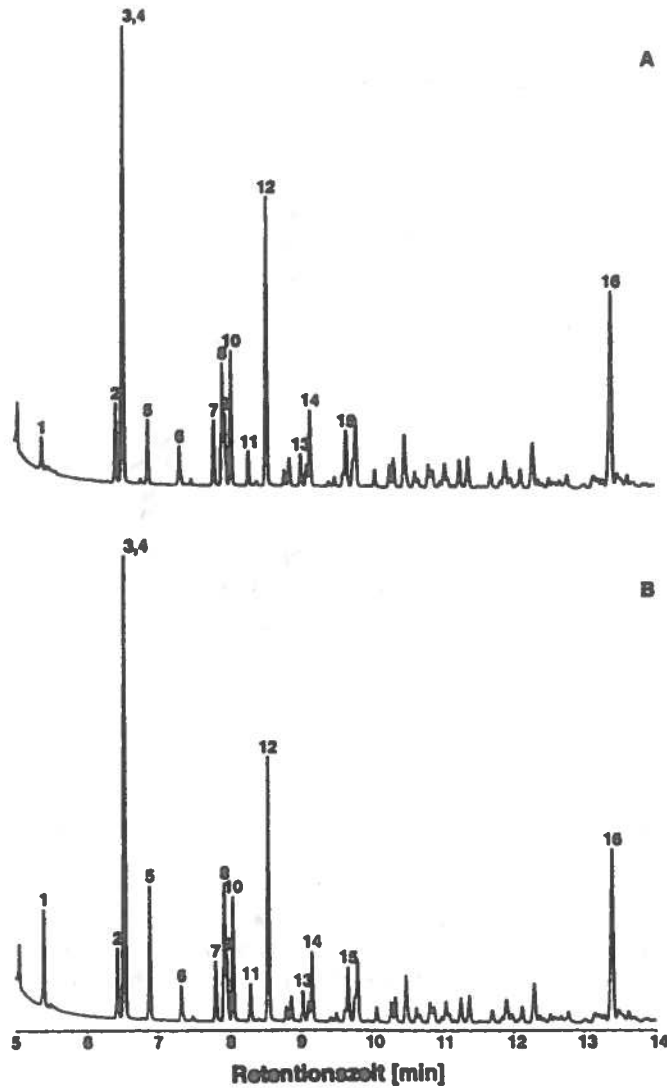


Abb. 35: Ausschnitt der gaschromatographischen Analyse der Aromatenfraktion von Rohöl nach dem Wachstum der sulfatreduzierenden β 4-Anreicherung auf indonesischem Öl. **A**, Von einem Wachstumsansatz, der ruhig inkubiert wurde; **B**, von einer sulfatfreien Kontrolle. Die strukturelle Zuordnung der angegebenen Verbindungen beruhte auf dem Vergleich ihres gaschromatographischen und massenspektrometrischen Verhaltens mit dem authentischer Substanzen: 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*-Cymen (*m*-Isopropyltoluol); 14, 1,2,3-Trimethylbenzol; 15, *m*-Propyltoluol; 16, Naphthalin. Die Trennung von *m*- und *p*-Xylol wurde mit einem zweiten GC-Trennsystem durchgeführt (B. 3.8.2.). Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willisch durchgeführt.

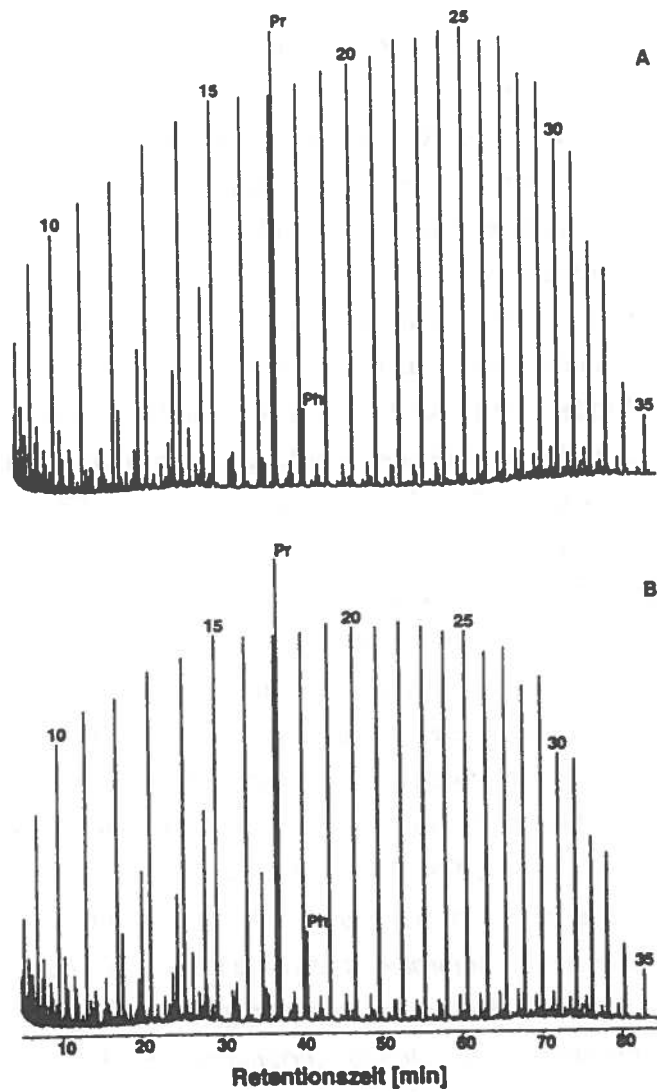


Abb. 36: Gaschromatogramm der Alkanfraktion von Rohöl nach Wachstum der sulfatreduzierenden β 4-Anreicherung auf indonesischem Öl. **A**, Von einem Wachstumsansatz, der ruhig inkubiert wurde; **B**, von einer sulfatfreien Kontrolle. Die Numerierung der Peaks entspricht der Kettenlänge der *n*-Alkane. Die Ölanalysen wurden von Dr. Heinz Wilkes und Dipl.-Ing. Helmut Willsch durchgeführt.

5. Einsatz von fluoreszierenden Oligonukleotidsonden

In mikrobiologischen Untersuchungen zur Bildung von Schwefelwasserstoff in Anlagen der Ölindustrie und zur anaeroben Korrosion lag das Hauptaugenmerk bislang auf der Gattung *Desulfovibrio*, die unvollständig oxidierende Arten mit relativ begrenzten Abbaufähigkeiten umfaßt. Mit der nachfolgenden Untersuchung sollte gezeigt werden, daß die Rolle der vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer bei diesen Prozessen bislang unterschätzt worden ist. Es war bereits gezeigt worden, daß das Toluol verwertende Bakterium *Desulfobacula toluolica* zu den vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern gehörte (Rabus et al. 1993). Weitere aromatenabbauende Sulfatreduzierer, nämlich das Phenol verwertende *Desulfobacterium phenolicum* (Bak und Widdel 1986a), das Indol verwertende *Desulfobacterium indolicum* (Bak und Widdel 1986b), das Anilin verwertende *Desulfobacterium anilini* (Schnell et al. 1989), das Catechol verwertende Bakterium *Desulfotomaculum* sp., Stamm Groll (Kuever et al. 1993) sowie die Benzoat verwertenden *Desulfococcus* spp., *Desulfosarcina* spp. und *Desulfonema magnum* (Widdel und Bak 1992) gehörten ebenfalls zur physiologischen Gruppe der vollständigen Oxidierer. Deshalb wurde vermutet, das auch in der β 4-Anreicherung die selektive Verwertung von Toluol, *o*-Xylol und anderen Alkylbenzolen aus dem Öl durch vollständig oxidierende Sulfatreduzierer erfolgte. Bezüglich der ribosomalen Verwandtschaft gehören alle Gram-negativen Sulfatreduzierer mit der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation einem Ast innerhalb der δ -Gruppe an, für den die Familienbezeichnung *Desulfobacteriaceae* vorgeschlagen wurde (Widdel und Bak 1992). Allerdings finden sich in diesem Ast auch *Desulfobotulus sapovorans*, ein unvollständiger Oxidierer, und die zur Sulfatreduktion nicht fähigen, schwefelreduzierenden *Desulfuromonas*-Arten und gärenden *Pelobacter*-Arten (Widdel und Pfennig 1992, Schink 1992). *Desulfovibrio*-Arten gehören einem getrennten Ast mit der vorgeschlagenen Familienbezeichnung *Desulfovibrionaceae* an (Devereux et al. 1990). Durch Einsatz von spezifischen, fluoreszierenden Oligonukleotidsonden sollte in der Bakterienpopulation der β 4-Anreicherung zwischen vollständig und unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern differenziert und beide Gruppen im Verhältnis zueinander quantifiziert werden.

5.1. Herstellung und Überprüfung einer spezifischen Sonde für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer

Prüfung bereits bekannter Sonden

Zunächst sollte grundsätzlich geklärt werden, ob erstens eine *in situ*-Hybridisierung mit ganzen Zellen der β 4-Anreicherung möglich ist und ob zweitens zwischen vollständig bzw. unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern mit Hilfe von Oligonukleotidsonden unterschieden werden kann. Dazu wurden zwei bereits bekannte Oligonukleotidsonden für sulfatreduzierende Bakterien eingesetzt (Tab. 13). Die RD814-Sonde war eine für *Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfobotulus sapovorans* spezifische Sonde, die zur Hybridisierung von isolierter und auf Nylon-Membran geblotteter RNA entwickelt worden war (Devereux et al. 1992). Die SRB385-Sonde war als allgemeine Sonde für die bisher beschriebenen Arten der δ -Gruppe der Proteobakterien beschrieben worden (Amann et al. 1990). In einer späteren Arbeit (Amann et al. 1992) wurde die SRB385-Sonde aufgrund einer nicht weiter diskutierten Fehlpaarung mit den verschiedenen Zielsequenzen in einer degenerierten Version mit der Bezeichnung SRB385F in der PCR verwendet. In dieser SRB385F-Sonde war das entsprechende Cytosin in der Sondensequenz gegen ein Inosin ausgetauscht. Damit hybridisierte die SRB385F-Sonde mit Zielsequenzen, die an Position 396 entweder ein Adenin oder ein Guanin enthielten. Über weitergehende Untersuchungen zu der Fehlpaarung der allgemeinen SRB385-Sonde wurde nicht berichtet. Zur Kontrolle wurden ferner die bereits beschriebene eubakterielle EUB338-Sonde (Amann et al. 1990) und eine Nonsense-Sonde (NOS), mit der Anti-Sense-Sequenz zur SRB385-Sonde, verwendet. Alle vier verwendeten Oligonukleotidsonden waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert. Als Referenzorganismen dienten die unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierer *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobulbus propionicus* und *Desulfobotulus sapovorans* und die vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer *Desulfobacter postgatei*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfonema magnum* und *Desulfonema limicola* sowie *Escherichia coli*. Die Zellen der β 4-Anreicherung und der Referenzorganismen wurden mit 20 % Formamid fixiert (B. 5.2.1.) und mit den beiden Sonden für Sulfatreduzierer, sowie den beiden Kontrollsonden inkubiert (B. 5.2.2.).

Tabelle 13: Sequenzen der FITC-markierten Oligonukleotidsonden. Die SRB385-Sonde sollte nach Literaturangaben die meisten Arten innerhalb der δ -Gruppe der Proteobakterien erfassen. Die RD814-Sonde erfaßt die Sulfatreduzierer *Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfobotulus sapovorans*. Die EUB338-Sonde erfaßt alle Eubakterien. Die Nonsense(NOS)-Sonde hatte eine Anti-Sense-Sequenz zur SRB385-Sonde.

Sonde	Sequenz	Abschnitt auf der Zielsequenz (5'-3', <i>E. coli</i> Numerierung)
RD814	5'-ACCTAGT GATCAACGTT T-3'	814-831
SRB385	5'-CGGCGT CGCTGCGTCA GG-3'	385-402
EUB338 (Positivkontrolle)	5'-GCT GCCTCCCGTA GGAGT-3'	338-355
NOS (Negativkontrolle)	5'-CCTGAC GCAGCGACGC CG-3'	385-402

Die Zellen der β 4-Anreicherung und aller Referenzorganismen gaben positive Fluoreszenzsignale mit der eubakteriellen EUB338-Sonde. Folglich konnten mit den fixierten Zellen der β 4-Anreicherung prinzipiell Hybridisierungen durchgeführt werden. Überraschenderweise wurden jedoch mit der bisher üblichen allgemeinen Sonde für Sulfatreduzierer, SRB385, nur bei 5 % der gesamten Zellpopulation der β 4-Anreicherung positive Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung beobachtet. Außerdem konnten von den Referenzorganismen lediglich *Desulfovibrio desulfuricans* und *Desulfobulbus propionicus* erfolgreich mit der SRB385-Sonde hybridisiert werden. Mit der RD814-Sonde konnten weder bei den Zellen der β 4-Anreicherung noch bei denen der Referenzorganismen positive Fluoreszenzsignale erzielt werden (Tab. 14). Die an isolierter und geblotteter RNA erprobte RD814-Sonde war demnach nicht für die *in situ* Hybridisierung von ganzen Zellen geeignet.

Die Ergebnisse dieser ersten Hybridisierungsversuche lagen zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorausgegangenen physiologischen Experimente. Die Abhängigkeit des Wachstums auf Rohöl und der selektiven Verwertung von Alkylbenzolen aus dem Öl vom Vorhandensein von Sulfat (C. III. 2.) sprach dafür, daß die Population der β 4-Anreicherung zum überwiegenden Teil aus sulfatreduzierenden Bakterien bestand. Als Grund für die schlechte Hybridisierungseffizienz mit der SRB385-Sonde wurde eine unzureichende Übereinstimmung zwischen der Sondensequenz und Zielsequenz in den meisten sulfatreduzierenden Bakterien der β 4-Anreicherung angenommen. Beim Einsatz der RD814-Sonde konnten vermutlich deshalb überhaupt keine Fluoreszenzsignale beobachtet werden, weil diese Sonde ursprünglich für die Hybridisierung gegen isolierte DNA und nicht gegen ganze Zellen entwickelt worden war (Devereux et al. 1992).

Tabelle 14: Fluoreszenzsignale von fixierten Zellen der β 4-Anreicherung und der Referenzorganismen, nach Hybridisierungsversuchen mit FITC-markierten Oligonukleotid-sonden. Eingesetzt wurden die allgemeine Sonde für Sulfatreduzierer (SRB385) von Rudolf Amann, die eubakterielle Sonde (EUB338) als Positivkontrolle, Richard Devereux Sonde gegen Sulfatreduzierer (RD814) und eine Nonsense Sonde (NOS) als Negativkontrolle. Nach Anregung des Farbstoffs FITC bei 489 nm wurden die grünen Fluoreszenzsignale bei 514 nm im Fluoreszenzmikroskop beobachtet: ++, positives Signal; +, schwaches Signal; -, kein signifikantes Signal. Während mit der eubakteriellen Kontrollsonde alle im Phasenkontrastbild sichtbaren Zellen der β 4-Anreicherung, d.h. 100 %, ein positives Fluoreszenzsignal gaben, waren es mit der allgemeinen SRB Sonde nur ca. 5 %.

Hybridisierte Zellen	Sonde			
	SRB385	EUB338	RD814	NOS
β 4-Anreicherung	++(5%)	++(100%)	-	-
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	++	++	-	-
<i>Desulfohalobium propionicum</i>	++	++	-	-
<i>Desulfobacter postgatei</i>	-	++	-	-
<i>Desulfococcus multivorans</i>	-	++	-	-
<i>Desulfonema magnum</i>	-	++	-	-
<i>Desulfonema limicola</i>	-	++	-	-
<i>Desulfonema</i> sp. Stamm jade02	-	++	-	-
<i>Desulfotulnus sapovorans</i>	-	++	-	-
<i>E. coli</i>	-	++	-	-

Design einer für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer spezifischen Sonde

Ausgehend von der Vermutung, daß die Sequenz der SRB385-Sonde nicht exakt genug mit der Zielsequenz in den sulfatreduzierenden Bakterien der β 4-Anreicherung übereinstimmte, wurde die Sondensequenz mit den 16S rRNA Zielsequenzen von vollständig und unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern verglichen. An Position 396 (bezogen auf die 16S rRNA-Sequenz von *E. coli*) hatten bis auf 3 Ausnahmen alle 16 untersuchten vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer ein Adenin. An der gleichen Position war in der SRB385-Sonde dagegen ein Guanin vorhanden. Demnach bestand zwischen der SRB385-Sonde und der Zielsequenz der meisten vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer eine Fehlpaarung. Diese Fehlpaarung wurde zwar bereits in der Literatur (Amann et al. 1992) erwähnt, die Sonde wurde jedoch noch nicht mit Zielsequenzen aus etlichen vollständig und unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern verglichen. Interessanterweise hatten nämlich die meisten unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierer genau wie die Zielsequenz der SRB385-Sonde ein Guanin an der Position 396 der 16S rRNA Sequenz (Tab. 15). Aufgrund dieser Sequenzanalyse wurde eine neue Sonde synthetisiert, die bis auf das Adenin an der Position 396 mit der bekannten SRB385-Sonde identisch war (Tab. 16). In Folgeversuchen wurde diese neue Sonde als CoSRB (complete

oxidizing sulfate-reducing bacteria) bezeichnet; die bereits bekannte, allgemeine SRB385-Sonde wurde in InSRB (incomplete oxidizing sulfate-reducing bacteria) umbenannt.

Tabelle 15: Vergleich der Sequenz der als allgemein verwendbar beschriebenen SRB385-Sonde für Sulfatreduzierer mit den Zielsequenzen auf der 16S rRNA von vollständig und unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern. Die Angaben über die vollständige (v) bzw. unvollständige (u) Oxidation von organischem Substrat wurden aus der Literatur entnommen (Widdel und Bak 1992); nb, nicht bekannt; N, unbekannte Base (A, T, G oder C); . Die dargestellten Zielsequenzen auf der 16S rRNA entsprechen den Positionen 385 bis 402 bezogen auf die 16S rRNA von *E. coli*.

Bakterienart	Oxidation	Zielsequenz auf der 16S rRNA
Allgemeine SRB385-Sonde		3'-GGACTG CGTCGCTGCG GC-5'
Zielsequenz der allgemeinen SRB385-Sonde		5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
<i>Escherichia coli</i>		5'-CCUGAU GCAGCCAUGC CG-3'
<i>Desulfobacterium autotrophicum vacuolatum</i>	v	5'-CCUNAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>niacini</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfobacter postgatei hydrogenophilus</i>	v	5'-CCUNAC GCAGCAACGC NG-3'
<i>curvatus</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>latus</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
spec.	v	5'-CCNNAC GCAGCAAUGC CG-3'
<i>Desulfobacula toluolica</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
Stamm Hxd3	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfococcus multivorans</i>	v	5'-CNUNAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfonema limicola magnum</i>	v	5'-CCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfoarculus baarsii</i>	v	5'-CCUGAN GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfomonile tiedje</i>	nb	5'-CCUGAC GCAGCCAUGC CG-3'
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	u	5'-UCUGAC GCAGCAACGC CG-3'
<i>Desulfovibrio desulfuricans vulgaris</i>	u	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
<i>gigas</i>	u	5'-CCUNAC GCAGCGACGC CG-3'
<i>africanus</i>	u	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
<i>salexigens</i>	u	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CA-3'
<i>baculatus</i>	u	5'-CCUGAC GCAGCNACGC CG-3'
Stamm dNorw	nb	5'-CCUGAC GCAGCNACGC CG-3'
Stamm ElAgh	nb	5'-CCCAC GCAGCGACGC CU-3'
<i>longus</i>	nb	5'-NNNNAC GCAGCGACGC CG-3'
Stamm PT-2	nb	5'-CCUGAC GCAGCGACGC CG-3'
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	u	5'-CCNNAC GCAGCGACGC NG-3'
spec.	nb	5'-CCUNAC GCAGCGACGC CG-3'

Tabelle 16: DNA-Sequenzen der neuen Sonde (CoSRB) für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer und der Sonde (InSRB) für unvollständig oxidierende Sulfatreduzierer (vormals allgemeine SRB385-Sonde). Das fettgedruckte Thymin in der CoSRB-Sonde ist komplementär zum Adenin an Position 396 im Zielort auf der 16S rRNA der meisten vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer. Das fettgedruckte Cytosin in der InSRB-Sonde ist komplementär zum Guanin an Position 396 im Zielort auf der 16S rRNA der meisten unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierer (Tab. 15).

Sonde	DNA-Sequenz
CoSRB	5'-CGG CGT TGC TGC GTC AGG-3'
InSRB	5'-CGG CGT CGC TGC GTC AGG-3'
SRB385	5'-CGG CGT CGC TGC GTC AGG-3'

Überprüfung der Spezifität der neuen Sonde

Der Sequenzabgleich mit Hilfe der RDP-Datenbank (Ribosomal RNA Data Base Project; Larsen et al. 1993) ergab eine 100 %ige Komplementarität zwischen der Sequenz der CoSRB Sonde und Sequenzbereichen der 16S rRNA von 64 Eubakterien. Von diesen 64 Sequenzen stammten nur 8 von Sulfatreduzierern. 50 der restlichen 56 Sequenzen stammten von Bakterien aus systematisch völlig unterschiedlichen Gruppen, nämlich 23 Arten bzw. Stämme der Gattung *Clostridium*, 8 Arten und Stämme aus der Gattung *Campylobacter*, 6 verschiedene Arten aus der Gruppe der Myxobakterien, 3 phototrophe Bakterien aus der Gattung *Chlorobium*, jeweils 2 Arten aus den Gattungen *Leptospirillum*, *Pelobacter*, *Bacteroides*, und *Eubacterium*, sowie *Bdellovibrio stolpii* und *Desulfuromonas acetoxidans*. Die verbleibenden 6 Sequenzen stammen von taxonomisch nicht eingeordneten Bakterienstämmen bzw. von Nucleinsäuren aus mit PCR amplifizierten Umweltproben. Bei der InSRB Sonde wurde eine 100 %ige Komplementarität mit Sequenzbereichen der 16S rRNA von 54 Eubakterien und 1 Archaeobakterium (*Methanobacterium bavaricum*) festgestellt. Von diesen 54 eubakteriellen Sequenzen stammten nur 9 von Sulfatreduzierern. 27 der restlichen 45 Sequenzen stammten von Bakterien aus systematisch völlig unterschiedlichen Gruppen, nämlich aus 11 verschiedenen Gattungen, Arten und Stämmen aus der Gruppe der Actinomyceten, 6 Arten bzw. Stämmen aus der Gattung *Thermoanaerobacter*, 4 Arten aus der Gruppe der Myxobakterien, 3 Arten aus der Gattung *Clostridium*, sowie *Eubacterium fossor*, *Syntrophomonas wolfei* und *Acetogenium kivuii*. Die verbleibenden 16 Sequenzen stammen von taxonomisch nicht eingeordneten Bakterienstämmen bzw. von Nucleinsäuren aus mit PCR amplifizierten Umweltproben. Trotz dieser Komplementarität der CoSRB- und der InSRB-Sonde zur 16S rRNA zahlreicher nicht sulfatreduzierender Eubakterien sind keine fluoreszierenden Zellen solcher Bakterien nach Hybridisierung der Zellen der β 4-Anreicherung zu erwarten, da es sich bei den nicht sulfatreduzierenden Eubakterien um aerobe, thermophile oder gärende Bakterien handelt und die

β 4-Anreicherung selbst zum überwiegenden Teil sulfatreduzierende Bakterien enthielt (C. III. 2.).

Die Spezifität der CoSRB- und der InSRB-Sonde wurde durch Hybridisierung mit verschiedenen vollständig und unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern sowie mit nicht sulfatreduzierenden Eubakterien überprüft. Zur Kontrolle wurde die eubakterielle EUB338-Sonde (Positivkontrolle) und die bereits erwähnte Nonsense(NOS)-Sonde (Negativkontrolle) eingesetzt (Tab. 17). Bei der Hybridisierung zeigten beide Sonden im wesentlichen die erwartete Spezifität. Die CoSRB-Sonde ergab mit allen getesteten vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern sehr gute Fluoreszenzsignale, während mit Ausnahme von *Desulfobotulus sapovorans* mit den unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern kein Signal zu beobachten war. Die InSRB-Sonde verhielt sich genau umgekehrt, d.h. sie ergab mit Ausnahme von *Desulfobotulus sapovorans* mit allen unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierern gute bis sehr gute Fluoreszenzsignale, mit den vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern dagegen keine Fluoreszenz. Mit den meisten nicht sulfatreduzierenden Eubakterien hybridisierte weder die CoSRB-Sonde noch die InSRB-Sonde. Ausnahmen waren *Pelobacter acetylenicus* und *Desulfuromonas acetoxidans*, die schwache Fluoreszenz mit der CoSRB-Sonde ergaben, und *Myxococcus xanthus*, der eine kräftige Fluoreszenz mit der InSRB-Sonde zeigte. Die eubakterielle Kontrollsonde (EUB338) ergab kräftige Fluoreszenz mit fast allen getesteten Eubakterien. Bei keinem der getesteten Bakterien wurde eine Hybridisierung mit der Nonsense-Sonde beobachtet. Damit war gezeigt, daß die beiden Sonden CoSRB und InSRB geeignet waren, in der Population der β 4-Anreicherung zwischen den Familien *Desulfobacteriaceae* und *Desulfovibrionaceae* zu unterscheiden; zu ersterer gehören viele vollständige Oxidierer.

Das Fruchtkörper bildende Bodenbakterium *Myxococcus xanthus*, das gärende Bakterium *Pelobacter acetylenicus* und das schwefelreduzierende Bakterium *Desulfuromonas acetoxidans* ergaben wie zuvor beschrieben als einzige nicht sulfatreduzierende Eubakterien eine Hybridisierung mit der CoSRB- bzw. InSRB-Sonde. *Pelobacter acetylenicus* und *Desulfuromonas acetoxidans* sind untereinander und mit vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern nahe verwandt (Widdel und Pfennig 1992). *Myxococcus xanthus* steht ebenfalls phylogenetisch nahe bei den sulfatreduzierenden Bakterien (Widdel und Bak 1992). Die phylogenetische Verwandtschaft dieser drei nicht sulfatreduzierenden Eubakterien mit sulfatreduzierenden Bakterien erklärt die positiven Fluoreszenzsignale nach Hybridisierung mit der CoSRB-Sonde (Tab. 17). Allerdings waren bei der β 4-Anreicherung nur sulfatreduzierende Bakterien zu erwarten, da sowohl das Wachstum auf Rohöl als auch die selektive Verwertung von Alkylbenzolen aus dem Öl vom Vorhandensein von Sulfat abhängig waren (C. III. 5.2.).

Tabelle 17: Hybridisierung von ganzen Zellen mit FITC-markierten Oligonukleotidsonden. Neben der neuen Sonde (CoSRB) für vollständig oxidierende Sulfatreduzierer wurden zum Vergleich auch eine Sonde für unvollständig oxidierende Sulfatreduzierer (InSRB), eine eubakterielle Sonde (EUB338) und eine Nonsense-Sonde (NOS) getestet. Nach Anregung des Farbstoffs FITC bei 489 nm wurden die grünen Fluoreszenzsignale bei 514 nm im Fluoreszenzmikroskop beobachtet: +++, sehr gutes Signal; ++, gutes Signal; +, schwaches Signal; -, kein signifikantes Signal. Die *in situ*-Hybridisierungen wurden von Dr. Manabu Fukui durchgeführt.

Organismus	Stärke des Fluoreszenzsignals mit den Sonden:			
	CoSRB	InSRB	EUB338	NOS
Vollständig oxidierende SRB				
<i>Desulfobacter postgatei</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfobacter latus</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfobacterium vacuolatum</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfobacula toluolica</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfococcus multivorans</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfonema magnum</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfonema limicola</i>	+++	-	+++	-
<i>Desulfonema</i> sp. Jade02	+++	-	+++	-
<i>Desulfonema</i> sp. Tokyo01	+++	-	+++	-
Unvollständig oxidierende SRB				
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	-	+++	+++	-
<i>Desulfovibrio gigas</i>	-	++	+++	-
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	-	++	+++	-
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	-	++	++	-
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	-	+++	+++	-
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	+++	-	+++	-
Nicht sulfatreduzierende Bakterien				
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	+	-	+++	-
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	+	-	+++	-
<i>Beggiatoa alba</i>	-	-	+++	-
<i>Myxococcus xanthus</i>	+++	-	+++	-
<i>Photobacterium</i> sp. FW	-	-	+++	-
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	-	+++	-
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-	-	+++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+++	-
<i>Comamonas testosteroni</i>	-	-	+++	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+++	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-
<i>Halobacterium halobium</i>	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-

Zur Veranschaulichung der Spezifität der Sonden wurden Reinkulturen von *Desulfococcus multivorans* (vollständig oxidierendes SRB) und *Desulfovibrio desulfuricans*

(unvollständig oxidierendes SRB) als morphologisch gut voneinander unterscheidbare Zelltypen zusammen in einem Präparat fixiert und anschließend mit der CoSRB-Sonde bzw. mit der InSRB-Sonde hybridisiert (B. 5.2.2.). Die CoSRB-Sonde war mit FITC (grüne Fluoreszenz) und die InSRB-Sonde mit Rhodamin (rote Fluoreszenz) markiert. Bei entsprechender Anregung fluoreszierten nur die Zellen von *Desulfococcus multivorans* grün und nur die Zellen von *Desulfovibrio desulfuricans* rot (Abb. 37).

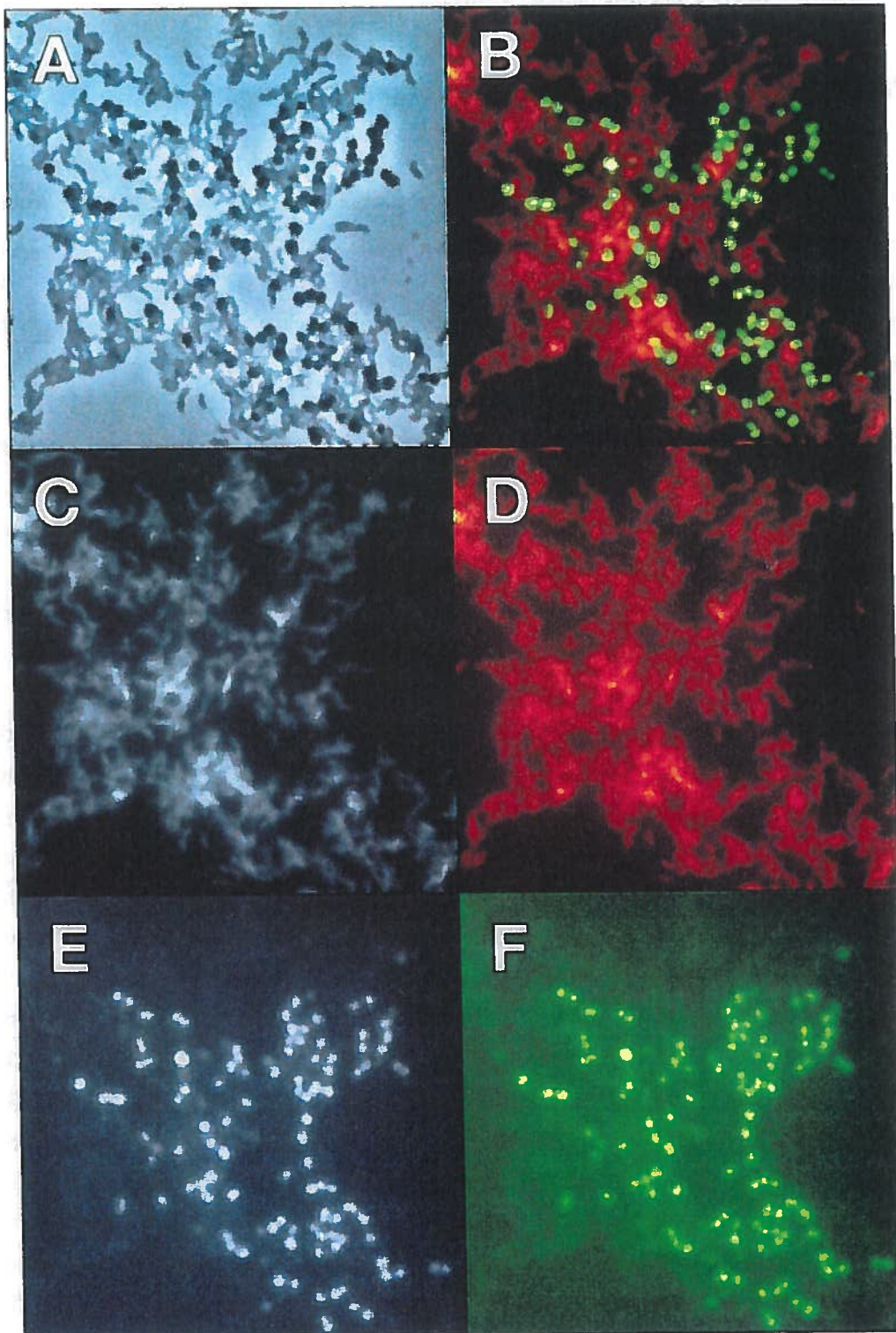


Abb. 37: Prüfung der FITC-markierten CoSRB-Sonde (grüne Fluoreszenz) und der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde (rote Fluoreszenz) an einem Gemisch aus Reinkulturen von *Desulfococcus multivorans* (coccoide Zellen) und *Desulfovibrio desulfuricans* (vibroide Zellen). A, Phasenkontrastaufnahme; B, die Fluoreszenz beider Sonden wurde durch Bildbearbeitung mit der Photoshop Software sichtbar gemacht; C, digitales Bild nach Hybridisierung mit der FITC-markierten CoSRB-Sonde und Anregung bei 489 nm; D, die grüne Fluoreszenz nach Hybridisierung mit der FITC-markierten CoSRB-Sonde und Anregung bei 489 nm wurde mit der Photoshop Software sichtbar gemacht; E, digitales Bild nach Hybridisierung mit der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde und Anregung bei 572 nm; F, die rote Fluoreszenz nach Hybridisierung mit der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde und Anregung bei 572 nm wurde mit der Photoshop Software sichtbar gemacht.

5.2. *In situ*-Hybridisierung der ölabbauenden β 4-Anreicherung

Bei der Ernte von Zellen der ölabbauenden β 4-Anreicherung wurde darauf geachtet, so wenig wie möglich an Ölpartikeln zu verschleppen (B. 5.2.1.), um Störungen bei der anschließenden *in situ*-Hybridisierung zu vermeiden. Nach Hybridisierung mit der FITC-markierten CoSRB-Sonde gaben mehr als 95 % der Zellen der β 4-Anreicherung ein positives Fluoreszenzsignal, während es mit der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde weniger als 5 % waren (Abb. 38). Das mikroskopische Bild im Phasenkontrast zeigte, daß alle erkennbaren Zellen der β 4-Anreicherung mit den beiden Sonden detektiert wurden, d.h. daß die β 4-Anreicherung ausschließlich aus sulfatreduzierenden Bakterien bestand. Der Nachweis von Angehörigen der *Desulfobacteriaceae* als vorherrschende Bakterien in der β 4-Anreicherung steht im Einklang mit der beobachteten Verwertung von Erdölbestandteilen. Sulfatreduzierende Bakterien, die Alkylbenzole aus dem Erdöl oxidieren (C. III. 4.), sind wahrscheinlich ebenso wie andere Typen mit der Fähigkeit zur Aromatenverwertung Angehörige der *Desulfobacteriaceae* und vollständigen Oxidierer.

Im Vergleich zur Hybridisierung ganzer Zellen von Referenzorganismen (C. III. 5.1.) waren die Fluoreszenzintensitäten mit beiden Sonden (CoSRB und InSRB) gering, wenngleich sie unterscheidbar waren. Die Fluoreszenz war stets schwach, unabhängig davon, ob für die Hybridisierung Zellen aus frisch gewachsenen oder bei 4 °C gelagerten Kulturen verwendet wurden. Demnach liegt die schwache Intensität des Fluoreszenzsignals nicht an einem Abbau der rRNA. Ein denkbarer Grund ist der allgemein niedrige Gehalt an Ribosomen und damit an rRNA in langsamwüchsigen Bakterien.

Die Signifikanz der beobachteten Fluoreszenzintensitäten von hybridisierten Zellen der β 4-Anreicherung wurde von Dr. Manabu Fukui durch Bestimmung von Pixelintensitäten mit Hilfe eines Konfokalen Laser-Raster Mikroskopes im Labor für Bodenkunde an der GSF in München durchgeführt (Tab. 18). Um die Vergleichbarkeit der gemessenen Pixelintensitäten zu gewährleisten, wurden alle Oligonukleotidsonden in diesem Versuch mit FITC markiert. Die durchschnittliche Pixelintensität nach Hybridisierung mit der CoSRB-Sonde war sogar höher als nach Hybridisierung mit der eubakteriellen EUB338-Sonde (Positivkontrolle). Aufgrund der niedrigen Zellzahl an unvollständig oxidierenden SRB entspricht die durchschnittliche Pixelintensität nach Hybridisierung mit der InSRB-Sonde der der NOS-Sonde (Negativkontrolle).

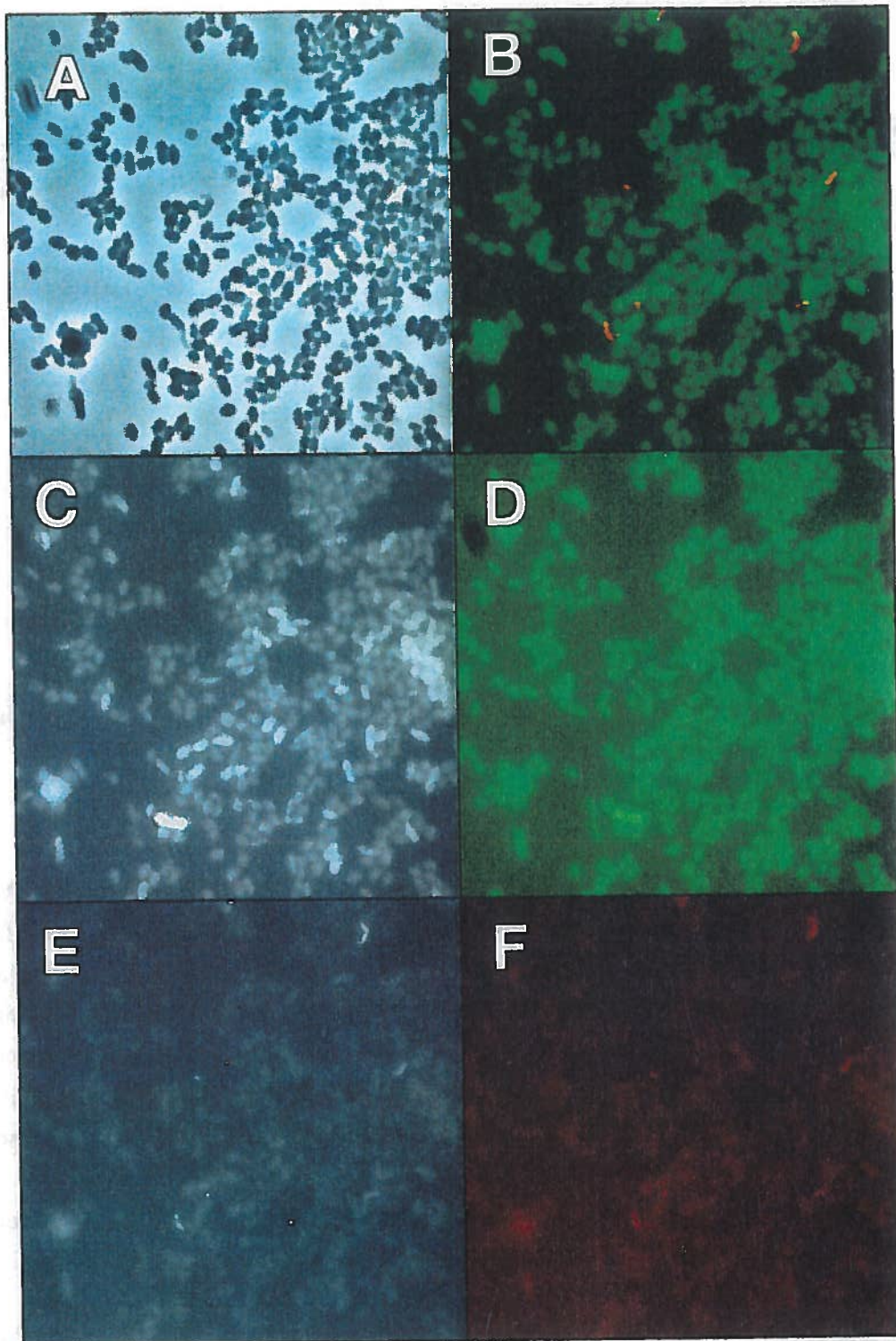


Abb. 38: Prüfung der FITC-markierten CoSRB-Sonde (grüne Fluoreszenz) und der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde (rote Fluoreszenz) mit Zellen der β 4-Anreicherung. **A**, Phasenkontrastaufnahme; **B**, die Fluoreszenz beider Sonden wurde durch Bildbearbeitung mit der Photoshop Software sichtbar gemacht. Mehr als 95 % der Population der β 4-Anreicherung zeigen ein grünes Fluoreszenzsignal und sind damit vollständig oxidierende SRB. Nur vereinzelt sind unvollständig oxidierende SRB als vibroide, rot fluoreszierende Zellen zu erkennen; **C**, digitales Bild nach Hybridisierung mit der FITC-markierten CoSRB-Sonde und Anregung bei 489 nm; **D**, die grüne Fluoreszenz nach Hybridisierung mit der FITC-markierten CoSRB-Sonde und Anregung bei 489 nm wurde mit der Photoshop Software sichtbar gemacht; **E**, digitales Bild nach Hybridisierung mit der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde und Anregung bei 572 nm; **F**, die rote Fluoreszenz nach Hybridisierung mit der Rhodamin-markierten InSRB-Sonde und Anregung bei 572 nm wurde mit der Photoshop Software sichtbar gemacht

Tabelle 18: Vergleich der Pixelintensitäten der Fluoreszenz von Zellen der β 4-Anreicherung, die mit verschiedenen FITC-markierten Oligonukleotidsonden hybridisiert wurden. CoSRB, Sonde für vollständig oxidierende SRB; InSRB, Sonde für unvollständig oxidierende SRB; EUB338, allgemeine eubakterielle Sonde (Positivkontrolle); NOS, Nonsense-Sonde (Negativkontrolle). Die Messung der Pixelintensitäten wurde von Dr. Manabu Fukui durchgeführt.

	Sonde			
	CoSRB	InSRB	EUB338	NOS
Durchschnittliche Pixelintensität	83,80	19,34	69,10	23,60
Standardabweichung	6,23	1,52	1,68	2,89
Anzahl der untersuchten Ausschnitte im Präparat	5	5	6	5

6. Isolierung von *o*-Xylol abbauenden sulfatreduzierenden Bakterien aus der ölabbauenden β 4-Anreicherung

Die gaschromatographische Analyse (C. III. 4.) hatte gezeigt, das die β 4-Anreicherung beim Wachstum auf Öl neben *o*-Xylol und *m*-Xylol und Toluol auch höhere Alkylbenzole wie *o*-Ethyltoluol und *m*-Ethyltoluol verwerten konnte. In Versuchen mit Reinsubstanzen war das Wachstum der β 4-Anreicherung allerdings nur mit *o*-Xylol und *m*-Xylol und Toluol möglich. Dies ließ vermuten, daß die beiden Xylole und Toluol die eigentlichen Substrate der β 4-Anreicherung beim Wachstum auf Öl waren und, daß die beiden Ethyltoluole lediglich cometabolisch verwertet wurden. Zur genaueren Abschätzung dieser Abbauleistungen sollten Alkylbenzol abbauende Reinkulturen aus der β 4-Anreicherung isoliert werden. Von besonderem Interesse war dabei *o*-Xylol, da bisher noch keine Reinkulturen anaerober Bakterien bekannt waren, die diesen aromatischen Kohlenwasserstoff unter anoxischen Bedingungen abbauen können.

Agarverdünnungsreihen in künstlichem Meerwassermedium wurden mit Toluol, *o*-Xylol, *m*-Xylol, *o*-Ethyltoluol und *m*-Ethyltoluol durchgeführt. Die einzelnen Alkylbenzole wurden jeweils als Verdünnungen von 5 % (v/v) in dünnflüssigem Paraffin zugesetzt. Während sich die für Sulfatreduzierer typischen braun gefärbten Kolonien in den Verdünnungsreihen auf Toluol bzw. *o*- und *m*-Xylol nach 4 bzw. 6 Wochen vollständig entwickelt hatten, bildeten sich mit *o*- und *m*-Ethylbenzol selbst nach einer Inkubationszeit von 3 Monaten keine Kolonien. Reinkulturen von *o*-Xylol (Stamm *o*XyS1) und Toluol (Stamm ToS2) abbauenden Sulfatreduzierern wurden schließlich über jeweils zwei aufeinanderfolgende

Agarverdünnungsreihen isoliert. Die Reinheit der Kulturen wurde mit den üblichen Methoden (B. 2.3.) kontrolliert. *m*-Xylol abbauende Sulfatreduzierer befinden sich gegenwärtig im Prozeß der Reinigung. Diese Isolierungen wurden zusammen mit Dr. Frank Aeckersberg durchgeführt.

Mit Hilfe dieser neuen sulfatreduzierenden Stämme sollte es in zukünftigen Versuchen möglich sein, die Abbaufähigkeit der β 4-Anreicherung beim Wachstum mit Öl in Reinkulturen zu bestätigen und den vermuteten Cometabolismus von *o*-Ethyltoluol und *m*-Ethyltoluol zu untersuchen.

D Diskussion

1. Nachweis des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol und anderen Alkylbenzolen durch neue nitratreduzierende Bakterien

Bis vor einigen Jahren war umstritten, ob aromatische Kohlenwasserstoffe, die unter oxidischen Bedingungen über initiale Oxygenase-Reaktionen abgebaut werden, auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff oxidiert werden können. Untersuchungen mit Toluol als Modellsubstrat zeigten jedoch, daß der mikrobielle Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in anaeroben Anreicherungen mit alternativen Elektronenakzeptoren (NO_3^- , HCO_3^-) prinzipiell möglich ist (Grbic-Galic und Vogel 1987, Kuhn et al. 1988, Zeyer et al. 1986). Schließlich wurden in den letzten Jahren Reinkulturen denitrifizierender (Altenschmidt und Fuchs 1991, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Fries et al. 1994 und Schocher et al. 1991), eisenreduzierender (Lovley und Lonergan 1990) und sulfatreduzierender (Rabus et al. 1993) Bakterien beschrieben, die anaerob Toluol abbauen konnten (A. 3.). Zwei der beschriebenen denitrifizierenden Reinkulturen konnten neben Toluol auch *m*-Xylol abbauen (Dolfing et al. 1990, Fries et al. 1994).

Da keine der beschriebenen Toluol abbauenden Reinkulturen Ethylbenzol abbauen konnte, stellte sich die Frage, bis zu welcher Länge der aliphatischen Seitenkette ein anaerober Abbau von Alkylbenzolen prinzipiell möglich ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Anreicherungen mit 8 verschiedenen Alkylbenzolen unter nitratreduzierenden Bedingungen versucht. Der Einsatz von großen Mengen eines Gemisches von Schlämmen aus unterschiedlichen Süßwasserstandorten sollte dabei einen möglichst großen Querschnitt an Organismen in den Anreicherungen sicherstellen. Erfolgreiche Anreicherungen wurden mit Ethylbenzol, Propylbenzol, Toluol und *m*-Xylol erzielt. Mit Isopropylbenzol, *n*-Butylbenzol, *o*-Xylol und *p*-Xylol konnten dagegen keine nitratreduzierenden Bakterien angereichert werden. Aus den erfolgreichen Anreicherungen wurden schließlich 4 denitrifizierende Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 auf Ethylbenzol, Propylbenzol, Toluol bzw. *m*-Xylol isoliert (C. II. 1.). Die Verwertung von Ethylbenzol bzw. Propylbenzol durch die Stämme EbN1 bzw. PbN1 ist eine neue, bisher nicht beschriebene Abbauleistung anaerober Bakterien. Weder mit Anreicherungen noch mit den vier neuen Isolaten wurde die Verwertung von Butylbenzol beobachtet. Unter der Voraussetzung, daß die in den Anreicherungen vorhandene Vielfalt an Organismen groß war, legt dieses Ergebnis den Schluß nahe, daß Alkylbenzole ab einer Länge

der aliphatischen Seitenkette von C₄ nicht mehr oder nur sehr langsam durch Aromaten verwertende Bakterien anaerob abbaubar sind. Bei Alkylbenzolen mit längeren Seitenketten als C₄ wäre auch ein anaerober Abbau durch Alkan verwertende Bakterien vorstellbar. In diesem Fall würde die Aktivierung des Kohlenwasserstoffs am freien Alkylende und nicht wie bei kurzkettigen Alkylbenzolen am ringständigen Benzyl-Kohlenstoffatom erfolgen. Alkan verwertende anaerobe Bakterien werden wahrscheinlich nur die aliphatische Seitenkette der höheren Alkylbenzole abbauen können, so daß vermutlich nur ein Benzoyl- oder Phenylacetylrest übrigbleibt. Alkan verwertende Bakterien verfügen vermutlich nicht über das für den Abbau des aromatischen Rings notwendige Enzymsystem, da alle bislang isolierten Alkanabbauer nicht in der Lage waren, auf Benzoat zu wachsen (Aeckersberg und Rueter, persönliche Mitteilung).

Keines der nitratreduzierenden Neuisolate war in der Lage, aerob auf einem der Alkylbenzole, die anaerob verwertet wurden, zu wachsen. Im Gegensatz dazu konnten alle Stämme mit der Mehrzahl der polaren aromatischen Verbindungen, die anaerob verwertet wurden, auch unter aeroben Bedingungen wachsen (C. II. 8. Tab. 10). Demzufolge sind die Eingangsreaktionen des Alkylbenzolabbaus bei allen Neuisolaten empfindlich gegenüber Sauerstoff.

Für die Bilanzierung des Ethylbenzolabbaus in Stamm EbN1 wurden in Wachstumsversuchen der Verbrauch von Nitrat bzw. die intermediäre Bildung von Nitrit, der Verbrauch von Ethylbenzol sowie die gebildete Zelltrockenmasse bestimmt (C. II. 4. Abb. 24 und Tab. 9). In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, daß in den Wachstumsansätzen für die Dauer des Experimentes Nitrat nicht verbraucht wurde, wenn den Zellen von Stamm EbN1 kein Ethylbenzol als Elektronendonator zur Verfügung stand. Ferner wurde gezeigt, daß weder Nitrat noch Nitrit durch Ascorbat chemisch reduziert wurden und daß kein Verlust von Ethylbenzol durch Adsorption an die Stopfen auftrat. Unter Berücksichtigung der Assimilation von Ethylbenzol zu Zelltrockenmasse konnte im Ansatz mit einer begrenzten Menge an Ethylbenzol gezeigt werden, daß die Menge an Reduktionsäquivalenten (Elektronen), die durch Dissimilation des eingesetzten Ethylbenzols entstehen konnte, mit der Menge an Reduktionsäquivalenten übereinstimmte, die für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und N₂ bzw. nur zu N₂ benötigt wurde. Nitrat wurde vollständig zu N₂ reduziert, da weder die Bildung von N₂O noch die von NH₄⁺ beobachtet wurde. Demzufolge erfolgt die Oxidation von Ethylbenzol in Stamm EbN1 vollständig zu CO₂, entsprechend der folgenden Gleichung:



Die freie Energie (ΔG°) wurde aus Standardwerten berechnet (Synowitz 1983, Thauer et al. 1977). Die Fähigkeit von Stamm EbN1, anaerob auf Acetat zu wachsen (C. II. 3. Tab. 8), bestätigt das durch die Abbaubilanz erzielte Ergebnis einer vollständigen Oxidation von Ethylbenzol zu CO_2 . Im Wachstumsansatz mit einem Überschuß an Ethylbenzol (C. II. 4. Tab. 9) wurden 20 % mehr Substrat oxidiert, als entsprechend der obigen Gleichung für die Reduktion des eingesetzten Nitrats notwendig gewesen wäre. Ein Grund dafür könnte eine unter Nitratlimitierung einsetzende Umwandlung des Substrats zu bislang nicht identifizierten organischen Verbindungen sein.

2. Taxonomische Einordnung der neuisolierten Nitratreduzierer

Aufgrund ihrer 16S rRNA-Sequenzen wurden alle neuen Alkylbenzol abbauenden Isolate in einen eng umgrenzten Ast der β -Gruppe der Proteobakterien eingeordnet. Dieser phylogenetische Ast enthielt auch *Thauera selenatis* (Macy et al. 1993) und *Azoarcus* Arten (Reinhold-Hurek et al. 1993), wobei die Bakterien beider Gattungen nicht in der Lage sind, aromatische Kohlenwasserstoffe zu verwerten. Dieses Ergebnis stimmt mit neueren phylogenetischen Untersuchungen überein, die gezeigt haben, daß bekannte Toluol abbauende (in einem Fall auch *m*-Xylol abbauende) nitratreduzierende Bakterien ebenfalls in diese phylogenetische Verwandtschaftsgruppe gehören (Andres und Fuchs, persönliche Mitteilung; Fries et al. 1994). Diese engen phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse legen die Vermutung nahe, daß die katabole Fähigkeit zum Abbau von Alkylbenzolen unter nitratreduzierenden Bedingungen einen monophyletischen Ursprung hat. Innerhalb dieser phylogenetischen Gruppe könnten sich dann verschiedene Linien entwickelt haben, in denen diese katabolen Fähigkeiten konserviert bzw. in ihrer Spezifität modifiziert worden sind.

3. Nachweis des anaeroben Abbaus von *o*-Xylol durch den sulfatreduzierenden Stamm oXyS1

Gaschromatographische Analysen der Aromatenfraktion hatten gezeigt, daß während des Wachstums der sulfatreduzierenden Anreicherung auf Rohöl (β 4-Anreicherung) selektiv Alkylbenzole aus dem Rohöl verwertet wurden. Von den insgesamt aus dem Rohöl abgebauten

Alkylbenzolen wurden wahrscheinlich nur Toluol, *o*-Xylol und *m*-Xylol als tatsächliche Wachstumssubstrate verwertet. Die übrigen höheren Alkylbenzole dürften in einem Cometabolismus nur unvollständig oxidiert worden sein (C. III. 4.). Von besonderem physiologischen Interesse war unter all diesen Abbauleistungen die vollständige Verwertung von *o*-Xylol, denn bislang war das Wachstum einer Reinkultur anaerober Bakterien auf diesem aromatischen Kohlenwasserstoff nicht bekannt. Unter sulfatreduzierenden Bedingungen ist bislang nur der anaerobe Abbau von Toluol durch *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 beschrieben (Rabus et al. 1993). Mit Hilfe von Agarverdünnungsreihen wurde deshalb der *o*-Xylol abbauende sulfatreduzierende Stamm oXyS1 aus der β 4-Anreicherung isoliert. Für das Wachstum auf *o*-Xylol benötigte der Stamm oXyS1 bei einem Inokulum von 5 % (v/v) ca. 2-3 Wochen (Aeckersberg, persönliche Mitteilung). Somit stellt der sulfatreduzierende Stamm oXyS1 die erste Reinkultur anaerober Bakterien dar, die *o*-Xylol unter anoxischen Bedingungen abbauen kann.

Gegenwärtig werden von Dr. Frank Aeckersberg aus der Öl abbauenden β 4-Anreicherung weitere sulfatreduzierende Bakterien mit *m*-Xylol bzw. Toluol als einzigem organischen Substrat isoliert. Ziel der Isolierung dieser Alkylbenzol abbauenden Sulfatreduzierer sollte neben der Beschreibung neuer anaerober Stoffwechselfähigkeiten bei sulfatreduzierenden Bakterien vor allem die Bestätigung der beobachteten Abbauleistungen der β 4-Anreicherung sein. Darüber hinaus könnte mit Hilfe der Reinkulturen geklärt werden, ob die Verwertung der C₃- und C₄-Alkylbenzole beim Wachstum der β 4-Anreicherung auf Rohöl wie vermutet durch eine cometabolische Oxidation zu den entsprechenden alkylierten Benzoaten zustandekommt.

4. Betrachtungen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Die anaerobe Aktivierung von Alkylbenzolen beginnt vermutlich mit der Spaltung einer C-H-Bindung. In der Biochemie sind drei prinzipielle Reaktionen zur Spaltung von C-H-Bindungen bekannt. Anders als bei den Alkylbenzolen wird bei den bekannten C-H-Bindungsspaltungen die Reaktion durch die Nachbarschaft der entsprechenden C-H-Bindung zu funktionellen Gruppen erleichtert. Dabei handelt es sich um heterolytische (Abstraktion von H⁺ bzw. H⁻) oder homolytische (Abstraktion von H[•]) Spaltungen von C-H-Bindungen (Frey 1990):

(a) *Abstraktion von H⁺*: C-H-Bindungen in direkter Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe werden durch Abstraktion eines Protons gespalten, da das entstehende

Carbanion durch die Carbonylgruppe mesomeriestabilisiert werden kann. Diese Spaltungsreaktionen sind z.B. bei Thioestern wie Acetyl-CoA bekannt (Abb. 39A).

(b) *Abstraktion von H*: Hydridionen können aus C-H-Bindungen abgespaltet werden, wenn das Kohlenstoffatom zusätzlich noch funktionelle Gruppen wie Alkohol- oder Aminogruppen trägt. Im Fall der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion wird das Hydridion auf NAD⁺ übertragen, während gleichzeitig ein Proton von der Alkoholgruppe abgespalten wird (Abb. 39B).

(c) *Abstraktion von H*: Wenn C-H-Bindungen weder OH- oder NH₂-Gruppen am Kohlenstoffatom tragen noch in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe stehen, wird die Bindung meistens homolytisch gespalten. Homolytische Spaltungsreaktionen werden von Coenzym B₁₂- oder S-Adenosylmethionin-abhängigen Enzymen katalysiert. In diesen Reaktionen wird durch Abstraktion eines H-Atoms zunächst ein Substratradikal erzeugt, das sich unter Beteiligung der benachbarten funktionellen Gruppen in ein Produktradikal umlagert. Das endgültige Produkt entsteht durch Wiederaufnahme des zuvor abstrahierten H-Atoms (Abb. 39C).

Im Gegensatz zu den zuvor aufgeführten Beispielen haben Alkylbenzole keine funktionellen Gruppen. Dennoch könnte der Phenylrest eine C-H-Spaltung begünstigen. Die bei der Spaltung von C-H-Bindungen gebildeten ionischen bzw. radikalischen Zwischenstufen könnten durch den konjugativen Effekt des aromatischen Systems begünstigt werden. Die Spaltung von C-H-Bindungen am Benzyl-Kohlenstoffatom des Toluols bzw. der höheren Alkylbenzole kann insbesondere dann vom delokalisierten π -Elektronensystem begünstigt werden, wenn Hydridionen oder H-Atome abstrahiert werden.

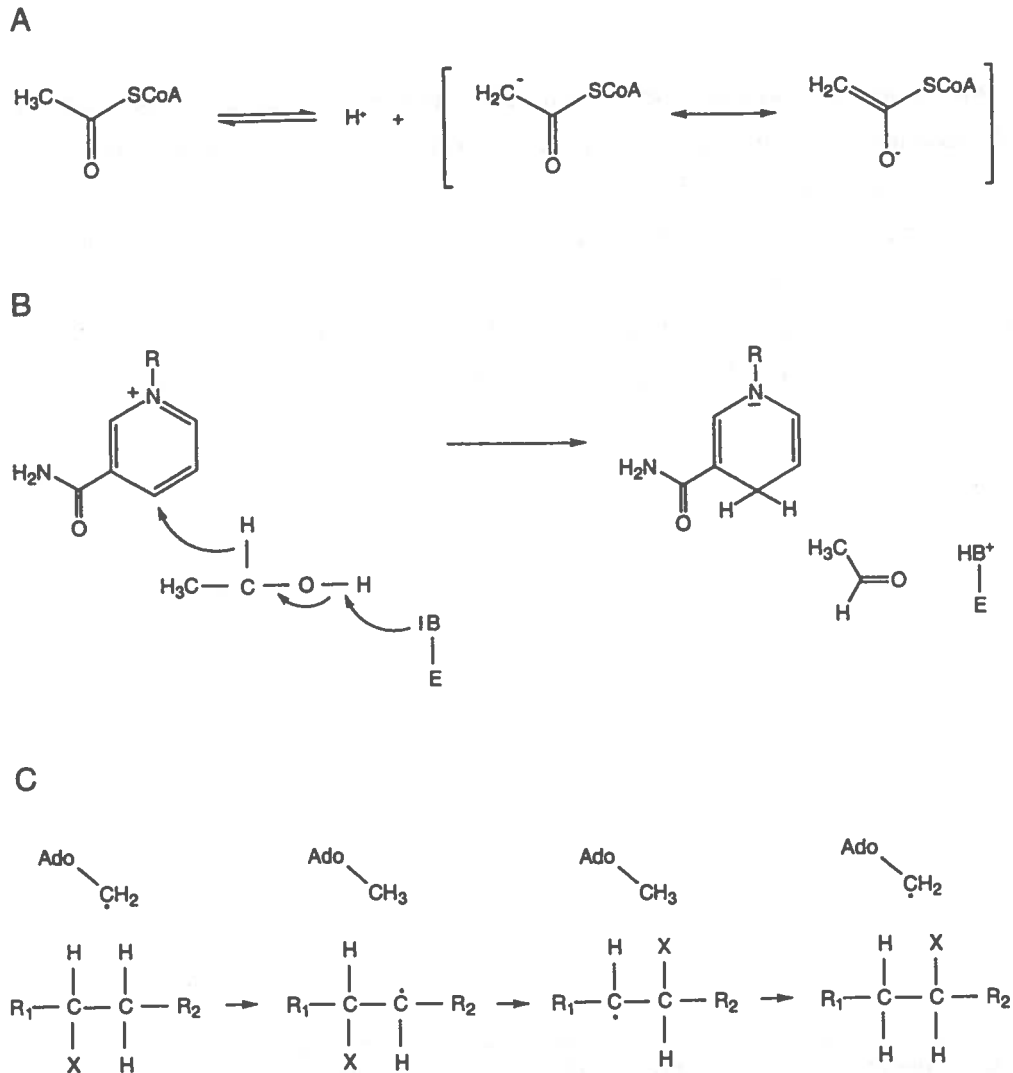


Abb. 39: Mögliche Spaltung von C-H-Bindungen. (A) Abstraktion eines Protons von Acetyl-CoA bzw. (B) eines Hydridions durch NAD^+ während der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion als Beispiele für heterolytische Spaltungen. (C) Allgemeiner Mechanismus einer Coenzym- B_{12} katalysierten Isomerisierungsreaktion als Beispiel einer homolytischen Spaltung.

4.1. Anaerobe Oxidation von Toluol im sulfatreduzierenden Stamm Tol2

Gegenwärtig werden zwei unterschiedliche Mechanismen bei der anaeroben Oxidation von Toluol diskutiert. In beiden Fällen erfolgt die Startreaktion an der Methylgruppe des Toluols. Altenschmidt und Fuchs (1991, 1992) schlugen eine anaerobe Methylhydroxylierung von Toluol zu Benzylalkohol als Aktivierungsreaktion vor, während Evans et al. (1992) Hinweise für eine oxidative Kondensation der Methylgruppe mit Acetyl-CoA zu Phenylpropionyl-CoA erbrachten. Mechanistisch gesehen könnten sowohl Benzylalkohol als auch Phenylpropionyl-CoA durch einen nukleophilen Angriff auf ein intermediär gebildetes Benzylkation entstehen (Abb. 40).

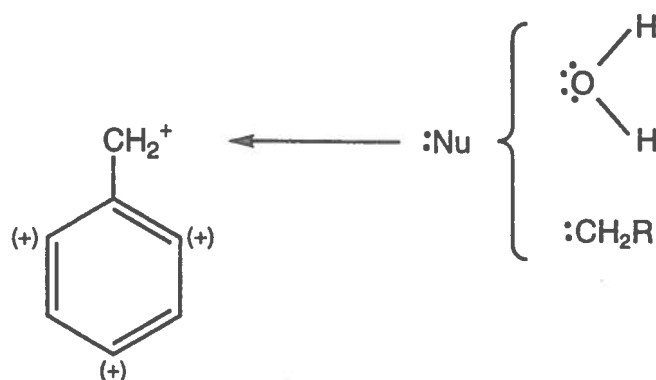


Abb. 40: Mechanistisches Prinzip einer Aktivierung von Toluol durch anaerobe Methylhydroxylierung bzw. Kondensation der Methylgruppe mit Acetyl-CoA. Dabei würde ein nukleophiler Angriff auf ein intermediär gebildetes Benzylkation erfolgen.

In einer früheren Arbeit über die anaerobe Oxidation von Toluol im sulfatreduzierenden Stamm Tol2 (Rabus et al. 1993) war durch Ergebnisse aus Wachstumsversuchen und Expressionsstudien in Zellsuspensionen eine Reihe denkbarer Reaktionen für die Aktivierung von Toluol als unwahrscheinlich erkannt worden. Auf Toluol gewachsene Zellen verfügten nicht konstitutiv über die Fähigkeit Phenylacetat abzubauen, und die drei Isomere des Methylbenzoats konnten nicht als Wachstumssubstrate verwertet werden. Deshalb war unter der Annahme, daß die getesteten Verbindungen genauso in die Zellen gelangten wie Benzoat, eine Carboxylierung der Methylgruppe oder des Ringes zu freien Carbonsäuren als Startreaktion unwahrscheinlich. Auf Toluol gewachsene Zellen verfügten ebenfalls nicht konstitutiv über die Fähigkeit *p*-Cresol abzubauen. Dies machte die Einführung einer Hydroxyl-Gruppe in den Ring

als Startreaktion ebenfalls unwahrscheinlich. Die Unfähigkeit von Stamm Tol2, auf Phenylpropionat zu wachsen, sprach nicht gegen eine Kondensation von Toluol mit Acetyl-CoA in Stamm Tol2, da das freie Phenylpropionat in dem vorgeschlagenen Weg über Phenylpropionyl-CoA nicht vorkommt. Benzylalkohol war nicht nur kein Wachstumssubstrat, sondern außerdem noch ein spezifischer Inhibitor der Toluoloxidation.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war damit nicht geklärt, ob die Aktivierung von Toluol tatsächlich an der Methylgruppe erfolgte und welche Bedeutung der inhibitorische Effekt von Benzylalkohol für die Toluoloxidation hatte.

Die Aktivierung von Toluol erfolgt an der Methylgruppe

Während der Oxidation von Toluol in dichten Zellsuspensionen bildete Stamm Tol2 *p*-Methylbenzoat aus *p*-Xylol (C. I. 4. Abb. 18). Die Bildung von *p*-Methylbenzoat als Dead-End-Produkt wurde dagegen nicht in Benzoat metabolisierenden Zellen beobachtet. Aus einer vorausgegangenen Arbeit war bereits bekannt, daß Zellen, die auf Benzoat gewachsen waren, nicht konstitutiv über die initialen Enzymsysteme der Toluoloxidation verfügten (Rabus et al. 1993). Demnach konnte die Methylgruppe von *p*-Xylol nur durch das Toluol oxidierende Enzymsystem von auf Toluol gewachsenen Zellen zur Carboxyl-Gruppe oxidiert werden. Diese cometabolische Oxidation von *p*-Xylol zu *p*-Methylbenzoat zeigt indirekt, daß auch im sulfatreduzierenden Stamm Tol2 die Startreaktion beim anaeroben Abbau von Toluol über eine Oxidation der Methylgruppe verläuft, was zu Benzoat als zentralem Intermediat führt (Abb. 41).

Benzylalkohol ist kein freies Intermediat der anaeroben Oxidation von Toluol

Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zur anaeroben Oxidation von Toluol widersprachen sich hinsichtlich der Bedeutung von Benzylalkohol als erstem Intermediat bei der Aktivierung von Toluol (A. 3.2.). Als häufigstes Argument gegen eine allgemeine Gültigkeit der von Altenschmidt und Fuchs (1992) vorgeschlagenen Aktivierung von Toluol durch Methylhydroxylierung zu Benzylalkohol wurde die Unfähigkeit einiger anaerob Toluol abbauender Stämme, Benzylalkohol als Wachstumssubstrat zu verwerten, genannt. Auch der in dieser Arbeit untersuchte sulfatreduzierende Stamm Tol2 war nicht in der Lage, auf Benzylalkohol zu wachsen. Die Besonderheit bei Stamm Tol2 war allerdings, daß Benzylalkohol sowohl das Wachstum auf Toluol als auch die Verwertung von Toluol in Zellsuspensionen irreversibel hemmte (Rabus et al. 1993). Zur Hemmung kam es offensichtlich nur beim Vorhandensein einer Hydroxymethyl-Gruppierung (CH₂OH-Gruppe) am Aromaten, denn Verbindungen mit einer dem Benzylalkohol ähnlichen Molekülstruktur (z.B. 1-Phenylethanol) hemmten die Toluolverwertung nicht (C. I. 2.).

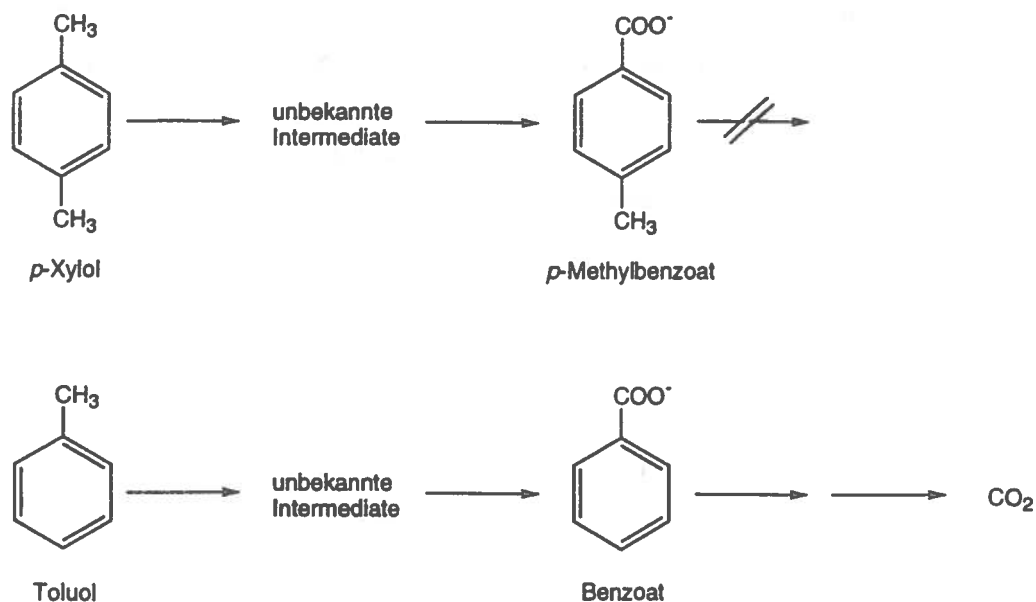


Abb. 41: Cometabolische Oxidation von *p*-Xylol zu *p*-Methylbenzoat in Toluol metabolisierenden Zellen von Stamm Tol2.

Für diese inhibitorische Wirkung von Benzylalkohol im sulfatreduzierenden Stamm Tol2 lassen sich eine Reihe von Ursachen von vornherein ausschließen. Da Toluol frei durch die Cytoplasmamembran diffundieren kann und deshalb für seine Aufnahme in die Zellen kein Transportsystem benötigt, ist eine Blockierung der Aufnahme durch Benzylalkohol unwahrscheinlich. Ebenfalls ausschließen läßt sich eine inhibierende Wirkung von Benzylalkohol auf die Expression von den Genen, die für die Enzyme der Aktivierung von Toluol kodieren, da die entsprechenden katabolen Enzymsysteme in den Zellen aus Anzuchten mit Toluol bereits vorhanden waren. Bei gleichzeitiger Zugabe von Benzylalkohol und Toluol zu dichten Zellsuspensionen des nitratreduzierenden Stamms K172 wurde Toluol erst nach vollständigem Verbrauch von Benzylalkohol verwertet (Altenschmidt und Fuchs 1992). Dies wurde als regulatorischer Effekt von Benzylalkohol auf die Toluoloxidation interpretiert. Es ist jedoch ebenso denkbar, daß es sich um die gleiche Hemmung durch ein Struktur analogon handelt, wie beim sulfatreduzierenden Stamm Tol2. Der Unterschied wäre nur, daß bei Stamm K172 das Struktur analogon verwertet wird und deshalb die Hemmung reversibel verläuft. In vorausgegangenen Versuchen mit dem sulfatreduzierenden Stamm Tol2 wurde bereits gezeigt, daß Benzaldehyd die Oxidation von Toluol in Zellsuspensionen nicht inhibierte (Rabus et al. 1993). Damit konnte ausgeschlossen werden, daß nicht Benzylalkohol sondern der durch

Dehydrogenierung sekundär entstandene Benzaldehyd der physiologisch wirksame Inhibitor war. Der physiologische Zielort von Benzylalkohol bei der Hemmung der Toluoloxidation könnte entweder die Initialreaktion selbst oder eine der nachfolgenden Reaktionen sein (Abb. 42). Da Benzylalkohol die Verwertung von Benzaldehyd in Zellsuspensionen nicht beeinträchtigte (C. I. 2. Abb. 15), konnte die inhibitorische Wirkung von Benzylalkohol auf die Startreaktion der anaeroben Toluoloxidation eingengt werden. Sollte der Benzylalkohol nun trotz seiner inhibierenden Wirkung das erste Intermediat der anaeroben Toluoloxidation sein, müßte er als effektiver Feedback-Inhibitor seine eigene Bildung in der Startreaktion der Toluoloxidation strikt regulieren. Unter dieser Annahme müßte Stamm Tol2 den Benzylalkohol dann verwerten können, wenn dieser in nicht inhibitorischen Konzentrationen zugesetzt würde. In einem entsprechenden Zellsuspensionsexperiment wurde der Benzylalkohol jedoch nicht verwertet (C. I. 2. Abb. 16). Demzufolge verläuft die anaerobe Oxidation von Toluol in *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 nicht über Benzylalkohol als freies Intermediat.

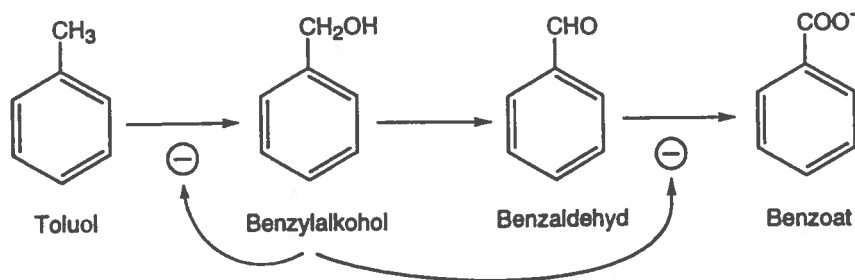


Abb. 42: Denkbare physiologische Zielorte von Benzylalkohol bei der Hemmung der Toluoloxidation sind die Startreaktion oder eine nachfolgende Reaktion.

In Analogie zu den Befunden beim sulfatreduzierenden Stamm Tol2 konnte der neu isolierte nitratreduzierende Stamm mXyN1 weder Benzylalkohol noch *m*-Methylbenzylalkohol verwerten. Außerdem hemmten beide Alkohole spezifisch sowohl die Verwertung von *m*-Xylol als auch die von Toluol. Diese inhibitorische Wirkung aromatischer Alkohole auf die Verwertung von Alkylbenzolen ist demnach nicht auf sulfatreduzierende Bakterien beschränkt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob die Verwertung von Toluol in den nitratreduzierenden Stämmen T1 (Evans et al. 1991) und T (Schocher et al. 1991) ebenfalls durch Benzylalkohol inhibiert werden kann.

Hinweise für eine Kondensation von Toluol mit Succinyl-CoA

Das Auftreten der beiden Dead-End-Produkte Benzylsuccinat bzw. *o*-Methylbenzylsuccinat bei der Toluoloxidation bzw. cometabolischen Oxidation von *o*-Xylol veranlaßte Evans et al. (1992), eine Kondensation von Toluol mit Acetyl-CoA als Startreaktion der Toluoloxidation im nitratreduzierenden Stamm T1 vorzuschlagen. Benzylsuccinat konnte im Ether-Extrakt von Toluol metabolisierenden Zellen des Stammes Tol2 nachgewiesen werden (C. I. 4., G. Abb. 18). Toluol metabolisierende Zellen von Stamm Tol2 bildeten außerdem cometabolisch aus *o*-Xylol ein nicht identifizierbares Dead-End-Produkt, bei dem es sich vermutlich um *o*-Methylbenzylsuccinat handelt (C. I. 4., G. Abb. 17). Eine Wiederholung dieser Metabolitbildung mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich. Dennoch können diese Ergebnisse als erste Hinweise darauf gewertet werden, daß auch Stamm Tol2 eine C-C-Kondensation zwischen der Methylgruppe des Toluols und einer Methylengruppe des Succinyl-CoA bzw. der Methylgruppe von Acetyl-CoA durchführt.

Die zuvor dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, daß die Toluoloxidation im Stamm Tol2 nicht über Benzylalkohol als freies Intermediat verlaufen kann. Eine Methylhydroxylierung wäre nur dann als Startreaktion denkbar, wenn der Benzylalkohol auf noch unbekannte Weise am Enzym oder einem Cofaktor gebunden bliebe. Diese Überlegung begründet sich auf Untersuchungen zur Oxidation von *p*-Cresol. Dabei wurde gezeigt, daß die Bindung von *p*-Hydroxybenzylalkohol an die gereinigte *p*-Cresol-Methylhydroxylase von *Pseudomonas putida* nur nach Entfernung des Elektronenakzeptors gelöst werden konnte (Hopper 1978). Eine Oxidation von Toluol über Benzaldehyd ohne ein Auftreten von freiem Benzylalkohol wäre vorstellbar, unter der Annahme, daß Benzylsuccinyl-CoA kein Nebenprodukt, sondern das erste Intermediat der anaeroben Aktivierung von Toluol ist. Nach Oxidation des ringständigen C-Atoms zum sekundären Alkohol wäre eine Spaltung in Benzaldehyd und Succinyl-CoA entsprechend einer rückläufigen Aldolkondensation möglich. Bei diesem Mechanismus würde das für die Startreaktion benötigte Succinyl-CoA wie ein Coenzym ständig recycelt werden (Abb. 43). Somit wäre Succinyl-CoA und nicht wie von Evans et al. (1992) vorgeschlagen Acetyl-CoA das nukleophile Agens in der Aktivierungsreaktion. Dem widerspricht das mehrfach gefundene Auftreten von Benzylsuccinat als Dead-End-Produkt nicht, denn es ist denkbar, daß es keine CoA-Ligase für die Reaktivierung von in einer hydrolytischen Nebenreaktion gebildetem Benzylsuccinat zu Benzylsuccinyl-CoA gibt. Das von Altenschmidt und Fuchs (1992) beschriebene Auftreten von Benzylalkohol als erstem Intermediat der Toluoloxidation ließe sich in diesem Fall durch eine schnelle Rückreaktion der Benzylalkohol-Dehydrogenase erklären. Dabei müßte die Aktivität dieser Rückreaktion höher sein als die der Benzaldehyd-Dehydrogenase, so daß der direkt aus

dem Toluol gebildete Benzaldehyd sofort zum Benzylalkohol reduziert wird, bevor er nach Verbrauch der Reduktionsäquivalente weiter zum Benzoat oxidiert werden kann.

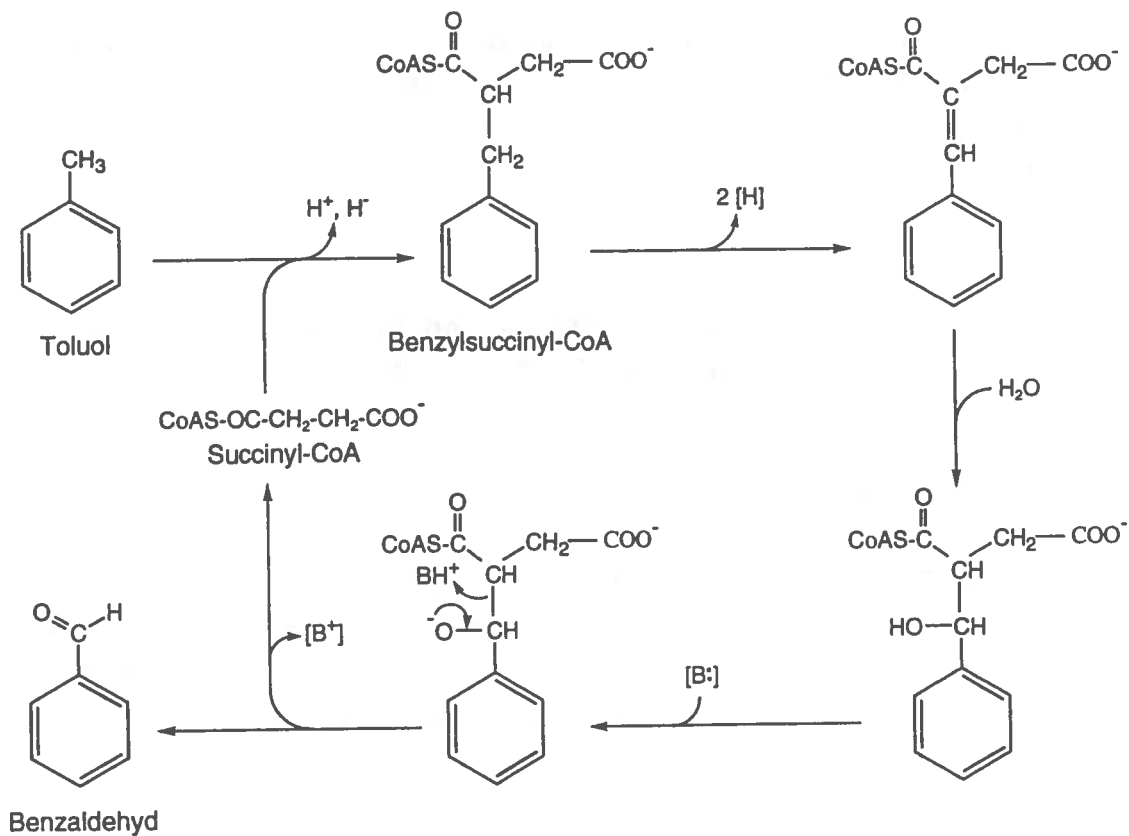


Abb. 43: Hypothetischer Oxidationsmechanismus von Toluol, bei welchem Benzaldehyd nach der anaeroben Aktivierung von Toluol mit Succinyl-CoA zu Benzylsuccinyl-CoA gebildet wird.

Eine endgültige Aussage über den Mechanismus der anaeroben Aktivierung von Toluol ist beim derzeitigen Stand der Forschung nicht möglich. Neben den alternativ diskutierten Wegen der Methylhydroxylierung (Altenschmidt und Fuchs 1992) bzw. der Kondensation mit Acetyl-CoA (Evans et al. 1992) bietet der in Abb. 43 vorgeschlagene Weg über Benzylsuccinyl-CoA als tatsächlichem Zwischenprodukt die Möglichkeit, die sich bislang widersprechenden Ergebnisse mit einem gemeinsamen Weg zu erklären.

Expressionsstudien von Proteinen mit 2D-Gelelektrophorese

Die bisherigen Ergebnisse lassen keine genaue Aussage über die Startreaktion bei der anaeroben Toluoloxidation zu. Ein zur Suche nach Intermediaten alternativer experimenteller Ansatz wurde mit Expressionsstudien von Proteinen verfolgt. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese wurde ein kleines Protein nachgewiesen, das spezifisch beim Wachstum auf Toluol exprimiert wurde (C. I. 5. Abb. 20). Über die N-terminale Sequenz dieses Proteins sollte es in der Zukunft möglich sein, DNA-Sonden zu entwickeln, um ein erstes mögliches Strukturgen des Toluolstoffwechsels zu finden.

4.2. Anaerobe Oxidation von Ethylbenzol und Propylbenzol in den nitratreduzierenden Stämmen EbN1 und PbN1

Startreaktionen bei der anaeroben Oxidation von Ethylbenzol und Propylbenzol

Die beiden nitratreduzierenden Stämme EbN1 und PbN1 zeigten eine auffallend hohe Spezifität hinsichtlich der Verwertung von Alkylbenzolen. Während Stamm EbN1 auf Ethylbenzol und Toluol, nicht aber auf Propylbenzol wachsen konnte, verwertete Stamm PbN1 Propylbenzol und Ethylbenzol, nicht aber Toluol. Darüber hinaus verwerteten beide Stämme spezifisch sekundäre aromatische Alkohole und aromatische Ketone. Stamm EbN1 wuchs auf 1-Phenylethanol und Acetophenon, nicht aber auf 2-Phenylethanol, 1-Phenyl-1-propanol oder Propiophenon. Stamm PbN1 dagegen wuchs auf 1-Phenylethanol, 1-Phenyl-1-propanol, Acetophenon und Propiophenon, nicht aber auf 1-Phenyl-2-propanol oder 3-Phenyl-1-propanol. Diese Substratspezifität wird durch den Vergleich mit den Stämmen ToN1 und mXyN1 zusätzlich hervorgehoben, die weder Ethylbenzol noch Propylbenzol verwerten und interessanterweise auch keinen der sekundären Alkohole 1-Phenylethanol oder 1-Phenyl-1-propanol und keines der Ketone Acetophenon oder Propiophenon. Damit korreliert die Verwertung dieser Alkohole und Ketone mit der Fähigkeit zum Wachstum auf den beiden Alkylbenzolen Ethylbenzol und Propylbenzol.

Die Aktivierung von Ethylbenzol und Propylbenzol verläuft vermutlich nach dem gleichen mechanistischen Prinzip wie zuvor für die Toluoloxidation dargestellt. Zunächst wird unter Abspaltung eines Hydridions am Benzyl-Kohlenstoffatom ein durch das aromatische System stabilisiertes Kation gebildet. Für den anschließenden nukleophilen Angriff auf das Kation sind zwei Möglichkeiten denkbar. Erstens könnten, in Analogie zu der von Altenschmidt und Fuchs (1992) vorgeschlagenen Methylhydroxylierung von Toluol, durch Hydroxylierung des Benzyl-Kohlenstoffatoms die sekundären Alkohole 1-Phenylethanol bzw.

1-Phenyl-1-propanol gebildet werden. Diese Alkohole würden dann weiter zu Acetophenon bzw. Propiophenon oxidiert werden (Abb. 44A). Zweitens ist, in Analogie zu der für den sulfatreduzierenden Stamm Tol2 vorgeschlagenen Aktivierung von Toluol zu Benzylsuccinyl-CoA, auch ein nukleophiler Angriff des Succinyl-CoA auf die Benzyl-Kohlenstoffatome von Ethylbenzol bzw. Propylbenzol vorstellbar. Unter dieser Annahme würden nach der oxidativen Kondensation durch Abspaltung von Succinyl-CoA direkt Acetophenon und Propiophenon entstehen (Abb. 44B). Außerdem wären die sekundären Alkohole 1-Phenylethanol und 1-Phenyl-1-propanol dann keine Intermediate der anaeroben Oxidation von Ethylbenzol und Propylbenzol.

Als C-H-azide Verbindungen würden die beiden Ketone Acetophenon und Propiophenon durch Carboxylierung weiter zu β -Ketosäuren metabolisiert werden. Die β -Ketosäuren könnten nach Aktivierung zu CoA-Estern dann schließlich durch β -Oxidation in das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA gespalten werden. Beim anaeroben Abbau von aliphatischen Ketonen wird eine Carboxylierung sowohl in nitratreduzierenden Bakterien (Platen und Schink 1989, Janssen und Schink 1995c) als auch bei den sulfatreduzierenden Bakterien *Desulfococcus biactus* (Janssen und Schink 1995a) und *Desulfobacterium cetonicum* (Janssen und Schink 1995b) als Startreaktion vorgeschlagen. Stämme EbN1 und PbN1 sind ebenfalls in der Lage auf den aliphatischen Ketonen Aceton und 2-Butanon zu wachsen. Dies deutet darauf hin, daß beide Stämme die Fähigkeit zur Carboxylierung von C-Atomen in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe besitzen.

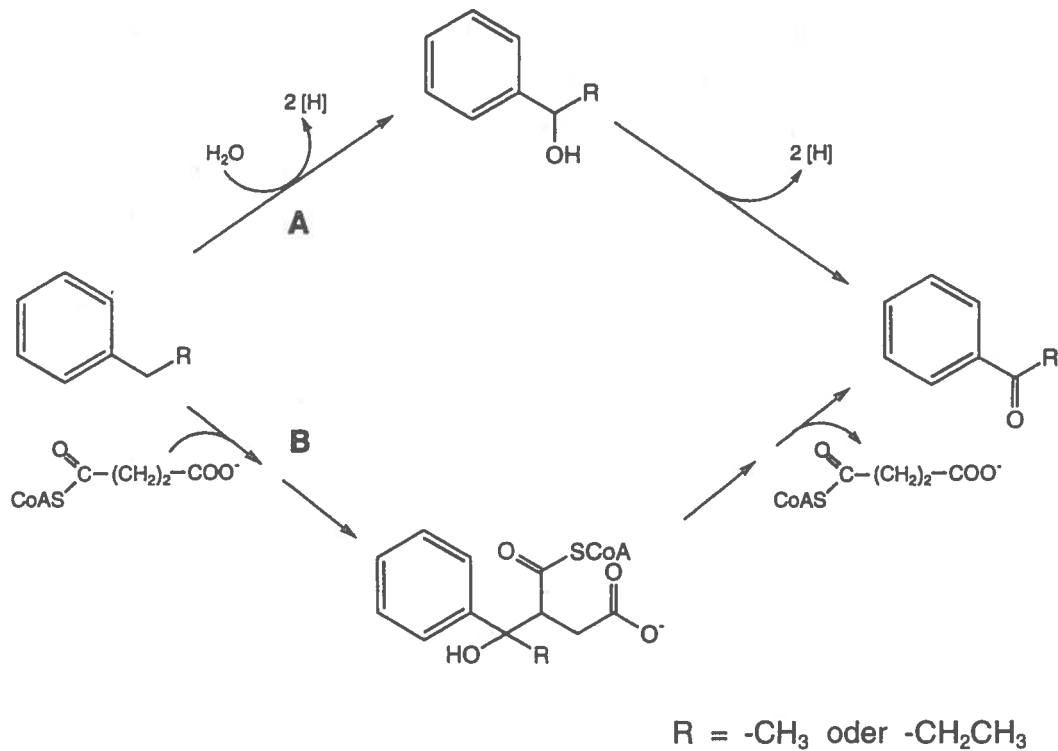


Abb. 44: Hypothetische Oxidationsmechanismen von Ethylbenzol und Propylbenzol. (A) Durch Hydroxylierung der Benzyl-Kohlenstoffatome entstehen die sekundären Alkohole 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenyl-1-propanol, die dann weiter zu Acetophenon bzw. Propiophenon oxidiert werden. (B) Nach oxidativer Kondensation der Benzyl-Kohlenstoffatome mit Succinyl-CoA und weiterer Oxidation werden Acetophenon und Propiophenon direkt durch Abspaltung von Succinyl-CoA gebildet.

Oxidation von Ethylbenzol und Toluol in Stamm EbN1

Die initiale Aktivierung von Ethylbenzol und Toluol in Stamm EbN1 kann nicht am gleichen Enzymsystem erfolgen, denn Zellsuspensionen aus Ethylbenzol-Anzuchten verfügen nicht konstitutiv über die Fähigkeit Toluol abzubauen. Toluol wurde erst nach einer Lag-Phase von ca. 130 h verwertet (C. II. 5. Abb. 26). Demzufolge werden Ethylbenzol und Toluol in Stamm EbN1 über zwei getrennte Wege abgebaut (Abb. 45).

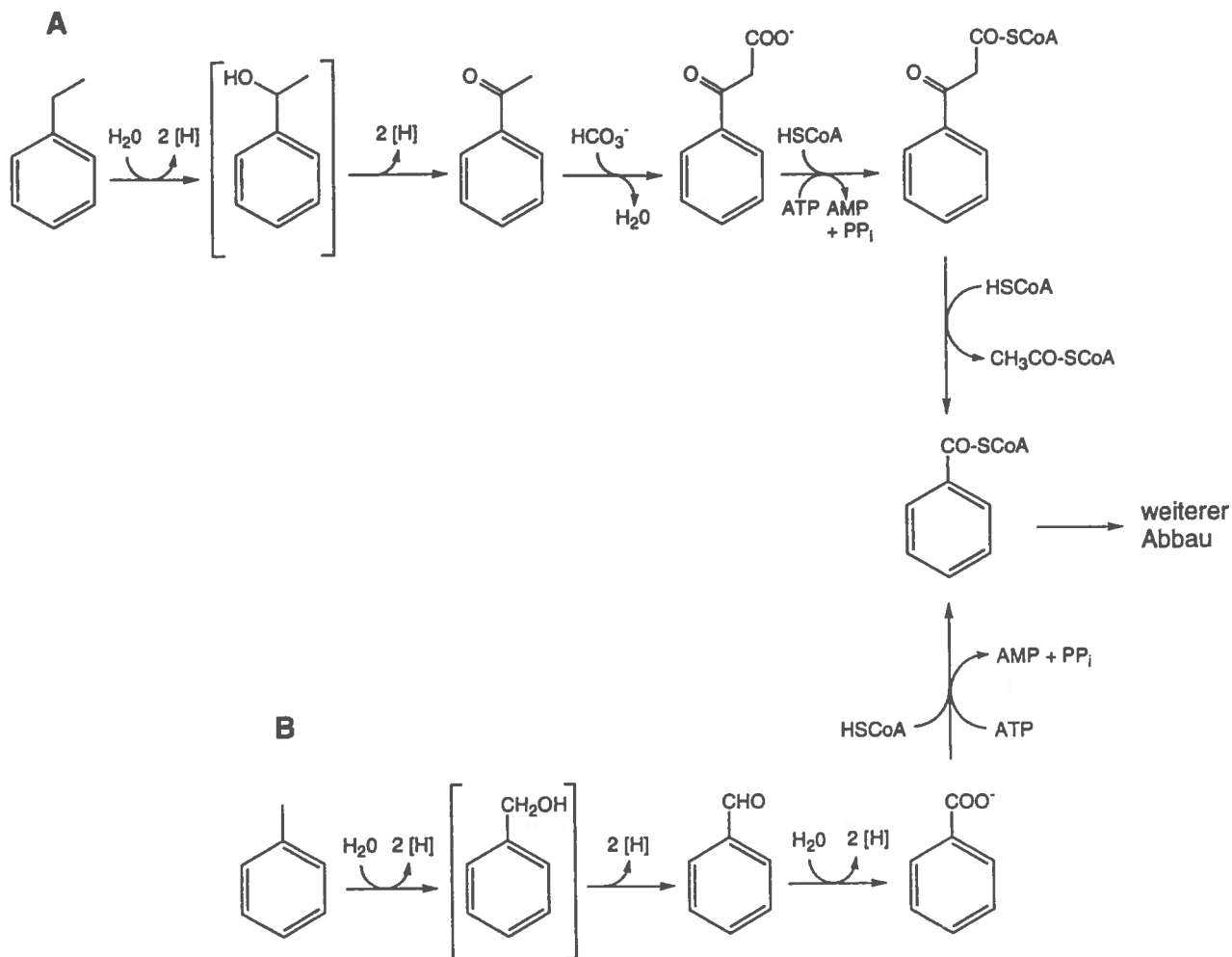


Abb. 45: Hypothetischer Weg der anaeroben Oxidation von Ethylbenzol und Toluol im nitratreduzierenden Stamm EbN1. Die Oxidation der beiden Alkylbenzole zum zentralen Benzoyl-CoA verläuft auf zwei getrennten Wegen.

5. Bedeutung der Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch sulfatreduzierende und nitratreduzierende Bakterien

Sulfatreduzierende Bakterien

Mit anoxischem Nordsee-Rohöl als einzigem organischen Substrat wurde aus der Wasserphase eines großen Rohöllagertanks eine mesophile, sulfatreduzierende Anreicherung (β 4-Anreicherung) direkt gewonnen. Beim Wachstum auf Rohöl bildete die β 4-Anreicherung unter optimierten Kulturbedingungen innerhalb von 3 Wochen bis zu 20 mM Sulfid. Gaschromatographische Analysen zeigten, daß während des Wachstums selektiv C₁- bis C₄-Alkylbenzole, nicht aber Alkane aus dem Rohöl verwertet wurden. In unserem Labor wurde außerdem gezeigt, daß der aus einem Tiefseesediment isolierte moderat thermophile Sulfatreduzierer Stamm Td3 *n*-Alkane von C₈ bis C₁₆, nicht aber Alkylbenzole aus dem Rohöl verwerten konnte (Aeckersberg 1994, Rueter et al. 1994). Beide Ergebnisse zeigen, daß die in Ölfeldern und Ölförderanlagen unerwünschte Bildung von Sulfid durch sulfatreduzierende Bakterien (A. 4.1.) prinzipiell auf eine direkte und selektive Verwertung von Alkylbenzolen bzw. *n*-Alkanen als den häufigsten Bestandteilen des Rohöls zurückgeführt werden kann. Diese Möglichkeit eröffnet eine neue Sichtweise bei zukünftigen mikrobiologischen Untersuchungen in Ölfeldern, denn bislang wurde eine Verwertung von in Rohöl vorhandenen Carbonsäuren, von Produkten aerober mikrobieller Abbauprozesse und von Ölfeldchemikalien für die mikrobielle Sulfidbildung in Ölfeldern und Ölförderanlagen verantwortlich gemacht. Die Verwertung von Alkylbenzolen und *n*-Alkanen hingegen kann auch die Sulfidbildung in Förderanlagen erklären, in denen keine oder nur minimale Mengen an Chemikalien eingesetzt werden und in denen kein Sauerstoff an das Rohöl gelangt.

Eine anaerobe Verwertung von Alkylbenzolen durch sulfatreduzierende Bakterien ist bislang nur unter mesophilen Temperaturen beobachtet worden (Rabus et al. 1993, Rueter et al. 1994). Diese Temperaturen herrschen vor allem in Rohöllagertanks und Pipelines. Auch sind mesophile Sulfatreduzierer, die anaerob *n*-Alkane oxidieren können bekannt (Aeckersberg et al. 1991, Aeckersberg 1994). Die anteilige Bedeutung der mesophilen Alkylbenzol bzw. Alkan oxidierenden Sulfatreduzierer an der beobachteten Sulfidbildung in den zuvor genannten Standorten ist schwer einzuschätzen. Alkylbenzol abbauende Sulfatreduzierer besitzen unter Laborbedingungen zwar die höheren Wachstumsraten, am natürlichen Standort können jedoch auch die langsameren Alkanverwerter durch Zurückhaltung und Anheftung beachtliche Wachstumsraten erzielen. In vielen Öllagerstätten liegen die Temperaturen dagegen höher. So könnten hier Alkan verwertende thermophile Sulfatreduzierer wie der Stamm Td3 wesentlich zur Sulfidbildung beitragen.

Sulfatreduzierende Bakterien wurden auch direkt aus Öllagerstätten isoliert (Rosnes et al. 1991a und 1991b, Stetter et al. 1993), wenngleich eine Verwertung von aromatischen oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen aus dem Rohöl nicht gezeigt wurde.

Über die Herkunft von in Öllagerstätten gefundenen sulfatreduzierenden Bakterien gibt es folgende grundsätzliche Vorstellungen:

a) Die gefundenen Sulfatreduzierer sind Teil einer mikrobiellen Gemeinschaft, die seit der Bildung der Öllagerstätten in diesen überdauert haben. Für diese Annahme spricht die Isolierung von thermophilen sporenbildenden Sulfatreduzierern aus Formationsgestein von Öllagerstätten, die zuvor noch nicht mit Injektionswasser geflutet worden waren (Rosnes et al. 1991b).

b) Oberflächenwasser, das durch Brüche in Gesteinsformationen in die Öllagerstätten gelangt, könnte eine ständige Quelle für sulfatreduzierende Bakterien sein.

c) Bei der sekundären Ölförderung in Offshore-Ölfeldern werden große Mengen an Meerwasser über die Injektionssonden in die Lagerstätten gepreßt, um die Förderausbeute zu erhöhen. Durch das Injektionswasser werden die Lagerstätten mit sulfatreduzierenden Bakterien kontaminiert. Für diese Möglichkeit spricht, daß in die von Stetter et al. (1993) untersuchten Lagerstätten bereits zum Zeitpunkt der Probeentnahme Injektionswasser eingeleitet worden war. Von diesen im Formationswasser von Lagerstätten gefundenen hyperthermophilen Bakterien war außerdem bekannt, daß sie in kaltem Meerwasser überleben können (Huber et al. 1990).

Die in dieser Arbeit aus einem Rohöllagertank angereicherten sulfatreduzierenden Bakterien stammten wahrscheinlich aus dem Meerwasser der Nordsee. Der Lagertank war mit einer Rohöl-Wasser-Emulsion aus einem Nordsee-Ölfeld befüllt. Das Wasser in dieser Emulsion könnte von dem ursprünglich bei der sekundären Ölförderung eingesetzten Injektionswasser stammen.

Die β 4-Anreicherung war in der Lage selektiv Toluol, *o*-Xylol, *m*-Xylol, *o*-Ethyltoluol, *m*-Ethyltoluol, *m*-Propyltoluol und *m*-Cymol aus dem Rohöl abzubauen. Es ist allerdings anzunehmen, daß nicht alle aus dem Öl verwerteten Alkylbenzole von der β 4-Anreicherung vollständig oxidiert wurden. Während Toluol, *o*-Xylol und *m*-Xylol als Reinsubstanzen für die β 4-Anreicherung gute Wachstumssubstrate waren, wurde mit *o*-Ethyltoluol und *m*-Ethyltoluol nur ein schwaches Wachstum beobachtet. In Analogie zu der Oxidation von *p*-Xylol zu *p*-Methylbenzoat durch *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 (C. I. 4.) ist anzunehmen, daß *o*-Ethyltoluol und *p*-Ethyltoluol lediglich unvollständig zu den entsprechenden Ethylbenzoaten oxidiert wurden. Dabei verlief die Oxidation der Ethyltoluole vermutlich an der Methylgruppe und nicht an der Ethylgruppe, da Ethylbenzol von der β 4-Anreicherung nicht verwertet werden konnte. Demzufolge werden Alkylbenzole aus Rohöl nicht immer vollständig zu CO₂ oxidiert, auch wenn ihr Abbau auf die Aktivität von vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern zurückgeht.

Vergleichende Wachstumsstudien mit verschiedenen Rohölen zeigten einerseits, daß auf Rohölen unterschiedlicher Herkunft und Konsistenz ein Wachstum der β 4-Anreicherung möglich war, aber andererseits auch, daß Öle nicht verwertet werden konnten bzw. sogar toxisch waren, obwohl sie Alkylbenzole als Wachstumssubstrate enthielten.

Die *in situ*-Hybridisierung der Zellen der Rohöl verwertenden β 4-Anreicherung mit der InSRB-Sonde zeigte, daß weniger als 5 % der Bakterienpopulation in der Anreicherung der Familie der *Desulfovibrionaceae* zuzuordnen waren. Dagegen konnte mit der neuentwickelten CoSRB-Sonde gezeigt werden, daß die Population der Rohöl verwertenden β 4-Anreicherung zu mehr als 95 % aus Angehörigen der Familie der *Desulfobacteriaceae* bestand; zu dieser Familie gehören viele vollständig oxidierende Sulfatreduzierer. Mit Hilfe dieser CoSRB-Sonde konnte außerdem das Vorhandensein von vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern in einem Lagertank für Nordsee-Rohöl (β -Raffinerie, Wilhelmshaven) nachgewiesen werden (Dr. Manabu Fukui, persönliche Mitteilung). Damit konnte gezeigt werden, daß der mit der β 4-Anreicherung beobachtete Prozeß der Bildung von H_2S durch selektive Verwertung von Alkylbenzolen aus Rohöl durch vollständig oxidierende Sulfatreduzierer prinzipiell in Rohöllagertanks stattfinden kann. Für weiterführende Untersuchungen könnte auf der Basis der 16S rRNA Sequenz des aus der β 4-Anreicherung isolierten Stamms oXyS1 eine artspezifische Oligonukleotidsonde entwickelt werden. Neben der CoSRB-Sonde könnte eine solche artspezifische Oligonukleotidsonde eingesetzt werden, um vollständig oxidierende Sulfatreduzierer *in situ* in Wasserphasen oder auch in Biofilmen in verschiedenen Ölförderanlagen nachzuweisen und um damit die Bedeutung des zuvor beschriebenen Prozesses an unterschiedlichen Standorten zu überprüfen.

Nitratreduzierende Bakterien

Mit allen vier Alkylbenzol abbauenden Neuisolaten, Stamm EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1, konnte erstmals das anaerobe Wachstum von nitratreduzierenden Reinkulturen mit Rohöl als einzigem organischen Substrat gezeigt werden. Das Rohöl für die Wachstumsansätze war zuvor in einem Spezialgefäß von Luftsauerstoff befreit und durch Autoklavieren sterilisiert worden (B. 2.2.3. Abb. 8). Durch gaschromatographische Analyse des Rohöls am Ende der Inkubation wurde eine selektive Verwertung einzelner Alkylbenzole, nicht aber von Alkanen festgestellt (C. II. 9. Abb. 28 und 29). Die Stämme EbN1 und ToN1 verwerteten genau die Alkylbenzole (Ethylbenzol und/bzw. Toluol) aus dem Rohöl, die ihnen auch als Reinsubstanzen als Wachstumssubstrate dienten. Stamm PbN1 verwertete nur Ethylbenzol aus dem Rohöl, obwohl auch Propylbenzol ein Wachstumssubstrat war. Stamm mXyN1 dagegen verwertete neben Toluol und *m*-Xylol auch noch die beiden anderen Isomere des Xylols aus dem Rohöl. Im Gegensatz zu Toluol und *m*-Xylol sind *o*-Xylol und *p*-Xylol keine Wachstumssubstrate von

Stamm mXyN1 und wurden deshalb wahrscheinlich nur zu Dead-End-Produkten metabolisiert. Eine unvollständige Oxidation von Xylolen zu Methylbenzoaten wurde bei Toluol metabolisierenden anaeroben Bakterien bereits mehrfach beobachtet (C. I. 4., Seyfried et al. 1994).

Diese Ergebnisse zeigten einerseits, daß die als toxisch bekannten Alkylbenzole (A. 1.) prinzipiell anaerob durch nitratreduzierende Bakterien aus dem Rohöl abgebaut werden können, andererseits aber, daß die Anzahl der von jedem einzelnen Stamm verwertbaren Alkylbenzole sehr begrenzt ist. Bei der *in situ*-Sanierung von mit Öl kontaminierten anoxischen Böden und Grundwasserleitern soll der Abbau des Öls durch Zugabe von Nitrat gefördert werden (Zeyer 1993). Es bleibt allerdings zu bedenken, daß nitratreduzierende Bakterien offenbar nur eine begrenzte Anzahl an Ölkomponenten verwerten können, und daß deshalb mit der Dosierung von dem im Grundwasser ebenfalls unerwünschten Nitrat überlegt umgegangen werden sollte.

E Zusammenfassung

1. Das marine sulfatreduzierende Bakterium *Desulfobacula toluolica* Stamm Tol2 oxidierte anaerob Toluol. Die Bildung von *p*-Methylbenzoat als Dead-End-Produkt aus *p*-Xylol in dichten Zellsuspensionen von Stamm Tol2 war spezifisch für den Toluolmetabolismus und war der erste Hinweis darauf, daß die Aktivierung von Toluol in Stamm Tol2 an der Methylgruppe erfolgte. Die Aktivierung von Toluol über eine Methylhydroxylierung zu Benzylalkohol erschien fraglich, da Benzylalkohol ein hoch spezifischer Inhibitor der anaeroben Toluoloxidation in Stamm Tol2 war. Da Substanzen, die wie z.B. 1-Phenylethanol dem Benzylalkohol strukturell ähnlich waren, keinen inhibitorischen Effekt auf die Toluoloxidation zeigten, war die Hemmwirkung von Benzylalkohol strikt an seine molekulare Struktur gebunden. Benzylalkohol hemmte die Verwertung von Toluol, nicht aber die von Benzaldehyd oder Benzoat. Deshalb war der physiologische Zielort von Benzylalkohol die Startreaktion der Toluoloxidation. Die Hemmung beruhte jedoch nicht auf einer negativen Feedback-Regulation der Toluolaktivierung, da Benzylalkohol in Zellsuspensionen selbst in sehr niedrigen, nicht inhibitorischen Konzentrationen nicht verwertet werden konnte. Demnach war Benzylalkohol kein freies Intermediat in der anaeroben Toluoloxidation von Stamm Tol2. Da in Ether-Extrakten von Toluol metabolisierenden Zellen von Stamm Tol2 Benzylsuccinat nachweisbar war, konnte die von einer anderen Arbeitsgruppe bei Denitrifizierern vermutete Aktivierung von Toluol durch oxidative Kondensation mit einem CoA-Thioester nicht ausgeschlossen werden. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese waren in Rohextrakten von Stamm Tol2 Proteine nachweisbar, die nur beim Wachstum auf Toluol gebildet wurden.
2. Aus Süßwasserstandorten wurden die 4 Alkylbenzol abbauenden nitratreduzierenden Stämme EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1 isoliert. Stamm EbN1 verwertete Ethylbenzol und Toluol, Stamm PbN1 verwertete Propylbenzol und Ethylbenzol, Stamm ToN1 verwertete Toluol und Stamm mXyN1 verwertete *m*-Xylol und Toluol. Die Bilanzierung des anaeroben Abbaus von Ethylbenzol in Stamm EbN1 zeigte eine vollständige Oxidation von Ethylbenzol zu CO₂. Während des Wachstums auf Ethylbenzol bzw. der Nitratreduktion schied Stamm EbN1 intermediär Nitrit in das Medium aus. Keiner dieser Stämme war in der Lage aerob auf einem der Alkylbenzole zu wachsen, während ihnen das fakultativ aerobe Wachstum auf etlichen polaren aromatischen Verbindungen möglich war.

3. Über die Sequenzierung der 16S rDNA ließen sich alle 4 nitratreduzierenden Neuisolate in die β -Gruppe der Proteobakterien einordnen. Innerhalb der β -Gruppe bildeten die Isolate eine phylogenetische Untergruppe mit *Thauera selenatis*, *Azoarcus* spp. und vor kurzem beschriebenen Toluol abbauenden nitratreduzierenden Bakterien.
4. Neben den Alkylbenzolen Ethylbenzol bzw. Propylbenzol verwerteten die nitratreduzierenden Stämme EbN1 bzw. PbN1 auch die sekundären Alkohole 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenyl-1-propanol und die Ketone Acetophenon bzw. Propiophenon. 2-Phenylethanol bzw. 3-Phenyl-1-propanol wurden dagegen nicht verwertet. Deshalb war als Startreaktion beim anaeroben Abbau von Ethylbenzol bzw. Propylbenzol eine Oxidation der Benzyl-Kohlenstoffatome der Ethyl- bzw. Propylseitenkette denkbar. Acetophenon und Propiophenon als Oxidationsprodukte könnten nach anschließender Carboxylierung zu β -Ketosäuren und Aktivierung zu den entsprechenden CoA-Estern unter Abspaltung von Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA in das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA überführt werden.
5. In Suspensionen von Zellen des Stamms EbN1, die auf Ethylbenzol gewachsen waren, wurde Toluol erst nach einer Lag-Phase von ca. 130 h verwertet. Demnach wurden Ethylbenzol und Toluol von unterschiedlichen Enzymsystemen aktiviert.
6. Alle 4 neuisolierten nitratreduzierenden Stämme, EbN1, PbN1, ToN1 und mXyN1, waren in der Lage, anaerob mit sterilem, sauerstofffreiem Rohöl als einzigem organischen Substrat zu wachsen. Das Wachstum auf Rohöl war genauso gut wie das auf definierten Alkylbenzolen. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysen zeigten, daß alle 4 Stämme selektiv Alkylbenzole aus dem Rohöl verwerteten. Dabei wurden die Alkylbenzole aus dem Rohöl abgebaut, die auch als definierte Substanzen in Substrattests verwertet wurden.
7. Aus der Wasserphase eines Rohöllagertanks wurden marine sulfatreduzierende Bakterien mit Rohöl als einzigem organischen Substrat angereichert (β 4-Anreicherung). Beim Wachstum auf Rohöl bildete die Anreicherung innerhalb von 6 Wochen bis zu 16 mM Sulfid. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysen zeigten eine selektive Verwertung von Toluol, *o*-Xylol, *m*-Xylol, *o*-Ethyltoluol, *m*-Ethyltoluol, *m*-Propyltoluol und *m*-Cymol. Die Anreicherung konnte demnach neben Toluol nur Alkylbenzole mit einer *o*- oder *m*-ständigen Methylgruppe verwerten. Ethylbenzol, *p*-Xylol und *p*-Ethyltoluol wurden nicht verwertet. Demnach könnte die H₂S-Bildung bei der Ölförderung durch Alkylbenzol verwertende Sulfatreduzierer verursacht werden.

8. Auf der Basis von bekannten 16S rRNA-Sequenzen sulfatreduzierender Bakterien wurde eine neue Oligonukleotidsonde (CoSRB-Sonde) entwickelt, die eine spezifische Erkennung der Familie der *Desulfobacteriaceae* in der δ -Gruppe der Proteobakterien erlaubt. Die meisten bekannten Arten und Gattungen dieser Familie sind vollständig oxidierende Sulfatreduzierer. Durch *in situ*-Hybridisierung fixierter Zellen aus der Anreicherung mit dieser fluoreszierenden Sonde konnte gezeigt werden, daß die Population zu mehr als 95 % aus Angehörigen der Familie der *Desulfobacteriaceae* und damit wahrscheinlich aus vollständig oxidierenden Sulfatreduzieren bestand. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die Anreicherung mit aromatischen Kohlenwasserstoffen des Erdöls wuchs, und daß alle bisher beschriebenen Reinkulturen von Aromaten abbauenden Sulfatreduzieren vollständige Oxidierer sind.

F Literaturverzeichnis

- Aeckersberg F** (1989) Anaerober Abbau von Alkanen durch sulfatreduzierende Bakterien. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg
- Aeckersberg F, Bak F, Widdel F** (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 156: 5-14
- Aeckersberg F** (1994) Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation. Universität Bremen, Bremen
- Altenschmidt U, Fuchs G** (1991) Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Archives of Microbiology* 156: 152-158
- Altenschmidt U, Fuchs G** (1992) Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Journal of Bacteriology* 174: 4860-4862
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA** (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1919-1925
- Amann RI, Stromley J, Devereux R, Key R, Stahl DA** (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 614-623
- Bache R, Pfennig N** (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Archives of Microbiology* 130: 255-261
- Bak F, Widdel F** (1986a) Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Archives of Microbiology* 146: 177-180
- Bak F, Widdel F** (1986b) Anaerobic degradation of indolic compounds by sulfate-reducing enrichment cultures, and description of *Desulfobacterium indolicum* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology* 146: 170-176
- Bak F, Behrendt HG, Kleinitz W** (1990) Bakterielle Korrosion in einer Rohölleitung. *Erdöl Erdgas Kohle* 106. Jahrg., Heft 3: 109-113
- 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. *Applied Geochemistry* 6: 1-15
- Bazylinski DA, Farrington JW, Jannasch HW** (1988) Hydrocarbons in surface sediments from a Guaymas Basin hydrothermal vent site. *Organic Geochemistry* 12: 547-558
- Beeder J, Nilsen RK, Rosnes JT, Torsvik T, Lien T** (1994) *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1227-1231

Beller HR, Reinhard M, Grbic-Galic D (1992) Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3192-3195

Blanc P, Connan J (1993) Crude oils in reservoirs: the factors influencing their composition, pp. 149-174. In Bordenave ML (ed), *Applied Petroleum Geochemistry*, Paris

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) *Elektrophoresis* 8: 93-99

Bossert ID, Whited G, Gibson DT, Young LY (1989) Anaerobic oxidation of *p*-cresol mediated by a partially purified methylhydroxylase from a denitrifying bacterium. *Journal of Bacteriology* 171: 2956-2962

Böger P (1975) Photosynthese in globaler Sicht. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 12: 429-435

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Braun K, Gibson DT (1984) Anaerobic degradation of 2-aminobenzoate (anthranilic acid) by denitrifying bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 48: 102-107

Bryant MP (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 25: 1324-1328

Butlin K (1953) The bacterial sulfur cycle. *Research* 6: 184-191

Canfield DE, Jørgensen BB, Fossing H, Glud R, Gundersen J, Ramsing NB, Thamdrup B, Hansen JW, Nielsen LP, Hall POJ (1993a) Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Marine Geology* 113: 27-40

Canfield DE (1993b) Organic matter oxidation in marine sediment, pp. 333-363. In Wollast R, Mackenzie FT, Chou L (eds), *Interactions of C, N, P and S Biogeochemical Cycles and Global Change*, vol. I 4. Springer-Verlag, Berlin

Canfield DE, Thamdrup B, Hansen JW (1993c) The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: Iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57: 3867-3883

Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry* 81: 461-466

Champion KM, Cook RJ, Tollaksen SL, Giometti CS (1994) Identification of a heritable deficiency of the folate-dependent enzyme 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 11338-11342

Cline JD (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14: 454-458

Cord-Ruwisch R, Garcia JL (1985) Isolation and characterization of an anaerobic benzoate-degrading spore-forming sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum sapomandens* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* 29: 325-330

- Cord-Ruwisch R, Kleinitz W, Widdel F** (1986a) Sulfatreduzierende Bakterien in einem Erdölfeld - Arten und Wachstumsbedingungen. Erdöl-Erdgas-Kohle 102. Jahrg., Heft 6: 281-289
- Cord-Ruwisch R, Widdel F** (1986b) Corroding iron as a hydrogen source for sulphate reduction in growing cultures of sulphate-reducing bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 25: 169-174
- Cord-Ruwisch R, Kleinitz W, Widdel F** (1987) Sulfate-reducing bacteria and their activity in oil production. Journal of Petroleum Technology January 1987: 97-106
- Corkery DM, O'Connor KE, Buckley CM, Dobson ADW** (1994) Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4. FEMS Microbiology Letters 124: 23-28
- Cozzarelli IM, Eganhouse RP, Baedeker MJ** (1990) Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic acids in anoxic groundwater environment. Environmental Geology and Water Science 16: 135-141
- Cozzarelli IM, Baedeker MJ, Eganhouse RP, Goerlitz DF** (1994) The geochemical evolution of low-molecular-weight organic acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater. Geochimica et Cosmochimica Acta 58: 863-877
- Dangel W, Brackmann R, Lack A, Mohamed M, Koch J, Oswald B, Seyfried B, Tschech A, Fuchs G** (1991) Differential expression of enzyme activities initiating anoxic metabolism of various aromatic compounds via benzoyl-CoA. Archives of Microbiology 155: 256-262
- Davis JB, Bray EE** (1969) Analyses of oil and cap rock from challenger (Sigsbee) Knoll, pp. 415-500, Initial reports of the deep sea drilling project, vol. 1. U.S. Government Printing Office, Washington
- Dean BJ** (1985) Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. Mutation Research 154: 153-181
- DeSoete G** (1983) A least square algorithm for fitting additive trees to proximity data. Psychometrika 48: 621-626
- Devereux R, He SH, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, LeGall J, Whitman WB** (1990) Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. Journal of Bacteriology 172: 3609-3619
- Devereux R, Kane MD, Winfrey J, Stahl DA** (1992) Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. Systematic and Applied Microbiology 15: 601-609
- Dolfing J, Zeyer J, Binder-Eicher P, Schwarzenbach RP** (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Archives of Microbiology 154: 336-341
- Donaldson EC, Knapp RM, Yen TF, Chilingarian GV** (1989) The subsurface environment, pp. 15-36. In Donaldson EC and Chilingarian GV (eds), Microbial Enhanced Oil Recovery. Elsevier, New York

- Edwards EA, Grbic-Galic D** (1992) Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2663-2666
- Ekzertsev VA** (1960) Production of methane by microorganisms in petroleum deposits. *Geochemistry* 4: 432-442
- Evans CW, Fuchs G** (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds, pp. 289-317. In Ornston LN (ed), *Annual Review of Microbiology*, vol. 42. Annual Reviews, Inc., Palo Alto
- Evans PJ, Mang DT, Kim KS, Young LY** (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1139-1145
- Evans PJ, Ling W, Goldschmidt B, Ritter ER, Young LY** (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 496-501
- Falbe J, Regitz M** (ed.). 1992. *Römpf Chemie Lexikon*, 9 ed, vol. 5. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Fishbein L** (1985) An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons II. Toluene. *The Science of the Total Environment* 42: 267-288
- Frey PA** (1990) Importance of organic radicals in enzymatic cleavage of unactivated C-H bonds. *Chemical Reviews* 90: 1343-1357
- Fries MR, Zhou J, Chee-Sanford J, Tiedje JM** (1994) Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2802-2810
- Fuchs G, Mohamed MES, Altenschmidt U, Koch J, Lack A, Brackmann R, Lochmeyer C, Oswald B** (1994) Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, pp. 513-553. In Ratledge C (ed), *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Ganahl P, Kleinitz W** (1983) Sulfatreduzierende Bakterien in der Rohölförderung. Auswirkung und betriebliche Maßnahmen. *Erdöl-Erdgas* 99. Jahrg., Heft 7-8: 241-251
- Gibson DT, Subramanian V** (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, pp. 181-252. In Gibson DT (ed), *Microbial degradation of aromatic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York
- Glöckler R, Tschech A, Fuchs G** (1989) Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species. *FEBS Letters* 251: 237-240
- Gorny N, Wahl G, Brune A, Schink B** (1992) A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Archives of Microbiology* 158: 48-53
- Gottschalk G** (1988) *Bacterial metabolism*, 2 ed. Springer-Verlag, Berlin

Görg A, Postel W, Günther S (1988) Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Elektrophoresis* 9: 531-546

Görg A (1991) Two-dimensional electrophoresis. *Nature* 349: 545-546

Grbic-Galic D (1986) Anaerobic production and transformation of aromatic hydrocarbons and substituted phenols by ferulic acid-degrading BESA-inhibited methanogenic consortia. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 161-169

Grbic-Galic D, Vogel TM (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 254-260

Grbic-Galic D (1990) Anaerobic microbial transformation of nonoxygenated aromatic and alicyclic compounds in soil, subsurface, and freshwater sediments, pp. 117-189. In Bollag JM and Stotzky G (eds), *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York

Gschwend P, Zafiriou OC, Gagosian RB (1980) Volatile organic compounds in seawater from the Peru upwelling region. *Limnology and Oceanography* 25: 1044-1053

Gschwend PM, Zafiriou OC, Mantoura RFC, Schwarzenbach RP, Gagosian RB (1982) Volatile organic compounds at a coastal site. 1. Seasonal variations. *Environmental Science and Technology* 16: 31-38

Gundlach ER, Boehm PD, Marchand M, Atlas RM, Ward DM, Wolfe DA (1983) The fate of Amoco Cadiz oil. *Science* 221: 122-129

Hamilton WA (1985) Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion, pp. 195-217, *Annual Review of Microbiology*, vol. 39. Annual Review Inc., Palo Alto

Hamilton WA, Moosavi AN, Pirrie RN (1988) Mechanism of anaerobic corrosion in the marine environment, pp. 13- 19. In Sequeira CAC and Tiller AK (eds), *Microbial Corrosion - 1*. Elsevier Science Publishers LTD, London

Harayama S, Kok M, Neidle EL (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46: 565-601

Hartgers WA, Sinnighe Damste JS, de Leeuw JW (1992) Identification of C₂-C₄ alkylated benzenes in flash pyrolysates of kerogens, coals and asphaltenes. *Journal of Chromatography* 606: 211-220

Hopper DJ (1976) The hydroxylation of *p*-cresol and its conversion to *p*-hydroxybenzaldehyde in *Pseudomonas putida*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 69: 462-468

Hopper DJ (1978) Incorporation of [¹⁸O]water in the formation of *p*-hydroxybenzyl alcohol by the *p*-cresol methylhydroxylase from *Pseudomonas putida*. *Biochemical Journal* 175: 345-347

Hopper DJ, Bossert ID, Rhodes-Roberts ME (1991) *p*-Cresol methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of *p*-cresol. *Journal of Bacteriology* 173: 1298-1301

Huber R, Stoffers P, Cheminee JL, Richnow HH, Stetter KO (1990) Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume or erupting MacDonald Seamount. *Nature* 345: 179-182

- Hunt JM** (1979) *Petroleum Geochemistry and Geology*. WH Freeman and Company, San Francisco
- Hutchins SR, Sewell GW, Kovacs DA, Smith GA** (1991) Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science and Technology* 25: 68-76
- Janssen PH, Schink B** (1995a) Catabolic and anabolic enzyme activities and energetics of acetone metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfococcus biactus*. *Journal of Bacteriology* 177: 277-282
- Janssen PH, Schink B** (1995b) Metabolic pathways and energetics of the acetone-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfobacterium cetonicum*. *Archives of Microbiology* 163: 188-194
- Janssen PH, Schink B** (1995c) $^{14}\text{CO}_2$ exchange with acetoacetate catalyzed by dialyzed cell-free extracts of the bacterial strain BunN grown with acetone and nitrate. *European Journal of Biochemistry* 228: 677-682
- Jobson AM, Westlake DWS** (1979) Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chemical Geology* 24: 355-365
- Jørgensen BB** (1977) The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnology and Oceanography* 22: 814-832
- Jørgensen BB** (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulphate reduction. *Nature* 296: 643-645
- Jørgensen BB, Sørensen J** (1985) Seasonal cycles of O_2 , NO_3^- and SO_4^{2-} reduction in estuarine sediments: the significance of a NO_3^- reduction maximum in spring. *Marine Ecology Progress Series* 24: 65-74
- Jüttner J, Henatsch JJ** (1986) Anoxic hypolimnion is a significant source of biogenic toluene. *Nature* 323: 797-798
- Jukes TH, Cantor CR** (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York London, pp. 21-132
- Kleinitz W, Bak F** (1991) Sulfatreduzierende Bakterien in Erdölförderbetrieben. *Erdöl, Erdgas, Kohle* 107. Jahrg.: 507-511
- Koch R, Wagner BO** (1989) *Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Koch J, Fuchs G** (1992) Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *European Journal of Biochemistry* 205: 195-202
- Koch J, Eisenreich W, Bacher A, Fuchs G** (1993) Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *European Journal of Biochemistry* 211: 649-661
- Kochi JK, Tang RT, Bernath T** (1973) Mechanism of aromatic substitution. Role of cation-radicals in the oxidative substitution of arenes by cobalt(III). *Journal of the American Chemical Society* 95: 7114-7123

- Kuever J, Kulmer J, Jannsen S, Fischer U, Blotevogel KH** (1993) Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol. *Archives of Microbiology* 159: 282-288
- Kuhn EP, Zeyer J, Eicher P, Schwarzenbach RP** (1988) Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 490-496
- Lack A, Fuchs G** (1992) Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *Journal of Bacteriology* 174: 3629-3636
- Lack A, Fuchs G** (1994) Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Archives of Microbiology* 161: 132-139
- Larsen N, Olsen GJ, Maidak BL, McCaughey MJ, Overbeck R, Macke TJ, Marsh TL, Woese CR** (1993) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* 21(Suppl): 3021-3023
- Lochmeyer C, Koch J, Fuchs G** (1992) Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *Journal of Bacteriology* 174: 3621-3628
- Lonneman WA, Seila RL, Bufalini JJ** (1978) Ambient air hydrocarbons in Florida. *Environmental Science and Technology* 12: 459-463
- Lovley DR, Lonergan DJ** (1990) Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1858-1864
- Lovley DR** (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* 55: 259-287
- Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJP, Gorby YA, Goodwin S** (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* 159: 336-344
- Lovley DR, Woodward JC, Chapelle FH** (1994) Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature* 370: 128-131
- Lovley DR, Coates JD, Woodward JC, Phillips EJP** (1995) Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 953-958
- Macy JM, Rech S, Auling G, Dorsch M, Stackebrandt E, Sly LI** (1993) *Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a member of the beta subclass of Proteobacteria with a novel type of anaerobic respiration. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 135-142
- Mantoura RFC, Gschwend PM, Zafiriou OC, Clarke KR** (1982) Volatile organic compounds at a coastal site. 2. Short-term variations. *Environmental Science and Technology* 16: 38-45
- March J** (1985) *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure*, 3 ed. John Wiley & Sons, New York

Marr IL, Cresser MS, Ottendorfer LJ (1988) Umweltanalytik. Eine allgemeine Einführung. Thieme Verlag, Stuttgart

Means JL, Hubbard N (1987) Short-chain aliphatic acid anions in deep subsurface brines: a review of their origin, occurrence, properties, and importance and new data on their distribution and geochemical implication in the Palo Duro Basin, Texas. *Organic Geochemistry* 3: 177-191

Mohamed MES, Seyfried B, Tschsch A, Fuchs G (1993) Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. Evidence for an α -oxidation mechanism. *Archives of Microbiology* 159: 563-573

Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB (1989) Precise measurement of G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 159-167

Morrison RT, Boyd RN (1986) Lehrbuch der Organischen Chemie, 3 ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Muller FM (1957) On methane fermentation of higher alkanes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 23: 369-384

Nazina TN, Rozanova EP, Kuznetsov SI (1985) Microbial oil transformation processes accompanied by methane and hydrogen-sulfide formation. *Geomicrobiology Journal* 4: 103-130

Nelson PF, Quigley SM (1982) Non-methane hydrocarbons in the atmosphere of Sydney, Australia. *Environmental Science and Technology* 16: 650-655

Nielsen H, Pilot J, Grinenko LN, Grinenko VA, Lein AY, Smith JW, Pankina RG (1991) Lithospheric sources of sulphur, pp. 65-132. In Krouse HR and Grinenko VA (eds), *Stable Isotopes: Natural and Anthropogenic Sulphur in the Environment*, vol. 43. John Wiley & Sons, New York

O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250: 4007-4021

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142

Odom JM (1993) Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria, pp. 189-210. In Odom JM and Singleton RJ (eds), *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*. Springer-Verlag, New York

Orr W (1974) Changes in sulfur content and isotopic ratios of sulfur during petroleum maturation - study on Big Horn basin Paleozoic oils. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* 58: 2295-2318

Parks J, Maxwell J (1993) Some like it hot (and oily). *Nature* 365: 694-695

Perrotta JA, Harwood CS (1994) Anaerobic metabolism of cyclohex-1-ene-1-carboxylate, a proposed intermediate of benzoate degradation, by *Rhodospseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1775-1782

- Pfennig N** (1978) *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B₁₂-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28: 283-288
- Pini A** (1992) Bakterieller Abbau von Xanthan unter strikt anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- Platen H, Schink B** (1989) Anaerobic degradation of acetone and higher ketones via carboxylation by newly isolated denitrifying bacteria. *Journal of General Microbiology* 135: 883-891
- Postgate JR** (1984) The sulphate-reducing bacteria. Cambridge University Press, Cambridge
- Pye VI, Patrick R** (1983) Ground water contamination in the United States. *Science* 221: 713-718
- Rabus R** (1992) Physiologie und Biochemie des anaeroben Abbaus von Toluol durch sulfatreduzierende Bakterien. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität München, München
- Rabus R, Nordhaus R, Ludwig W, Widdel F** (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1444-1451
- Rabus R, Widdel F** (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 163: 96-103
- Radke M, Willsch H, Welte DH** (1980) Preparative hydrocarbon group type determination by automated medium pressure liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 52: 406-411
- Rainey FA, Dorsch M, Morgan HW, Stackebrandt E** (1992) 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: position and implications for the systematics of the order *Spirochaetales*. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 224-226
- Ramsing NB, Kühl M, Jørgensen BB** (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3840-3849
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K, De Ley J** (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 574-584
- Rosnes JT, Graue A, Lien T** (1991a) Activity of sulfate-reducing bacteria under simulated reservoir conditions. *SPE Production Engineering* May 1991: 217-220
- Rosnes JT, Torsvik T, Lien T** (1991b) Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2302-2307
- Rožanova EP, Nazina TN** (1982) Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil pools. Translated from *Mikrobiologiya* 51: 342-348

Ruckmick JC, Wimberly BH, Edwards AF (1979) Classification and genesis of biogenic sulfur deposits. *Economic Geology* 74: 469-474

Rudolphi A, Tschech A, Fuchs G (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 155: 238-248

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

Sauer TCJ (1980) Volatile liquid hydrocarbons in waters of the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Limnology and Oceanography* 25(2): 338-351

Schidlowski M, Hayes JM, Kaplan IR (1983) Isotopic inferences of ancient biochemistries: carbon, sulfur, hydrogen, and nitrogen, pp. 149-186. In Schopf JW (ed), *Earth's Earliest Biosphere*. Princeton University Press, Princeton

Schink B, Stieb M (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, Gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1905-1913

Schink B, Brune A, Schnell S (1992) Anaerobic degradation of aromatic compounds, pp. 219-242. In Winkelmann G (ed), *Microbial Degradation of Natural Products*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Schink B (1992) The genus *Pelobacter*, pp. 3393-3399. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), *The Prokaryotes*, 2 ed, vol. 4. Springer-Verlag, New York

Schlesener CJ, Amatore C, Kochi JK (1984) Kinetics and mechanism of aromatic oxidative substitutions via electron transfer. Application of Marcus theory to organic processes in the endergonic region. *Journal of the American Chemical Society* 106: 3567-3577

Schnell S, Bak F, Pfennig N (1989) Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Archives of Microbiology* 152: 556-563

Schnell S, Schink B (1991) Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. *Archives of Microbiology* 155: 183-190

Schocher RJ, Seyfried B, Vazquez F, Zeyer J (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 157: 7-12

Scott PJB, Davies M (1993) Souring of new Irian Jaya wells traced to indigenous bacteria. *Oil and Gas Journal* June 14: 47-50

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

Shelton TB, Hunter JH (1975) Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. *Journal WPCF* 47: 2256-2270

Simoneit BRT, Lonsdale PF (1982) Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295: 198-202

- Smith MR, Ratledge C** (1989) Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 68-75
- Smith MR** (1994) The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria, pp. 347-378. In Ratledge C (ed), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Smolenski WJ, Suflita JM** (1987) Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 710-716
- Stetter KO, Huber R, Blöchl E, Kurr M, Eden RD, Fielder M, Cash H, Vance I** (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature* 365: 743-745
- Sykes P** (1988) *Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie. Eine Einführung*, 9 ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Synowietz C** (1983) *Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Vol. 2, Organische Verbindungen*. Springer Verlag, Berlin
- Szwezyk R, Pfennig N** (1987) Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov. *Archives of Microbiology* 147: 163-168
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41: 100-180
- Thode HG, Wanless KK, Wallough R** (1954) The origin of native sulfur deposits from isotopic fractionation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 5: 286-298
- Tiedje JM** (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, pp. 179-244. In Zehnder AJB (ed), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York
- Tiller AK** (1988) The impact of microbially induced corrosion on engineering alloys, pp. 3-9. In Sequeira CAC and Tiller AK (eds), *Microbial Corrosion 1*. Elsevier Applied Science, London
- Tissot BP, Welte DH** (1984a) Petroleum alteration, pp. 459-469, *Petroleum Formation and Occurrence*, 2 ed. Springer-Verlag, New York
- Tissot BP, Welte DH** (1984b) Composition of crude oils, pp. 375-414, *Petroleum Formation and Occurrence*, 2 ed. Springer-Verlag, New York
- Travin D, Buswell AM** (1934) The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *Journal of the American Chemical Society* 56: 1751-1755
- Tschech A, Fuchs G** (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Archives of Microbiology* 148: 213-217
- Tschech A, Fuchs G** (1989) Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Archives of Microbiology* 152: 594-599

US Environmental Protection Agency (1986) Underground motor fuel storage tanks: a national survey. Publication NTIS PB 86-216512. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Utkin I, Yakimov MM, Matveeva LN, Kozlyak EI, Rogozhin IS, Solomon ZG, Bezborodov AM (1991) Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS Microbiology Letters* 77: 237-242

Vanlooke R, De Borger R, Voets JP, Verstraete W (1975) Soil and groundwater contamination by oil spills; problems and remedies. *International Journal of Environmental Studies* 8: 99-111

Vogel TM, Grbic-Galic D (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 200-202

Voordouw G, Niviere V, Ferris FG, Fedorak PM, Westlake DWS (1990) Distribution of hydrogenase genes in *Desulfovibrio* spp. and their use in identification of species from the oil field environment. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3748-3754

Voordouw G, Voordouw JK, Karkhoff-Schweitzer RR, Fedorak PM (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. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3070-3078

Voordouw G, Voordouw JK, Jack TR, Foght J, Fedorak PM, Westlake DWS (1992) Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3542-3552

Voordouw G, Shen Y, Harrington CS, Telang AJ, Jack TR, Westlake DWS (1993) Quantitative reverse sample genome probing of microbial communities and its application to oil field production waters. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4101-4114

Widdel F (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfatreduzierender Bakterien. Dissertation. Universität Göttingen, Göttingen

Widdel F (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria, pp. 469-585. In Zehnder AJB (ed), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York

Widdel F (1990) Microbial corrosion, pp. 277-318. In Präve P, Schlingmann M, Crueger W, Esser K, Thauer R, Wagner F (ed.), *Jahrbuch Biotechnologie*, vol. 3. Carl Hanser Verlag, München

Widdel F, Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, pp. 3352-2278. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), *The Prokaryotes*, 2 ed, vol. 4. Springer-Verlag, New York

Widdel F, Pfennig N (1992) The genus *Desulfuromonas* and other gram-negative sulfur-reducing eubacteria, pp. 3379-3392. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), *The Prokaryotes*, 2 ed, vol. 4. Springer-Verlag, New York

Wilson BH, Wilson JT, Kampbell DH, Bledsoe BE, Armstrong JM (1990) Biotransformation of monoaromatic and chlorinated hydrocarbons at an aviation gasoline spill site. *Geomicrobiology Journal* 8: 225-240

Zehnder AJB, Stumm W (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats, pp. 1-38. In Zehnder AJB (ed), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York

Zeyer J, Kuhn EP, Schwarzenbach RP (1986) Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 944-947

Zeyer J (1993) Biologische Sanierung - Illusionen und Realitäten. *Spektrum der Wissenschaft* Oktober 1993: 90-93

ZoBell CE, Prokop JF (1966) Microbial oxidation of mineral oils in Barataria Bay bottom deposits. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 6: 143-162

Zumpft WG (1992) The denitrifying prokaryotes, pp. 554-582. In Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds), *The Prokaryotes*, 2 ed, vol. 1. Springer-Verlag, New York

G Anhang

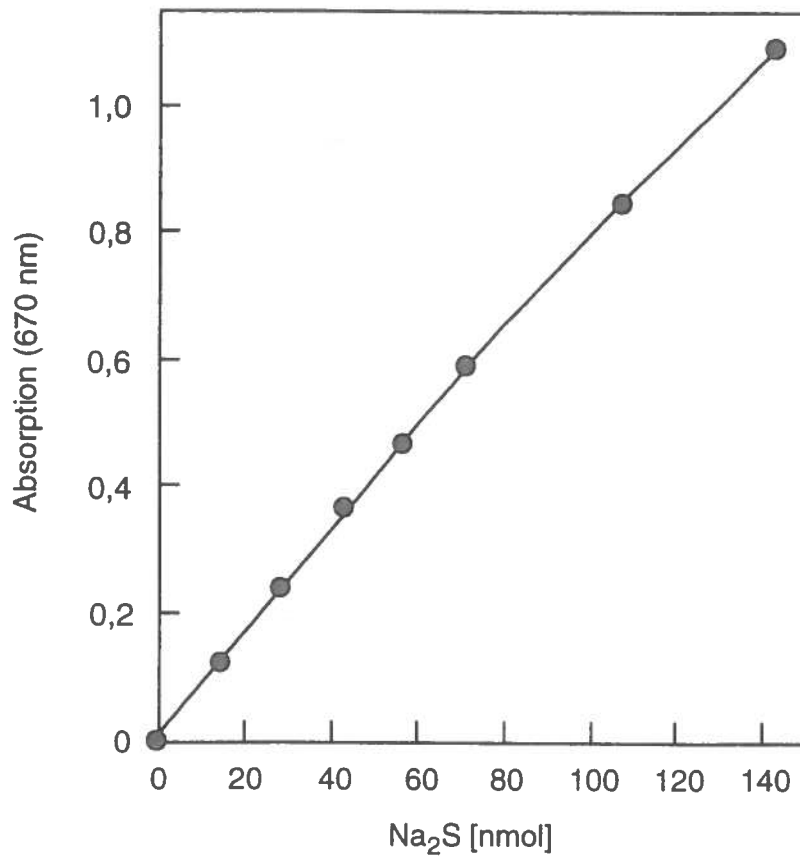


Abb. 1: Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung von Sulfid nach der Methylenblau-Bildungsreaktion (B. 3.2.). Die Bestimmung von Sulfid wurde in einem Testvolumen von 4 ml durchgeführt. Als Eichlösung wurde eine 7,16 mM Na₂S-Lösung verwendet. Die Absorption wurde bei 670 nm gemessen. Die für die Eichgerade verwendeten Absorptionswerte wurden durch Mittelung von 2 Meßwerten gebildet.

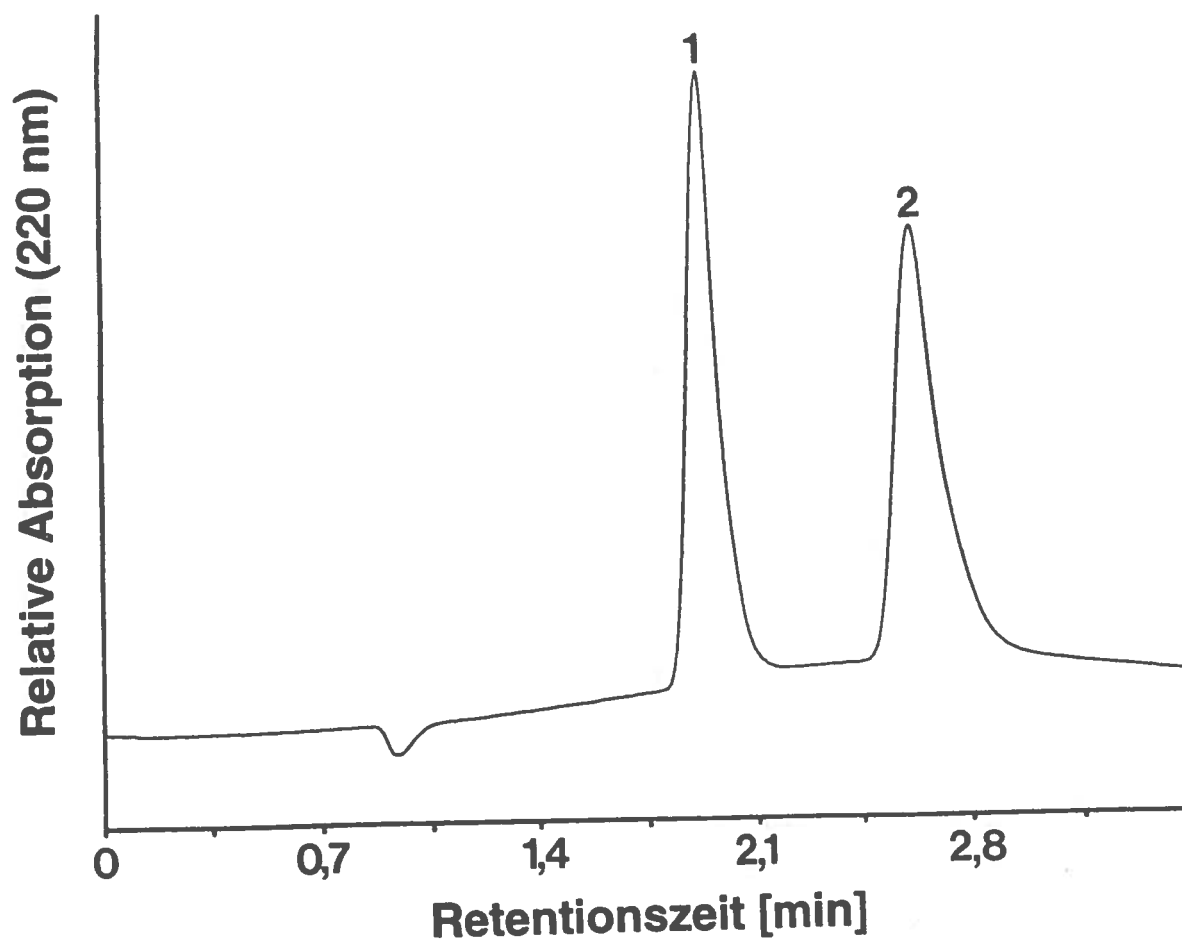


Abb. 2: Ionenchromatographische Trennung von Nitrat und Nitrit. Mit 70 mM NaCl in bidest. H₂O als Laufmittel, einer Flußrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 65 °C eluierten Nitrit (1) nach 1,8 min und Nitrat (2) nach 2,5 min von der A09 Mikro-Anionenaustauschersäule. Die Detektion erfolgte bei 220 nm an einem UV-Photometer. Eichgeraden für die Bestimmung von Nitrat und Nitrit sind in Abb. 3 des Anhangs dargestellt.

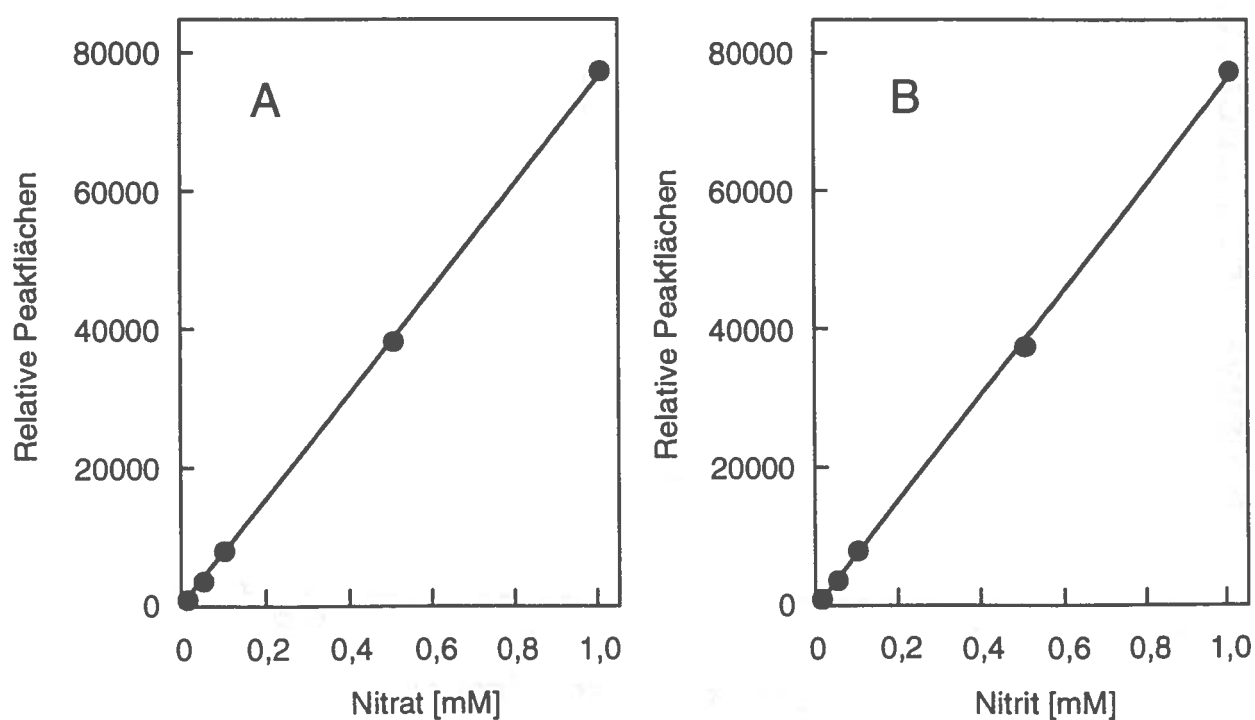


Abb. 3: Eichgeraden zur ionenchromatographischen Bestimmung von Nitrat und Nitrit (B. 3.3.). Als Standard wurden Verdünnungen einer Lösung von 10 mM KNO_3 und 10 mM KNO_2 als Gemisch in bidest. H_2O verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 30 μl . Die Eichung von Nitrat (A) und Nitrit (B) wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1,0 mM durchgeführt.

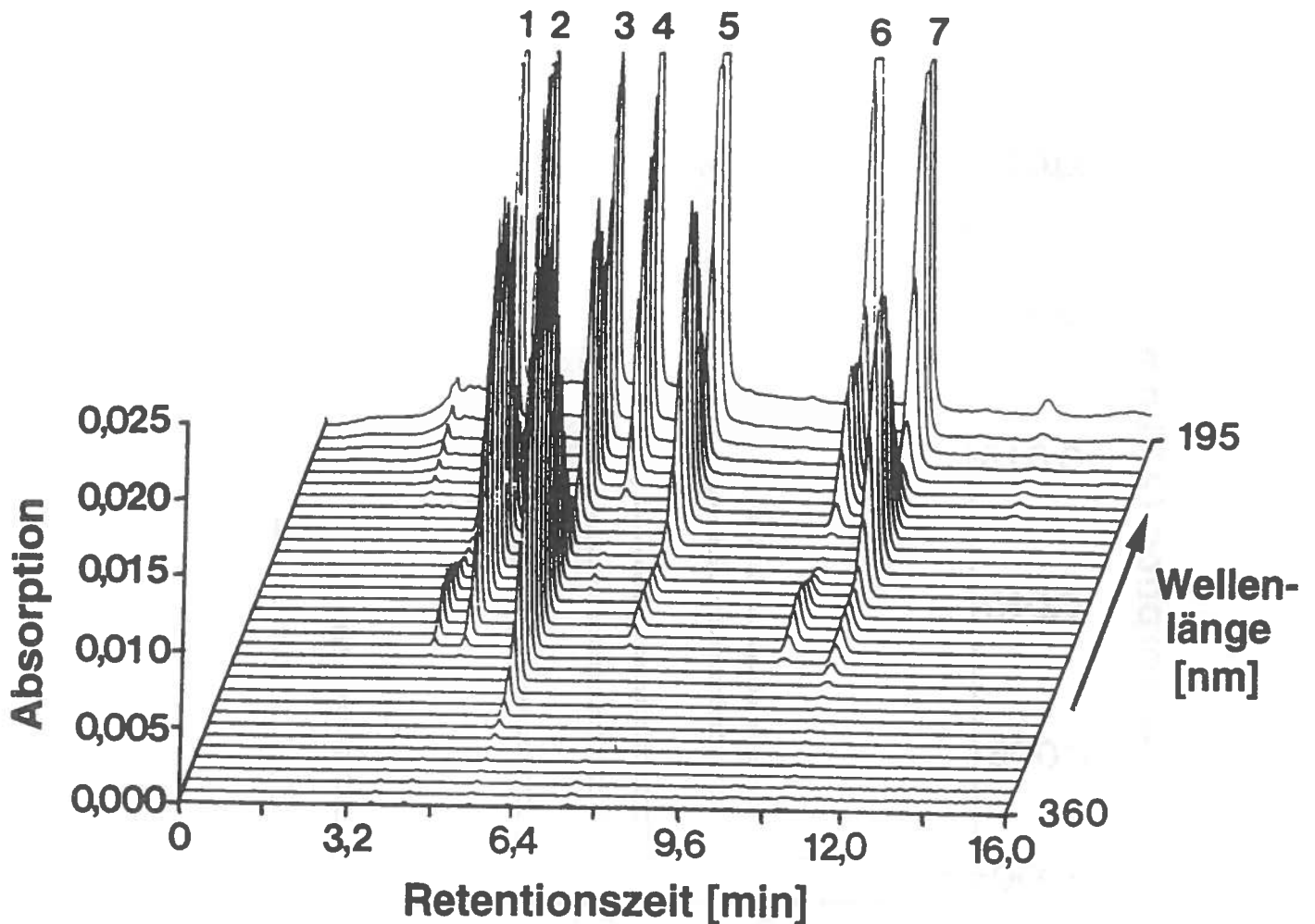


Abb. 4: HPLC-Trennung von polaren aromatischen Verbindungen bei gleichzeitiger Erfassung der UV-Spektren. Die Trennung erfolgte an einer C_{18} -Säule (Säulentemperatur $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) mit einem Laufmittelgemisch aus 35 % Acetonitril und $0,75\text{ mM H}_3\text{PO}_4$ in bidest. H_2O und bei einer Flußrate von 1 ml/min . Die Detektion wurde über einen Wellenlängenbereich von 195 bis 360 nm an einem Hochgeschwindigkeits-Vielkanal-UV/VIS-Detektor durchgeführt. Das Chromatogramm zeigt die Trennung folgender polarer aromatischer Verbindungen: *p*-OH-Benzylalkohol (1), *p*-OH-Benzoat (2), *p*-OH-Benzaldehyd (3), Benzylalkohol (4), Benzoat (5), *p*-Cresol (6), Benzaldehyd (7). Das für die Quantifizierung benutzte Chromatogramm mit einer festen UV-Detektion bei 210 nm ist in Abb. 5 des Anhangs dargestellt.

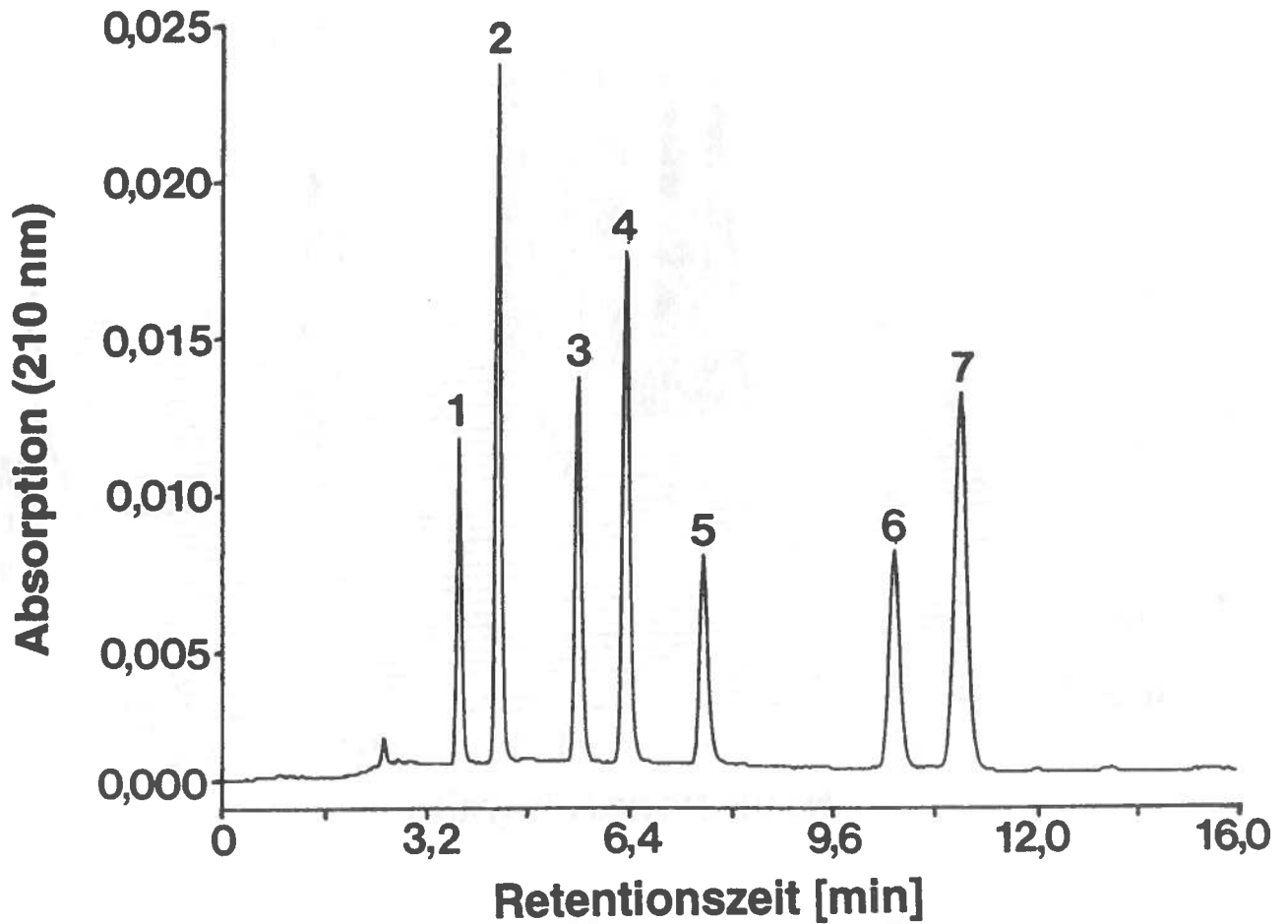


Abb. 5: HPLC-Trennung von polaren aromatischen Verbindungen. Die Abbildung zeigt die zuvor (G. Abb. 4) dargestellte Trennung nunmehr mit einer UV-Detektion bei einer festen Wellenlänge von 210 nm. Folgende polare aromatische Verbindungen wurden getrennt: (1) *p*-OH-Benzylalkohol (3,7 min), (2) *p*-OH-Benzoat (4,3 min), (3) *p*-OH-Benzaldehyd (5,6 min), (4) Benzylalkohol (6,4 min), (5) Benzoat (7,5 min), (6) *p*-Cresol (10,6 min), (7) Benzaldehyd (11,6 min).

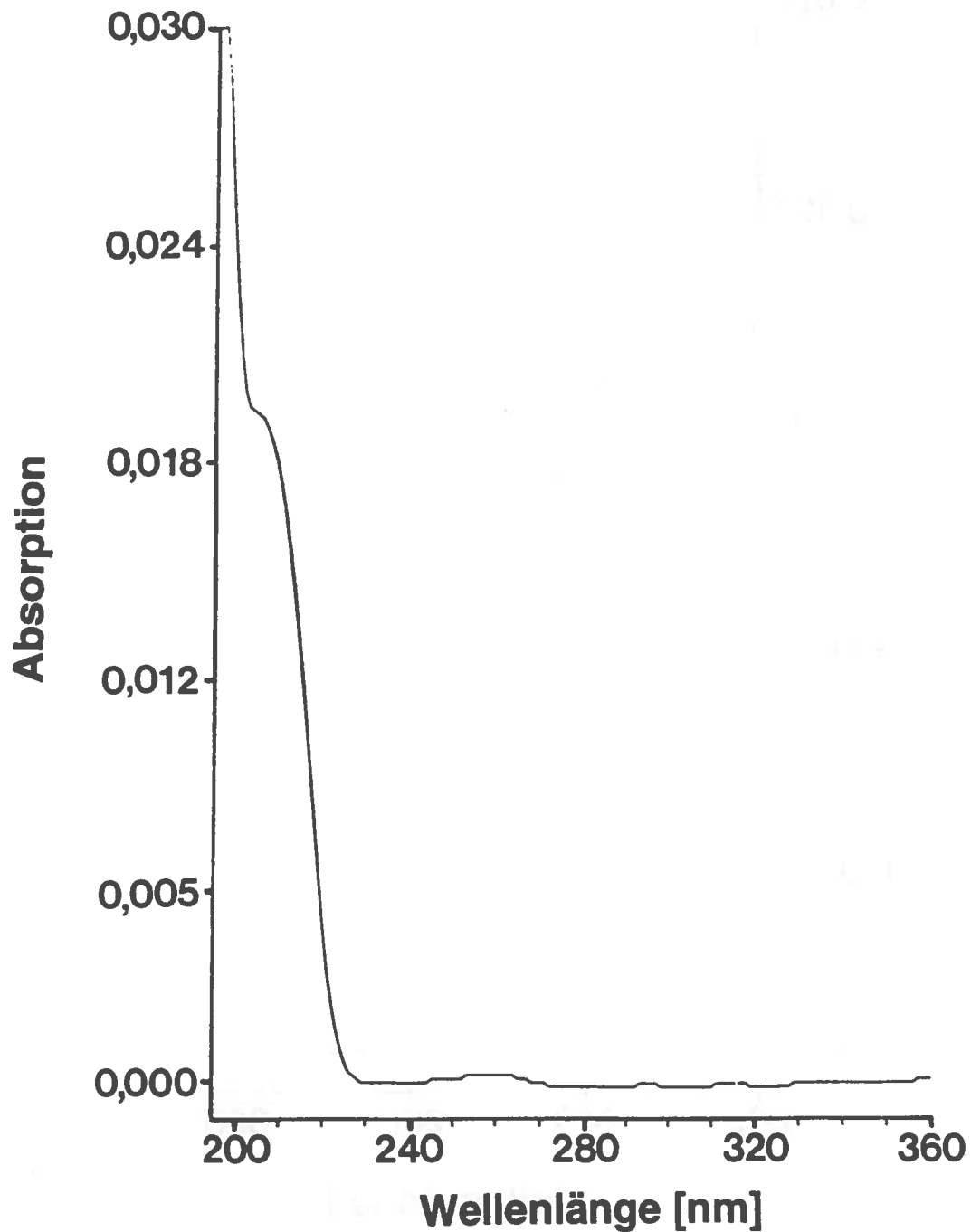


Abb. 6: Absorptionsspektrum von Benzylalkohol nach HPLC-Trennung (B. 3.6., G. Abb. 5). Benzylalkohol (20 μM) wurde in einem Gemisch aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 mit einem Injektionsvolumen von 20 μl auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 6,4 min.

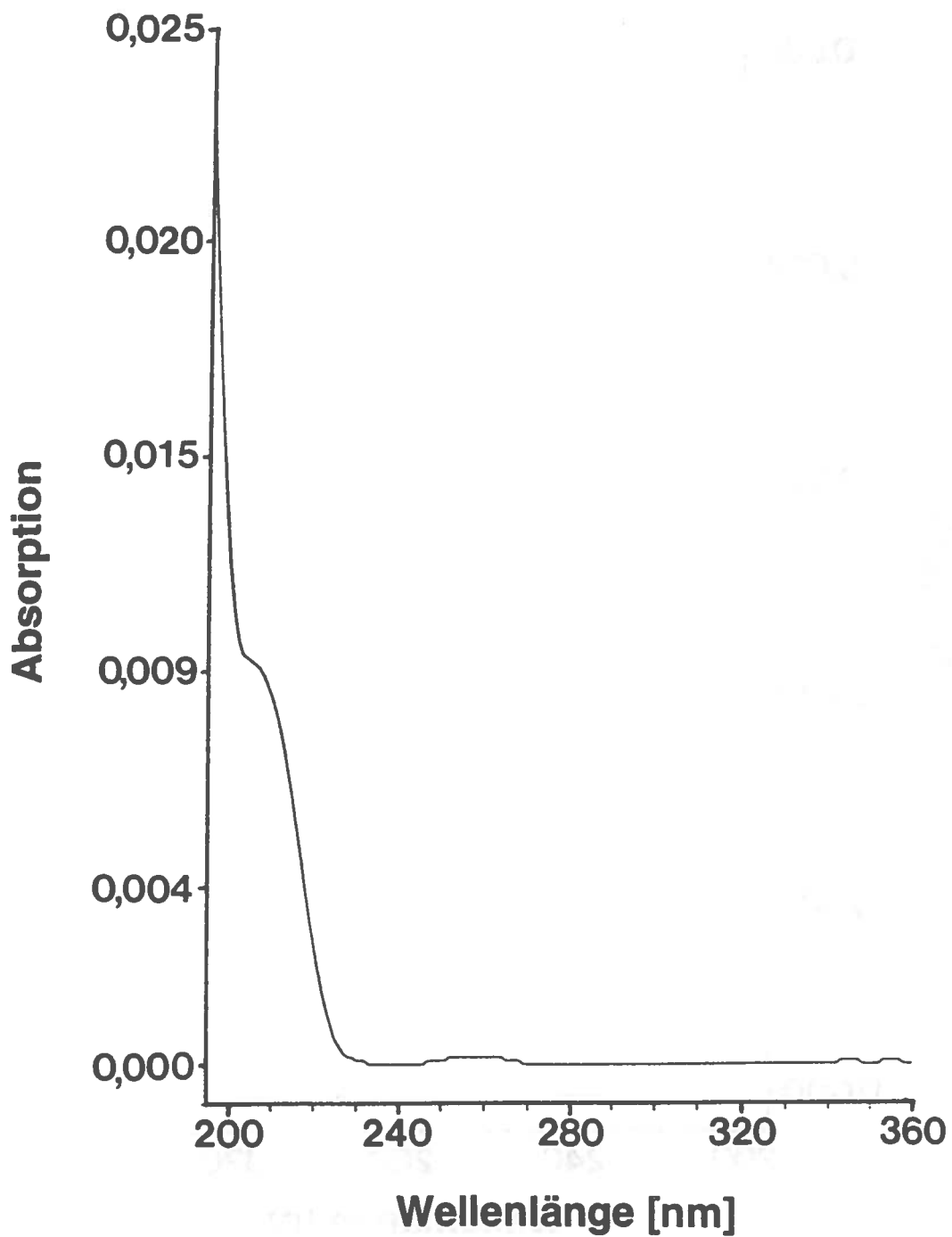


Abb. 7: Absorptionsspektrum von Benzylsuccinat nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). Benzylsuccinat (20 μM) wurde in einem Gemisch aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 mit einem Injektionsvolumen von 20 μl auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 6,7 min.

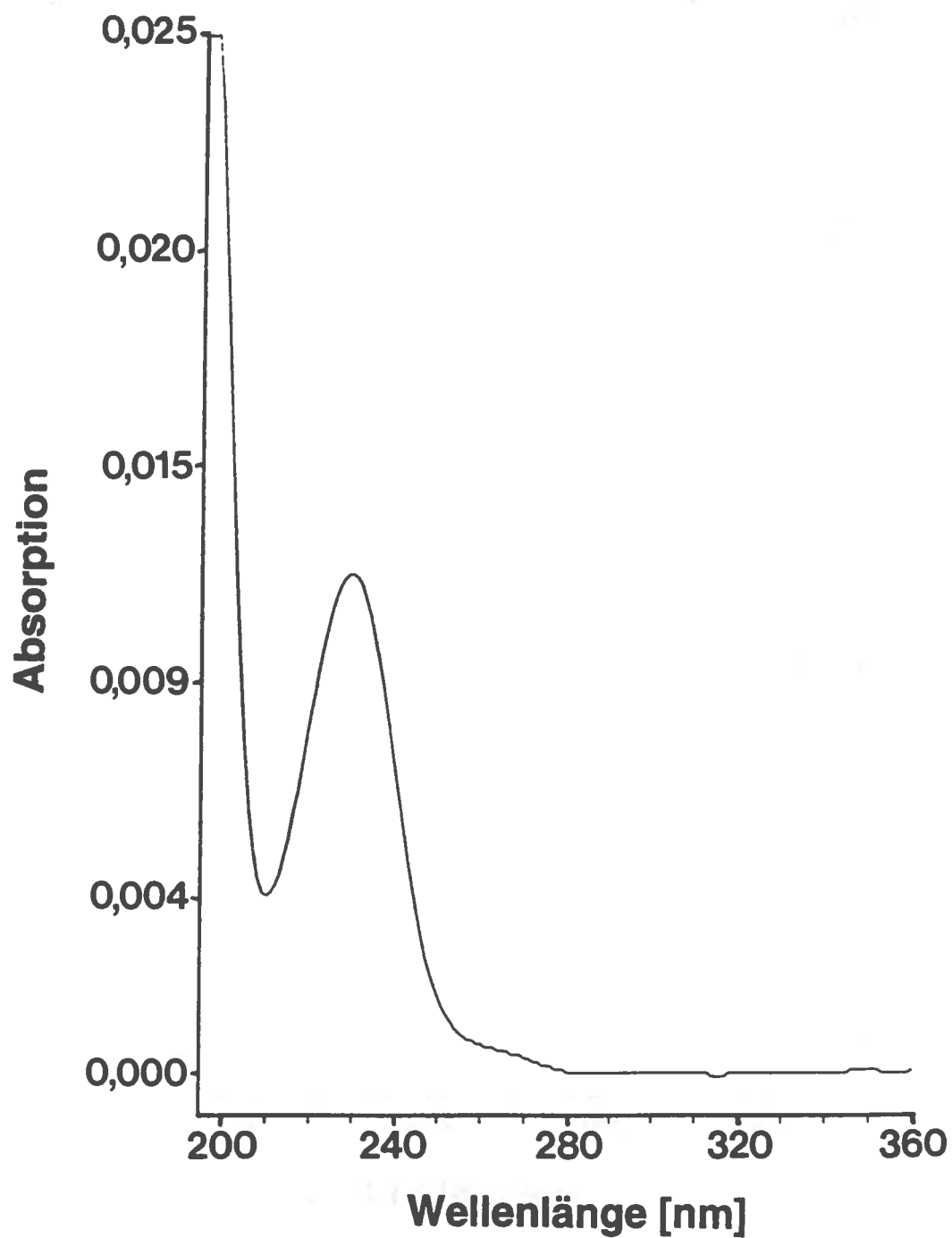


Abb. 8: Absorptionsspektrum von *p*-Fluorbenzoat nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). *p*-Fluorbenzoat (20 μ M) wurde in einem Gemisch aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 mit einem Injektionsvolumen von 20 μ l auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 8,5 min.

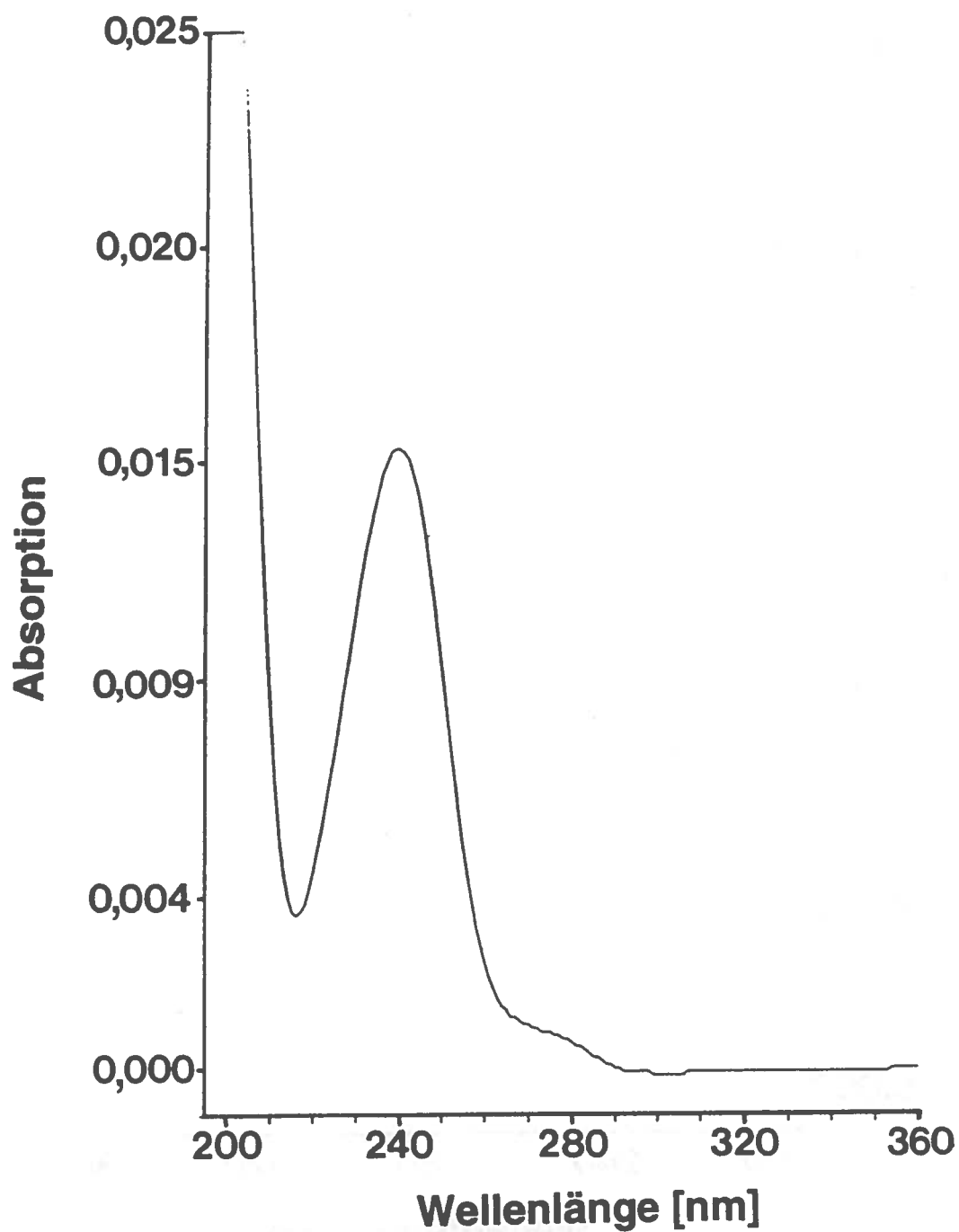


Abb. 9: Absorptionsspektrum von *p*-Methylbenzoat nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). *p*-Methylbenzoat (20 μ M) wurde in einem Gemisch aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 mit einem Injektionsvolumen von 20 μ l auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 11,0 min.

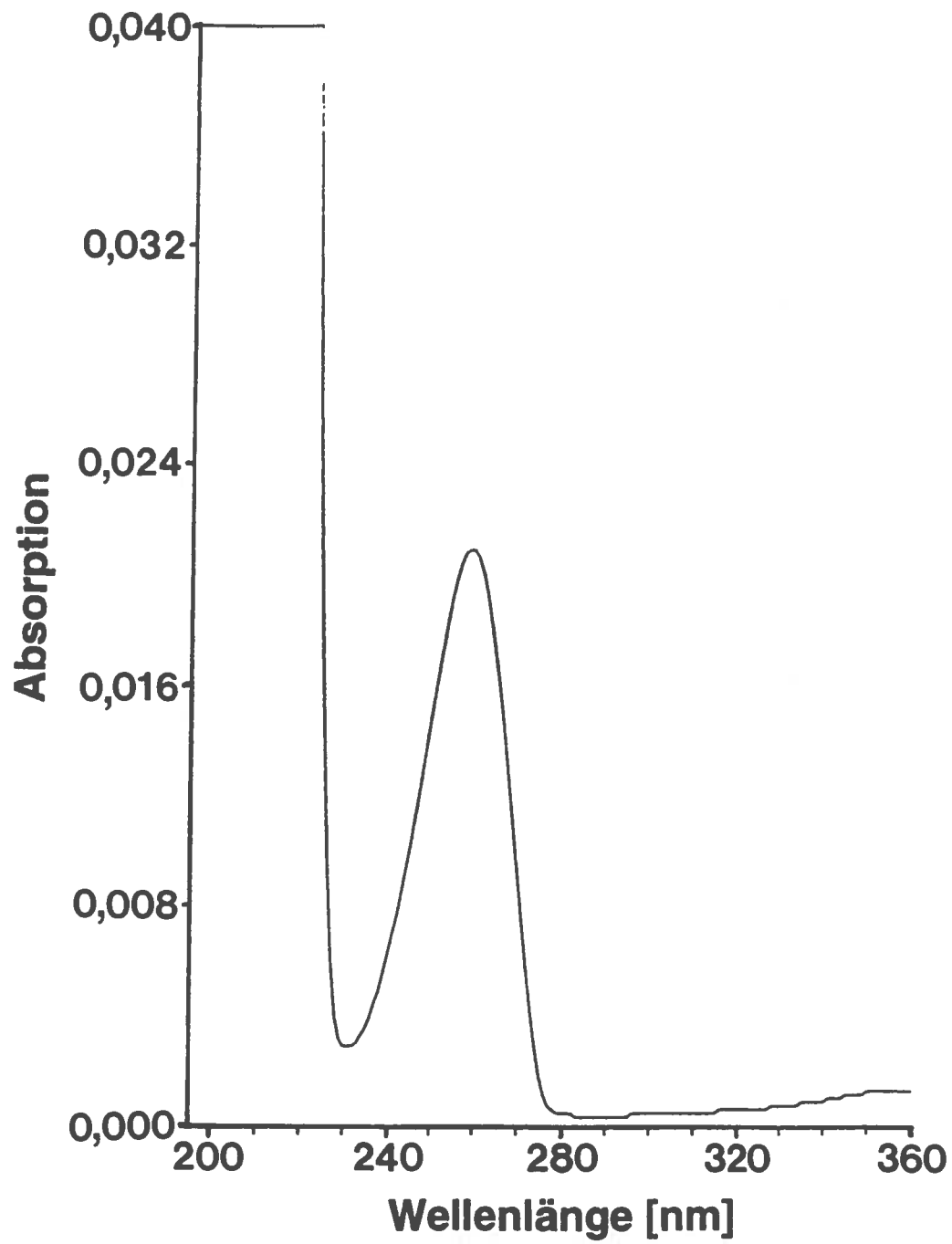


Abb. 10: Absorptionsspektrum von Ethylbenzol nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). Ethylbenzol (50 μM) wurde in 80 % Acetonitril mit einem Injektionsvolumen von 20 μl auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 80 % Acetonitril in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 5,8 min.

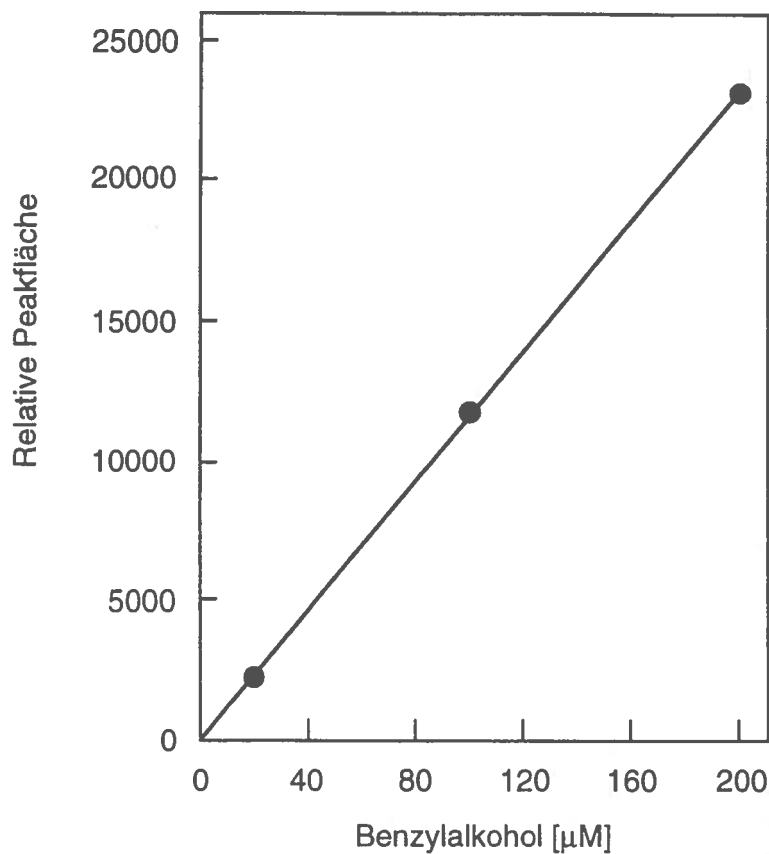


Abb. 11: Eichgerade zur Bestimmung von Benzylalcohol nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). Verdünnungen von Benzylalcohol (20-200 μM) in einem Gemisch aus 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 wurden mit einem Injektionsvolumen von 50 μl auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 6,4 min. Die dargestellten Datenpunkte entstanden durch Mittelung von jeweils 2 Meßwerten.

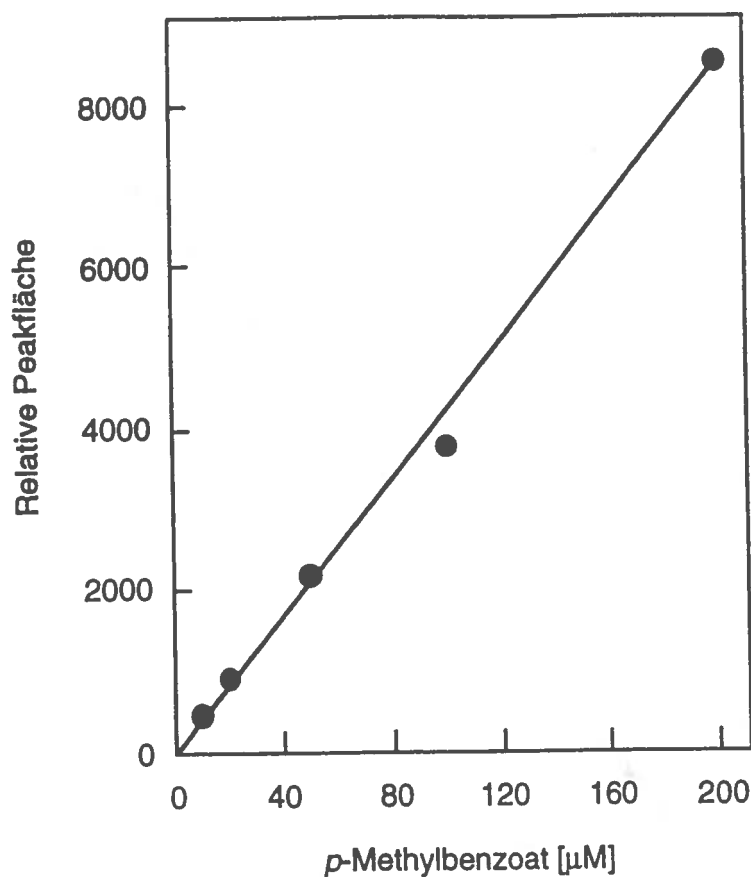


Abb. 12: Eichgerade zur Bestimmung von *p*-Methylbenzoat nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). Da *p*-Methylbenzoat in der Probenmatrix trotz Ansäuerung mit etwas kürzerer Retentionszeit eluierte als gelöst im Laufmittel (10,6 statt 11,0 min) wurde die Eichgerade in der Probenmatrix erstellt. Dazu wurden Verdünnungen von *p*-Methylbenzoat (10-200 µM) in einem Gemisch aus 45 mM H₃PO₄, 35 % (v/v) Acetonitril und 1:2 verdünnten, zellfreien Überständen von toluoloxidierenden Zellsuspensionen hergestellt. Der verwendete Überstand war frei von *p*-Methylbenzoat und hatte eine ausreichend saubere Basislinie (C. I. 4. Abb. B). Das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die dargestellten Datenpunkte entstanden durch Mittelung von jeweils 2 Meßwerten.

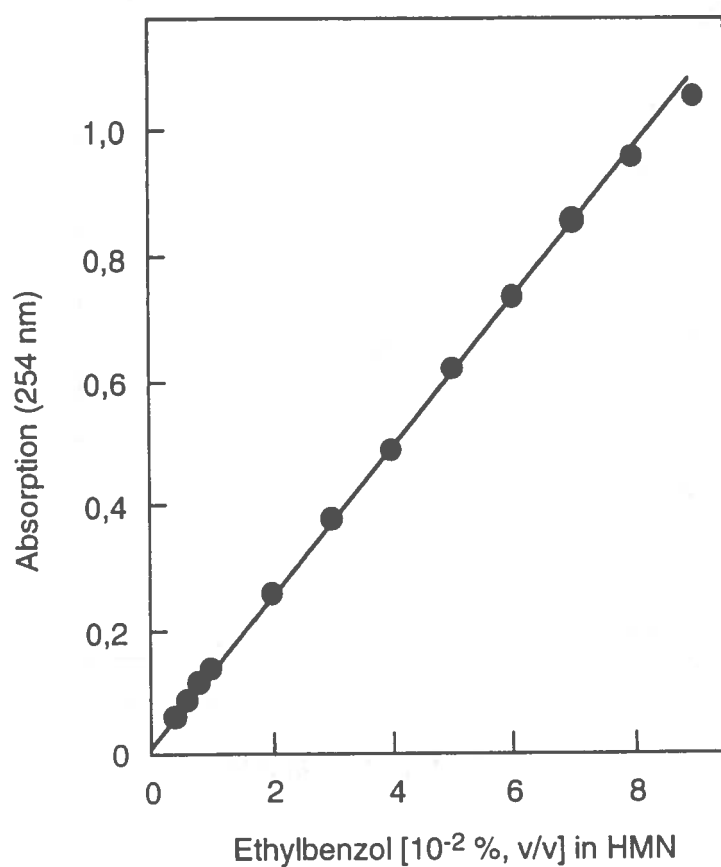


Abb. 13: Eichgerade zur Bestimmung von Ethylbenzol in der hydrophoben Trägerphase aus Heptamethylnonan (B. 3.7.). Definierte Verdünnungen ($0,1-10 \times 10^{-2}$ %, v/v) von Ethylbenzol in Heptamethylnonan wurden direkt in Quarzküvetten hergestellt. Die Absorption von Ethylbenzol wurde bei 254 nm gemessen. Die dargestellten Datenpunkte entstanden durch Mittelung von jeweils 2 Meßwerten.

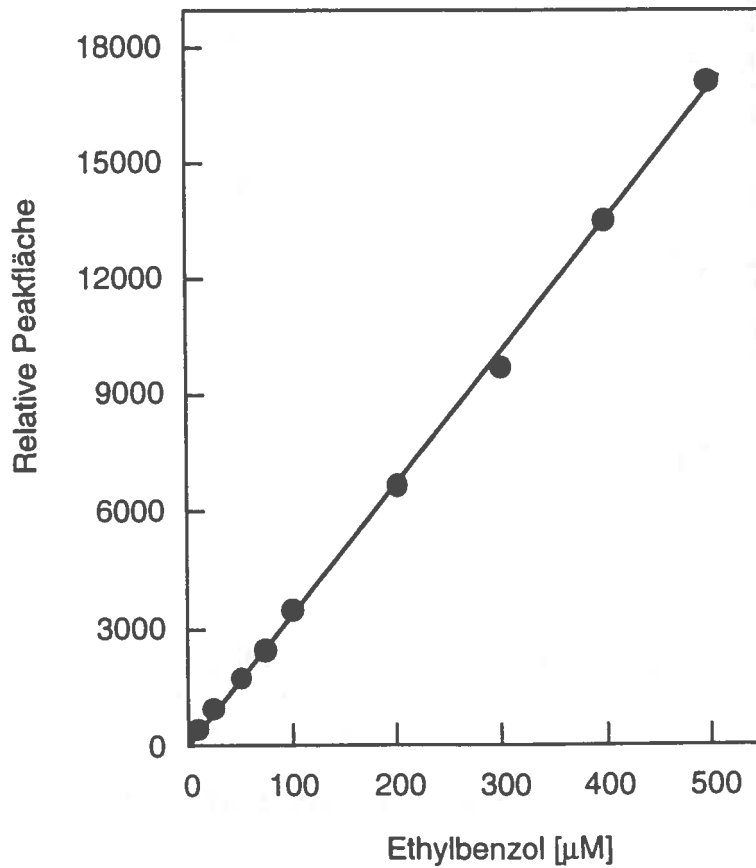


Abb. 14: Eichgerade zur Bestimmung von Ethylbenzol in der wässrigen Phase nach HPLC-Trennung (B. 3.6.). Verdünnungen von Ethylbenzol (10-500 μM) in 80 % Acetonitril wurden mit einem Injektionsvolumen von 20 μl auf die C_{18} -Säule gegeben. Laufmittel: 80 % Acetonitril in bidest. H_2O ; Retentionszeit: 5,8 min. Die dargestellten Datenpunkte entstanden durch Mittelung von jeweils 2 Meßwerten.

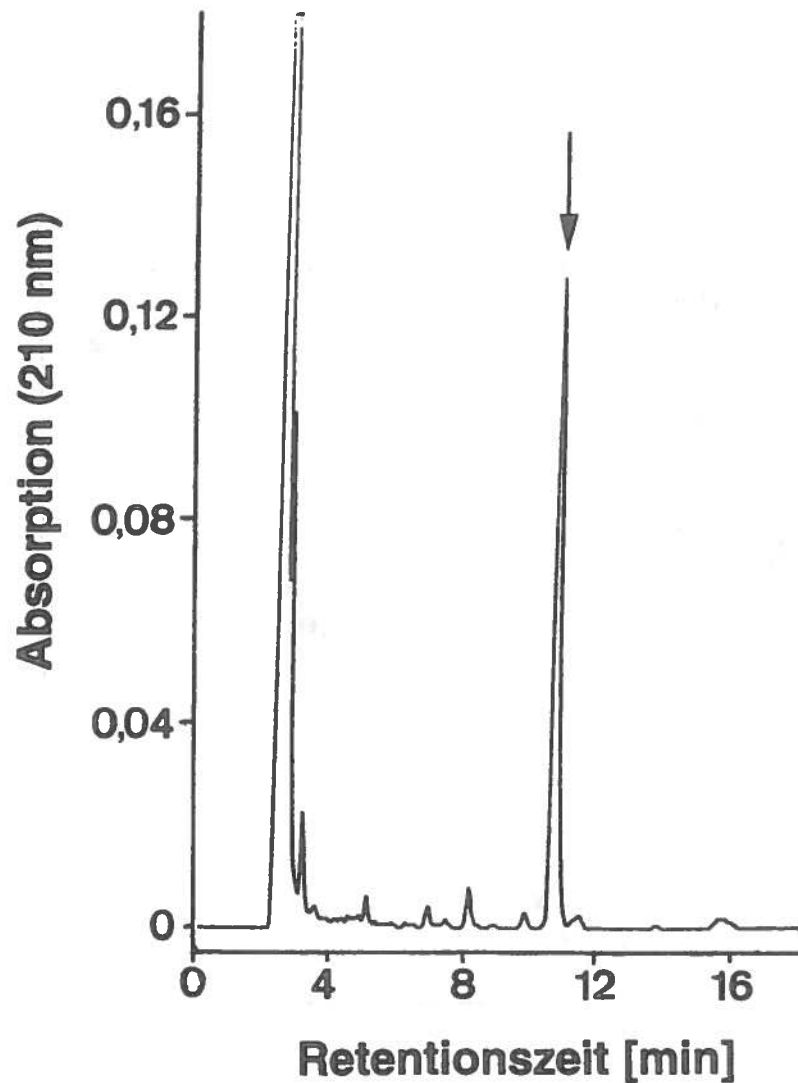


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm eines zellfreien Überstandes einer Zellsuspension von Stamm Tol2 nach Zugabe von *p*-Methylbenzoat als Standard. Die Standardaddition ergab einen symmetrische Peak (10,6 min; Pfeil) und diente zur Identifikation eines Dead-End-Metaboliten als *p*-Methylbenzoat. Dieser Metabolit wurde im Überstand von Zellsuspensionen akkumuliert, wenn *p*-Xylol und Toluol (je 1 %, v/v) gleichzeitig als Elektronendonatoren zugesetzt worden waren (C. I. 4.). 100 μ l der zu analysierende Probe enthielten 5 μ l Standardsubstanz (*p*-Methylbenzoat, 2 mM), 45 μ l zellfreien Überstand, 15 μ l verdünnte H_3PO_4 (0,3 M) und 35 μ l reines Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 20 μ l. C_{18} -Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Flußrate: 1 ml/min.

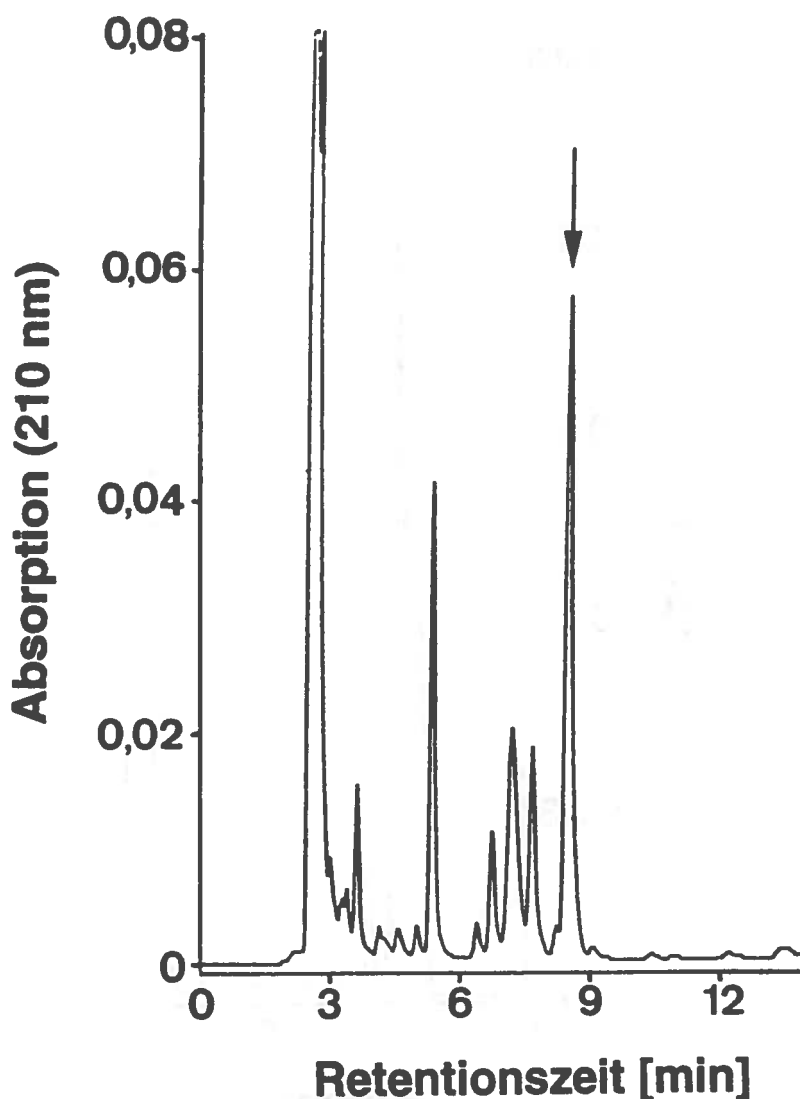


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm von *p*-Fluorbenzoat im zellfreien Überstand einer Zellsuspension von Stamm Tol2. *p*-Fluorbenzoat (8,5 min; **Pfeil**) wurde mittels Standardaddition und Vergleich von UV-Absorptionsspektren identifiziert. *p*-Fluorbenzoat akkumulierte in Zellsuspensionen denen *p*-Fluortoluol (0,1 %, v/v) und Toluol (1,0 %, v/v) gleichzeitig als Elektronendonatoren zugegeben worden waren (C. I. 4.). Die zu analysierende Probe enthielt 1:2 verdünnten, zellfreien Überstand, 45 mmol/l H_3PO_4 und 35 % (v/v) reines Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 50 μl . C_{18} -Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Flußrate: 1 ml/min.

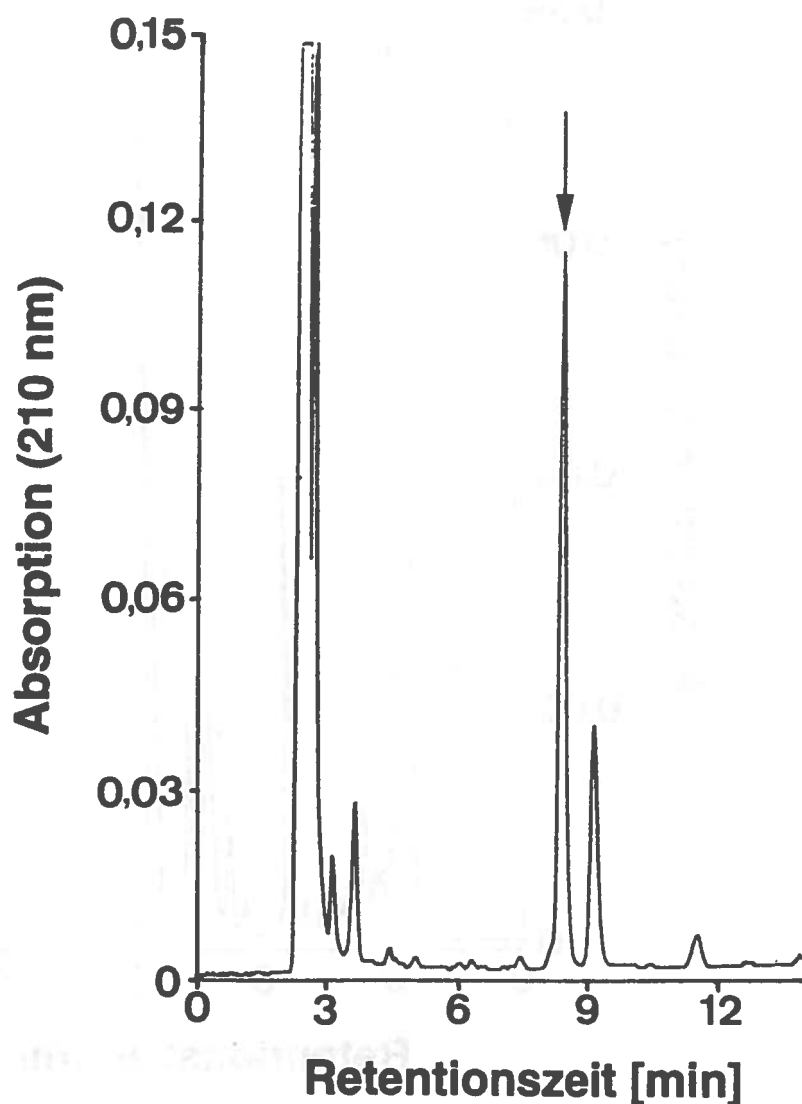


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm eines nicht identifizierbaren Metaboliten im zellfreien Überstand einer Zellsuspension von Stamm Tol2. Der Metabolit (8,4 min; **Pfeil**) akkumulierte in Zellsuspensionen denen *o*-Xylol und Toluol (je 1,0 %, v/v) gleichzeitig als Elektronendonatoren zugegeben worden waren (C. I. 4.). Die zu analysierende Probe enthielt 1:2 verdünnten, zellfreien Überstand, 45 mmol/l H_3PO_4 und 35 % (v/v) reines Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 50 μl . C_{18} -Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H_3PO_4 in bidest. H_2O ; Flußrate: 1 ml/min.

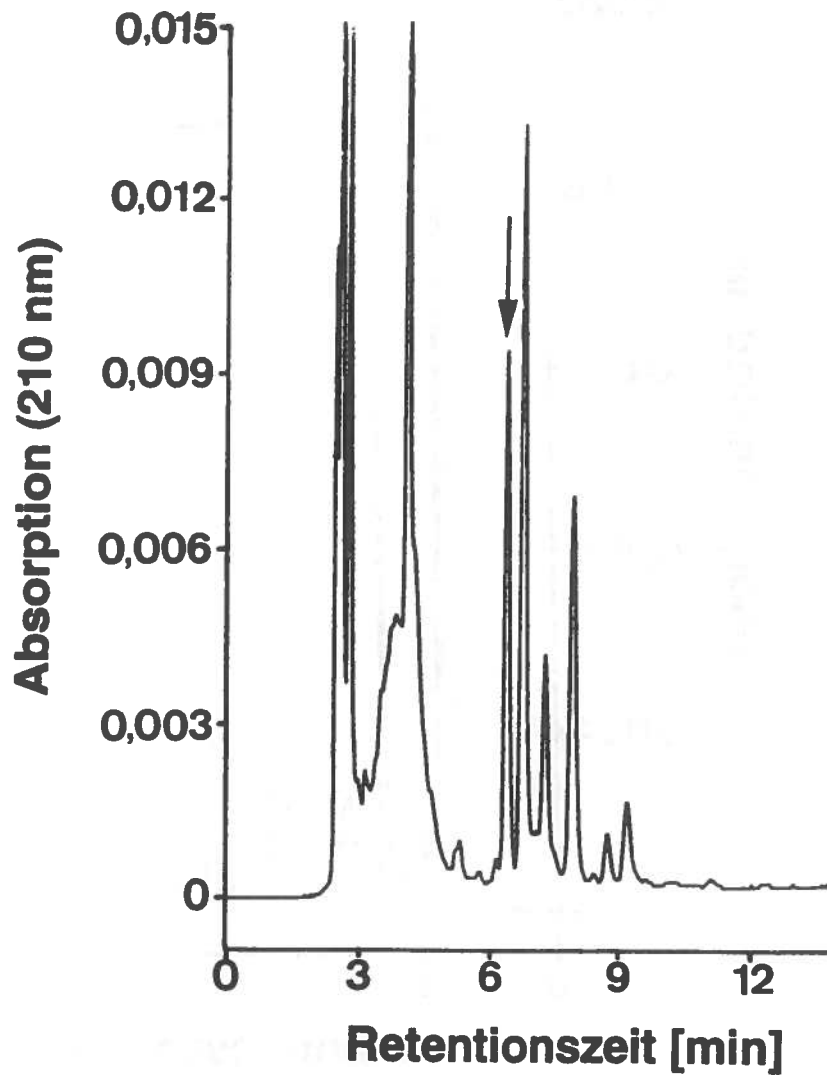


Abb. 18: HPLC-Chromatogramm von Benzylsuccinat im Etherextrakt von toluoloxidierenden Zellsuspensionen von Stamm Tol2 (C. I. 4.). Ein Metabolit (6,5 min; **Pfeil**) wurde durch Standardaddition (G. Abb. 19 und 20) und Vergleich von UV-Absorptionsspektren als Benzylsuccinat identifiziert. Die zu analysierende Probe bestand aus 65 % (v/v) Etherextrakt und 35 % (v/v) Acetonitril. Das Injektionsvolumen war 50 μ l. C₁₈-Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in bidest. H₂O; Flußrate: 1 ml/min.

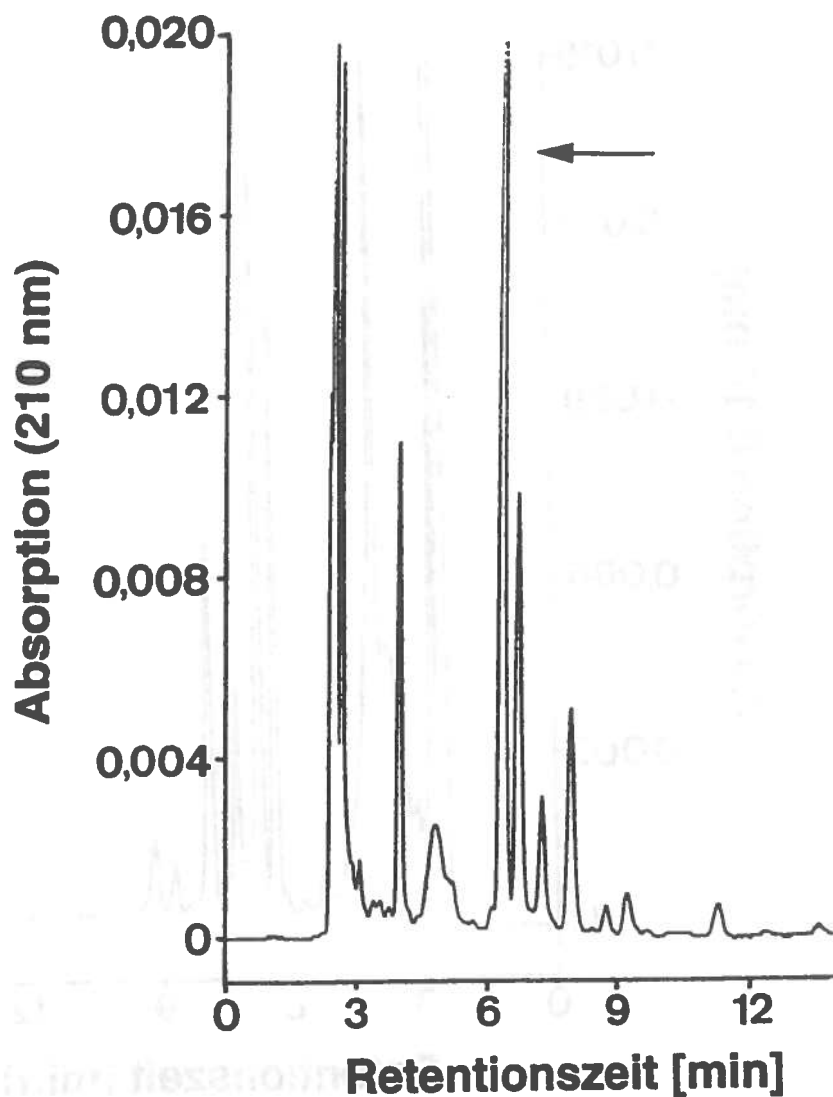


Abb. 19: HPLC-Chromatogramm eines Etherextraktes von toluoxidierenden Zellsuspensionen von Stamm Tol2 nach Zugabe von Benzylsuccinat als Standard (C. I. 4., G. Abb. 18). Die Standardaddition ergab einen symmetrischen Peak (Pfeil) und diente zur Identifikation eines dead-end Metaboliten als Benzylsuccinat. Die zu analysierende Probe bestand aus 10 % (v/v) Standardsubstanz (Benzylsuccinat, 20 μ M Endkonzentration), 45 % (v/v) Etherextrakt und 35 % (v/v) reinem Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 50 μ l. C₁₈-Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in bidest. H₂O; Flußrate: 1 ml/min.

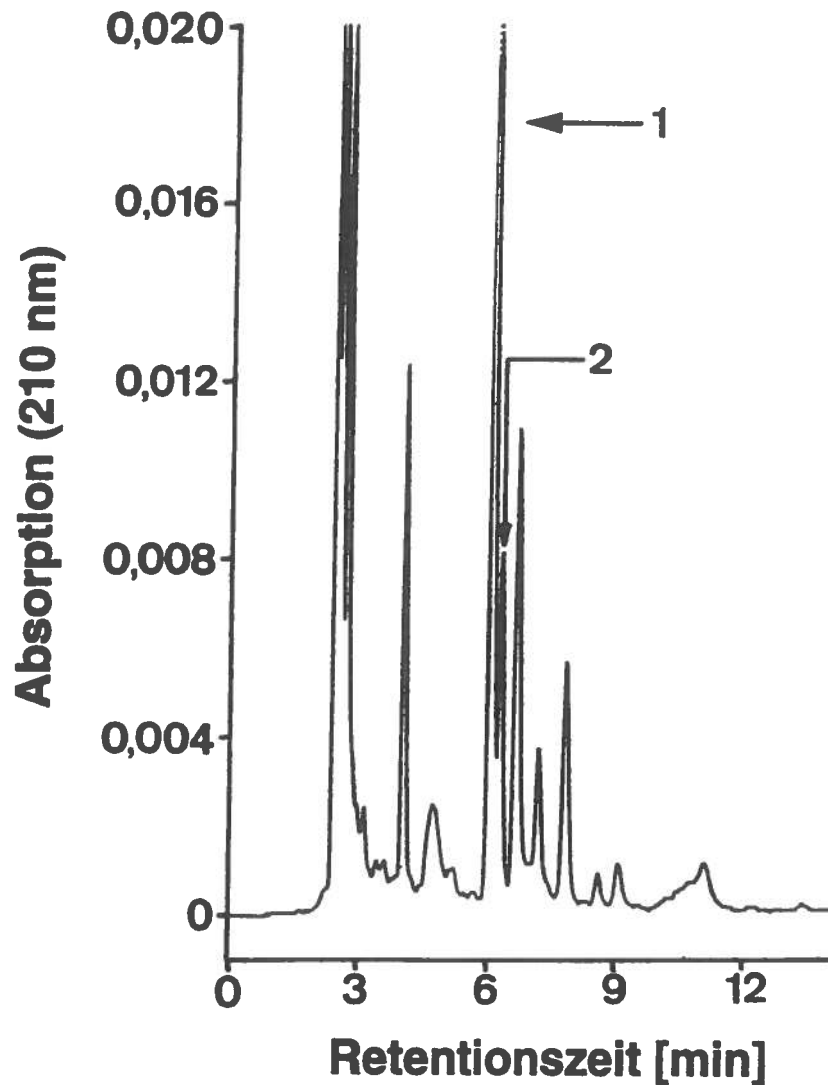


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm eines Etherextraktes von toluoxidierenden Zellsuspensionen von Stamm Tol2 nach Zugabe von Benzylalkohol als Standard (C. I. 4., G. Abb. 18). Die Standardaddition ergab zwei Peaks für Benzylalkohol (1) und den Metaboliten (2). Demnach war der Metabolit nicht mit Benzylalkohol identisch. Die zu analysierende Probe bestand aus 10 % (v/v) Standardsubstanz (Benzylalkohol, 20 μ M Endkonzentration), 45 % (v/v) Etherextrakt und 35 % (v/v) reinem Acetonitril. Das Injektionsvolumen betrug 50 μ l. C₁₈-Trennsäule; Laufmittel: 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in bidest. H₂O; Flußrate: 1 ml/min.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Friedrich Widdel für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung, die vielen wertvollen Anregungen und vor allem für die ständige Diskussionsbereitschaft

Danken möchte ich Herrn Dr. Manabu Fukui vom NIRE (Japan) für die Einführung in das Gebiet der molekularen Ökologie und die Durchführung der vielen *in situ*-Hybridisierungen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Fred Rainey von der DSM in Braunschweig für die Sequenzierung der 16S rDNA.

Bei Herrn Dr. Heinz Wilkes und Herrn Dipl.-Ing. Helmut Willsch von der KFA in Jülich möchte ich mich für die Einführung in die Methoden der Ölanalytik und die Durchführung der zahlreichen Ölanalysen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Frank Aeckersberg für die große Unterstützung bei der Isolierung der neuen Sulfatreduzierer aus der β 4-Anreicherung.

Dr. Armin Ehrenreich gilt mein Dank für die Einführung in die Technik der 2D-Gelelektrophorese.

Mein Dank gilt nicht zuletzt allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie und des gesamten Instituts, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Unseren technischen Assistentinnen Christina und Ingrid danke ich für die vielen Hilfen im Laboralltag. Gerda und Karsten danke ich für das Korrekturlesen und wünsche Ihnen viel Spaß und Erfolg mit den Aromaten. Schließlich möchte ich mich vor allem bei Kristina und Frank für die vielen wissenschaftlichen und anderen Plaudereien bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ralf Rabus
Geburtstag: 09. 05. 1966
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Eltern: Claus Rabus
Ruth Rabus, geb. Oexmann

Schulbildung

1971 - 1976 Grundschule in Germering, bei München
1976 - 1985 Max-Born-Gymnasium in Germering, bei München;
Abitur

Zivildienst

1985 - 1986 Umweltschutzreferat der Landeshauptstadt München

Studium

1986 - 1992 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in
München; Diplom
1992 - 1995 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von
Prof. Dr. F. Widdel am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie
in Bremen