

Frank Aeckersberg

Anaerober Abbau von Alkanen
und 1-Alkenen
durch sulfatreduzierende Bakterien

Frank Aeckersberg

Anaerober Abbau von Alkanen
und 1-Alkenen
durch sulfatreduzierende Bakterien



Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Aeckersberg, Frank:

Anaerober Abbau von Alkanen und 1-Alkenen durch
sulfatreduzierende Bakterien / Frank Aeckersberg. - Aachen :

Mainz, 1995

Zugl. : Bremen, Univ., Diss., 1994

ISBN 3-930911-15-9

1. Auflage 1994

© Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen

Herstellung: Fotodruck Mainz GmbH

Süsterfeldstr. 83, 52072 Aachen

Tel. 0241/87 34 34

ISBN 3-930911-15-9

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	V
A Einleitung	1
1. Alkane	1
1.1. Eigenschaften und Reaktionen von Alkanen	1
1.2. Vorkommen von Alkanen	3
1.3. Bildung von Alkanen in biologischen Systemen	5
2. Mikrobieller Abbau von Alkanen in Gegenwart von Sauerstoff	5
3. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen in Abwesenheit von Sauerstoff	7
3.1. Arbeiten zum anaeroben Abbau von definierten gesättigten Kohlenwasserstoffen	8
3.2. Arbeiten zum anaeroben Abbau von ungesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen	11
4. Bedeutung des anaeroben Alkanabbaus bei der Erdölförderung	12
5. Bedeutung der Verwertung von Erdöl unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei der Entstehung von Schwefellagerstätten	19
6. Zielsetzung der Arbeit	20
B Material und Methoden	21
1. Chemikalien und Gase	21
2. Probenmaterial und Organismen	21
3. Nährmedien	22
3.1. Herstellung von Grundmedien und Stammlösungen	22
3.2. Aufbewahrung des Grundmediums und weitere Zusätze für die Kultivierung	27
3.2.1. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen	27
3.2.2. Sonstige Zusätze	33
4. Isolierungen von Bakterien	34
4.1. Verdünnungsreihe in Agar	34

II

4.2. Ausstrich auf Agarplatten	34
4.3. Reinheitskontrollen	35
5. Kultivierungsmethoden und Gewinnung von Zellmasse	35
5.1. Stammkulturen und Wachstumsversuche	35
5.2. Massenanzücht	36
6. Analytische Methoden	37
6.1. Qualitativer Schnellnachweis von Schwefelwasserstoff	37
6.2. Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff	37
6.3. Proteinbestimmung nach Bradford	39
6.4. Gravimetrische Sulfatbestimmung	40
6.5. Bestimmung reduzierender Zucker	40
6.6. Bestimmung von Hexadecan	41
6.7. Bestimmung der Zellfettsäuren	41
6.8. Bestimmung des GC-Gehaltes der DNS	43
6.9. Analyse der 16S rRNS	44
7. Wachstumsversuche für quantitative Messungen zum anaeroben Alkanabbau	44
7.1. Wachstumsversuche in zugeschmolzenen Glasampullen	44
7.2. Wachstumsversuche in Flachgefäßen	50
8. Bestimmung von Aktivitäten in Zellsuspensionen	51
9. Bestimmung von Enzymaktivitäten	52
9.1. Herstellung von Rohextrakten unter anoxischen Bedingungen	52
9.2. Durchführung optischer Enzymtests unter anaeroben Bedingungen	53
C Ergebnisse	58
1. Anreicherung und Isolierung von alkanabbauenden sulfatreduzierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen	58
1.1. Anreicherung und Isolierung unter mesophilen Bedingungen	58
1.2. Anreicherung und Isolierung unter thermophilen Bedingungen	59
2. Charakterisierung der isolierten sulfatreduzierenden Bakterien	62
2.1. Charakterisierung von Stamm Hxd3	62
2.2. Charakterisierung von Stamm Pnd3	66
3. Quantitative Messungen zum anaeroben Alkanabbau	68
3.1. Bilanzierung des Alkanabbaus in zugeschmolzenen	

III

Glasampullen	69
3.2. Bilanzierung des Alkanabbaus in Flachgefäßen	71
4. Versuche zur Stimulierung des Wachstums der Stämme Hxd3 und Pnd3 auf Alkanen	74
4.1. Stimulierung des Wachstums auf Alkanen durch eine erhöhte Verteilung der Alkanphase	74
4.2. Stimulierung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Alkanen durch Erhöhung der Spurenelementkonzentrationen	78
5. Prüfung bekannter Arten sulfatreduzierender Bakterien auf die Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen	79
6. Wachstum alkanverwertender sulfatreduzierender Bakterien mit Rohöl	81
7. Prüfung der Wirkung kurzkettiger Alkane auf die Verwertung von Hexadecan durch Stamm Hxd3	83
8. Verwertung möglicher Intermediate in Zellsuspensionsversuchen	83
8.1. Ermittlung geeigneter Antibiotika	84
8.2. Induktionsversuche	85
9. Einfluß der Substrate auf die Synthese von Zellfettsäuren	87
10. Verwertung von Hexadecan durch Zellsuspensionen von Stamm Hxd3 in Gegenwart von CO	91
11. Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm Hxd3	92
11.1. Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase	92
11.2. Enzyme der Oxidation von Propionyl-CoA	95
12. Versuche zum enzymatischen Abbau von α -Cyclodextrin in Kulturmedium mit Hexadecan	96
D Diskussion	99
1. Nachweis des anaeroben Alkanabbaus durch Stamm Hxd3	99
2. Taxonomische Einordnung der Bakterienisolate	101
3. Stimulierung des Wachstums der Stämme Hxd3 und Pnd3 auf Alkanen	102
4. Betrachtungen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung aliphatischer Kohlenwasserstoffe	106
4.1. Hypothesen zum anaeroben Aktivierungsmechanismus von Alkanen durch Stamm Hxd3	112

IV

4.2. Hypothesen zum anaeroben Aktivierungsmechanismus von 1-Alkenen durch Stamm Hxd3	125
5. Bedeutung der Ergebnisse für die Rohölförderung	126
E Zusammenfassung	129
F Literaturverzeichnis	131
G Anhang	143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
C_n	n C-Atome
CoA	Coenzym A
CO-Dehydrogenase	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
d	Tag(e)
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
dest.	destilliert
DH	Dehydrogenase
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
E	Extinktion
E_o'	Standardelektrodenpotential bei pH 7 [V]
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
ΔG°	Änderung der freien Gibbs'schen Enthalpie unter Standardbedingungen
G+C	Guanin und Cytosin
Gl.	Gleichung
h	Stunde(n)
konz.	konzentriert
l	Liter
m	Meter
min	Minute(n)
M	Molar
mol	Mole
M_r	relative Molekülmasse
N	Normal
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nikotinamid-adenindinukleotid(-phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotid(-phosphat)
ox.	oxidiert
Pa	Pascal
PM5	N-Methylphenaziniummethylsulfat

VI

psi	pounds per square inch
red.	reduziert
rpm	Rotationen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonucleinsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes (Licht)
V	Volt
verd.	verdünnt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

Abkürzungen für Fettsäuren

Gesättigte Fettsäuren

11:0	Undecansäure
12:0	Dodecansäure
13:0	Tridecansäure
14:0	Tetradecansäure
15:0	Pentadecansäure
16:0	Hexadecansäure
17:0	Heptadecansäure
18:0	Octadecansäure
19:0	Nonadecansäure

Ungesättigte Fettsäuren

15:1 cis 9	<i>cis</i> -9-Pentadecensäure
16:1 cis 9	<i>cis</i> -9-Hexadecensäure
17:1 cis 9	<i>cis</i> -9-Heptadecensäure
18:1 cis 9	<i>cis</i> -9-Octadecensäure
18:2 cis 9 cis 12	<i>cis</i> -9- <i>cis</i> -12-Octadecadiensäure

Verzweigte Fettsäuren

15:0 anteiso	12-Methyltetradecansäure
15:0 10-Methyl	10-Methylpentadecansäure
16:0 iso	14-Methylpentadecansäure
16:0 10-Methyl	10-Methylhexadecansäure
17:0 10-Methyl	10-Methylheptadecansäure

Hydroxylierte Fettsäuren

12:0 3-OH	3-Hydroxydodecansäure
13:0 2-OH	2-Hydroxytridecansäure
13:0 3-OH	3-Hydroxytridecansäure
14:0 3-OH	3-Hydroxytetradecansäure

Einleitung

In einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes hatte eine Bildung von Schwefelwasserstoff bereits über mehrere Jahre Probleme durch Kontamination des Öls, Geruchsbelästigung und Ausfällung von Eisensulfid verursacht. Der Nachweis von hohen Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien in der Wasserphase des Öl-Wasser-Separators führte zu dem Schluß, daß eine biologische Sulfatreduktion die Ursache der Sulfidbildung war (Cord-Ruwisch et al., 1986). Da weder biologisch abbaubare Ölfeldchemikalien noch molekularer Sauerstoff, der zu einer bakteriellen Bildung organischer Säuren aus Kohlenwasserstoffen führen kann, in das System gelangt waren, mußten Bestandteile des Rohöls anaerob abgebaut worden sein. Die sulfatreduzierenden Bakterien wurden zunächst mit Acetat und Benzoat, also polaren Verbindungen, nachgewiesen. Darüber hinaus wurde jedoch auch eine sulfatreduzierende Anreicherung mit ölhaltigen Asphaltenausfällungen erhalten. Dies führte zu der Vermutung, daß auch Kohlenwasserstoffe, die Hauptbestandteile des Erdöls, anaerob abgebaut werden können. Die Möglichkeit eines anaeroben Abbaus von gesättigten Kohlenwasserstoffen war zuvor sehr umstritten. Tatsächlich wurde dann aus der Anreicherung mit ölhaltigen Asphaltenteilchen ein sulfatreduzierendes Bakterium isoliert, das in Abwesenheit von Sauerstoff auf Alkanen mit einer Kettenlänge von C₁₂ bis C₂₀ wuchs (Aeckersberg, 1989).

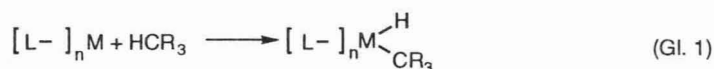
1. Alkane

1.1. Eigenschaften und Reaktionen von Alkanen

Von allen organischen Verbindungen zeigen Alkane das geringste Reaktionsvermögen, wie auch die ältere Bezeichnung Paraffine besagt (lat. *parum*, wenig; *affinis*, geneigt). Dies ist darauf zurückzuführen, daß Alkane nur unpolarisierte σ -Bindungen enthalten, die aufgrund ihres niedrigen Energieniveaus und der Lokalisation der Bindungselektronen thermodynamisch und kinetisch sehr stabil sind. Alkane reagieren daher entweder nur unter sehr extremen Bedingungen, wie sie bei der Verbrennung und Pyrolyse herrschen, oder mit extrem reaktiven Verbindungen, wie photolytisch hergestellten Halogenradikalen, molekularem Fluor oder Supersäuren. Die meisten dieser

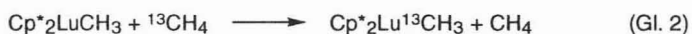
Reaktionen verlaufen über radikalische Zwischenprodukte, da C-H- oder C-C-Bindungen durch ihre Apolarität eine homolytische Spaltung begünstigen.

Bei chemischen Synthesen sind radikalische Reaktionen schwer zu kontrollieren und führen in der Regel zu Gemischen von verschiedenen Produkten. Deshalb wurde verstärkt nach Katalysatoren gesucht, die eine gezielte Umsetzung von Alkanen zu definierten Produkten unter milden Bedingungen erlauben. Als geeignete Katalysatoren erwiesen sich Komplexe von Übergangsmetallen, wie Rhodium, Rhenium, Osmium oder Iridium. Mit diesen konnten Alkane bei Temperaturen unterhalb von 100°C gezielt zu Alkenen (Baudry et al., 1983), Aldehyden (Sakakura und Tanaka, 1987) oder Alkylhalogeniden (Janowicz und Bergmann, 1982) umgesetzt werden. Primäre C-H-Bindungen wurden mit höherer Rate umgesetzt als sekundäre und tertiäre, was gegen ein Alkylradikal als Zwischenprodukt spricht. Vielmehr wurde die C-H-Bindung des Alkans durch Insertion von koordinativ ungesättigten Metallzentren aktiviert. Der Mechanismus wurde als oxidative Addition beschrieben, wobei formal ein Hydridion und ein Carbanion den Übergangsmetallkomplex ligandieren (Gl. 1; L = Ligand, M = Metallzentrum).



In weiteren Reaktionen wurde der Alkylrest zu Aldehyden, Alkenen oder Alkylhalogeniden umgesetzt. Übergangsmetallkomplexe sind für die Aktivierung von völlig unpolarisierten C-H-Bindungen besonders geeignet, weil ihre Grenzorbitale oft ein ähnliches Energieniveau besitzen wie die bindenden σ - oder antibindenden σ^* -Molekülorbitale der C-H-Bindung. Außerdem handelt es sich bei den Grenzorbitalen von Übergangsmetallkomplexen um ausgedehnte Hybridorbitale, die relativ gut mit den schwer zugänglichen Molekülorbitalen der C-H-Bindung überlappen können (Saillard, 1990).

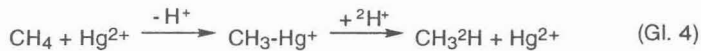
Auch Komplexe von Metallen der dritten Nebengruppe katalysieren eine Umsetzung von Alkanen unter milden Bedingungen. Watson (1983) konnte einen Methanaustausch an einem Lanthanidenkomplex zeigen (Gl. 2; Cp* = Pentamethylcyclopentadienyl).



Periana (1993) konnte kürzlich zeigen, daß CH_4 in konz. H_2SO_4 bei 180°C in Gegenwart von Hg^{2+} -Ionen zu Methylbisulfat umgesetzt wird (Gl. 3).



Die Aktivierung von CH_4 erfolgte vermutlich nicht durch oxidative Addition eines Metallkomplexes, sondern durch eine elektrophile Verdrängung eines Protons durch Hg^{2+} . Dafür sprechen Versuche, in denen ein Deuteriumeinbau in Methan mit deuterierter Schwefelsäure unter Katalyse von Hg^{2+} gezeigt wurde (Gl. 4).



So wurde die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zusatz von basischen Gegenionen zu Hg^{2+} erhöht. Ähnliche Reaktionen, in denen Methan vermutlich durch elektrophile Verdrängung eines Protons aktiviert wird, werden durch Pd^{2+} (Gretz, 1987), Co^{3+} (Vargaftik, 1990) und Pt^{2+} (Shilov, 1984) katalysiert.

Auch in biologischen Systemen werden Reaktionen von unpolarisierten σ -Bindungen unter Beteiligung von Übergangsmetallkomplexen katalysiert. Beispiele hierfür sind B_{12} - und S-Adenosylmethionin-abhängige Reaktionen sowie Alkan-Monooxygenase und Methan-Monooxygenase-Reaktionen. In diesen Reaktionen werden die unpolarisierten C-H-Bindungen, anders als bei der Methanoxidation unter Hg^{2+} -Katalyse, homolytisch gespalten, d. h. die biologischen Reaktionen verlaufen radikalisch.

1.2. Vorkommen von Alkanen

Gesättigte Kohlenwasserstoffe sind Hauptbestandteile des Erdöls; *n*-Alkane, verzweigte und cyclische Alkane hatten bei 517 untersuchten Rohölen einen durchschnittlichen Anteil von 57,2 % (Tissot und Welte S. 381, 1984).

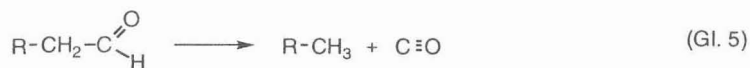
In geringen Mengen sind gesättigte Kohlenwasserstoffe auch in rezenten Sedimenten enthalten. So wurden z. B. in den Sedimenten des Greifensees (Schweiz) ca. 200 μg Alkan pro g Sediment gefunden (Giger et al., 1980). Die in Meeres- oder Süßwassersedimenten gefundenen Alkane haben überwiegend Ketten mit ungerader Anzahl von C-Atomen, was auf die Herkunft der Alkane hinweist. Wenn *n*- C_{15} und *n*- C_{17} -Alkane überwiegen, stammen diese aus

sedimentiertem Phytoplankton. Algen enthalten 0,0008 - 0,012 % Alkane (Blumer et al., 1971); in Cyanobakterien machen Alkane sogar 0,05 - 0,12 % des Trockengewichts aus (Winters et al., 1969). Dagegen stammen Alkane mit ungerader Anzahl an C-Atomen in einem Kettenlängenbereich von C₂₅ bis C₃₃ aus den Oberflächenwachsen höherer Landpflanzen. Neben den direkt im Phytoplankton oder in höheren Pflanzen gebildeten Alkanen werden auch aus höheren Pflanzen oder Phytoplankton stammende langkettige Alkohole oder Fettsäuren können im Sediment durch Defunktionalisierungsreaktionen zu Alkanen umgesetzt. Darüber hinaus gelangen große Mengen von Alkanen, die aber keine Dominanz von ungeradzahligen Kettenlängen aufweisen, durch Verschmutzungen mit Rohöl in Sedimente oder andere natürliche Habitate. Der jährliche Öleintrag aus Tankerhavarien, normalem Schiffsverkehr, häuslichen Abwässern, Unfällen auf Ölplattformen oder auch aus unterseeischen natürlichen Ölquellen beträgt ca. 3×10^6 t (Poremba und Gunkel, 1994). Neben den genannten Algen und höheren Pflanzen enthalten auch andere Organismengruppen Alkane. In Bakterien der Gattung *Micrococcus* machen Alkane 0,7 bis 35 % der gesamten Zelllipide aus; Pilzsporen enthalten 0,004 - 0,015 % Alkane; in Vertebraten kommen Alkane in den Myelinscheiden der peripheren Nervenfasern vor (Cheesebrough und Kolattukudy, 1988). Pristan wurde in der Leber von Haifischen gefunden (Hillen, 1992; S. 3618).

Eine Besonderheit bezüglich des Kohlenwasserstoffgehaltes stellt die einzellige Grünalge *Botryococcus braunii* dar, deren Trockenmasse zu bis zu 86 % aus Kohlenwasserstoffen bestehen kann. Diese setzen sich hauptsächlich aus mehrfach ungesättigten verzweigten Kohlenwasserstoffen, die Botryococcene genannt werden, und geringen Mengen von Alkanen zusammen. Die Algen bilden Wasserblüten, die aufgrund ihres hohen Kohlenwasserstoffgehaltes auf der Wasseroberfläche schwimmen und daher leicht in Küstenbereichen angespült werden. Weil Kohlenwasserstoffe im Erdöl aus russischen und australischen Lagerstätten Strukturhomologien zu Botryococcenen zeigen, wird eine Beteiligung von *Botryococcus*-Wasserblüten an der Entstehung dieser Lagerstätten vermutet (Birch und Bachofen, 1984; Poremba und Gunkel, 1994).

1.3. Bildung von Alkanen in biologischen Systemen

Die Synthese von höheren Alkanen in Organismen verläuft über langkettige Fettsäuren als Zwischenprodukte, die zu den entsprechenden Aldehyden reduziert werden. Diese werden über eine Decarboxylierungsreaktion zu einem Alkan umgesetzt (Gl. 5).



Diese Reaktionen wurden erstmalig in höheren Pflanzen (Cheesbrough und Kolattukudy, 1984) nachgewiesen und danach auch in Vertebraten (Cheesbrough und Kolattukudy, 1988) und Grünalgen (Dennis und Kolattukudy, 1992) gefunden.

Methan wird als ein Endprodukt des dissimilatorischen Stoffwechsels von methanogenen Bakterien gebildet. Diese disproportionieren dabei ein sehr begrenztes Spektrum von Substraten mit Methylgruppen, wie Acetat, Methanol oder Methylamine, zu Methan und CO₂ oder reduzieren CO₂ mit H₂ oder Formiat zu Methan (Mah et al., 1977). In geringen Mengen wird Methan auch von allen Bakterien gebildet, die eine CO-Dehydrogenase besitzen (Minimethanbildung) (Schauder et al., 1986). Vermutlich ist das gebildete Methan ein Nebenprodukt der CO-Dehydrogenase-Reaktion, in deren Verlauf eine aktivierte Methylgruppe entsteht und zu einem geringen Teil zu Methan umgesetzt wird.

Ethan entsteht vermutlich als Nebenprodukt der Methanbildung durch Methanbakterien (Oremland, 1981).

2. Mikrobieller Abbau von Alkanen in Gegenwart von Sauerstoff

Bereits 1895 berichtete Miyochi (Miyochi, 1895) vom Wachstum des Pilzes *Botrytis cinerea* auf Paraffin. Seitdem sind viele Arten von Bakterien, Hefen und Pilzen beschrieben worden, die in Gegenwart von Sauerstoff auf Alkanen wachsen (für eine Übersicht siehe Bühler und Schindler, 1984; Britton, 1984).

Sauerstoff erfüllt beim aeroben Abbau von Alkanen eine Doppelfunktion. Er dient erstens als Reaktionspartner in der initialen Oxidationsreaktion des Alkanabbaus. Eine mischfunktionelle Monooxygenase katalysiert dabei die Oxidation eines Alkans mit O₂ zum entsprechenden primären Alkohol (Gl. 6).



Zweitens ist Sauerstoff terminaler Elektronenakzeptor bei der Oxidation der organischen Substrate. Dabei ermöglicht sein stark positives Redoxpotential ($E_o' = +0,81 \text{ V}$) eine große Energieausbeute. Damit die sehr stabile und unpolare C-H-Bindung der Alkane angegriffen werden kann, muß das kinetisch stabile O₂-Molekül in eine sehr reaktive Sauerstoffspezies überführt werden. Durch partielle Reduktion von O₂ an einem Übergangsmetallzentrum oder einem Flavin wird das Molekül unter Bildung von H₂O gespalten. Bei metallhaltigen Monooxygenasen bleibt ein hochreaktives Sauerstoffatom am Metallzentrum gebunden und radikalisiert unter homolytischer Spaltung einer primären C-H-Bindung das Alkan; das entstandene gebundene OH-Radikal verbindet sich dann mit dem Alkylradikal (Abb. 1). Der so gebildete primäre Alkohol wird durch Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase-Reaktionen zu der entsprechenden Fettsäure umgesetzt, welche über die Reaktionen der β -Oxidation weiter abgebaut wird. Die einleitende Hydroxylierung von Alkanen wurde in Bakterien (Stewart et al., 1959), Hefen (Souw et al., 1977) und Schimmelpilzen (Hoffmann und Rehm, 1976) nachgewiesen.

Neben der erwähnten terminalen Oxidation werden Alkane durch Monooxygenasereaktionen auch subterminal unter Bildung von sekundären Alkoholen (Rehm und Reiff, 1982) und diterminal unter Bildung von α,ω -Dienen oder ω -Hydroxycarbonsäuren oxidiert (Kester und Foster, 1963).

Ältere Arbeiten enthalten Hinweise auf Alkylperoxide (R-CH₂OOH) als Intermediate des aeroben Alkanabbaus (Stewart et al., 1959; Finnerty et al., 1962). Die einleitende Oxidationsreaktion würde dann nach einem Dioxygenase-Mechanismus verlaufen. Allerdings konnten Alkylperoxide bisher nicht als freie Intermediate isoliert werden (Britton, 1984).

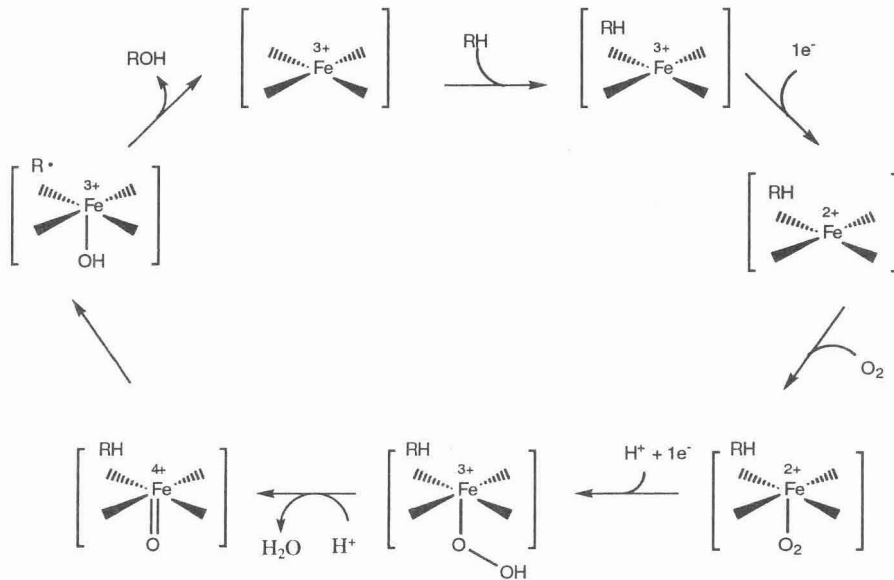


Abb 1: Mechanismus der durch Cytochrom P450 katalysierten Hydroxylierung von Alkanen (modifiziert nach Frey, 1990).

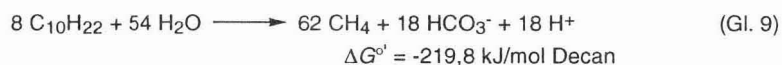
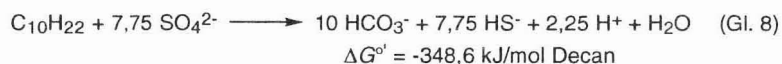
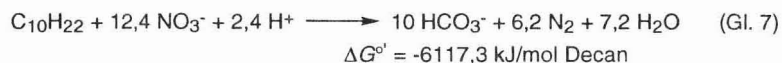
3. Mikrobieller Abbau von Alkanen in Abwesenheit von Sauerstoff

Lange Zeit war umstritten, ob Verbindungen, die unter aeroben Bedingungen über initiale Oxygenase-Reaktionen abgebaut werden, auch in Abwesenheit von Sauerstoff oxidiert werden können. Zwar sind viele Abbaureaktionen unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart alternativer Elektronenakzeptoren, von denen NO_3^- , Fe(III) , SO_4^{2-} und HCO_3^- die wichtigsten sind, möglich. Doch blieb zunächst unklar, ob alternative Reaktionen in Abwesenheit von Sauerstoff auch die initialen Oxygenase-Reaktionen ersetzen können. Insbesondere aus biochemischer Sicht wurde bezweifelt, ob die chemisch relativ inerten Kohlenwasserstoffe überhaupt ohne Beteiligung von Sauerstoff abgebaut werden

können. Allerdings erschienen Ende der 80er Jahre Berichte über einen anaeroben Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Anreicherungskulturen (Vogel und Grbic-Galic, 1986; Grbic-Galic und Vogel, 1987; Kuhn et al., 1988). Schließlich wurden Reinkulturen eisenreduzierender (Lovely et al., 1989), nitratreduzierender (Dolfing et al., 1990; Schocher et al., 1991; Evans et al., 1991; Altenschmidt und Fuchs, 1992) und sulfatreduzierender (Rabus et al., 1993) Bakterien beschrieben, die Toluol in Abwesenheit von Sauerstoff abbauen.

Dagegen war noch bis vor kurzem umstritten, ob gesättigte Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen in Abwesenheit von Sauerstoff oxidiert werden (Schink, 1988). Die Ergebnisse älterer Arbeiten (siehe A 3.1.) waren nicht überzeugend, da die verwendeten Kulturen wahrscheinlich nicht vollständig anoxisch waren oder eine Verwertung von Substratverunreinigungen nicht ausgeschlossen werden konnte.

Thermodynamisch ist eine vollständige Oxidation von gesättigten Kohlenwasserstoffen mit NO_3^- (Gl. 7) oder SO_4^{2-} (Gl. 8) als Elektronenakzeptor oder unter methanogenen Bedingungen (Gl. 9) möglich:



Somit liegt die Hauptschwierigkeit beim anaeroben Abbau von Alkanen in der Überwindung der hohen kinetischen Stabilität der Moleküle.

3.1. Arbeiten zum anaeroben Abbau von definierten gesättigten Kohlenwasserstoffen

Anaerober Alkanabbau in Sedimenten

Nach anaerober Inkubation von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Hexadecan mit Seesedimenten fanden Ward und Brock (1978) 5,6 % der eingesetzten Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ und 8,1 %

in der partikulären Fraktion wieder. Allerdings wurde auch in mit Formaldehyd behandelten Kontrollen ein ähnlich hoher Umsatz der Radioaktivität beobachtet. DELaune et al. (1980) führten anaerobe Inkubationsexperimente mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octadecan und anaeroben Sedimenten aus Salzwiesen unter einem kontrollierten Redoxpotential von -200 mV durch. Nach 25 Tagen Inkubation wurden ca. 10 % der eingesetzten Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ gefunden. In einem ähnlichen Experiment setzten Hambrick et al. (1980) $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Octadecan mit Sedimenten aus Salzwiesen unter einem Redoxpotential von -250 mV ein. 18,8 % der eingesetzten Radioaktivität konnten als $^{14}\text{CO}_2$ gefunden werden. Die Arbeiten von DELaune et al. (1980) und Hambrick et al. (1980) lieferten somit gute Belege für eine anaerobe Alkanoxidation in Sedimenten, da eine Umsetzung von 10 bzw. 18 % der eingesetzten Radioaktivität wahrscheinlich zu groß war, um durch Verunreinigungen oder Fehlmarkierungen in den Alkanen verursacht worden zu sein. Allerdings fehlen Angaben über die Reinheit der Substrate und den möglichen Anteil von Fehlmarkierungen. Außerdem wurden keine Sterilkontrollen erwähnt. Giger (1980) inkubierte *n*-Heptadecan 80 Wochen lang anaerob mit Seesedimenten (Greifensee, Schweiz). Eine gaschromatographische Analyse der Ansätze zeigte, daß der Heptadecan-Gehalt von anfänglich 8 bis 9 $\mu\text{g/g}$ auf 0,2 $\mu\text{g/g}$ gesunken war. In einem Parallelansatz mit Phytan konnte keine Abnahme des Kohlenwasserstoffes beobachtet werden. Der Nachweis einer Abnahme des Heptadecans von über 90 % des ursprünglich eingesetzten ist ein überzeugender Beleg für einen anaeroben Heptadecanabbau in Sedimenten.

In einer anderen Arbeit mit Sedimenten (Mille et al., 1988) konnte dagegen kein Abbau von Kohlenwasserstoffen unter anaeroben Bedingungen gezeigt werden. Nach Inkubation von Nonadecan, Eicosan, Pristan und Phenanthren mit Standortproben in kontinuierlicher Kultur unter einem Sauerstoffpartialdruck von 0,2 bis 0,3 ppm verschwanden die zugesetzten Kohlenwasserstoffe nicht (Mille et al., 1988). Die Analyse der Kohlenwasserstoffe erfolgte gaschromatographisch. Ebenso konnten Michaelsen et al. (1992) in mit marinen Sedimenten beimpften Ansätzen einen Abbau von Hexadecan nur in Gegenwart von Sauerstoff (0,4 - 80 % Sättigung) bestimmen. Ohne Sauerstoff erfolgte innerhalb des Inkubationszeitraumes von 190 h kein Hexadecanabbau.

Sulfatreduzierende Rein- oder Mischkulturen

Sulfatreduzierende Anreicherungen und Reinkulturen von *Desulfovibrio* bildeten während der anaeroben Inkubation mit Tetradecan, Eicosan oder Docosan Sulfid

(Novelli und ZoBell, 1944). Rosenfeld (1947) berichtete von sulfareduzierenden Anreicherungen, die anaerob mit Hexadecan und anderen Kohlenwasserstoffen Sulfat reduzierten. Dabei wurde eine vorübergehende Bildung von langkettigen Fettsäuren beobachtet. Allerdings blieben die damals verwendeten Kulturen sulfatreduzierender Bakterien nicht erhalten. Außerdem wurden die verwendeten Anaerobentechniken nur unvollständig beschrieben. Reduktionsmittel wurden nicht erwähnt; die Inkubationsgefäße wurden mit Glasstopfen verschlossen. In einer späteren Arbeit konnten Updegraf und Wren (1954) mit den von ZoBell verwendeten Kulturen keinen anaeroben Abbau von Hexadecan oder Rohöl mehr zeigen.

In Zellsuspensionen von *Desulfovibrio desulfuricans* wurde in Gegenwart von Octadecan Methylenblau schneller entfärbt als in Abwesenheit des Alkans. Außerdem wurde eine Sulfidbildung beobachtet (Davis und Yarbrough, 1966). In einem zweiten Versuch bildeten Zellsuspensionen von *Desulfovibrio desulfuricans* $^{14}\text{CO}_2$ aus zugesetztem 1- ^{14}C -Alkanen. Allerdings wurden nur 0,18 % der eingesetzten Radioaktivität in $^{14}\text{CO}_2$ überführt. Aus den quantitativen Angaben der Autoren berechnet man, daß bei der Reduktion des Methylenblaus weniger als nur 0,1 % des eingesetzten Octadecans oxidiert werden konnten. Somit wäre auch möglich, daß aus dem Octadecan stammende Verunreinigungen zu den beobachteten Reaktionen geführt hatten. Außerdem wurde berichtet, daß die verwendete sulfatreduzierende Kultur mit Glucose wuchs, was auf eine verunreinigte Kultur schließen läßt.

Nitratreduzierende Reinkulturen

Senez und Azoulay (1961) beschrieben eine Reduktion von Pyocyanin oder NAD^+ in anaeroben Zellsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa* in Gegenwart von Heptan. In einer nachfolgenden Arbeit wurde 1-Hepten aus solchen Zellsuspensionen isoliert (Choteau et al., 1962). Deshalb wurde eine Heptan-Dehydrogenase-Reaktion, die zur Bildung von 1-Hepten führt, postuliert. Aber die weitere Oxidation von 1-Hepten zu Heptanal war sauerstoffabhängig, wobei eine Epoxidierung von 1-Hepten vorgeschlagen wurde (Azoulay et al., 1963). Anaerobes Wachstum eines nitratreduzierenden Bakteriums, *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196 Aa, auf Alkanen wurde erstmalig 1969 von Traxler und Bernard (1969) berichtet. Als Kohlenwasserstoffe wurden Octan oder Hexadecan eingesetzt. Später wurde die Reinigung einer Alkan-Dehydrogenase und einer Alken-Hydroxylase aus Zellen von *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 196 Aa

beschrieben (Parekh und Traxler, 1977). In anaeroben Enzymtests mit der gereinigten Alkan-Dehydrogenase, Decan und NAD⁺ konnte infrarotspektroskopisch die Bildung von 1-Decen gezeigt werden. Außerdem wurden Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase im Zellextrakt gemessen. Allerdings wurde von Atlas (1981) berichtet, daß diese Ergebnisse nicht mehr reproduziert werden konnten. Darüber hinaus konnten Griffin und Traxler (1981) das zuvor beschriebene anaerobe Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* auf Octan (Traxler und Bernard, 1969) nicht reproduzieren. Vielmehr wurde gezeigt, daß der Stamm anaerob nicht auf Octan, sondern auf Aminosäuren wuchs, die in der Vorkultur ausgeschieden worden waren. Ebenso erhielten Swain und Somerville (1978) mit *Pseudomonas aeruginosa* und Bonin et al. (1992) mit *Pseudomonas nautica* kein anaerobes Wachstum auf Alkanen. Diese wurden aber unter erniedrigten Sauerstoffpartialdrücken bei gleichzeitig ablaufender Nitratreduktion verwertet. Anaerobe Zellsuspensionen von *Pseudomonas stutzeri* verwerteten 1-Dodecanol und Dodecanal, nicht aber Dodecan und 1-Dodecen (Hansen und Kallio, 1957). Somit blieb die Möglichkeit einer anaeroben Verwertung von Alkanen durch nitratreduzierende Bakterien sehr umstritten.

3.2. Arbeiten zum anaeroben Abbau von ungesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen

Im Gegensatz zu den widersprüchlichen Ergebnissen zum anaeroben Alkanabbau wurde der anaerobe Abbau von ungesättigten Kohlenwasserstoffen eindeutig gezeigt.

Mit 1-Hexadecen und Squalen wurden methanogene Anreicherungen erhalten. Nach 3 bis 4 Monaten Inkubation ließ die gebildete Methanmenge auf eine Umsetzung von 78 - 91 % des eingesetzten 1-Hexadecens, bzw. von ca. 50 % des eingesetzten Squalens schließen (Schink, 1985a). Dagegen wurde mit Hexadecan oder Heptadecan keine Methanbildung beobachtet. Gilevicz et al. (1991) beschrieben eine anaerobe Oxidation von 1-Heptadecen durch eine nitratreduzierende Reinkultur. In einem Wachstumsversuch wurden 22 % des eingesetzten 1-Heptadecens umgesetzt. Dagegen wurden Alkane nur in Gegenwart von Sauerstoff verwertet.

Die Ergebnisse von Schink (1985a) und Gilevicz et al. (1991) zeigen, daß eine endständige Doppelbindung den Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe

erleichtert. Vermutlich wird die Doppelbindung durch Hydratisierung zum primären Alkohol angegriffen, wie Schink (1985a) vorgeschlagen hat.

Der anaerobe Abbau des Alkins Acetylen durch das fermentative Bakterium *Pelobacter acetylenicus* wurde von Schink (1985b) beschrieben.

4. Bedeutung des anaeroben Alkanabbaus bei der Erdölförderung

Ein anaerober Abbau von gesättigten Kohlenwasserstoffen hätte für die Erdölförderung große wirtschaftliche Bedeutung. Um die Rolle eines möglichen anaeroben Alkanabbaus dabei genau zu verstehen, ist es notwendig, zunächst auf die Zusammensetzung des Erdöls und die Reservoirbedingungen einzugehen.

Zusammensetzung von Rohöl

Beispiele für die wichtigsten im Rohöl vorkommenden Stoffgruppen sind in Abb. 2 dargestellt. Die Hauptbestandteile des Rohöls lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

(a) *Gesättigte Kohlenwasserstoffe*. Diese umfassen *n*-Alkane, verzweigte Alkane und Cycloalkane (Naphthene); der durchschnittliche Anteil in 517 untersuchten Rohölen beträgt 57,2 % (Tissot und Welte, 1984; S. 381).

(b) *Aromatische Kohlenwasserstoffe*. Diese Gruppe setzt sich aus reinen Aromaten und polycyclischen Kohlenwasserstoffen, die mindestens einen aromatischen Ring enthalten, zusammen. Der durchschnittliche Anteil beträgt 28,6 %. In 87 % der untersuchten Rohöle liegt der Anteil der Aromaten zwischen 20 und 45 %; in 10 % liegt dieser unter 20 %, in 3 % über 45 %.

(c) *Harze und Asphaltene*. Hierbei handelt es sich um hochmolekulare, polycyclische Verbindungen, die N-, S- und O-Atome enthalten. Der durchschnittliche Anteil der Harze und Asphaltene beträgt 14,2 %; allerdings kann dieser in Schwerölen bis zu 60 % betragen. Dieser hohe Anteil ist auf den selektiven mikrobiellen Abbau von Kohlenwasserstoffen zurückzuführen. Rohöle, die keinem mikrobiellen Abbau unterworfen waren, enthalten deutlich weniger Harze und Asphaltene (0 - 40 %).

Neben den Hauptbestandteilen enthält Rohöl auch geringe Mengen an niedermolekularen N-, S- und O-haltigen Verbindungen. Beispiele für S-haltige Verbindungen sind Benzothiophene, die bis zu 23,4 % der aromatischen Fraktion ausmachen können (Tissot und Welte, 1984; S. 397). Außerdem enthält Rohöl

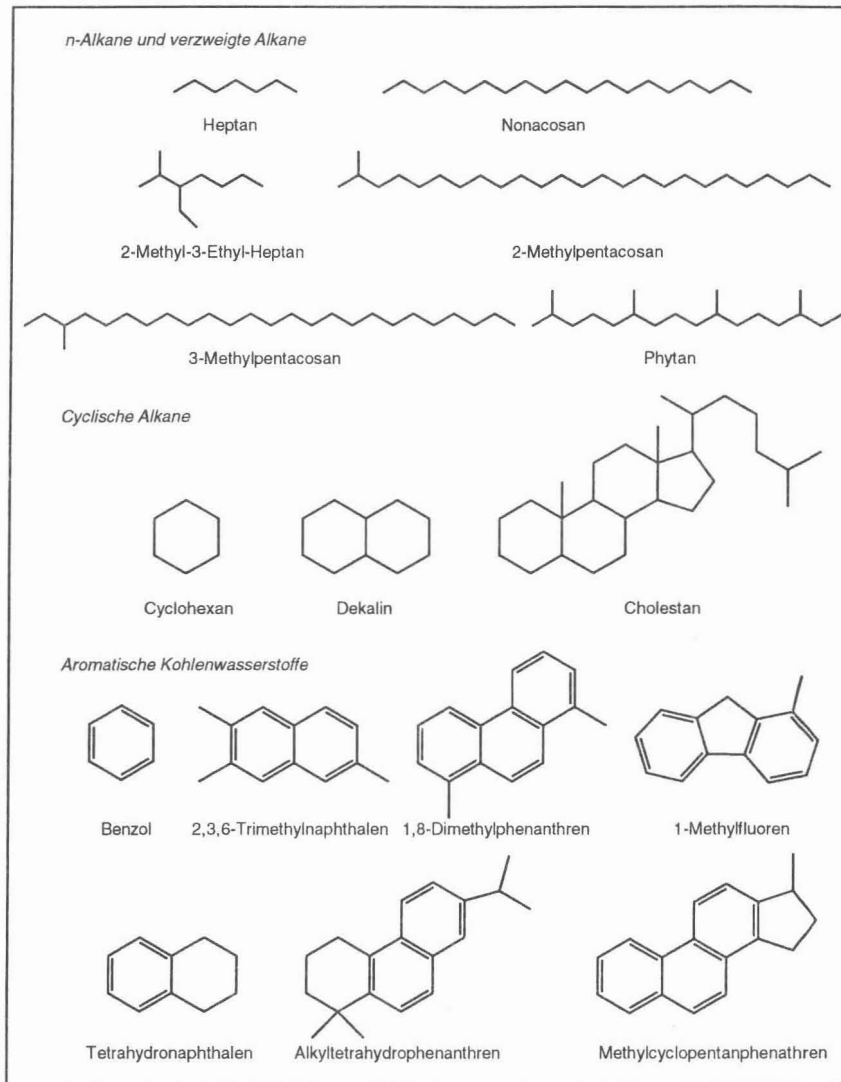
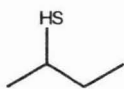
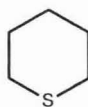


Abb. 2a: Beispiele für Verbindungen der wichtigsten im Rohöl vorkommenden Stoffklassen

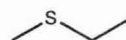
Schwefelhaltige Verbindungen



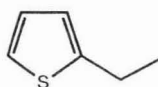
2-Butanethiol



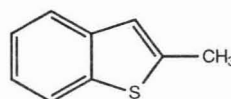
Thiacyclohexan



Methylethylsulfid

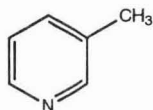


Ethylthiophen

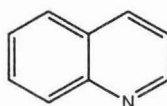


Methylbenzothiophen

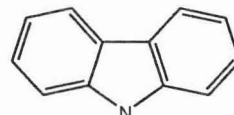
Stickstoffhaltige Verbindungen



Methylpyridin

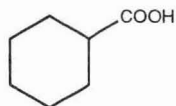


Chinolin

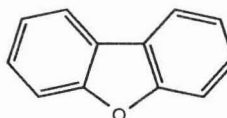


Carbazol

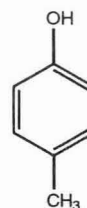
Sauerstoffhaltige Verbindungen



Cyclohexancarbonsäure



Dibenzofuran



p-Cresol

Abb. 2b: Beispiele für Verbindungen der wichtigsten im Rohöl vorkommenden Stoffklassen

geringe Mengen an Thiolen, Thioethern und organischen Dialkylsulfiden. N-haltige niedermolekulare Verbindungen sind z. B. Pyridine, Chinone und Carbazole, die aber nur in geringen Mengen vorkommen. Die wichtigsten O-haltigen Verbindungen im Rohöl sind gesättigte Fettsäuren ($C_1 - C_{20}$) und Cycloalkansäuren. In jungen Rohölen kann der Anteil der Fettsäuren bis zu 2,5 % betragen. Daneben finden sich in Rohölen auch O-haltige aromatische Verbindungen, wie Cresole, Phenol und Furanderivate.

Reservoirbedingungen

Für mikrobielle Aktivitäten in Erdöllagerstätten sind Temperatur, Druck, Redoxbedingungen und Salzgehalt des Porenwassers in den erdöltragenden Formationen von besonderer Bedeutung.

(a) *Druck und Temperatur.* Die Zunahme des Drucks mit der Tiefe liegt zwischen dem hydrostatischen (10,5 kPa/m) und dem lithostatischen Druckgradienten (22,6 kPa/m). In Ölfeldern, die bereits mit Hilfe von Wasserinjektion im Zuge der sekundären Ölförderung ausgebeutet werden, folgt der Druck in der Regel dem hydrostatischen Druckgradienten (Donaldson, 1989).

Ebenso wie der Druck nimmt auch die Temperatur mit der Tiefe zu. Der geothermale Gradient beträgt 18,2°C/km (Donaldson, 1989). In einem Ölfeld mit einer Oberflächentemperatur von 20°C wäre also in 2 km Tiefe eine Temperatur von 56°C und ein Druck von 21 MPa zu erwarten.

(b) *Salzgehalt des Porenwassers.* Auch der Salzgehalt steigt mit der Tiefe nach einem Gradienten von ungefähr 50.000 ppm/km bis zur Sättigungskonzentration, die bei ca. 350.000 ppm liegt (Donaldson, 1989). Die vorherrschenden Ionen sind, nach absteigender durchschnittlicher Konzentration im Formationswasser geordnet, Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} und HCO_3^- . In den meisten Erdöllagerstätten liegen die NaCl-Konzentrationen deutlich über 100.000 mg/l.

(c) *Redoxbedingungen.* Erdöllagerstätten sind normalerweise frei von molekularem Sauerstoff. Allerdings gelangt durch das Einleiten von sauerstoffhaltigem Injektionswasser Sauerstoff in begrenztem Umfang in die Lagerstätten. Somit ist Sulfat der wichtigste Elektronenakzeptor bei der Oxidation von organischem Material durch Mikroorganismen.

Erdöllagerstätten stellen also aufgrund der genannten Bedingungen einen für mikrobielles Leben extremen Lebensraum dar.

Aktivitäten anaerober Bakterien in Erdöllagerstätten und Ölförderanlagen

Trotz der genannten extremen Bedingungen in Erdöllagerstätten gibt es mehrere Arbeiten, die eine Aktivität von anaeroben Bakterien in Ölfeldern beschreiben. In diesen wurde sowohl eine Methanbildung (Ekzertsev, 1960; Nazina et al., 1985) als auch eine Sulfidbildung (Rozanova und Nazina, 1982; Cord-Ruwisch et al., 1986; Ganahl und Kleinitz, 1983) beobachtet. Durch Zählungen in Ölfeldproben oder Anreicherungen aus diesen wurde die Anwesenheit von methanogenen (Ekzertsev, 1960; Nazina et al., 1985) und sulfatreduzierenden Bakterien nachgewiesen (Rozanova und Nazina, 1982; Ganahl und Kleinitz, 1983; Postgate, 1984; Cord-Ruwisch, 1987; Rosnes et al. 1991a,b; Stetter et al., 1993). Ebenso konnte Voordouw mit dem Nachweis von Hydrogenasegenen (Voordouw et al., 1990) oder dem "Reverse Sample Genome Probing" (RSGP) (Voordouw et al., 1991; 1992; 1993) sulfatreduzierende Bakterien in Ölfeldern nachweisen. Bei dem RSGP wird, anders als bei üblichen Methoden, die aus der Probe extrahierte und denaturierte DNS markiert. Diese wird danach auf Filter gegeben, auf die zuvor denaturierte, chromosomale DNS bekannter Typen in Form von "Spots" aufgetragen wurde. Nach der Hybridisierungsreaktion kann dann in den Proben vorhandene DNS der bekannten Typen identifiziert werden.

Sulfatreduzierende Bakterien bereiten insbesondere durch die Bildung von Schwefelwasserstoff bei der Rohölförderung große Probleme (Ganahl und Kleinitz, 1983; Cord-Ruwisch et al., 1986). Schwefelwasserstoff beschleunigt die Korrosion von Eisen und Stahl in den Förderanlagen. Außerdem gefährdet er als flüchtige Verbindung aufgrund seiner Toxizität die Gesundheit des an der Rohölförderung beteiligten Personals. Die Bildung von unlöslichen Sulfiden führt zu einer Verringerung der Permeabilität des erdöltragenden Gesteins und damit zu einer Erniedrigung der Förderausbeute. Schließlich löst sich ein Teil des Schwefelwasserstoffs im Rohöl und verursacht dadurch das sogenannte "Souring", was zu einer Wertminderung des Rohöls führt.

Ob sulfatreduzierende Bakterien auch unter den extremen Bedingungen der Öllagerstätten aktiv sind, wurde von Rosnes (1991a,b) untersucht. Aus Ölreservoirs der Nordsee, in denen Temperaturen von 60 bis 120°C und Drücke von 20 bis 50 MPa herrschen, wurden thermophile sporenbildende Sulfatreduzierer der Gattung *Desulfotomaculum* isoliert. Unter simulierten Reservoirbedingungen wurde mit den isolierten Arten bei Temperaturen bis zu 80°C und bei Drücken bis zu 30 MPa eine Sulfatreduktion nachgewiesen. Außerdem keimten die Sporen noch nach 20minütiger Inkubation bei 130°C aus (Rosnes, 1991b). Dies zeigt, daß die

nachgewiesenen Sulfatreduzierer tatsächlich große Temperaturschwankungen überleben können. Vor kurzem erhielten Stetter et al. (1993) aus Ölfeldern in Alaska und der Nordsee Anreicherungen sulfatreduzierender Bakterien bei 85 und 102°C und konnten im Formationswasser hohe Lebendzellzahlen (10^4 bis 10^7 Zellen l⁻¹) hyperthermophiler Sulfatreduzierer bestimmen.

Neben der Temperatur und dem Druck kann auch die ursprünglich hohe Salzkonzentration (max. 350.000 ppm; Donaldson, 1989) die Sulfidbildung durch sulfatreduzierende Bakterien limitieren. So könnte die häufig beobachtete Stimulierung der Sulfidbildung durch das Einleiten von Injektionswasser (Postgate, 1984; Odom, 1993) auch auf die Erniedrigung der Salzkonzentrationen im Formationswasser zurückzuführen sein. Im Falle der Nordseeölfelder hat die Stimulierung der Sulfidbildung bei der Erdölförderung vermutlich eine andere Ursache. Dort wird die Sulfatkonzentration in dem sonst sulfatarmen Porenwasser der Formation durch das Einleiten von Meerwasser (28 mM Sulfat) erhöht (Rosnes et al., 1991a).

Durch diese Ergebnisse wurde belegt, daß sulfatreduzierende Bakterien in der Lage sind, unter Reservoirbedingungen bei Temperaturen bis zu 102°C Sulfid zu bilden. Eine Sulfidbildung aus Sulfat in Öreservoirs bei Temperaturen von weit über 100°C (ab ca. 150°C) ist ein abiotischer Prozess. Bei diesen hohen Temperaturen komproportioniert Sulfat mit Sulfid zu Schwefel. Dieser reagiert vermutlich mit Kohlenwasserstoffen unter Bildung von CO₂ und H₂S, was einen autokatalytischen Prozeß bedingt (Orr, 1974).

Noch ungeklärt ist die Herkunft der Substrate, die den sulfatreduzierenden Bakterien als Elektronendonatoren zur Sulfidbildung dienen. Als mögliche Quellen kommen (a) organische Säuren im Porenwasser der Formation, (b) zugesetzte Ölfeldchemikalien. (c) Produkte einer aeroben Erdöloxidation und (d) Bestandteile des Erdöls in Frage.

(a) *Organische Säuren*. Die von Rosnes et al. (1991a,b) isolierten *Desulfotomaculum*-Arten verwerteten kurzkettige Fettsäuren, Alkohole, Lactat und H₂. Weil in dem Porenwasser der Erdölformationen aliphatische Fettsäuren von C₂ bis C₆ und geringe Mengen an Benzoat gefunden wurden (Barth, 1991; Means and Hubbard, 1987), ist zu vermuten, daß diese den isolierten und anderen Arten als Substrate dienen.

(b) *Ölfeldchemikalien*. Während der Rohölförderung werden Chemikalien als Korrosionsinhibitoren, Biozide, Demulgatoren oder zur Erhöhung der Viskosität des Injektionswassers eingesetzt. Einige der zugesetzten Substanzen sind nachweislich biologisch abbaubar. Auch wenn dabei nicht jede der Verbindungen

direkt durch sulfatreduzierende Bakterien abgebaut werden kann, führt eine Umsetzung durch gärende Bakterien zu Produkten, die sulfatreduzierenden Bakterien als Substrate dienen. Methanol, das als Lösungsmittel für viele Ölfeldchemikalien dient, wird von einigen Sulfatreduzierern direkt abgebaut, aber auch durch acetogene Bakterien zusammen mit CO_2 zu Acetat umgesetzt (Bache und Pfennig, 1981). Acetat wird bevorzugt von *Desulfobacter*-Arten verwertet. Zur Erhöhung der Viskosität des Injektionswassers wird das Biopolymer Xanthan zugesetzt, welches durch gärende Bakterien anaerob zu Acetat, H_2 und CO_2 abgebaut werden kann (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 eines aeroben Abbaus von Ölbestandteilen.* In Öllagerstätten, die von Natur aus anoxisch sind (Tissot und Welte, 1984), gelangt Sauerstoff nur durch das Einleiten von sauerstoffhaltigem Injektionswasser. Aerobe kohlenwasserstoffoxidierende Bakterien wurden hauptsächlich im Injektionsbereich von Lagerstätten gefunden (Nazina et al., 1985). Beim aeroben Abbau von gesättigten Kohlenwasserstoffen werden häufig langkettige Fettsäuren, Ketone, Aldehyde und Alkohole ausgeschieden. Wenn diese unter anaerobe Bedingungen gelangen, ist eine weitere Verwertung durch sulfatreduzierende Bakterien möglich (Shelton und Hunter, 1975; Jobson et al., 1979; Rozanova und Nazina, 1982; Nazina et al., 1985; Cord-Ruwisch et al., 1986). Außerdem könnte auch die bei der anaeroben Oxidation von Kohlenwasserstoffen entstandene Zellmasse durch anaerobe Bakterien abgebaut werden und schließlich zu einer Sulfatreduktion führen (Cord-Ruwisch et al., 1986).

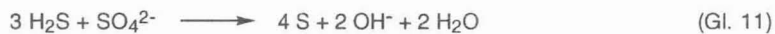
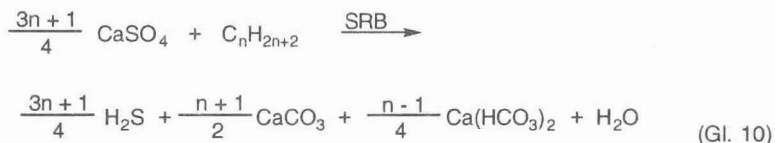
(d) *Anaerober Abbau von Ölbestandteilen.* In einigen alten Arbeiten finden sich Hinweise auf eine anaerobe Verwertung von Rohöl. In anaeroben Ansätzen mit 11 Rohölsorten, die mit anaeroben Schlämmen inokuliert worden waren, wurde nach 6 bis 56 Monaten Inkubation Methanbildung beobachtet (Muller, 1957). Ekzertsev (1960) beobachtete ebenfalls eine Methanbildung in anaeroben Ansätzen mit Rohöl und zerkleinertem ölhaltigem Gestein. Auf einen Abbau von Rohölbestandteilen unter sulfatreduzierenden Bedingungen deutete eine Sulfidbildung in Ansätzen hin, die Rohöl als Substrat enthielten und mit anaeroben Schlämmen beimpft worden waren (ZoBell und Prokopp, 1966). Cord-Ruwisch et al. (1986) erhielten mit ausgefallenen ölhaltigen Asphaltenen aus einem Erdöltank sulfatreduzierende Anreicherungen. Auch die von Stetter et al. (1993) beschriebenen sulfatreduzierenden Anreicherungen aus Ölfeldern waren mit Rohöl als Substrat bei 85 und 102°C erhalten worden. Allerdings blieb ungeklärt,

welche Bestandteile des Rohöls unter anoxischen Bedingungen als Substrate verwertet wurden. Rohöl enthält viele Substanzen, die als reine Substanzen unter anderem durch Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien verwertet werden. Solche durch Reinkulturen sulfatreduzierender Bakterien gut verwertbare Verbindungen, sind *n*-Fettsäuren (Widdel, 1980), Cyclohexancarbonsäure (Widdel, 1988), *p*-Cresol, Phenol (Bak und Widdel, 1986) und Toluol (Rabus et al., 1993). Deshalb läßt eine anaerobe Verwertung von Rohöl noch nicht auf einen anaeroben Abbau von gesättigten Kohlenwasserstoffen schließen.

5. Bedeutung der Verwertung von Erdöl unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei der Entstehung von Schwefellagerstätten

Pro Jahr werden ca. 33 Mio t elementarer Schwefel produziert. Ungefähr die Hälfte davon wird durch den Frasch-Prozeß aus bioepigenetischen Schwefellagerstätten gewonnen. Die Schwefeldeponien sind von Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oder Anhydrit (CaSO_4), Calcit (CaCO_3) und Erdöl umgeben. Der biogene Ursprung dieser Lagerstätten ist durch die Anreicherung des leichten ^{32}S -Isotopes im elementaren Schwefel im Vergleich zu dem im umgebenden Gips oder Anhydrit belegt (Thode et al., 1954). Aus den Beobachtungen wurde folgende Hypothese, die hier nach Ruckmick et al. (1979) vereinfacht dargestellt ist, für die Entstehung von bioepigenetischen Schwefellagerstätten abgeleitet.

Aus Erdöl stammendes organisches Material wird durch sulfatreduzierende Bakterien mit Sulfat als Elektronenakzeptor unter Bildung von Sulfid oxidiert (Gl. 10; SRB = sulfatreduzierende Bakterien). Das dabei entstehende Carbonat lagert sich als Calcit ab. Das gebildete Sulfid wird entweder durch Sulfat (Gl. 11) oder durch Sauerstoff (Gl. 12) zu elementarem Schwefel oxidiert.



Als Hinweis auf ein solches Modell wurde gewertet, daß aus Salzstöcken in der Nähe von Schwefellagerstätten sulfatreduzierende Bakterien angereichert wurden (Butlin, 1953; Davis und Bray, 1969; über Davis und Kirkland, 1979). Allerdings sind die genauen Reaktionen bei der Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel noch ungeklärt. Die Oxidation mit Sauerstoff setzt voraus, daß sauerstoffhaltiges Oberflächenwasser an den Ort der Sulfidbildung gelangte. Eine chemische Oxidation mit Sulfat sollte erst bei höheren Temperaturen erfolgen, als sie in Schwefellagerstätten herrschen (Davis und Kirkland, 1979). Der in diesem Modell vorgeschlagene anaerobe Abbau von Alkanen unter sulfatreduzierenden Bedingungen war bislang nicht bewiesen (A 3.1.). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß ein anaerober Abbau von Alkanen durch sulfatreduzierende Bakterien möglich ist.

6. Zielsetzung der Arbeit

Nach der Isolierung eines sulfatreduzierenden Bakteriums, das anaerob mit Hexadecan wächst, ergaben sich folgende Ziele:

- (a) Nachweis des anaeroben Alkanabbaus in Inkubationsexperimenten mit dem bereits isolierten Stamm Hxd3;
- (b) weitere physiologische Charakterisierung von Stamm Hxd3;
- (c) Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung von weiteren alkanverwertenden, sulfatreduzierenden Stämmen;
- (d) Optimierung der Wachstumsbedingungen auf Alkanen, mit dem Ziel, die Zellmassegewinnung zu verbessern;
- (e) Zellsuspensionsversuche und enzymatische Untersuchungen, um Hinweise auf den Weg des anaeroben Alkanabbaus zu gewinnen.
- (f) vergleichende Untersuchungen mit 1-Alkenen als Substrate für sulfatreduzierende Bakterien.

Material und Methoden

1. Chemikalien und Gase

Handelsübliche Chemikalien mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" bzw. "reinst" wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz) Aldrich (Steinheim), Sigma (München) und Riedel de Haën (Seelze) bezogen. Zum Nachweis der Alkanoxidation dienten reinstes Hexadecan (99,5 % für die Gaschromatographie) der Firma Merck und reinstes Octadecan (99,9 % für die Gaschromatographie) der Firma Riedel de Haën. Das verwendete dickflüssige Paraffinöl (Paraffinum subliquidum) hatte DAB9 Qualität und stammte von der Firma Henry Lamotte (Bremen). Das für Wachstumsversuche mit Alkanen und die routinemäßige Anzucht mit Hexadecan verwendete α -Cyclodextrin wurde von der Firma Wacker (München) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Folgende Gase der Firma Messer-Griesheim (München oder Osterholz-Scharmbeck) wurden verwendet: N₂ (99,999 %), CO₂ (99,995 %), H₂ (99,999 %), synthetische Luft (Kohlenwasserstoff-frei), N₂/CO₂-Gemisch (90/10).

2. Probenmaterial und Organismen

Als Inokulum für mesophile Anreicherungen sulfatreduzierender alkanabbauender Bakterien wurde ein Gemisch anaerober Schlämme von den folgenden marinen Standorten eingesetzt:

Rio de la Pergola (Venedig)
Jadebusen (Nordsee)
Dollart (Nordsee)
Etang de Prévost (Montpellier)
Eel Pond, Woods Hole (Massachusetts)

Als Inokulum für thermophile Anreicherungen sulfatreduzierender alkanabbauender Bakterien wurde Sediment aus dem Guaymas Basin (Baja California) verwendet. Die Proben wurden während einer Forschungsfahrt der

Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole (Massachusetts), im März 1991 mit Hilfe des Tiefseetauchboots Alvin gesammelt.

Für die Mehrzahl der Versuche zum anaeroben Alkanabbau wurde der während der vorangegangenen Diplomarbeit (Aeckersberg, 1989) isolierte Stamm Hxd3 verwendet.

Reinkulturen folgender Bakterien wurden für vergleichende Untersuchungen verwendet:

Desulfotomaculum sapomandens, DSM Nr. 3223

Desulfobacterium autotrophicum, DSM Nr. 3382

Desulfobacterium catecholicum, DSM Nr. 3882

Desulfococcus multivorans, DSM Nr. 2059

Desulfosarcina variabilis, DSM Nr. 2060

Desulfoarculus baarsii, DSM Nr. 2075

Desulfobotulus sapovorans, DSM Nr. 2055

Desulfovibrio desulfuricans, Stamm California, NCIMB Nr. 8326

Für die Anreicherung von aeroben marinen α -Cyclodextrin-Abbauern diente aerober Schlamm aus dem Jadebusen (Nordsee).

3. Nährmedien

3.1. Herstellung von Grundmedien und Stammlösungen

Die hitzestabilen Salze der Grundmedien (Tabelle 1) wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert (Widdel, 1980). Nach dem Abkühlen des Mediums unter einer N_2/CO_2 Atmosphäre (90/10) wurden die hitzelabilen Komponenten des Mediums aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit steriler 2 M HCl- oder 1 M Na_2CO_3 -Lösung auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt. Mit schwachem Überdruck (10 kPa) an N_2/CO_2 (90/10) wurde das Medium über ein gegen Staub geschütztes Glasrohr ("Abfüllglocke") in autoklavierte 50 ml Flaschen gefüllt (Widdel und Bak, 1992), die anoxisch verschlossen wurden (B. 3.2.).

Grundmedien (nach Widdel und Bak, 1992)

(a) Grundmedien für sulfatreduzierende Bakterien.

Tabelle 1: Konzentrationen der hitzestabilen Salze in Grundmedien für sulfatreduzierende Bakterien.

	Süßwasser- ¹ medium [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 ²
NH ₄ Cl	0,25	0,25	0,25 ²
NaCl	1,0	20,0	26,4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4	3,0	5,7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	6,8
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

¹ Brackwassermedium wurde hergestellt, indem aseptisch 1 ml Salzkonzentrat (B 3.1.) zu 50 ml Süßwassermedium gegeben wurde.

² Bei der Herstellung von künstlichem Meerwassermedium wurden diese Salze in einem Teil des Wassers (10 ml) separat autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen (B 3.1.) zugegeben.

- Spurenelement-Lösungen I und II		1 ml/l
- Selenit-Wolframat-Lösung		1 ml/l
- Vitamingemisch I oder II		1 ml/l
- Thiaminlösung		1 ml/l
- Riboflavinlösung		1 ml/l
- Vitamin-B ₁₂ -Lösung		1 ml/l
- NaHCO ₃ -Lösung	für Süß- und Salzwassermedium	30 ml/l
	für synthetisches Meerwassermedium	20 ml/l

- 2 M HCl oder/und 1 M Na₂CO₃ zum Einstellen eines pH-Wertes
zwischen 7,0 und 7,3

- Na₂S-Lösung 1,5 ml/l

Soweit bei einzelnen Versuchen vermerkt, wurden auch andere Konzentrationen bzw. Zusammensetzungen an Spurenelementen, Vitaminen oder Natriumsulfid verwendet.

(b) *Medium für die Anreicherung und Anzucht von aeroben α -Cyclodextrin-verwertenden Bakterien.*

Na ₂ SO ₄	4,0	g/l
K ₂ HPO ₄	1,75	g/l
KH ₂ PO ₄	0,75	g/l
NH ₄ Cl	0,25	g/l
NaCl	20,0	g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3,0	g/l
KCl	0,5	g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15	g/l

Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurde Spurenelementlösung I (1 ml/l) zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl oder 2 M NaOH auf pH 7,0 bis 7,2 eingestellt.

Zusammensetzung der Stammlösungen

(a) *Spurenelemente.*

Spurenelementlösung I (sauer):

HCl (37 %ig)	8,5	ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2100,0	mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190,0	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144,0	mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100,0	mg
H ₃ BO ₃	30,0	mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24,0	mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2,0	mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36,0	mg
dest. H ₂ O	ad 1000,0	ml

Spurenelementlösung II (komplexiert):

Spurenelementlösung II hatte die gleiche Zusammensetzung wie Spurenelementlösung I; nur statt HCl wurden 5,2 g Dinatrium-EDTA zugegeben und der pH-Wert mit NaOH-Lösung unter Rühren auf 6,5 eingestellt.

Selenit-Wolframat-Lösung:

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

Die Spurenelementlösungen I und II und die Selenit-Wolframat-Lösung wurden in Schraubverschußflaschen mit Luftraum autoklaviert.

(b) Vitamine.

Vitamingemisch I (6 Komponenten):

4-Aminobenzoesäure	4 mg
D(+)-Biotin	1 mg
Nicotinsäure	10 mg
Ca-D(+)-Pantothenat	5 mg
Pyridoxin·2HCl	15 mg
Thiamin·2HCl	10 mg
dest. H ₂ O	ad 1000 ml

Vitamingemisch II (8 Komponenten):

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
Ca-D(+)-Pantothenat	5,0 mg
Pyridoxin·2HCl	15,0 mg
Liponsäure	1,5 mg
Folsäure	4,0 mg
2-Mercaptoethansulfonsäure, Natriumsalz	25,0 mg

Thiaminlösung:

NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ , 50 mM, pH 3,7	100,0 ml
Thiamin-2HCl	10,0 mg

Riboflavinlösung:

dest. H ₂ O	100,0 ml
Essigsäure	0,1 ml
Riboflavin	2,5 mg

Vitamin-B₁₂-Lösung:

Cyanocobalamin	5 mg
dest. H ₂ O	ad 100 ml

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

(c) *Natriumbicarbonatlösung.*

NaHCO ₃	84 g/l
--------------------	--------

Die Lösung wurde mit CO₂ gesättigt und in Portionen von 30 ml in 50 ml Flaschen unter CO₂-Atmosphäre autoklaviert.

(d) *Natriumsulfidlösung.*

Na ₂ S·9H ₂ O	240 g/l
-------------------------------------	---------

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

(e) *Salzkonzentrat.*

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

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

3.2. Aufbewahrung des Grundmediums und weitere Zusätze für die Kultivierung

Die Grundmedien wurden entweder in luftblasenfrei gefüllten Schraubverschlußflaschen (50 ml) oder in Röhrchen (20 ml) oder Flaschen (50, 100, 250 und 500 ml) mit Gasraum aufbewahrt; um das Aufrechterhalten des pH-Wertes zu gewährleisten, enthielt der Gasraum ein N₂/CO₂-Gemisch (90/10). Die Begasung erfolgte nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972).

Organische Substrate und andere für das Wachstum benötigte Substanzen wurden aus sterilen Stammlösungen zugesetzt. Danach wurden die Gefäße entweder wieder vollständig gefüllt und luftblasenfrei oder unter Begasung mit dem N₂/CO₂-Gemisch verschlossen.

3.2.1. Elektronendonatoren und Kohlenstoffquellen

Die wasserlöslichen Substrate wurden direkt aus konzentrierten sterilen Stammlösungen in die Kulturgefäße gegeben. Wenn die Substanzen thermolabil waren, wurden die Stammlösungen über Nitrocellulosemembranen (Porengröße: 0,2 µm) sterilfiltriert, ansonsten wurden die Stammlösungen in dicht verschlossenen Flaschen (50, 100 ml) mit Luftraum (ca. 1/3 des Flaschenvolumens) autoklaviert.

Wasserstoff und Kohlendioxid

Die Ansätze wurden nach der Hungate-Technik mit einem H_2/CO_2 -Gemisch (80/20) steril begast. Als Kohlenstoffquelle wurde diesen Ansätzen Acetat (Endkonzentration 2 mM) zugesetzt.

Kohlenwasserstoffe

(a) *Gasförmige Kohlenwasserstoffe.* Die gasförmigen Kohlenwasserstoffe Methan, Ethan, Propan und Butan wurden über eine Spritze, die vorher mehrfach mit dem Gas gespült worden war, in bereits verschlossene und mit einem N_2/CO_2 -Gemisch begaste Röhrchen durch den Stopfen eingespritzt. Die Gase wurden bis zu einem Partialdruck von 60 kPa zugegeben. Die Ansätze waren zur Hälfte mit Medium gefüllt und wurden flach liegend inkubiert, um eine möglichst große Flüssigkeitsoberfläche zu gewährleisten.

(b) *Leicht flüchtige Kohlenwasserstoffe.* Die flüchtigen Kohlenwasserstoffe (Pentan, Hexan, Heptan, Octan, Decan, 1-Hexen, 1-Octen und 1-Decen) wurden durch gegen Lösungsmittel resistente Membranen (regenerierte Cellulose, Porengröße 0,1 μm ; Schleicher und Schuell) sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte in Schraubdeckelröhrchen mit Teflondichtungen. Bereits beimpfte und mit Dithionit (B 3.2.2.) versehene Ansätze wurden mit sterilem und entgastem dickflüssigem Paraffin (B 1.) überschichtet. Die flüchtigen Alkane und Alkene wurden als Reinsubstanzen direkt in die Paraffinphase zu Endkonzentrationen zwischen 1 und 10 % (v/v) pipettiert.

(c) *Schwer flüchtige Kohlenwasserstoffe.* Die schwer flüchtigen Kohlenwasserstoffe (Dodecan, Tetradecan, Pentadecan, Hexadecan, Heptadecan, Octadecan, 1-Tetradecen, 1-Hexadecen und 1-Heptadecen) wurden in Spezialgefäßen (Abb. 3) entgast und unter N_2 -Atmosphäre autoklaviert und gelagert. Die Kohlenwasserstoffe wurden beimpften und mit Dithionit versetzten Ansätzen mit Hilfe von Glaspipetten als Reinsubstanzen zugesetzt. Da Octadecan bei Raumtemperatur fest ist, wurde es vor der Zugabe auf ca. 30°C erwärmt.

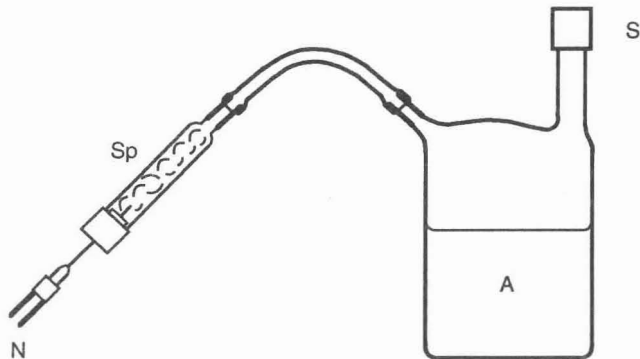


Abb. 3: Vorratsgefäße zur anoxischen Lagerung von sauerstofffreien, sterilen Alkanen oder Alkenen (A). Die mit Watte gestopfte Spritze (Sp) wurde mit einem Stopfen verschlossen, der mit einem Schraubdeckel (S) mit Öffnung gesichert war. So konnte das Gefäß über eine Nadel mit N_2 (N) begast werden. Der autoklavierte oder sterilfiltrierte Kohlenwasserstoff wurde steril in das autoklavierte Gefäß gegeben und durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Die Öffnung war mit einem Schraubdeckel (S) mit Teflondichtung verschlossen. Die Proben wurden durch die Öffnung unter einem ständigem Strom von N_2 entnommen.

Eicosan ist bei der Inkubationstemperatur von 30°C noch fest. Um dennoch eine möglichst große Oberfläche zu erhalten, wurden 20 mg in einem Röhrchen autoklaviert und dann durch Zugabe von ca. 2 ml sterilem Petroleumbenzin gelöst. Das Röhrchen wurde fast waagrecht unter einem Strom von sterilem Stickstoff solange gedreht bis das Petroleumbenzin verdampft war. Das Eicosan bildete dabei einen Belag an der Wand des Röhrchens. Dieses wurde darauf mit sterilem Stickstoff begast, mit einem Gummistopfen verschlossen und ca. 12 h inkubiert; auf diese Weise wurde adsorbierter Sauerstoff aus dem Eicosan entfernt. Am nächsten Tag wurde das Medium unter Begasung mit Stickstoff eingefüllt. Die Ansätze wurden beimpft, unter N_2/CO_2 verschlossen und inkubiert.

Carbonsäuren

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden die Säuren unter Rühren mit einer nahezu äquivalenten Menge an 4 M NaOH versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde dann mit 1 M NaOH zwischen 8 und 9 eingestellt. Danach wurde mit dest. H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die langkettigen, wasserunlöslichen Säuren wurden nach der Zugabe einer äquivalenten Menge an NaOH so lange im siedenden Wasserbad erhitzt und gerührt, bis die Lösung klar und homogen war. Dann wurde das Endvolumen mit destilliertem Wasser eingestellt. Bevor die langkettigen Carbonsäuren dem Medium zugesetzt werden konnten, mußte die beim Abkühlen als weiße Masse erstarrte Lösung wiederum im siedenden Wasserbad verflüssigt werden. Danach wurde die klare, homogene Lösung dem Medium heiß zugesetzt. Um eine möglichst feine Verteilung der bei der Zugabe ausfallenden Erdalkalisalze ("Kalkseifen") zu erreichen, wurden die geschmolzenen Natriumsalze zunächst in Süßwassermedium (B 3.1.) gegeben. Dieses wurde dann durch Zusatz steriler Stammlösungen von 5 M NaCl, 2 M MgCl₂·6H₂O und 2 M CaCl₂·2H₂O in Salzwassermedium (B 3.1.) oder künstliches Meerwassermedium (B 3.1.) überführt. Weil sich die Flocken der neutralisierten Säure am Boden des Inkubationsgefäßes sammelten, wurde dieses flach liegend inkubiert; so war eine große Oberfläche des unlöslichen Substrats gewährleistet.

In Tabelle 2 sind die Konzentrationen der Stammlösungen und die Endkonzentrationen in den Ansätzen aufgeführt:

Tabelle 2: Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen der in Wachstumsversuchen als Kohlenstoff- und Energiequellen verwendeten organischen Säuren.

	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration [mM]
Monocarbonsäuren, Na-Salze:		
Formiat	5,0	10,0 - 20,0
Acetat	2,0	5,0 - 10,0
Propionat	1,0	3,0 - 6,0
Butyrat	1,0	2,0 - 4,0
Isobutyrat	1,0	2,0 - 4,0
Valerianat	1,0	2,0 - 4,0
2-Methylbutyrat	1,0	2,0 - 4,0
Isovalerianat	1,0	2,0 - 4,0
Capronat	1,0	1,5 - 3,0
Caprylat	0,2	1,0 - 2,0
Tetradecanat	0,1	0,5 - 1,0
Pentadecanat	0,1	0,5 - 1,0
Palmitat	0,1	0,5 - 1,0
Heptadecanat	0,1	0,5 - 1,0
Stearat	0,1	0,5 - 1,0
Dicarbonsäuren, Na-Salze:		
Succinat	1,0	3,0 - 6,0
Malat	1,0	2,0 - 4,0
Fumarat	1,0	2,0 - 4,0
Glutarat	1,0	2,0 - 4,0
Sonstige Carbonsäuren, Na-Salze:		
Lactat	1,0	4,0 - 8,0
Pyruvat	1,0	4,0 - 8,0
Citrat	0,8	2,0 - 4,0
Benzoat	1,0	1,5 - 3,0
Aminosäuren:		
Glycin	1,0	10,0 - 20,0
Alanin	1,0	5,0 - 10,0
Serin	1,0	8,0 - 16,0
Aspartat, Mononatriumsalz	1,0	5,0 - 10,0
Glutamat; Mononatriumsalz	1,0	5,0 - 10,0

Alkohole

Die unlöslichen, festen Alkohole 1-Hexadecanol und 2-Hexadecanol wurden so behandelt, wie unter B 3.2.1. für Eicosan beschrieben wurde. Der flüssige und schlecht wasserlösliche Alkohol 1-Decanol wurde wie die leicht flüchtigen Alkane in Konzentrationen von 1 und 2 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin (B 1.) eingesetzt. In Tabelle 3 sind für die wasserlöslichen Alkohole die Konzentrationen der Stammlösungen und die Endkonzentrationen im Medium aufgeführt.

Tabelle 3: Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen der in Wachstumsversuchen als Kohlenstoff- und Energiequellen verwendeten Alkohole.

	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration [mM]
Methanol	2,0	7,0 - 14,0
Ethanol	2,0	4,0 - 8,0
1-Propanol	2,0	3,0 - 6,0
1-Butanol	2,0	2,0 - 4,0

Sonstige Substrate (Tabelle 4)

Tabelle 4: Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen der in Wachstumsversuchen als Kohlenstoff- und Energiequellen verwendeten Zucker.

	Konzentration der Stammlösung [M]	Endkonzentration [mM]
Glucose	1,0	3,0 - 6,0
Fructose	1,0	3,0 - 6,0

Aldehyd

Decanal wurde, wie für die leicht flüchtigen Alkane beschrieben, direkt in eine Paraffinphase pipettiert. Dabei wurden Konzentrationen von 1 und 2 % (v/v) in dickflüssigem Paraffin (B 1.) verwendet.

Rohöl

Das sauerstofffreie Rohöl wurde entweder direkt in beimpfte und mit Dithionit versetzte Ansätze pipettiert oder in einer Paraffinphase verdünnt. Rohöl wurde in Spezialgefäßen (Abb. 3) unter N₂-Atmosphäre autoklaviert und aufbewahrt.

3.2.2. Sonstige Zusätze

Suppline

Suppline wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und in verschlossenen 50 ml Schraubverschlußflaschen autoklaviert und aufbewahrt.

Table 5: Konzentrationen der Stammlösungen und Endkonzentrationen der in Wachstumsversuchen verwendeten Suppline.

	Konzentration der Stammlösung [g/l]	Endkonzentration [g/l]
Pepton	100,0	0,1 - 2,5
Trypticase	50,0	0,1 - 2,5
Hefeextrakt	100,0	0,1 - 2,5

Natriumdithionit

Dithionit diente in Wachstumsversuchen als zusätzliches oder alleiniges Reduktionsmittel. Kurz vor dem Beimpfen wurden den Ansätzen pro l Medium 0,6 ml einer 5 %igen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Stammlösung oder ca. 20 mg pulverförmiges $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ aus einem trockenen Vorratsgefäß aseptisch zugesetzt.

Da gelöstes Dithionit durch Luftoxidation schnell zu Bisulfit oxidiert wird, wurde die Stammlösung in einem Spezialgefäß (Widdel und Bak, 1992) unter N_2 -Atmosphäre hergestellt. Unter diesen Bedingungen ist die Stammlösung im Dunkeln bei 4°C ca. eine Woche haltbar.

Resazurin

Resazurin diente in Wachstumsansätzen als Redoxindikator. 20 mg Resazurin wurden in 20 ml dest. H_2O gelöst. Die Lösung wurde in einer verschlossenen Schraubdeckelflasche autoklaviert und dunkel aufbewahrt.

Antibiotika

Folgende Stammlösungen von transkriptions- oder translationsinhibierenden Antibiotika wurden hergestellt:

Streptomycin	1 mg/ml
Tetracyclin	1 mg/ml
Erythromycin	20 mg/ml
Rifampicin	20 mg/ml
Kanamycin	2 mg/ml

Erythromycin wurde in 70 %igem Ethanol und Rifampicin in Methanol gelöst. Alle anderen Antibiotika wurden in wässrigen Lösungen hergestellt. Die Lösungen wurden über Nitrocellulose-Membranen (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

α-Cyclodextrin

Das Wachstum der Stämme Hxd3 und Pnd3 auf Alkanen wurde durch α-Cyclodextrin stimuliert. Wachstumsansätzen mit Alkanen als Substrat wurde α-Cyclodextrin aus einer wässrigen Stammlösung zugesetzt.

Die Stammlösung mit 100 g/l α-Cyclodextrin wurde durch dreimaliges Ausschütteln unter N₂-Atmosphäre anaerobisiert und unter N₂-Atmosphäre autoklaviert und gelagert.

4. Isolierungen von Bakterien**4.1. Verdünnungsreihe in Agar**

Zur Isolierung von alkanabbauenden sulfatreduzierenden Bakterien wurden Agarverdünnungsreihen verwendet (Widdel und Bak, 1992).

4.2. Ausstrich auf Agarplatten

Die Isolierung von aeroben α-Cyclodextrin-abbauenden Bakterien erfolgte durch Ausstreichen auf Agarplatten nach der Dreistrichmethode.

4.3. Reinheitskontrollen

War nach einem Isolierungsschritt ein einheitlicher Zelltyp im Mikroskop zu erkennen, wurde die Kultur in verschiedenen Medien auf Reinheit geprüft. Bei der Reinheitskontrolle der mesophilen Isolate Hxd3 und Pnd3 wurden dem Medium folgende Substrate und Suppline zugesetzt:

- (i) 4 mM Propionat, 3 mM Butyrat, 2 mM Capronat mit 0,5 oder 5,0 g/l Pepton
- (ii) 15 mM Pyruvat mit 0,5 oder 5,0 g/l Hefeextrakt
- (iii) 10 mM Glucose mit 0,5 oder 5,0 g/l Hefeextrakt

5. Kultivierungsmethoden und Gewinnung von Zellmasse

5.1. Stammkulturen und Wachstumsversuche

Als Gefäße zur routinemäßigen Anzucht dienten 20 ml Schraubdeckelröhrchen. Das Grundmedium wurde aus der Abfüllvorrichtung (Widdel und Bak, 1992) oder mit einer 50 ml Vollpipette aus den Vorratsfläschchen (B 3.1.) in die leeren, autoklavierten Röhrchen bis zu einer Markierung (15 ml) gefüllt. Beim Auslaufen des Mediums wurde die Pipettenspitze in das Medium getaucht und knapp unter der Flüssigkeitsoberfläche nachgeführt, um den Kontakt mit Luft so gering wie möglich zu halten. Danach wurden die jeweils benötigten Elektronendonatoren, Suppline oder Elektronenakzeptoren aus sterilen Stammlösungen zugegeben. Die Röhrchen wurden am Schluß nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972) mit einem für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes erforderlichen Gehalt an CO₂ in N₂ (B 3. 2.) steril begast und mit sterilen Stopfen verschlossen. Waren die verwendeten Substrate unlöslich, wurden die Röhrchen flach liegend inkubiert, um eine möglichst große Grenzfläche zwischen Substrat und Medium zu gewährleisten.

Für die Kultivierung mit löslichen Substraten oder langkettigen Fettsäuren wurden außerdem 50 ml Schraubdeckelflaschen verwendet. Die Schraubdeckelflaschen wurden nach dem Beimpfen gasblasenfrei verschlossen.

5.2. Massenanzucht

Zur Anzucht von Zellmasse auf Alkanen oder Alkenen für Umsatzmessungen in Zellsuspensionsversuchen oder die Bestimmung der Zellfettsäuren wurden 500 ml Meplat-Flaschen verwendet. Die Flaschen wurden mit 350 ml Medium bis zu einem Eichstrich gefüllt. Dann wurden α -Cyclodextrin (Endkonzentration 5 g/l) und Natriumdithionit (Endkonzentration 30 mg/l) zugesetzt und mit ca. 20 ml einer auf Palmitat oder Stearat gewachsenen Vorkultur beimpft. Vor dem Begasen und Verschließen der Flaschen wurden jeweils 2 ml reines anaerobisiertes Alkan oder Alken zugegeben.

Die Flaschen wurden mit dem Stopfen nach unten inkubiert (Abb. 4), um einen Kontakt zwischen Kohlenwasserstoffphase und dem Stopfen zu verhindern und eine möglichst große Grenzfläche zwischen Medium und Kohlenwasserstoff herzustellen. In der ersten Woche während der Inkubation wurden die Flaschen ruhig liegend inkubiert und einmal am Tag per Hand kurz geschüttelt. Danach wurden die Ansätze auf einem Schüttler mit 65 rpm bis zum Ende des Wachstums inkubiert.

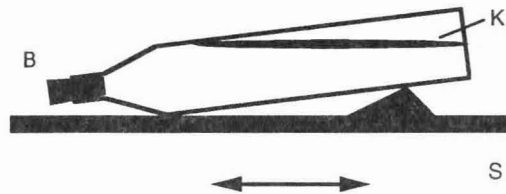


Abb. 4: Anzuchten von Stamm Hxd3 in 500 ml Flachflaschen (Meplat-Flaschen) auf Kohlenwasserstoffen. Die Flaschen wurden mit dem Butylstopfen (B) nach unten auf einem Schüttler (S) gelagert, um zu vermeiden, daß die Kohlenwasserstoffphase (K) die Stopfen berührt.

Die Ernte der Zellen erfolgte in einer Anaerobenkammer. Dabei wurde der Inhalt der Flaschen in einen Scheidetrichter gefüllt, um die Kulturflüssigkeit von dem aus Kohlenwasserstoff und α -Cyclodextrin gebildeten Niederschlag und der Kohlenwasserstoffphase zu trennen.

Mit langkettigen Fettsäuren als Substrat wurden Zellen der mesophilen Isolate in 500 ml Meplat-Flaschen oder 1 l Steilbrustflaschen angezogen. Bei der Inkubation wurden die Flaschen flach liegend gelagert, um eine möglichst gute

Verteilung der als Flocken ausgefallenen Erdalkalisalze der Fettsäuren zu gewährleisten.

6. Analytische Methoden

6.1. Qualitativer Schnellnachweis von Schwefelwasserstoff

Mit dem Schnellnachweis für H_2S (Cord-Ruwisch, 1985) wurde geprüft, ob sulfatreduzierende Bakterien in Wachstumsversuchen und Substrattests die eingesetzten Substanzen unter den jeweiligen Bedingungen als Elektronendonatoren verwendeten.

Als Reagenz diente 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 diese durch Schütteln vermischt. Es bildete sich braunes, anfangs kolloidales CuS , das nach 1 - 3 min in Form brauner Flocken ausfiel. Anhand der Intensität der Braunfärbung war eindeutig zu erkennen, ob ein Ansatz im Vergleich zu einer Kontrolle viel, wenig oder keinen Schwefelwasserstoff gebildet hatte.

6.2. Quantitative Bestimmung von Schwefelwasserstoff

Zur quantitativen Bestimmung von Schwefelwasserstoff über die Bildung von Methylenblau wurde das von Cline (1969) beschriebene Verfahren modifiziert. Das Testvolumen wurde von 50 auf 4 ml reduziert.

Reagenzien

Lösung A: Konzentrierte Zinkacetat-Lösung

Zn-Acetat·2 H_2O	20,0 g
Essigsäure (100 %)	1,0 ml
dest. Wasser	ad 1000,0 ml

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

In 500 ml dest. H_2O wurden langsam unter Rühren im Eisbad 200 ml konz. H_2SO_4 gegeben. Der abgekühlten verdünnten Schwefelsäure wurden 2 g Dimethyl-*p*-

phenylendiammonium-dichlorid zugesetzt. Danach wurde im Meßzylinder mit dest. Wasser auf 1000 ml Endvolumen aufgefüllt. Die fertige Lösung ist stark sauer und carcinogen. Daher sollte ein Kontakt der Lösung mit der Haut vermieden werden. Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung 1:2,5 mit dest. H₂O verdünnt.

Lösung C:

Eisen(III)-ammoniumsulfat·12H ₂ O	10,0 g
konz. H ₂ SO ₄	2,0 ml
dest. H ₂ O	ad 100,0 ml

Kurz vor Gebrauch wurden die Lösung 1:50 mit dest. H₂O verdünnt.

Durchführung der Bestimmung

In ein kleines Reagenzglas (120 x 11 mm) wurden nacheinander pipettiert:

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

Die Proben wurden den verschlossenen Kulturgefäßen über die Stopfen mit Mikroliterspritzen (10, 25 µl) entnommen und in die Zinkacetatlösung pipettiert. Dabei wurde die Spitze der Spritze in die Lösung getaucht. Nachdem 1 ml dest. H₂O und dann 1 ml der verdünnten Lösung B zugegeben worden waren, wurde das Röhrchen mit einem Stopfen verschlossen und zum Durchmischen einmal umgeschwenkt. Unmittelbar danach wurde 1 ml der verdünnten Lösung C zugesetzt und ein weiteres Mal umgeschwenkt. Die Ansätze wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur ca. 20 min. inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 670 nm gemessen.

Eine Eichkurve wurde mit einem Na₂S-Standard erstellt. Ein farbloser klarer Kristall Na₂S·9H₂O wurde auf einem Sieb zur Entfernung von Oxidationsprodukten kurz mit dest. H₂O abgespült und durch Abtupfen des Siebes von unten mit Zellstoff von anhängenden Tropfen befreit. Der Kristall wurde gewogen und sofort in einen 1 l Meßkolben, der ca. 900 ml sauerstofffreies destilliertes Wasser unter einer N₂-Atmosphäre enthielt, gegeben. Der Meßkolben wurde mit destilliertem H₂O auf 1000 ml aufgefüllt, mit N₂ 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 Flaschen verteilt. Diese wurden mit N_2 begast, mit einem Stopfen verschlossen und bei 4°C aufbewahrt. Die mit Hilfe des Standards erstellte Eichkurve war nicht linear. Der Extinktionskoeffizient nahm mit zunehmender Konzentration von Na_2S ab (Abb. 5).

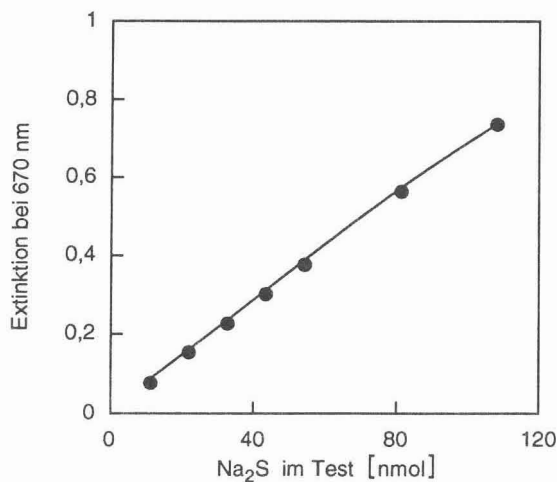


Abb. 5: Eichgerade zur quantitativen Bestimmung von Sulfid. Als Eichlösung wurde eine 5,4 mM Na_2S -Lösung verwendet. Die eingesetzten Extinktionswerte wurden durch Mittelung von 3 Meßwerten gebildet.

6.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Zellextrakt wurde mit Coomassie-Reagenz (Bio-Rad) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bestimmt (Bradford, 1976). 0,8 ml einer verdünnten Probe oder Standardlösung wurden mit 0,2 ml Farbreagenz auf einem Vortex-Mixer gut vermischt und ca. 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Blindwert dienten ein Ansatz aus 0,8 ml H_2O mit 0,2 ml Reagenz. Für die Eichung wurden Lösungen bekannter Konzentrationen an Rinderserum-Albumin verwendet.

6.4. Gravimetrische Sulfatbestimmung

Durch die Kulturlösung wurde solange CO_2 geleitet bis alles H_2S ausgetrieben war. Dann wurde 20 min bei 10.000 g zentrifugiert. Definierte Volumina des Überstandes von 2 bis 8 ml wurden mit HCl zu einer Endkonzentration von 0,1 M angesäuert und im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Eine 0,5 M BaCl_2 -Lösung wurde zu einer Endkonzentration von 0,1 M zugegeben. Der gebildete weiße Niederschlag von BaSO_4 wurde aus der abgekühlten Probe quantitativ abfiltriert. Dazu wurden mit HCl (100 mM) gewaschene Membranfilter aus Cellulosenitrat (Porengröße 0,2 μm), die bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C getrocknet und gewogen worden waren, und eine Vakuumflasche mit Absaugfritte verwendet. Dann wurde mit ca. 5 ml dest. Wasser nachgewaschen. Die Filter wurden bei 80°C getrocknet und schließlich gewogen.

6.5. Bestimmung reduzierender Zucker

Das von Kidby und Davidson (1973) beschriebene Verfahren zur Bestimmung reduzierender Zucker wurde in modifizierter Form verwendet.

Reagenz

$\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	628 mg
K_2HPO_4	1400 mg
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	132 mg
dest. H_2O	ad 100 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Schraubdeckelflasche bei 4°C aufbewahrt.

Durchführung der Bestimmung

Zu 1 ml der Probenlösung wurde 0,25 ml Reagenz pipettiert und das Gemisch für 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach schneller Abkühlung der Proben mit Leitungswasser wurden sie mit je 9,0 ml dest. H_2O verdünnt und ihre Extinktion bei 237 nm in Quarzküvetten bestimmt.

Glucose konnte im Konzentrationsbereich von 10 bis 200 μM reproduzierbar nachgewiesen werden. Mit einer Glucosestandard-Lösung wurde eine Eichgerade erhalten, anhand derer die Konzentrationen in den Proben bestimmt wurden.

6.6. Bestimmung von Hexadecan

Das aus Wachstumsansätzen mit Hexan extrahierte Hexadecan wurde gaschromatographisch bestimmt. Es wurde jeweils 1 µl der Lösung von Hexadecan in Hexan eingespritzt. Zum Eichen dienten Lösungen bekannter Konzentration von Hexadecan in Hexan. Das verwendete Material und die Meßbedingungen waren wie folgt:

Gerät		Carlo Erba 6000
Säule:	Länge	2,0 m
	Durchmesser	2 mm
	Material	15 % Apiezon L auf Chromosorb W NAW; 80 - 100 mesh
Trägergas		N ₂
Eingangsdruck		2,5 atü
Trägergasfluß		60 ml/min
Detektor		FID
Brenngas		H ₂ /Luftgemisch
Eingangsdruck: H ₂		2,5 atü
Brenngasfluß: H ₂		40 ml/min
Eingangsdruck: Luft		2,5 atü
Brenngasfluß: Luft		480 ml/min
Temperatur:	Injektor	290°C
	Säule	230°C
	Detektor	250°C

6.7. Bestimmung der Zellfettsäuren

Die Anzucht von Kulturen zur Bestimmung von Zellfettsäuren erfolgte in einem Volumen von 1 l. Dabei wurde mit einer Vorkultur beimpft, die bereits auf dem gleichen Substrat gewachsen war. Nach dem Ende des Wachstums wurden die Zellen geerntet und bis zur weiteren Verwertung bei -20°C gelagert.

Die Zellfettsäuren wurden als Methylester gaschromatographisch bestimmt. Die Veresterung und Isolierung der Zellfettsäuren erfolgte nach Sasser (1990).

Herstellung der Methylester der Zellfettsäuren(a) *Reagenzien.*

Reagenz 1 (Verseifung):

NaOH	45,0 g
Methanol	150,0 ml
dest. H ₂ O	150,0 ml

Reagenz 2 (Veresterung):

HCl (6 N)	325,0 ml
Methanol	275,0 ml

Reagenz 3 (Extraktion):

Hexan	200,0 ml
Methyl-tert.-Butylether	200,0 ml

Reagenz 4 (Reinigung der Probe):

NaOH	10,8 g
NaCl	240,0 g
dest. H ₂ O	ad 900,0 ml

(b) *Durchführung der Veresterung.*

(i) Verseifung. Ungefähr 40 mg Zellmaterial wurden in ein Röhrchen gegeben, das sich mit einem Schraubdeckel mit Teflondichtung verschließen läßt. Dann wurde 1,0 ml Reagenz 1 zugesetzt, die Röhrchen mit dem Schraubdeckel verschlossen und 5 min im siedendem Wasserbad erhitzt. Darauf wurden die Röhrchen auf einem Vortex-Mixer 5 - 10 s kräftig geschüttelt und weitere 25 min im siedenden Wasserbad erhitzt.

(ii) Veresterung. Den abgekühlten Röhrchen wurden 2 ml Reagenz 2 zugesetzt; die verschlossenen Röhrchen wurden für 10 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt (Zeit und Temperatur sind bei diesem Schritt genau einzuhalten).

(iii) Extraktion. Nach Zugabe von 1,25 ml Reagenz 3 zu den abgekühlten Röhrchen wurden diese für 10 min auf einem Schüttler bei ca. 100 rpm inkubiert. Danach wurde die wässrige (untere) Phase verworfen.

(iv) Reinigung. Der verbliebenen organischen Phase wurden ungefähr 3 ml Reagenz 4 zugegeben, worauf die Röhrchen für 5 min bei ca. 100 rpm auf dem Schüttler inkubiert wurden. Etwa 2/3 der organischen Phase wurden in ein GC-Vial pipettiert, das danach verschlossen wurde. Die Proben waren nun fertig für die gaschromatographische Analyse.

Gaschromatographische Analyse der Methylester der Zellfettsäuren

Jeweils 1 µl der Probe wurde eingespritzt. Das verwendete Material und die Meßbedingungen der gaschromatographischen Bestimmungen waren wie folgt:

Gerät	Perkin Elmer Autosystem
Säule	OV 351 (Perkin Elmer)
Trägergas	N ₂
Trägergasfluß	3 ml/min (Säule)
Splitventil	10 ml/min
Detektor	FID
Brenngas	Gemisch aus H ₂ und synthetischer Luft
Brenngasfluß H ₂	50 ml/min
Brenngasfluß Luft	420 ml/min
Injektortemperatur	250°C
Detektortemperatur	270°C
Säulentemperaturgradient	170°C, 8 min isotherm 170°C bis 210°C, 2°C/min 210°C, 2 min isotherm

Die Identifikation der Fettsäuremethylester erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen bekannter Standards (Supelco).

Ein Teil der Bestimmungen wurde freundlicherweise von Dr. Kroppenstedt, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, übernommen.

6.8. Bestimmung des GC-Gehaltes der DNS

Das für die Gewinnung von DNS benötigte Zellmaterial von Stamm Hxd3 wurde in einem Kulturvolumen von 4 l auf Stearat angezogen. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge bei 6.000 rpm 25 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei der DNS-Isolierung auf Eis gelagert. Die Isolierung der DNS erfolgte nach Marmur (1961), wobei alle Schritte der DNS-Isolierung mit sterilen Lösungen durchgeführt wurden. Der GC-Gehalt der isolierten DNS wurde durch thermische Denaturierung (Marmur und Doty, 1962) ermittelt.

Als Vergleich diente *Escherichia coli* K12, Nr. 498, aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen; der GC-Gehalt von Stamm K12 beträgt 51,7 mol%.

6.9. Analyse der 16S rRNS

Das benötigte Zellmaterial wurde auf Stearat in einem Kulturvolumen von 2 l angezogen. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge bei 6.000 rpm 25 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung auf Trockeneis gelagert. Die Sequenz der 16S rRNS von Stamm Hxd3 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Wolfgang Ludwig, TU München, bestimmt.

Für die Preparation der chromosomalen DNS, die in vitro Amplifikation der 16S rRNA Gene und die Sequenzierung der amplifizierten DNS wurden die von Weizenegger et al. (1991) beschriebenen Methoden verwendet. Die 16S rRNS-Gen-Sequenzen wurden mit mehr als 900 homologen Sequenzen für vergleichende Analysen in ein Alignment¹ eingesetzt. Mit diesem wurden Distanz Matrizen unter Verwendung eines neuen Programmes (SEQDIS [Stuckmann und Ludwig, nicht publiziert]) berechnet. Phylogenetische Stammbäume wurden durch Verwendung der Distanz-Matrix², Maximum-Parsimony³ und Maximum-Likelihood⁴ Methoden mit Hilfe der Programme NEIGHBOR und DNAPARS des PHYLIP Paketes (Felsenstein, 1982) und fastDNAmI erstellt.

¹ Alignment: Untereinanderschreiben verschiedener Gensequenzen, so daß homologe Abschnitte in der gleichen Spalte liegen.

² Distanz-Matrix Methode: Der phylogenetische Abstand zweier Sequenzen wird aus dem Anteil der unterschiedlichen Basen bestimmt.

³ Maximum Parsimony: Die Stammbäume werden unter der Annahme der geringsten Anzahl an Mutationen erstellt

⁴ Maximum Likelihood: Die Stammbäume werden durch Ermittlung des wahrscheinlichsten Mutationsweges erstellt.

7. Bestimmung der Bilanz der anaeroben Alkanoxidation

7.1. Wachstumsversuche in zugeschmolzenen Glasampullen

Zur Bilanzierung des anaeroben Alkanabbaus wurden Wachstumsansätze in zugeschmolzenen Glasampullen hergestellt. Diese wurden verwendet, um eine Diffusion von Sauerstoff in die Ansätze während der langen Inkubationszeiträume auszuschließen. Außerdem kommt in zugeschmolzenen Glasröhrchen weder das Medium noch die Hexadecanphase mit Stopfenmaterial, aus dem sich Verunreinigungen lösen könnten, in Berührung.

Analyse des hochreinen Hexadecans

In den Wachstumsversuchen wurde hochreines Hexadecan (99,5 %ig) verwendet. Um auszuschließen, daß eine mögliche Sulfatreduktion durch die Verwertung von eventuell vorhandenen Verunreinigungen im hochreinen Hexadecan verursacht wurde, wurde die Reinheit des Hexadecans geprüft. Stamm Hxd3 verwertet neben Alkanen langkettige Fettsäuren, Alkohole und 1-Alkene. Deshalb sollte geprüft werden, ob diese Verbindungen im hochreinen Hexadecan als Verunreinigungen enthalten sind.

(a) *Test auf langkettige Alkohole.* Dazu wurde die Hexadecanphase vorsichtig mit konz. Schwefelsäure unterschichtet. Mit Hexadecan, dem mindestens 0,25 % 1-Hexadecanol oder 2-Hexadecanol zugesetzt worden war, war die Bildung von gelblichen Estern an der Phasengrenze zu beobachten. Wenn sterilfiltriertes oder autoklaviertes hochreines Hexadecan eingesetzt wurde, wurde keine Bildung von Estern beobachtet.

(b) *Test auf langkettige Fettsäuren.* Die Hexadecanphase wurde mit 0,2 N NaOH vorsichtig unterschichtet. Wenn dem Hexadecan zuvor min. 0,1 % Palmitinsäure zugesetzt worden war, konnte an der Phasengrenze die Bildung der weißen Na-Salze der Palmitinsäure beobachtet werden. Dagegen waren die Salze mit hochreinem autoklaviertem oder sterilfiltriertem Hexadecan nicht zu beobachten.

(c) *Test auf langkettige Alkene.* Die Anwesenheit von Alkenen im hochreinen Hexadecan wurde durch Aufnahme eines UV-Spektrums von 200 bis 250 nm geprüft. Das UV-Spektrum von Hexadecan, dem 0,1 % (v/v) 1-Hexadecan zugesetzt worden waren, enthielt bei 202 nm einen Peak mit einer Absorption von ungefähr 0,3. Mit hochreinem autoklaviertem oder sterilfiltriertem Hexadecan wurde im Meßbereich kein Peak detektiert. Die Eichung der photometrischen Messungen erfolgte gegen Luft.

Diese Ergebnisse wurden durch gaschromatographische Kontrollen des hochreinen Hexadecans bestätigt. Dazu wurden Lösungen von hochreinem autoklaviertem oder sterilfiltriertem Hexadecan in Hexan hergestellt und jeweils 1 µl eingespritzt. Unter den verwendeten Meßbedingungen (B 6.6.) konnte 1-Hexadecan von Hexadecan getrennt werden und noch in einer Konzentration von weniger als 0,1 % (v/v) in Hexadecan detektiert werden. Als einzige Verunreinigungen in dem hochreinen Hexadecan wurden geringe Mengen (weniger als 0,05 %) an Pentadecan und Heptadecan gefunden.

Herstellung der Inkubationsgefäße und Beschickung mit Hexadecan

40 ml Reagenzgläser aus Duranglas (Schott) wurden mit Hilfe eines Gebläsebrenners wenige cm unterhalb der Öffnung verjüngt (Abb. 6), um das Zuschmelzen nach dem Fertigstellen der Ansätze zu erleichtern. Die verjüngten Reagenzgläser wurden mit Wattestopfen verschlossen und autoklaviert.

Das als Substrat verwendete Hexadecan war hochrein (99,5 %ig, Eichsubstanz für die Gaschromatographie). Es wurde in kleinen Glasröhrchen mit Schraubdeckeln und Teflondichtung autoklaviert. Bei der Behandlung der Röhrchen wurde darauf geachtet, daß das Hexadecan nur mit Glas in Berührung kam, um Verunreinigungen aus organischen Kunststoffen auszuschließen. Für die Zugabe von Hexadecan wurden von den dünnen Enden von Pasteurpipetten kurze Kapillarröhrchen (Länge: 10 mm) abgeschnitten und autoklaviert. In die mit einer Pinzette gehaltenen Kapillarröhrchen wurden mit einer sterilen Microliter-Spritze (Unimetrix, 25 µl) jeweils 5 µl des hochreinen Hexadecans gefüllt. Danach wurden die gefüllten Kapillarröhrchen in die sterilen Reagenzgläser so fallengelassen, daß kein Hexadecan an die Verjüngung der Reagenzgläser gelangte. Diese wurden darauf mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen und in die Anaerobenkammer eingeschleust, wobei das Hexadecan durch das Evakuieren und Begasen der Schleusenammer mit N₂ anaerobisiert wurde.

Herstellung des Mediums

Für das Wachstum in zugeschmolzenen Reagenzgläsern wurde ein modifiziertes Salzwassermedium mit 3 ml Spurenelementlösung I (B 3.1.) pro l verwendet. Einem Teil des Mediums wurde 0,2 g/l Pepton zugesetzt. Kurz vor dem Einschleusen in die Anaerobenkammer wurden 30 µl einer 5 %igen Na-Dithionitlösung (B 3.2.2.) zu jeweils 50 ml Medium gegeben. Für einen sulfatfreien Kontrollansatz wurde ein Medium ohne Na₂SO₄ mit zusätzlich 60 mM NaCl hergestellt. Die Medien wurden in verschlossenen 50 ml Schraubdeckelflaschen in die Anaerobenkammer eingeschleust.

Einfüllen des Mediums und Beimpfen

Zum Einfüllen des Mediums in die verengten Reagenzgläser wurden sterile Plastikspritzen verwendet, die statt einer Kanüle ein ca. 20 cm langes

Glasröhrchen trugen. Dieses wurde über ein kurzes Stück Schlauch mit der Spritze verbunden. Die Glasröhrchen mit dem Schlauch und die Spritzen wurden in separaten, mit Watte verschlossenen Behältern autoklaviert und in die Anaerobenkammer eingeschleust. Das Material wurde einen Tag in der Anaerobenkammer inkubiert, um adsorbierten Sauerstoff zu entfernen. Danach wurden die Glasstäbe mit dem Stück Schlauch auf die Spritzen gesetzt. Damit wurden jeweils 12 ml Medium in die verjüngten Reagenzgläser überführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß das Medium nicht mit dem verengten Teil des Reagenzglases in Berührung kam und dadurch später das Zuschmelzen erschwerte. Anschließend wurden die Ansätze mit ca. 0,6 ml einer auf Palmitat gewachsenen Kultur beimpft. Die Ansätze wurden mit sterilen Stopfen verschlossen, welche zusätzlich mit Klebeband befestigt wurden.

Zuschmelzen der Reagenzgläser

Nach dem Ausschleusen aus der Anaerobenkammer wurden die Ansätze zum Austausch der Gasphase über eine sterile, mit Watte gefüllte Spritze dreimal evakuiert und mit N₂/CO₂-Gemisch (90/10) begast. Da das geschmolzene Glas schon bei sehr geringem Überdruck Blasen bildete, die leicht aufplatzten, durfte das zum Begasen verwendete System während des Zuschmelzens keinen Überdruck aufbauen. Dennoch durfte keine Luft eindringen. Deshalb wurde das N₂/CO₂-Gemisch (90/10) beim Zuschmelzen der Röhrchen über eine Verzweigung ständig nach außen geleitet. Die verwendete Anlage ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Ansätze wurden an der verengten Stelle mit Hilfe eines Gebläsebrenners zugeschmolzen und nach dem Abkühlen waagrecht inkubiert.

*Herstellen einer Kontrolle mit Zellen von *Desulfovibrio salexigens**

Eine auf Lactat gewachsene Kultur von *Desulfovibrio salexigens* wurde anaerob bei 10.000 rpm 30 min zentrifugiert (SS 34 Rotor; Sorvall-Kühlzentrifuge). Anschließend wurde der Überstand in einer Anaerobenkammer entfernt und das Pellet in etwa 1 ml anaerobem Salzwassermedium (B 3.1.) resuspendiert. Davon wurden 0,6 ml in ein Reagenzglas mit Medium und Hexadecan überführt. Dieser Ansatz wurde ebenso wie die übrigen zugeschmolzen.

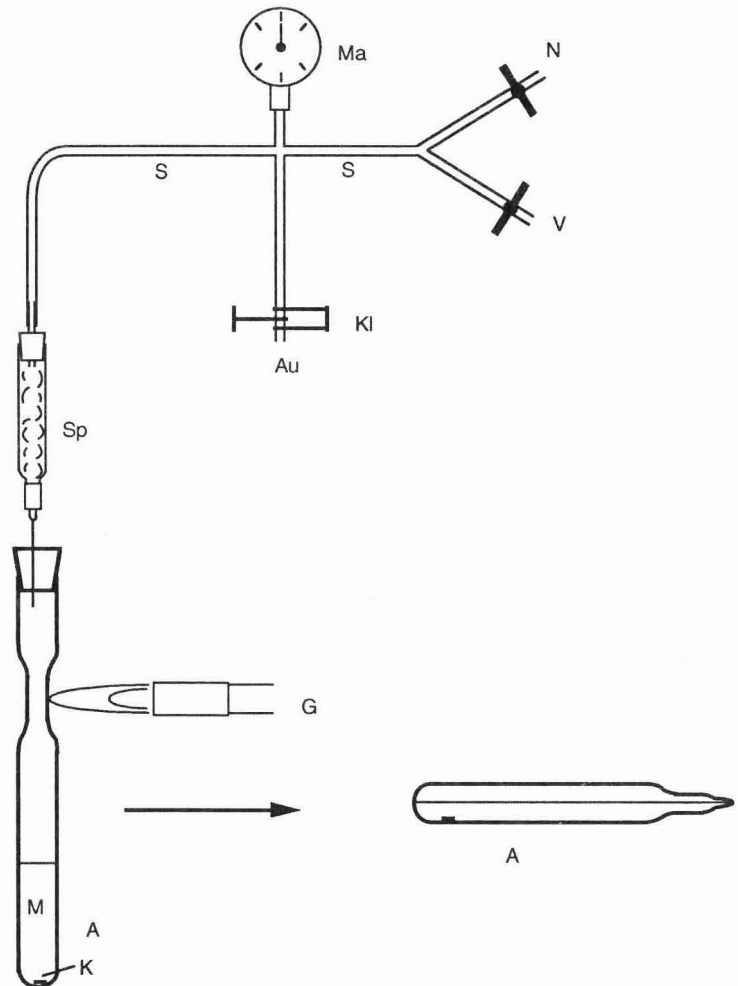


Abb. 6: Anoxisches Zuschmelzen einer Glasampulle (A), die beimpftes Medium (M) und Hexadecan (nicht gezeigt) enthält, das mit einem Kapillarröhrchen (K) zugesetzt worden ist. Die Glasampulle war in einer Anaerobenkammer verschlossen worden. Die Gasphase wurde nach dem Ausschleusen durch wiederholtes Evakuieren und Begasen mit N_2/CO_2 -Gemisch (90/10) über eine autoklavierte mit Watte gefüllte Spritze (Sp) ausgetauscht. Während des Zuschmelzens wurde die Schlauchklemme (KI) geöffnet, um dem permanenten Gasstrom ein Entweichen über den Auslaß (Au) zu erlauben. Die zugeschmolzene Ampulle wurde waagrecht inkubiert. (G) Gebläsebrenner; (N) Zuleitung von N_2/CO_2 -Gemisch mit Zweiwegehahn; (S) Schlauch; (V) Vakuumanschluß mit Zweiwegehahn; (Ma) Manometer.

Prüfung der Glasampullen auf Dichtigkeit

Zur Prüfung der Gasdurchlässigkeit der Glasampullen wurde Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0; 30 mM) mit 2 μ M Resazurin als Redoxindikator durch Ausschütteln unter einer N₂-Gasphase anaerobisiert. Durch Zugabe von Na-Dithionit (18 μ M Endkonzentration) wurde die blau gefärbte Lösung reduziert und entfärbt. Die reduzierte Lösung wurde, wie für die Wachstumsansätze oben beschrieben, anaerob in 12 ml-Portionen auf Röhrchen mit verjüngtem Hals verteilt. Diese wurden wie die Wachstumsansätze zugeschmolzen und bei 30°C inkubiert.

Analyse der Ansätze nach der Inkubation

Zur Bestimmung der Hexadecan-Menge und Sulfatkonzentration wurden die zugeschmolzenen Röhrchen am Ende der Inkubation aufgebrochen. Dazu wurden sie am verjüngten Ende mit einer kleinen Feile angeritzt und durch Aufdrücken eines rotglühenden Glastropfens an die angeritzte Stelle aufgesprengt. Die Kulturflüssigkeit wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas mit kleiner Öffnung übertragen. Das leere aufgesprengte Kulturröhrchen und die abgesprengte Kappe wurden jeweils dreimal mit Hexan gespült. Das Hexan wurde in dem Glaszentrifugenröhrchen gesammelt, in dem sich die entsprechende Kulturflüssigkeit befand. Dann wurde das Zentrifugenröhrchen mit einem Vitonstopfen verschlossen und ca. 1 min geschüttelt, um mit dem zugesetzten Hexan das emulgierte Hexadecan zu extrahieren. Zur Trennung der Hexanphase von der Kulturflüssigkeit wurde das Röhrchen bei 3.000 rpm (SS 34-Rotor) 5 min zentrifugiert. Die Hexanphase wurde abgehoben und in ein gewogenes 50 ml Glasfläschchen gegeben, das mit einem Stopfen verschlossen wurde. Die Kulturflüssigkeit in dem Zentrifugenröhrchen wurde noch zweimal mit Hexan extrahiert. Die Hexanphasen wurden in dem 50 ml Glasfläschchen gesammelt. Dieses wurde mit den gesammelten Hexanphasen gewogen; aus der Gewichts Differenz und der Dichte von Hexan (0,66 g/ml) wurde das Volumen der Hexanphase bestimmt. Die so gewonnene Hexanphase wurde zur gaschromatographischen Bestimmung von Hexadecan verwendet. Die verbliebene Kulturflüssigkeit wurde zur Sulfatbestimmung verwendet.

7.2. Wachstumsversuche in Flachgefäßen

Weil die genaue Bestimmung von gebildetem Sulfid in den Ansätzen in zugeschmolzenen Glasampullen wegen der Flüchtigkeit von H_2S nicht möglich war, wurden Wachstumsansätze mit Hexadecan zur Bilanzierung des anaeroben Alkanabbaus in speziell angefertigten Flachgefäßen hergestellt (Abb. 7). Aus diesen konnten Proben zur Sulfidbestimmung durch den Stopfen entnommen werden, ohne die Gefäße zu öffnen. Gegenüber Gefäßen für Routineanzuchten hatten die Flachgefäße eine im Verhältnis zum Kulturvolumen (115 ml) sehr kleine

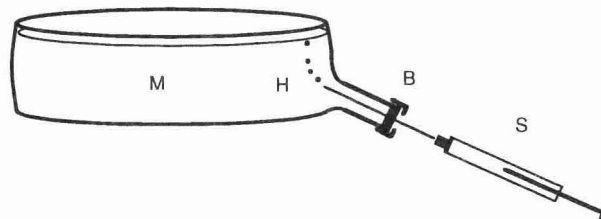


Abb. 7: Zugabe von Hexadecan (H) zu einem speziell angefertigten Flachgefäß (Durchmesser: 84 mm; Höhe: 33 mm), das beimpftes Medium (M) unter einer kleinen Gasphase enthält. Hexadecan steigt zur Oberfläche des Mediums ohne den Stopfen zu berühren. (S) Mikroliterspritze; (B) Butylseptum durch Schraubdeckel mit Öffnung gesichert.

Septumoberfläche (Durchmesser der Septen, 9 mm). Außerdem ermöglichten diese Gefäße eine sehr große Grenzfläche des Hexadecans zum Medium, was die Substratdiffusion begünstigte.

Das verwendete Salzwassermedium (B 3.1.) wurde nicht mit Na_2S sondern nur mit Natriumdithionit reduziert (60 μl einer 5 %igen Lösung pro 100 ml Medium; B 3.2.2.). Dieses wurde dem Medium vor dem Abfüllen in die Gefäße zugesetzt. Jeweils 109 ml des reduzierten Mediums wurden über einen Schlauch aseptisch unter Begasung mit N_2 in die senkrecht gestellten Flachgefäße bis zu einer Markierung gefüllt. Die Ansätze wurden mit jeweils 6 ml einer auf Fettsäuren gewachsenen Kultur von Stamm Hxd3 oder Pnd3 beimpft, mit N_2/CO_2 -Gemisch (90/10) begast und mit einem Butylseptum und einem durchbohrten Schraubverschluß verschlossen. Anschließend wurden jeweils 40 μl hochreines Hexadecan (99,5 %ig) mit einer sterilen Mikroliterspritze (Unimatrix, 50 μl) in die mit den Septen nach unten gehaltenen Ansätze gegeben. Das Hexadecan wurde

40 μ l hochreines Hexadecan (99,5 %ig) mit einer sterilen Microliterspritze (Unimatrix, 50 μ l) in die mit den Septen nach unten gehaltenen Ansätze gegeben. Das Hexadecan wurde so zugegeben, daß es dabei nicht das Septum berührte, sondern sogleich zur Oberfläche des Mediums aufstieg (Abb. 7). Die Ansätze wurden waagrecht mit dem Septum nach unten inkubiert. Ein Kontrollansatz wurde mit 5 ml einer Zellsuspension von *Desulfovibrio salexigens* beimpft, die aus einer 100 ml Lactatkultur gewonnen worden war (B 7.1.).

8. Bestimmung von Aktivitäten in Zellsuspensionen

Zellsuspensionsversuche für Aktivitätsbestimmungen wurden unter strikt anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Kulturflüssigkeit wurde in einer Anaerobenkammer über einen Scheidetrichter von der Kohlenwasserstoffphase und den aus α -Cyclodextrin und Hexadecan bestehenden Ausfällungen getrennt. Danach wurde die Kulturflüssigkeit in gasdicht verschließbare Zentrifugenbecher (500, Nalgene) überführt und bei 5.000 rpm (GS3 Rotor, Sorvall) in einer Kühlzentrifuge (RC-5B, Sorvall) 25 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/20 des Ausgangsvolumens an Salzwassermedium (B 3.1.) resuspendiert. Das verwendete Salzwassermedium enthielt statt der üblichen 1 mM nur 0,2 mM Na_2S , um den Anfangswert der Schwefelwasserstoffkonzentration im Experiment niedrig zu halten. Die nun 20-fach konzentrierte Kultur wurde anoxisch in Portionen von 10 ml auf Reagenzgläser (15 ml) verteilt, die mit Butylsepten und Schraubdeckel gasdicht verschlossen wurden. Die verwendeten Butylsepten und Zentrifugenbecher waren mindestens einen Tag lang in einer Anaerobenkammer inkubiert worden, um Reste von Sauerstoff zu entfernen. Die Zellsuspensionen wurden entweder in der Anaerobenkammer oder unter Begasung nach der Hungate-Technik (Bryant, 1972) mit weiteren Zusätzen versehen (pro 10 ml Zellsuspension):

Natriumdithionitlösung, 50 mg/ml	6 μ l
Tetracyclin-Lösung, 1 mg/ml	1000 μ l
Substrate (alternativ):	
(i) Alkane, Alkene; sauerstofffrei (B 3.2.1.)	200 μ l
α -Cyclodextrin-Lösung, 100 g/l	500 μ l

- (ii) Palmitat-Lösung, 100 mM 200 µl
 Das aus der heißen Stammlösung (B 3.2.1.) entnommene Volumen wurde zunächst in 0,5 ml Süßwassermedium gegeben. Die dabei gebildeten Flocken der Erdalkalisalze wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in einen Ansatz pipettiert.
- (iii) 1-Hexadecanol 40 mg
 Die Menge an unlöslichem Alkohol wurde zunächst in 0,5 ml Isopropanol gelöst. Dazu wurden 2,5 ml dest. H₂O gegeben. Die gebildeten Flocken von 1-Hexadecanol wurden mit einer Pasteurpipette abgehoben und zum Entfernen von Isopropanol in 3 ml dest. H₂O überführt. Der Waschvorgang in dest. H₂O wurde fünfmal wiederholt. Danach wurden die Flocken einem Ansatz zugesetzt.

Die Ansätze wurden flach liegend auf einem Schüttler bei 70 rpm inkubiert, um die Grenzfläche zwischen den unlöslichen Substraten und dem Medium zu vergrößern. Die Probenentnahme zur quantitativen Sulfidbestimmung erfolgte durch die Butylsepten mit einer Mikroliterspritze (Unimatrix, 10 oder 25 µl), die vorher durch mehrmaliges Spülen mit N₂ anaerobisiert worden war.

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

9.1. Herstellung von Rohextrakten unter anoxischen Bedingungen

In 0,5 l Meplats-Flaschen angezogene, gut gewachsene Kulturen von Stamm Hxd3 mit einem Gesamtvolumen von ca. 2 l wurden in der Anaerobenkammer in gasdicht verschließbare Zentrifugenbecher überführt und bei 5.000 rpm (GS3-Rotor) für 25 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Pellets wurden in der Anaerobenkammer in insgesamt 50 ml Salzwassermedium (B 3.1.) resuspendiert. Darauf wurden die Zellen bei 10.000 rpm (SS 34-Rotor) für 20 min abzentrifugiert und in der Anaerobenkammer in ca. 3 ml reduziertem Aufschlußpuffer resuspendiert.

Aufschlußpuffer:

Tris/HCl, pH 7,5	100,0 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) in der Anaerobenkammer mit der Zellsuspension beschickt und verschlossen worden war, erfolgte der Zellaufschluß anaerob bei 900 psi. Die aufgeschlossenen Zellen wurden über eine Kanüle in eine verschlossene mit N₂ begaste Serumflasche überführt. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die aufgeschlossenen Zellen in der Anaerobenkammer in Zentrifugenbecher mit gasdichtem Verschuß überführt und 30 min bei 10.000 rpm (SS 34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand, im folgenden als Rohextrakt bezeichnet, wurde in einer 8 ml Serumflasche unter N₂-Atmosphäre im Eisbad aufbewahrt.

9.2. Durchführung optischer Tests unter anaeroben Bedingungen

Es wurden ausschließlich frisch hergestellte und auf Eis aufbewahrte anaerobe Rohextrakte in den Enzymtests eingesetzt. Alle Enzymaktivitäten wurden photometrisch in einem U-1100 Spectrophotometer (Hitachi) bei 23°C bestimmt. Die verwendeten Puffer und Stammlösungen wurden durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N₂ anaerobisiert und in verschlossenen Serumflaschen bei 4°C unter N₂-Atmosphäre aufbewahrt.

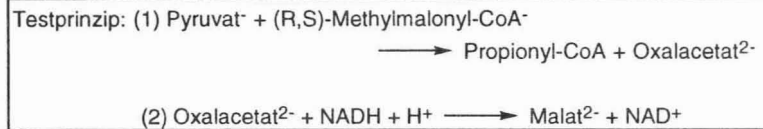
Die Messungen wurden in 1,5 ml Glasküvetten mit Schliff durchgeführt. Nachdem diese mit einem Gummistopfen verschlossen worden waren, wurde der Gasraum für ca. 1 min mit N₂ durchspült. In den nun anaeroben Küvettenraum wurden ca. 1 ml anoxischer Puffer mit einer anaerobisierten Spritze gegeben. Lösliche Substrate und andere Zusätze wurden mit ebenfalls anaerobisierten Mikroliterspritzen zugesetzt.

Malat-Dehydrogenase (nach Stams und Hansen, 1984)

Testansatz (1 ml):

Tris/HCl, pH 7,2	50,0 mM
NADH, Dinatriumsalz	0,2 mM
Oxalacetat, Dinatriumsalz	3,3 mM
Gasphase: N ₂ (100 %; 131 kPa)	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl Rohextrakt oder Oxalacetat gestartet und bei 365 nm photometrisch verfolgt.

Methylmalonyl-CoA:Pyruvat-Transcarboxylase (nach Stams und Hansen, 1984)

Testansatz (1 ml):

KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH 7,0	50,0 mM
Gluthation	2,5 mM
NADH, Dinatriumsalz	0,2 mM
Pyruvat, Natriumsalz	10,0 mM
(R,S)-Methylmalonyl-CoA, Lithiumsalz	0,2 mM
Gasphase: N ₂ (100 %; 131 kPa)	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Rohextrakt, Pyruvat oder (R,S)-Methylmalonyl-CoA gestartet und bei 365 nm photometrisch verfolgt.

Alkohol-Dehydrogenase

Testansatz (1 ml):

Tris/HCl, pH 9,0	100 mM
NAD ⁺ , freie Säure	2 mM
1-Decanol-Emulsion	10 µl

Da 1-Decanol in Wasser schlecht löslich ist, wurde eine Emulsion von 1-Decanol in dest. H₂O hergestellt. Dafür wurden 100 µl 1-Decanol in 20 ml dest. H₂O gegeben und dann mit Ultraschall emulgiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Rohextrakt oder 50 µl einer 1-Decanol Emulsion in dest. H₂O gestartet. Bei 365 nm wurde die Reaktion photometrisch verfolgt.

Aldehyd-Dehydrogenase

Zusammensetzung von 1 ml Testansatz:

Tris/HCl, pH 7,5	100,0 mM
NADH, Dinatriumsalz	0,2 mM
Decanal-Emulsion	10,0 µl

Mit Decanal wurde so, wie oben für 1-Decanol beschrieben, eine Emulsion in dest. H₂O hergestellt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Rohextrakt oder 50 µl einer Emulsion von Decanal in dest. H₂O gestartet und photometrisch bei 365 nm verfolgt.

Stammlösungen und Puffer

Zur Optimierung der Bedingungen des Alkohol-Dehydrogenase-Tests wurden folgende Stammlösungen und Puffer hergestellt:

(a) Puffer

(i) Tris/HCl, pH 9,0	30,0 mM
Na ₂ SO ₄	28,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NH ₄ Cl	4,7 mM
NaCl	340,0 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	14,8 mM
KCl	6,7 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,0 mM
(ii) Glycin, pH 9,5	100,0 mM
(iii) Glycin, pH 9,5	100,0 mM
weitere Salze wie unter (i) beschrieben	

(b) Salze

KCl	0,5 M
NaCl	1,0 M
NH ₄ Cl	0,4 M
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,4 M
ZnSO ₄	

(c) Elektronenakzeptoren und -donatoren

NAD ⁺ , freie Säure	100,0 mM
NADP ⁺ , Tetra-Na-Salz	100,0 mM
NADH, Di-Na-Salz	100,0 mM
PMS ^b	4,0 mM
Ferricyanid	100,0 mM
Methylenblau	5,0 mM

(d) *Substrate*

1-Dodecanol	Emulsion ^a
1-Decanol	Emulsion ^a
1-Octanol	Emulsion ^a
1-Hexanol	Emulsion ^a
1-Butanol	0,5 M
1-Propanol	1,0 M
Ethanol	1,0 M
Isoamylalkohol	0,2 M
2-Butanol	0,8 M

^a von diesen Substraten wurden mit Ultraschall Emulsionen mit 100 µl Substanz in 20 ml dest. H₂O hergestellt.

^b N-Methylphenazoniummethylsulfat

Ergebnisse

1. Anreicherung und Isolierung von alkanabbauenden sulfat-reduzierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen

1.1. Anreicherung und Isolierung unter mesophilen Bedingungen

Anreicherung und Isolierung aus einem Öl-Wasser-Separator

In einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes wurde H₂S-Bildung beobachtet. Der Nachweis hoher Zellzahlen sulfatreduzierender Bakterien (8 bis 9x10⁶ koloniebildende Einheiten) in der Wasserphase des Öl-Wasser-Separators führte zu dem Schluß, daß die beobachtete Sulfidbildung durch biologische Sulfatreduktion verursacht worden war (Cord-Ruwisch, 1987). Mit asphalten- und ölhaltigen Ausfällungen aus der Wasserphase des Öl-Wasser-Separators wurden sulfatreduzierende Anreicherungen gewonnen. Aus dieser Kultur wurde mit Hexadecan als Substrat eine sulfatreduzierende Kultur angereichert und über Agarverdünnungsreihen mit Caprylat (1,5 mM) als Substrat isoliert. Das Isolat, im folgenden Stamm Hxd3 genannt, wuchs anaerob auf Alkanen von C₁₂ bis C₂₀. Die Einzelheiten der Anreicherung und Isolierung wurden bereits beschrieben (Aeckersberg, 1989).

Anreicherung und Isolierung aus marinen Sedimenten

Anreicherung. Zur Anreicherung eines weiteren mesophilen, alkanabbauenden Sulfatreduzierers wurde synthetisches Meerwassermedium mit 0,2 mM Na₂S als Reduktionsmittel (B 3.1.) verwendet. Die Ansätze, die ein Kulturvolumen von 75 ml in 100 ml Flaschen hatten, wurden mit einem anaeroben marinen Schlammgemisch (B 2.) beimpft. Anoxisches Pentadecan und Hexadecan (B 3.2.1.) wurden als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle (20 ml/l Medium) zugesetzt. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert. Im Abstand von ein bis zwei Wochen wurde die Sulfidkonzentration bestimmt. Nach drei Monaten Inkubation wurde eine deutlich erhöhte Sulfidkonzentration (ca. 15 mM) gegenüber einer Kontrolle ohne Alkan gemessen. Folgekulturen mit jeweils 10 % Inokulum wurden etwa zwei Monate bis zu einer deutlichen Sulfidbildung inkubiert. Trotz der sich nur wenig unterscheidenden Molekülketten der zwei

Substrate (C_{15} gegenüber C_{16}) entwickelten sich die Anreicherungen mit Pentadecan schneller als die mit Hexadecan. Nach der dritten Übertragung wurden stäbchenförmige Zellen beobachtet, die an der Oberfläche der Alkanphase Mikrokolonien bildeten. Da Zellen von Stamm Hxd3 beim Wachstum auf Alkanen das gleiche Verhalten zeigten, wurde vermutet, daß auch hier die an der Alkanphase haftenden Zellen an der Oxidation von Pentadecan beteiligt waren.

Isolierung. Ein Aliquot der vierten Folgekultur der Anreicherung mit Pentadecan wurde in eine Agarverdünnungsreihe (B 4.1.) mit Capronat als Substrat überführt. Dabei wurde auch ein Teil der Alkanphase mit den daran haftenden Zellen als Inokulum verwendet. Als Substrat für die Agarverdünnungsreihe wurde Capronat (3 mM) gewählt, da das Wachstum einer einzelnen Zelle bis zu einer Kolonie mit in Agar emulgiertem Pentadecan wahrscheinlich sehr lange gedauert hätte. Nach drei Wochen wurden in der vierten und fünften Verdünnungsstufe rotbraune und weiße Kolonien beobachtet. Die weißen Kolonien waren deutlich kleiner und etwa doppelt so häufig wie die rotbraunen. Die Zellen der rotbraunen Kolonien entsprachen morphologisch den Zellen, die in der Anreicherung an der Alkanphase hafteten. Daher wurden mehrere freiliegende rotbraune Kolonien aus der fünften Verdünnungsstufe isoliert und in Flüssigmedium mit Capronat (3 mM) als Substrat übertragen. Alle so erhaltenen Kulturen wuchsen auch nach Übertragung auf Pentadecan als Substrat. Nachdem den pentadecanabbauenden Bakterien nunmehr ein erkennbarer Zelltyp zugeordnet werden konnte, wurde dieser über zwei aufeinanderfolgende Agarverdünnungsreihen mit Capronat (3 mM) von eventuell noch vorhandenen Begleitern gereinigt. In beiden Agarverdünnungsreihen wurden nur noch einheitlich aussehende rotbraune Kolonien beobachtet. Die aus der dritten Agarverdünnungsreihe isolierten Kulturen wuchsen alle auf Pentadecan und unterschieden sich morphologisch nicht. Ein Isolat mit der Bezeichnung Pnd3 wuchs am schnellsten auf Pentadecan und wurde deshalb für alle weiteren Versuche verwendet.

1.2. Anreicherung und Isolierung unter thermophilen Bedingungen

Anreicherung. Zur Anreicherung von thermophilen sulfatreduzierenden Bakterien mit gesättigten Kohlenwasserstoffen wurden Ansätze mit synthetischem Meerwassermedium (B 3.1.) mit anoxischem, sulfidhaltigem Schlamm aus dem

Guaymas-Becken (B 2.) beimpft. Sedimente dieses Standorts sind reich an Kohlenwasserstoffen. Diese werden dort aus dem reichlich vorhandenen abgesunkenem Detritus unter Druck ($2,03 \cdot 10^4 \text{ kPa}$) infolge hydrothormaler Erhitzung gebildet, d. h. dort finden rezente Erdölbildungsprozesse statt. In diesem Sediment ist eine natürliche Anreicherung thermophiler alkanabbauender Bakterien zu erwarten. Als Substrate wurden folgende Kohlenwasserstoffe zugesetzt (Prozentangaben beziehen sich auf Paraffinöl als inerte Trägerphase): Methan (60 kPa), Ethan (60 kPa), Propan (60 kPa), Butan (60 kPa), Hexan (2 und 4 % [v/v]), Heptan (2 und 4 % [v/v]), Decan (4 und 8 % [v/v]), Dodecan (20 % [v/v] und unverdünnt), Pentadecan (unverdünnt), Hexadecan (unverdünnt), 2-Methyloctan (2 und 4 % [v/v]), 3-Methyloctan (2 und 4 % [v/v]), Cyclohexan (2 und 4 % [v/v]), 1-Hexen (1 und 2 % [v/v]), 1-Octen (1 und 2 % [v/v]), 1-Decen (1 und 2 % [v/v]) und 1-Hexadecen (unverdünnt). Die Ansätze hatten ein Volumen von 75 ml in 100 ml Flaschen. Das zugesetzte Volumen reiner Kohlenwasserstoffe betrug 1,2 ml, das verdünnter Kohlenwasserstoffe 2 ml. In Ansätzen mit gasförmigen Kohlenwasserstoffen wurden die Flaschen mit 50 ml Medium gefüllt. Flüssige Kohlenwasserstoffe mit merklichem Dampfdruck (C_6 bis C_{12}) wurden deshalb in einer Paraffinphase verdünnt, weil sich diese in reiner Form in Wachstumsversuchen mit Stamm Hxd3 als giftig erwiesen hatten (C 2.1.). Die Ansätze wurden unter N_2/CO_2 (80/20) bei 60°C inkubiert.

Mit Hexan, Heptan, Decan, 3-Methyloctan, Cyclohexan und 1-Decen wurde im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Kohlenwasserstoff auch in der dritten Folgekultur deutlich Sulfid (10 - 15 mM) gebildet. Mit den übrigen verwendeten Kohlenwasserstoffen fand keine deutliche Sulfidbildung statt.

Demnach führten unter mäßig thermophilen Bedingungen bevorzugt Alkane in einem Kettenlängenbereich von C_6 bis C_{12} zu Anreicherungen mit sulfatreduzierenden Bakterien. Dabei wurden auch verzweigt-kettige (3-Methyloctan) und cyclische (Cyclohexan) Kohlenwasserstoffe verwertet. Von den verwendeten 1-Alkenen führte nur 1-Decen zu einer Sulfidbildung. Mit 1-Hexen und 1-Octen wurde sogar weniger Sulfid gebildet als in Kontrollansätzen ohne Kohlenwasserstoffzusatz. Demnach waren diese Alkene in den eingesetzten Konzentrationen toxisch.

In der dritten Folgekultur hatten Anreicherungen mit Decan nach zwei Wochen Inkubation eine Sulfidkonzentration von 10 - 15 mM gebildet; Anreicherungen auf Hexan, Heptan, Dodecan, 3-Methyloctan und 1-Decen erreichten diese Konzentration nach drei Wochen. Mit Cyclohexan wurde erst nach zweieinhalb Monaten Inkubation deutliche Sulfidbildung beobachtet.

Mikroskopisch waren in den Anreicherungen mit Decan und Dodecan kurze stäbchenförmige Zellen zu erkennen, die an der Kohlenwasserstoffphase hafteten. Frei im Medium fielen kleine kokkoide und leicht gekrümmte, aktiv bewegliche Stäbchen auf. Mit Hexan wurden Kurzstäbchen, mit Cyclohexan lange Stäbchen ("Zigarrenform") angereichert. Diese hafteten nicht an der Kohlenwasserstoffphase. Wahrscheinlich ist die Löslichkeit dieser Alkane bei 60°C genügend hoch, um ein Wachstum ohne direkten Kontakt mit der Kohlenwasserstoffphase zu ermöglichen.

Isolierung. Weil die Anreicherung mit Decan am schnellsten wuchs, wurde diese für Versuche zur Isolierung eines thermophilen alkanoxidierenden Sulfatreduzierers verwendet. Als organische Substrate in den Agarverdünnungsreihen (B 4.1.) dienten Capronat (3 mM) und Caprylat (2 mM). Nach zwei Wochen Inkubation bei 60°C waren in der zweiten, dritten und vierten Verdünnung folgende Typen von Kolonien zu sehen:

(i) kleine hellbraune etwas unregelmäßig geformte Kolonien mit stäbchenförmigen und zum Teil aktiv beweglichen Zellen; diese glichen morphologisch den Zellen, die an der Kohlenwasserstoffphase der Anreicherung beobachtet worden waren;

(ii) große dunkelbraune Kolonien, die selten vorkamen, mit leicht gekrümmten, aktiv beweglichen Stäbchen;

(iii) kleine weiße Kolonien mit kleinen kokkoiden Zellen.

Die kleinen weißen Kolonien waren ungefähr hundertmal häufiger als die kleinen hellbraunen und dunkelbraunen Kolonien, was deren Isolierung erschwerte.

Von jedem Typ wurden einige Kolonien isoliert und in Flüssigmedium mit Capronat (3 mM) und Caprylat (2 mM) übertragen. Danach wurde das Wachstum auf Decan geprüft. Nur Isolate aus den kleinen hellbraunen Kolonien wuchsen auf Decan. Diese Isolate enthielten stäbchenförmige zum Teil bewegliche Zellen, die, wie in der Anreicherung, an der Kohlenwasserstoffphase hafteten. Allerdings waren nach dem ersten Isolierungsschritt in der Kultur noch kleine kokkoide Begleiter zu sehen.

In einer sich anschließenden Arbeit wurden aus dieser vorgereinigten Kultur über zwei aufeinanderfolgende Agarverdünnungsreihen mit Capronat (3 mM) mehrere decanverwertende Reinkulturen gewonnen (P. Rueter, persönliche Mitteilung). Das Isolat mit dem schnellsten Wachstum (Stamm TD3) wird eingehender untersucht.

2. Charakterisierung der isolierten sulfatreduzierenden Bakterien

2.1. Charakterisierung von Stamm Hxd3

Der aus einem Öl-Wasser-Separator isolierte Stamm Hxd3 war morphologisch und physiologisch schon zum Teil charakterisiert worden (Aeckersberg, 1989). Im folgenden sind die Ergebnisse einer eingehenden Charakterisierung zusammengefaßt.

Morphologische Eigenschaften

Stamm Hxd3 hatte kleine stäbchenförmige Zellen (Abb. 8). In älteren Kulturen traten daneben auch leicht gekrümmte Formen auf. Aktiv bewegliche Zellen wurden nicht beobachtet.

Während des Wachstums auf Alkanen hafteten die meisten Zellen an der Alkanphase (Abb. 8). Mit zunehmendem Alter der Kultur lösten sich immer mehr Zellen von der Alkanphase und trübten das Medium. Frei im Medium suspendierte Zellen lysierten nach einigen Wochen, wahrscheinlich infolge von Substratmangel. Die Zellen neigten dazu, sich an Glasoberflächen wie die von Objektträgern und Deckgläsern zu heften. So waren mikroskopische Aufnahmen von vielen Zellen in einer Ebene auch ohne Verwendung von agarbeschichteten Objektträgern möglich.

Natürliche Verwandtschaft

Die 16S rRNS wurde von Herrn Dr. Wolfgang Ludwig, München, sequenziert. Stamm Hxd3 gehört in die δ -Gruppe der Proteobakterien, ist aber mit keiner der bekannten Gattungen nahe verwandt (Abb. 9).

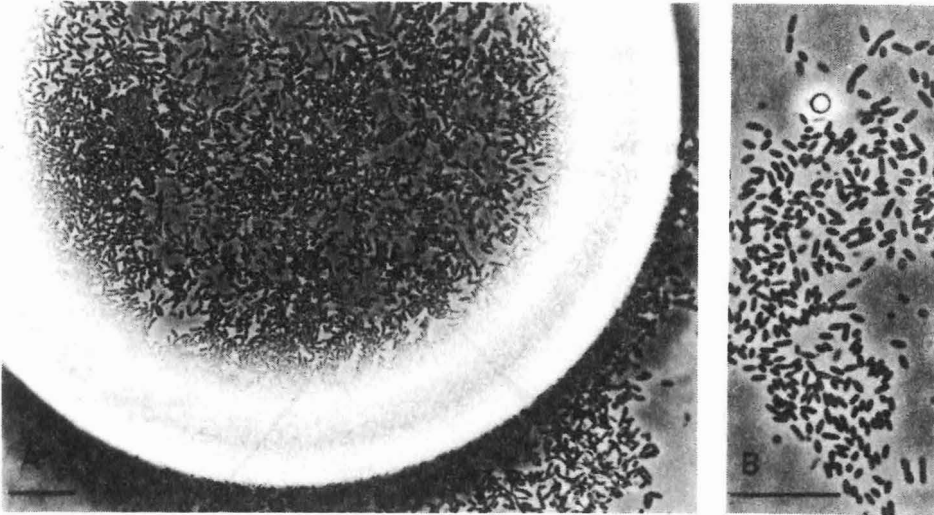


Abb. 8: Phasenkontrastaufnahmen der Reinkultur von Stamm Hxd3, anaerob gewachsen mit Hexadecan. (A) Zellen haften an einem Hexadecantropfen, der durch seine lichtbrechenden Grenzen sichtbar ist. (B) Stärkere Vergrößerung von Zellen, die am Deckglas haften. Die eingetragenen Strecken entsprechen 10 µm.

Substratverwertung

Alkane. Kurzkettige Alkane mit merklichem Dampfdruck können als reine Phase (100 %) wachstumshemmend wirken. Durch Verdünnung der Alkane in einer inerten hydrophoben Trägerphase kann die Wachstumshemmung vermieden werden (Gill und Ratledge, 1972). Der Dampfdruck und damit die Aktivität der kurzkettigen Alkane wird durch die Verdünnung herabgesetzt; die Gleichgewichtskonzentration der Alkane im Medium bleibt so unterhalb der Sättigungskonzentration. Dennoch bleibt die Gesamtmenge an Alkanen bei genügend großer Trägerphase ausreichend, um ein Wachstum zu gewährleisten.

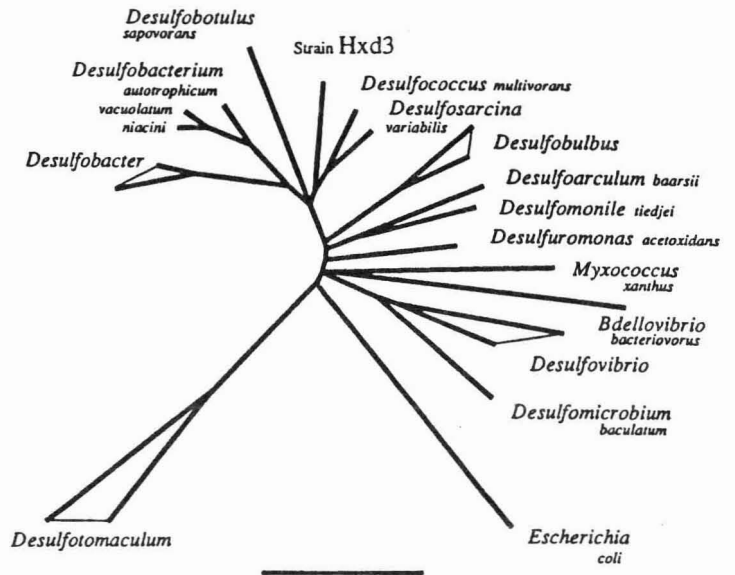


Abb. 9: Nach dem Distanz-Matrix-Verfahren berechneter phylogenetischer Stammbaum, der die taxonomischen Beziehungen von Stamm Hxd3 darstellt. Die eingetragene Strecke entspricht 5 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA Sequenzen.

Als mögliche Trägerphasen für die folgenden Versuche wurden Pristan und dickflüssiges Paraffin (B 1.) geprüft. Dabei wurde das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat in Gegenwart von Pristan oder dickflüssigem Paraffin nicht beeinträchtigt. In Ansätzen mit Pristan und Stamm Hxd3 wurde auch nach 3 Monaten Inkubation kein Sulfid gebildet; mit dickflüssigem Paraffin aber wurden nach 3 Monaten Inkubation ca. 3 mM Sulfid gefunden. Deshalb wurde Pristan als inertes Trägermaterial für die folgenden Untersuchungen verwendet.

Die gasförmigen Alkane Methan, Ethan, Propan und Butan (B 3.2.1.) hemmten das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat nicht, wurden aber auch nicht als Elektronendonatoren verwertet.

In Ansätzen mit Pentan, Hexan, Heptan, Octan oder Decan als reiner Phase (100 %) wurde das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat vollständig gehemmt. Verdünnungen von Pentan, Hexan, Heptan und Octan in Konzentrationen von 5 und 10 % (v/v) verlangsamten das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat noch

deutlich; dagegen waren Konzentrationen dieser Alkane in Pristan von 2 % (v/v) ohne Hemmwirkung.

Decan erwies sich als weniger giftig. Konzentrationen von 10 und 20 % (v/v) in Pristan verlangsamten das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat, während eine Konzentration von 5 % (v/v) nicht hemmte.

Schließlich sollte geprüft werden, ob diese Alkane in nicht wachstumshemmenden Konzentrationen von Stamm Hxd3 verwertet wurden. Dazu wurden Ansätze mit Stamm Hxd3 und folgenden Verdünnungen der Alkane in Pristan hergestellt: Pentan, Hexan, Heptan und Octan mit 1 und 2 % (v/v); Decan mit 2 und 4 % (v/v). Während der 4 monatigen Inkubation bei 30°C wurde in keinem der Ansätze Wachstum oder Sulfidbildung beobachtet. Dagegen wurden in Ansätzen mit Stamm Hxd3 und Hexadecan (2 und 5 % (v/v) in Pristan) nach 4 Monaten Inkubation ca. 5 mM Sulfid gefunden.

Alkane mit Kettenlängen von C₁ bis C₁₀ werden demnach von Stamm Hxd3 auch dann nicht als Elektronendonatoren verwertet, wenn sie in nicht wachstumshemmenden Konzentrationen vorliegen (Tabelle 6).

Stamm Hxd3 verwertete Alkane mit einer Kettenlänge von 12 bis 20 C-Atomen (Tabelle 6). Dabei ermöglichten Hexadecan und Octadecan das schnellste Wachstum; in Gegenwart von α -Cyclodextrin wurden 10 mM Sulfid nach ca. 4 Wochen gebildet. Dieselbe H₂S-Konzentration wurde dagegen mit Palmitat oder Stearat bereits nach einer Woche erreicht.

Andere Substrate. Die langkettigen Monocarbonsäuren Palmitat, Heptadecanat und Stearat ermöglichten von allen Substraten das schnellste Wachstum. Mit 5 % Impfvolumen wurden nach 7 Tagen Inkubation bei 30°C etwa 10 mM Sulfid gebildet. Die kurzkettigen Säuren wie Butyrat oder Capronat wurden dagegen nur langsam verwertet. Mit Acetat wuchs Stamm Hxd3 trotz der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation nicht.

Vitaminbedürfnis

Das Vitaminbedürfnis wurde mit Stearat als Substrat geprüft. In Ansätzen ohne Vitamin B₁₂ wurde bereits in der zweiten Folgekultur kein Wachstum mehr beobachtet. Wenn jeweils eines der anderen Vitamine fehlte, wuchs Stamm Hxd3 auch nach der vierten Übertragung mit je 5 % Inokulum problemlos. In Folgekulturen war das Wachstum mit Vitamin B₁₂ als einzigem Wachstumsfaktor ebenso gut, wie mit dem Gemisch aller Vitamine (B 3.1.).

Sonstige Eigenschaften

Ein Zusatz von Dithionit (6 μ l 5 %ige Lösung auf 10 ml Medium) stimulierte das Wachstum von Stamm Hxd3 deutlich. Mit dem weniger konzentrierten Salzwasser-Medium (B 3.1.) war das Wachstum genauso gut wie mit synthetischem Meerwasser-Medium (B 3.1.), das für die Anreicherungen verwendet worden war. Für alle weiteren Versuche wurde Salzwasser-Medium verwendet, insbesondere weil dieses geringere Konzentrationen an den zu Ausfällungen neigenden Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen enthält.

2.2. Charakterisierung von Stamm Pnd3

Morphologie

Ähnlich wie Stamm Hxd3 hatte auch Stamm Pnd3 stäbchenförmige unbewegliche Zellen, die sich an die Alkanphase hefteten.

Substratverwertung

Alkane. Gegenüber Alkanen zeigte Stamm Pnd3 eine noch höhere Spezifität als Stamm Hxd3. Es wurden nur Alkane mit 14 bis 17 C-Atomen verwertet (Tabelle 6), wobei Pentadecan und Hexadecan das schnellste Wachstum ermöglichten. In Gegenwart von α -Cyclodextrin (6 g/l) (C 4.1.) wurden nach 4 Wochen Inkubation bei 30°C ca. 15 mM Sulfid gebildet.

Andere Substrate. Monocarbonsäuren dagegen verwertete Stamm Pnd3 in einem Kettenlängenbereich von C_4 bis C_{18} (Tabelle 6). Außerdem wurde auch Formiat in Gegenwart von Acetat (2 mM) als C-Quelle verwertet (Tabelle 6). Das schnellste Wachstum ermöglichte Capronat. Mit einem Impfvolumen von 5 % wurden ca. 10 mM H_2S in vier Tagen gebildet, während mit langkettigen Fettsäuren die gleiche H_2S -Konzentration in ungefähr 7 Tagen erreicht wurde.

Tabelle 6: Eigenschaften neu isolierter alkanverwertender Sulfatreduzierer (Symbole: + = Wachstum bzw. Eigenschaft vorhanden; (+) = Wachstum langsamer und/oder mit geringerer Zelldichte als auf dem Anreicherungssubstrat; - = kein Wachstum bzw. Eigenschaft nicht vorhanden; nb, nicht bestimmt).

Eigenschaft	Stamm		
	Hxd3	Pnd3	TD3 ^d
Herkunft	Öl-Wasser-Separator	anoxischer mariner Schlamm	öhlhaltiges Tiefseesediment (Guaymas-Becken)
Anreicherungs-substrat	Hexadecan	Pentadecan	Decan
Isolierungssubstat	Caprylat	Capronat	Capronat
Zellform	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Zellbreite [µm]	0,4 - 0,5		0,8 - 1,0
Zelllänge [µm]	0,8 - 2,0		2,0 - 3,5
Beweglichkeit	-	-	-/+
Optimale Wachstumstemperatur [°C]	30	30	60
G+C-Gehalt der DNS [mol %]	62,5	nb	nb
Als Elektronendonatoren geprüft:			
Formiat (10; 20 mM)	-	+	-
Acetat (5; 10 mM)	-	-	-
Propionat (3; 6 mM)	-	+	-
Butyrat (2; 4 mM)	(+)	+	+
Valerat (2; 3 mM)	-	+	+
Capronat (2; 3 mM)	(+)	+	+
Caprylat (1; 2 mM)	(+)	+	+
Decanat (0; 5 mM)	+	nb	-
Myristinat (0,5; 1 mM)	+	+	+
Pentadecanat ;0,5; 1 mM)	+	+	nb
Palmitat (0,5; 1 mM)	+	+	+
Heptadecanat (0,5; 1 mM)	+	+	nb
Stearat (0,5; 1 mM)	+	+	+
Hexan (2; 4 Vol.%) ^a	-	-	+
Heptan (2; 4 Vol.%) ^a	-	-	+
Octan (2; 4 Vol.%) ^a	-	-	+
Nonan (4 Vol.%) ^a	nb	nb	+
Decan (4; 8 Vol.%) ^a	-	-	+
Dodecan (20; 100 Vol.%) ^a	+	-	+
Tridecan ^b	+	-	+
Tetradecan ^b	+	+	+
Pentadecan ^b	+	+	(+)
Hexadecan ^b	+	+	(+)
Heptadecan ^b	+	+	nb
Octadecan ^b	+	-	-
Eicosan ^c	+	-	nb
1-Tetradecen ^b	+	+	nb
1-Hexadecen ^b	+	+	nb
1-Heptadecen	+	+	nb
1-Hexadecanol ^c	+	+	nb
2-Hexadecanol ^c	+	-	nb

Von keinem der Stämme verwertet:

Alkane: Methan, Ethan, Propan, Butan, Pentan

Alkohole: Methanol (4; 8 mM), Ethanol (3; 6 mM)

Monocarbonsäuren: Isovalerat (2; 3 mM)

Dicarbonsäuren: Malat (3; 6 mM), Succinat (3; 6 mM), Fumarat (3; 6 mM), Glutarat (3; 6 mM)

Sonstige Säuren: Pyruvat (4; 8 mM), Citrat (3; 6 mM), Benzoat (1,5; 3 mM), Glycin (5; 10 mM), Alanin (4; 8 mM),

Serin (4; 8 mM), Aspartat (4; 8 mM), Glutamat (4; 8 mM)

Kohlenhydrate: Glucose (3; 6 mM), Fructose (3; 6 mM)

^a Die kurzkettigen Alkane wurden in Pristan oder Paraffin verdünnt

^b Die langkettigen Alkane wurden als Reinsubstanzen zugesetzt

^c Die unter Normalbedingungen festen, unlöslichen Substanzen wurden wie unter (B 3.1.) beschrieben zugesetzt

^d alle Angaben zu Stamm TD3 von P. Rueter (pers. Mitteilung)

Sonstige Eigenschaften

Für die Anreicherung von Stamm Pnd3 war synthetisches Meerwasser-Medium (B 3.1.) verwendet worden. In Wachstumsversuchen auf Capronat wuchs Stamm Pnd3 auf dem weniger konzentrierten Salzwasser-Medium genauso gut, wie auf synthetischem Meerwasser-Medium. Für alle weiteren Versuche wurde Salzwasser-Medium verwendet. Eine Zugabe von Dithionit als zusätzliches Reduktionsmittel stimulierte das Wachstum weder auf Capronat noch auf Pentadecan.

Pepton (0,2 g/l) stimulierte das Wachstum auf Pentadecan leicht, während Hefeextrakt (0,2 g/l) nicht stimulierte.

Die Charakterisierung von Stamm Pnd3 ist noch nicht abgeschlossen, weil dieser erst gegen Ende der experimentellen Arbeit isoliert wurde.

3. Quantitative Messungen zum anaeroben Alkanabbau

Der Beweis einer strikt anaeroben Alkanoxidation durch die neu isolierten Bakterien konnte nur durch eine genaue Bilanzierung der Substratumsetzung erbracht werden. Dabei mußten folgende mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden:

(i) Eine Diffusion von Spuren von Sauerstoff in die Kulturen, z. B. durch den Stopfen, und somit eine eventuelle O₂-abhängige Initialreaktion.

(ii) Ein Wachstum und eine Sulfatreduktion durch Verwertung möglicher Begleitsubstanzen, z. B. aus dem käuflichen Hexadecan oder dem Stopfenmaterial.

Zunächst wurde die Reinheit des in den folgenden Versuchen verwendeten Hexadecans (99,5 %ig, B 1.) geprüft. Langkettige Alkene, primäre Alkohole oder langkettige Fettsäuren waren nicht nachweisbar (Nachweisgrenze in Hexadecan: < 0,1%). Auch nach dem Autoklavieren des Hexadecans in verschlossenen Gefäßen unter N₂ waren diese Verbindungen nicht nachweisbar (B 7.1.). In Wachstumsversuchen mit den isolierten Stämmen wurde hochreines Hexadecan (99,5%) eingesetzt; von diesem wurden möglichst geringe Mengen verwendet, um einen deutlichen Verbrauch nachzuweisen. Bisher war Hexadecan immer in großem Überschuß zugesetzt worden, um die Wachstumsgeschwindigkeit nicht zu begrenzen. Die Wachstumsversuche wurden in zugeschmolzenen

Glasampullen (B 7.1.; Abb. 6) und in Flachgefäßen (B 7.2.; Abb. 7) mit einer im Verhältnis zum Kulturvolumen möglichst kleinen Stopfenoberfläche durchgeführt.

3.1. Bilanzierung des Alkanabbaus in zugeschmolzenen Glasampullen

Durch Verwendung von zugeschmolzenen Glasampullen (B 7.1.; Abb. 6) als Wachstumsgefäße wurden ein Kontakt mit Stopfenmaterial und eine Diffusion von O₂ vollständig vermieden. Für die Bilanzierung wurde sterilfiltriertes Hexadecan in nur geringen Mengen (5µl/12ml Kulturvolumen) zugesetzt. Die Wachstums- und Kontrollansätze sind in Tabelle 7 aufgeführt.

In früheren Veröffentlichungen war eine anaerobe Verwertung von Alkanen durch Stämme der Gattung *Desulfovibrio* beschrieben worden (Davis und Yarbrough, 1966; Novelli und ZoBell, 1944). Deshalb wurde zur Kontrolle ein Ansatz mit *Desulfovibrio salexigens* als marinem Vertreter der Gattung *Desulfovibrio* beimpft.

Die zugeschmolzenen Ansätze wurden bei 30°C flach liegend inkubiert und ein- bis zweimal pro Woche kurz umgeschwenkt. Nach zwei bis drei Monaten Inkubation deuteten eine starke Emulgierung des Hexadecans und eine leichte Trübung des Mediums in den Röhrchen auf Wachstum hin. Offensichtlich war das Wachstum von Stamm Hxd3 mit den hier zugesetzten geringen Mengen an Hexadecan (1,36 mmol/l) deutlich langsamer als mit dem in routinemäßigen Anzuchten verwendeten großen Überschuß (40 mmol/l). Nach weiteren drei Monaten machten sich allmählich Lyseerscheinungen bemerkbar. Die zugeschmolzenen Ampullen wurden nach insgesamt 11 Monaten an der Verjüngung aufgebrochen. Das verbliebene Hexadecan wurde mit Hexan sorgfältig extrahiert und gaschromatographisch bestimmt (B 6.6.). Sulfat wurde gravimetrisch als BaSO₄ gemessen (B 6.4.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

In den Ansätzen mit lebenden Zellen von Stamm Hxd3 und einer ausreichenden Sulfatkonzentration wurden ca. 90 % des eingesetzten Hexadecans und 12 bis 14 mmol/l Sulfat verbraucht. Dagegen wurde in den Kontrollansätzen mit niedriger Sulfatkonzentration, ohne Zusatz von Bakterien oder mit pasteurisierten Zellen die ursprünglich zugesetzte Hexadecanmenge fast

Tabelle 7: Bestimmung des Hexadecan- und Sulfatverbrauchs nach anaerobem Wachstum von Stamm Hxd3 auf hochreinem Hexadecan (99,5%) im Vergleich zu Kontrollansätzen. Die Ansätze waren 11 Monate in anoxisch zugeschmolzenen Glasampullen (B 7.1.; Abb. 6) inkubiert worden. Dabei waren einem Kulturvolumen von 12,5 ml 5µl Hexadecan^a zugesetzt worden.

Versuch	Hexadecan				Sulfat			molares Verhältnis des Verbrauchs Sulfat/Hexadecan
	zugesetzt ^a [mmol/l]	gefunden [mmol/l]	verbraucht		zugesetzt [mmol/l]	gefunden [mmol/l]	verbraucht [mmol/l]	
			[mmol/l]	[%]				
Wachstumsansätze mit Stamm Hxd3:								
Ansatz 1	1,37	0,14	1,23	89,8	30,1	18,0	12,1	9,8
Ansatz 2	1,37	0,13	1,24	90,5	30,1	18,5	11,6	9,4
Ansatz 3, mit Pepton ^b	1,37	0,07	1,30	94,9	30,1	17,1	13,0	10,0
Ansatz 4, mit Pepton ^b	1,37	0,07	1,30	94,9	30,1	15,8	14,3	11,0
Kontrollansätze:								
Stamm Hxd3, wenig Sulfat ^c	1,37	1,28	0,09	6,6	1,1	-	1,1	-
Stamm Hxd3, ohne Hexadecan	-	-	-	-	30,1	30,6	-	-
Stamm Hxd3, ohne Hexadecan mit Pepton ^b	-	-	-	-	30,1	29,8	0,3	-
Stamm Hxd3, pasteurisiert	1,37	1,29	0,08	6,2	30,1	30,0	0,1	-
Stamm Hxd3, unbeimpft	1,37	1,35	0,02	1,4	30,1	30,1	0,0	-
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	1,37	1,35	0,02	1,4	30,1	29,9	0,2	-

^a Dichte bei 20°C, 0,775 g·cm⁻³; M_r = 226,45

^b Die Konzentration betrug 0,2 g/l

^c Das verwendete Medium war ohne Sulfat hergestellt worden. Die niedrige Sulfatkonzentration wurde durch die Vorkultur eingebracht, die auf Stearat mit einem Überschuß an Sulfat gewachsen war.

vollständig wiedergefunden. Auch in dem mit *Desulfovibrio salexigens* beimpften Ansatz blieb die eingesetzte Hexadecanmenge während der Inkubation weitgehend unverändert (Tabelle 7). In dem Kontrollansatz ohne Hexadecan verschwand nur wenig Sulfat. Die Zugabe von Pepton hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis.

In parallelen Ansätzen mit Hexadecan, das unter N₂ autoklaviert worden war, wurden die gleichen Ergebnisse erzielt, wie mit sterilfiltriertem Hexadecan.

3.2. Bilanzierung des Alkanabbaus in Flachgefäßen

Wachstumsversuche mit Stamm Hxd3

Zusätzliche Wachstumsexperimente wurden in speziell angefertigten Flachgefäßen (B 7.2.; Abb. 7) mit kleinen Butylsepten durchgeführt, um auch das während des Wachstums gebildete Sulfid zu bestimmen. Eine genaue Sulfidbestimmung war in den Glasampullen nicht möglich, da diese am Ende der Inkubation aufgebrochen werden mußten. Dabei konnte ein großer Teil des gebildeten Sulfids aus der verhältnismäßig großen Gasphase als Schwefelwasserstoff entweichen. Aus den Flachgefäßen konnten hingegen mit einer Mikroliterspritze Proben zur Sulfidbestimmung über das Septum entnommen werden, ohne das Gefäß zu öffnen. Durch die Form der Gefäße ergab sich eine große Grenzfläche zwischen Alkan und Medium, was das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Alkanen begünstigen sollte. Die Flachgefäße wurden so weit mit Medium gefüllt, daß die Gasphase gerade noch die gewünschte Ausbreitung von Hexadecan auf der Wasseroberfläche erlaubte. Auf diese Weise wurde das Entweichen von Schwefelwasserstoff in die Gasphase begrenzt. Das Verhältnis von Septumboberfläche zu Kulturvolumen war kleiner als bei den üblichen Anzuchtgefäßen. Dadurch wurde die Diffusion von Sauerstoff in das Gefäß und von Schwefelwasserstoff aus dem Gefäß eingeschränkt.

Als Substrat wurden wiederum geringe Mengen (40 µl/115 ml Kulturvolumen; 1,19 mmol/l) an sterilfiltriertem Hexadecan (99,5 %) zugesetzt. Die Ansätze wurden mit 6 ml einer auf Palmitat gewachsenen Vorkultur beimpft. Nach 9 Monaten Inkubation bei 30°C wurden die Hexadecan-Menge, die Sulfat- und die Sulfidkonzentration bestimmt (Tabelle 8). In Ansätzen mit Stamm Hxd3 wurden 72 % des zugesetzten Hexadecans verbraucht. Die dabei gebildete Sulfidkonzentration von 9,6 mM entsprach 91 % des verbrauchten Sulfats. In den

Kontrollansätzen ohne Hexadecan wurde kein Sulfid gebildet oder Sulfat verbraucht. In dem Kontrollansatz mit *Desulfovibrio salexigens* wurde weder ein Verbrauch von Hexadecan oder Sulfat noch eine Bildung von Sulfid beobachtet (Tabelle 8).

Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente in zugeschmolzenen Röhrchen und Flachgefäßen (Tabellen 7 und 8) stehen im Einklang mit einer vollständigen Oxidation von Hexadecan gemäß der folgenden Gleichung:



Wachstumsversuche mit Stamm Pnd3

Auch mit Stamm Pnd3 wurde die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum auf Alkanen gezeigt. Dazu wurden Flachgefäßen mit Salzwassermedium (B 3.1.) geringe Mengen (40 µl/115ml Kulturvolumen; 1,19 mmol/l) an sterilfiltriertem hochreinem Hexadecan (99,5 %ig), α-Cyclodextrin (5 g/l) und Stamm Pnd3 zugesetzt. Als Kontrollen dienten folgende Ansätze: (a) ohne Hexadecan (b) mit Hexadecan ohne Sulfat (c) ein Ansatz wurde pasteurisiert. Alle Kontrollansätze enthielten, wie die Wachstumsansätze, α-Cyclodextrin (5 g/l).

Nach 3 Monaten Inkubation wurde die Sulfidkonzentration in den Flachgefäßen bestimmt. In den Wachstumsansätzen mit Stamm Pnd3 und Hexadecan wurde 11,30 bzw 12,14 mM Sulfid gefunden. In den Kontrollansätzen wurden folgende Sulfidkonzentrationen bestimmt: (a) 1,11 mM (b) 0,95 mM (c) 0,66 mM. Nach Abzug der in der Kontrolle ohne Hexadecan (a) gebildeten Sulfidkonzentration ergaben sich 10,19 bzw. 11,13 mM Sulfid, die in den Wachstumsansätzen durch die Oxidation von Hexadecan gebildet worden sind. Diese Sulfidkonzentrationen entsprechen einer Oxidation von 70 bzw. 76 % des eingesetzten Hexadecans (berechnet nach Gl. 13). Demnach wächst auch Stamm Pnd3 unter anoxischen Bedingungen mit Hexadecan.

Tabelle 8: Bestimmung des Hexadecan- und Sulfatverbrauchs und der Sulfidbildung nach anaerobem Wachstum von Stamm Hxd3 auf hochreinem Hexadecan (99,5 %ig) im Vergleich zu Kontrollen. Die Ansätze waren 9 Monate in Flachgefäßen (B 7.2.; Abb. 7) inkubiert worden. Die Menge an zugesetztem Hexadecan^a betrug 40 µl, das Kulturvolumen 115 ml.

Versuch	Hexadecan				Sulfat			Sulfid	
	zugesetzt ^a	gefunden	verbraucht ^b		zugesetzt	gefunden	verbraucht ^b	gemessen	gebildet ^c
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[%]	[mM]	[mM]	[mM]	[mM]	[mM]
Wachstumsansätze mit Stamm Hxd3:									
Ansatz 1	1,19	0,33	0,86	72,3	30,1	19,5	10,6	10,1	9,6
Ansatz 2, mit Pepton ^d	1,19	0,30	0,89	74,8	30,1	19,6	10,5	9,0	8,7
Kontrollansätze:									
Stamm Hxd3, ohne Hexadecan	-	-	-	-	30,1	29,2	0,9	0,5	-
Stamm Hxd3, ohne Hexadecan mit Pepton ^d	-	-	-	-	30,1	28,9	1,2	0,3	-
<i>Desulfovibrio salexigens</i>	1,19	1,12	0,07	5,9	30,1	30,8	-	0,1	-

^a Dichte bei 20°C, 0,775 g·cm⁻³; M_r = 226,45

^b Die Werte wurden durch Abzug der gefundenen Mengen an Hexadecan bzw. Sulfat von den zugesetzten Mengen berechnet

^c Die Werte wurden durch Bildung der Differenz zwischen den in den Ansätzen gemessenen Sulfidkonzentrationen und denen in den entsprechenden Kontrollansätzen berechnet.

^d Die Konzentration betrug 0,2 g/l

4. Versuche zur Stimulierung des Wachstums der Stämme Hxd3 und Pnd3 auf Alkanen

4.1. Stimulierung des Wachstums auf Alkanen durch eine erhöhte Verteilung der Alkanphase

Erhöhung der Viskosität des Mediums

Weil Hexadecan in Wasser unlöslich ist, wird das Wachstum von Stamm Hxd3 vermutlich durch die Diffusion der Alkanmoleküle von der Grenzfläche in die Zellen limitiert. Eine Vergrößerung der Grenzfläche durch Emulsionsbildung sollte daher das Wachstum beschleunigen.

Durch Zusatz von Agar (2 g/l), Methylcellulose (20 g/l), Stärke (15 g/l), Gummi arabicum (40 g/l) oder Gelatine (50 g/l) wurde die Viskosität des Mediums erhöht und dadurch eine durch Schütteln des Ansatzes gebildete Emulsion von Hexadecan in wässriger Phase stabilisiert.

Nur mit Agar wurde eine schwache Stimulierung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Hexadecan festgestellt (Abb. 10). Alle anderen Zusätze zur Erhöhung der Viskosität hemmten das Wachstum in den verwendeten Konzentrationen deutlich.

Versuche mit Teflonband

Ferner wurde versucht die Substratoberfläche durch Tränken von Teflonband mit Hexadecan zu vergrößern. Dies hatte eine nur schwache Stimulierung des Wachstums mit Hexadecan zur Folge.

Wachstumsversuche mit α -Cyclodextrin

Cyclodextrine können mit niedermolekularen hydrophoben Verbindungen wie Kohlenwasserstoffen wasserlösliche Einschlußverbindungen bilden. Daher wurde geprüft, ob durch Zusatz von Cyclodextrinen die Verfügbarkeit der wasserunlöslichen Alkane für Stamm Hxd3 erhöht und dessen Wachstum beschleunigt werden konnte.

Tatsächlich stimulierte α -Cyclodextrin in der zunächst eingesetzten Konzentration von 10 g/l das Wachstum stark (Abb. 10). In einem Kontrollansatz mit

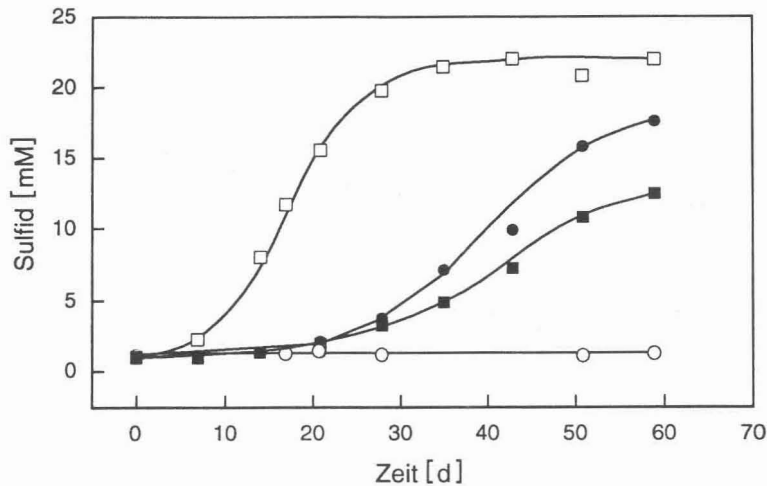


Abb. 10: Stimulierung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Hexadecan durch Agar und α -Cyclodextrin. ■ = ohne Zusatz; ● = Agar, 2 g/l; □ = α -Cyclodextrin, 5 g/l; ○ = 5 g/l α -Cyclodextrin ohne Hexadecan.

mit α -Cyclodextrin (10 g/l) ohne Hexadecan wurde kein Sulfid gebildet. α -Cyclodextrin diente Stamm Hxd3 demnach nicht als Substrat. Mit β -Cyclodextrin (5,0 und 10 g/l) und γ -Cyclodextrin (5,0 und 10 g/l) wurde keine Stimulierung des Wachstums auf Hexadecan beobachtet.

Zur Ermittlung einer für die Routinekultivierung auf Hexadecan geeigneten α -Cyclodextrin-Konzentration wurden Ansätze mit Zusätzen zwischen 1 bis 10 g/l hergestellt. Das schnellste Wachstum wurde mit 5 g/l α -Cyclodextrin beobachtet. Mit 2,5 g/l war das Wachstum deutlich langsamer, wenn auch immer noch etwas schneller als ohne α -Cyclodextrin (Abb. 11).

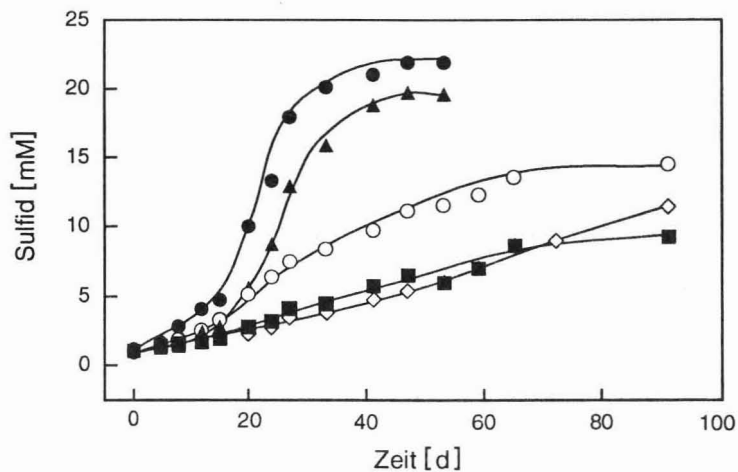


Abb. 11: Einfluß verschiedener Konzentrationen von α -Cyclodextrin auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Stamm Hxd3 auf Hexadecan. Als Maß für das Wachstum wurde die Sulfidbildung bestimmt. ◇ = ohne α -Cyclodextrin; ■ = 1 g/l α -Cyclodextrin; ○ = 2,5 g/l α -Cyclodextrin; ● = 5 g/l α -Cyclodextrin; ▲ = 10 g/l α -Cyclodextrin

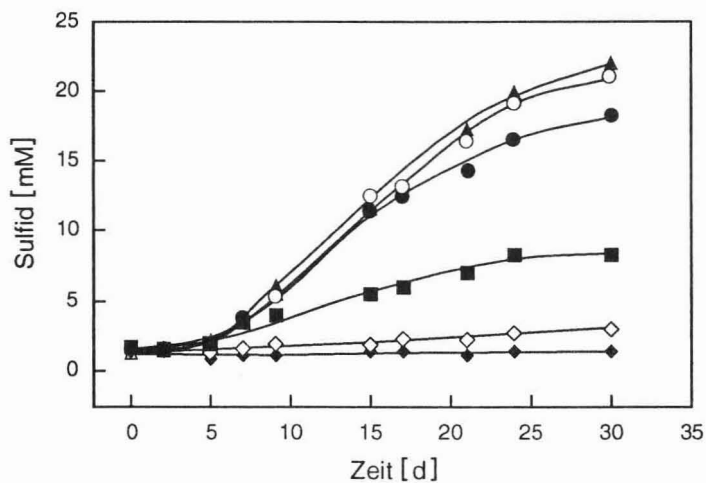


Abb. 12: Einfluß verschiedener Konzentrationen von α -Cyclodextrin auf das Wachstum von Stamm Pnd3 auf Hexadecan. Als Maß für das Wachstum wurde die Sulfidbildung bestimmt. ◇ = ohne α -Cyclodextrin; ■ = 3 g/l α -Cyclodextrin; ● = 6 g/l α -Cyclodextrin; ○ = 10 g/l α -Cyclodextrin; ◆ = 6 g/l α -Cyclodextrin ohne Hexadecan; ▲ = α -Cyclodextrin mit komplexierten Spurenelementen (B 3.1.).

Auch das Wachstum von Stamm Pnd3 auf Hexadecan wurde durch Zusatz von α -Cyclodextrin stimuliert. Bei der Bestimmung der für die Routinekultivierung geeigneten Konzentrationen an α -Cyclodextrin war das Wachstum mit 10 g/l am schnellsten (Abb. 12).

Ohne α -Cyclodextrin betragen die lag-Phasen beim Wachstum von Stamm Hxd3 oder Stamm Pnd3 auf Alkanen 1 bis 4 Wochen. Bisweilen blieb das Wachstum sogar ganz aus, ohne daß ein Grund dafür zu erkennen war. In Gegenwart von α -Cyclodextrin wurde hingegen stets ein gutes Wachstum mit lag-Phasen von nur zwei bis vier Tagen erzielt.

Hexadecan bildete mit α -Cyclodextrin in Konzentrationen von 5 und 10 g/l nach einigen Stunden einen weißen Niederschlag, der in den Ansätzen mit 2,5 und 1,0 g/l nicht auftrat.

Wachstumsversuche unter Schütteln

Für die bisherigen Versuche zur Optimierung des Wachstums dienten 20 ml Röhrchen, die liegend inkubiert wurden und so kurze Diffusionsstrecken gewährleisten. Bei Massenanzuchten in größeren liegenden Gefäßen war mit einer Verlangsamung der Substratversorgung durch Diffusion zu rechnen. Daher wurde geprüft, ob ein Schütteln solcher Gefäße das Wachstum beschleunigte.

Wachstumsansätze mit Hexadecan in 0,5 l Meplats-Flaschen wurden in Gegenwart von 5,0 g/l α -Cyclodextrin auf einem Schüttler bei 65 rpm inkubiert. Kontrollansätze wurden entweder einmal am Tag per Hand kurz geschüttelt und sonst ruhig liegend inkubiert, oder sie wurden überhaupt nicht geschüttelt.

Ansätze, die überhaupt nicht geschüttelt wurden, zeigten stets das langsamste Wachstum. In kontinuierlich geschüttelten Ansätzen war das Wachstum in der ersten Woche langsamer als in denen, die einmal kurz geschüttelt wurden. Nach der ersten Woche war dann das Wachstum in den kontinuierlich geschüttelten Ansätzen am schnellsten (Abb. 13).

Bei allen folgenden Anzuchten größerer Zellmengen wurden die 0,5 l Flaschen in der ersten Woche ruhig liegend inkubiert und danach bei 65 rpm kontinuierlich geschüttelt.

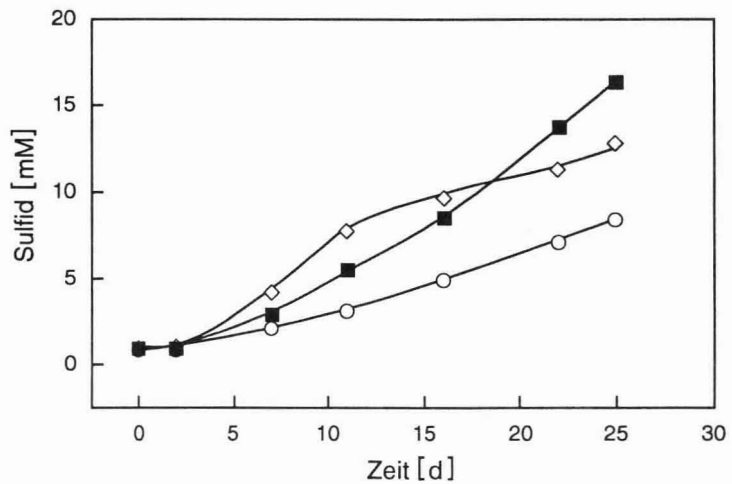


Abb. 13: Einfluß des Schüttelns auf das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan in Kulturvolumina von 0,5 l. Das Medium enthielt 5 g/l α -Cyclodextrin. Als Maß für das Wachstum wurde die Sulfidbildung bestimmt. \circ = ohne Schütteln inkubiert; \diamond = alle zwei Tage von Hand geschüttelt; \blacksquare = bei 65 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

4.2. Stimulierung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Alkanen durch Erhöhung der Spurenelementkonzentrationen

Bereits in Versuchen vor der Verwendung von α -Cyclodextrin hatte eine dreifache Konzentrationserhöhung von Fe^{2+} (von 7,5 auf 22,5 μM) und von Zn^{2+} (von 0,5 auf 1,5 μM) das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan leicht stimuliert.

Auch in Gegenwart von α -Cyclodextrin bewirkte eine Verdreifachung der Konzentration aller Spurenelemente, aber auch der Konzentration von Fe^{2+} und Zn^{2+} allein eine schwache zusätzliche Stimulation (Abb. 14). Mit fünffach erhöhten Konzentrationen von Fe^{2+} , Zn^{2+} oder von Spurenelementlösung I wurde keine weitere Stimulierung des Wachstums beobachtet.

Das Wachstum von Stamm Pnd3 auf Hexadecan wurde durch Verwendung von komplexierten Spurenelementen (B 3.1.) stimuliert (Abb. 12). Dagegen hatte eine Verdreifachung der Konzentrationen an Fe^{2+} , Zn^{2+} oder aller in

Spurenelementlösung I vorhandenen Spurenelemente keinen Einfluß auf das Wachstum von Stamm Pnd3 auf Hexadecan.

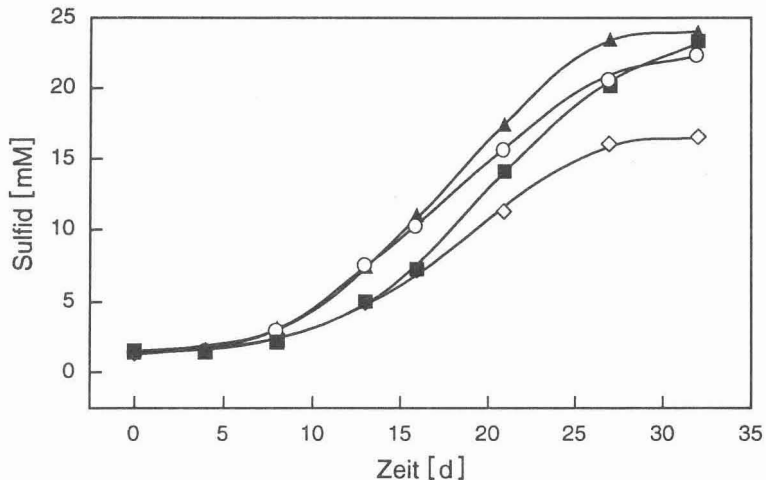


Abb. 14: Einfluß von erhöhten Konzentrationen an Spurenelementen auf das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan in Gegenwart von α -Cyclodextrin (5 g/l). Als Maß für das Wachstum wurde die Sulfidbildung bestimmt. ◇ = ohne erhöhte Spurenelementkonzentrationen; ■ = Spurenelemente der Spurenelementlösung I dreifach konzentriert; ○ = Zn²⁺-Konzentrationen dreifach; ▲ = Fe²⁺-Konzentrationen dreifach.

5. Prüfung bekannter Arten sulfatreduzierender Bakterien auf die Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen

In ihrer Fähigkeit zur Verwertung langkettiger Fettsäuren glichen die neu isolierten Stämme Hxd3, Pnd3 und TD3 mehreren bereits beschriebenen Arten sulfatreduzierender Bakterien (Widdel und Bak, 1992). Daher lag es nahe, auch einige solcher Arten auf die Fähigkeit zur Oxidation von Alkanen und Alkenen zu prüfen. Es wurden acht Spezies verschiedener Gattungen ausgewählt (Tabelle 9). In früheren Veröffentlichungen wird ferner von einem Wachstum von *Desulfovibrio* mit Alkanen berichtet (Novelli und ZoBell, 1944; Rosenfeld, 1947; Davis und Yarbrough, 1966). Von diesen Kulturen ist allerdings nur noch ein von Davis und Yarbrough (1966) verwendetes Isolat, *Desulfovibrio desulfuricans* Stamm California, erhalten. Dieser Stamm wurde in die Substrattests miteinbezogen.

Tabelle 9: Prüfung verschiedener Arten und Stämme sulfatreduzierender Bakterien auf ein Wachstum mit langkettigen Kohlenwasserstoffen, Alkoholen und Fettsäuren. Die Inkubationsdauer betrug mindestens drei Monate. In Abständen von einigen Wochen wurde als Maß für das Wachstum die Sulfidbildung kontrolliert (-, kein Wachstum; +, Wachstum; nb, nicht bestimmt).

Art oder Stamm	Substrat der Vorkultur	Wachstum auf				
		Alkane (C-Kettenlänge)	1-Alkene (C-Kettenlänge)	prim. Alkohole (C-Kettenlänge)	sek. Alkohole (C-Kettenlänge)	n-Fettsäuren (C-Kettenlänge)
<i>Desulfococcus multivorans</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	- (16)	- (16)	+ (3 - 16) ^a
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Myristinat	- (14)	- (14)	- (14)	- (14)	+ (3 - 14) ^a
<i>Desulfotomaculum sapomandens</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	- (16)	- (16)	+ (4 - 18) ^a
<i>Desulfoarculus baarsii</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	+ (16)	+ (16)	+ (3 - 18) ^a
<i>Desulfobotulus sapovorans</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	+ (16)	- (16)	+ (4 - 16) ^a
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	+ (16)	- (16)	+ (3 - 16) ^a
<i>Desulfobacter catecholicum</i>	Palmitat	- (16)	- (16)	- (16)	- (16)	+ (3 - 20) ^a
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>						
California	Lactat	- (16)	- (16)	- (16)	- (16)	- ^a
Hxd3	Palmitat	+(12 - 20)	+ (16)	+ (16)	+ (16)	+ (4 - 18)
Pnd3	Capronat	+(14 - 17)	+ (16)	+ (16)	- (16)	+ (1 - 18)
TD3	Capronat	+(6 - 14) ^b	- (10) ^b	- (10) ^b	nb	+ (4 - 18) ^b

^a (Widdel und Bak, 1992)

^b (P. Rueter, pers. Mitteilung)

Neben Alkanen wurden auch langkettige 1-Alkene, sowie primäre und sekundäre Alkohole geprüft.

Keine der bekannten Arten wuchs auf Alkanen oder Alkenen (Tabelle 9). Dagegen wurde 1-Hexadecanol von mehreren Stämmen verwertet. *Desulfovibrio baarsii* und Stamm Hxd3 wuchsen auf 2-Hexadecanol.

6. Wachstum alkanverwertender sulfatreduzierender Bakterien mit Rohöl

Wachstumsversuche mit Stamm Hxd3

Stamm Hxd3 war aus einem Öl-Wasser-Separator isoliert worden, in dem intensive Sulfidbildung stattfand (Cord-Ruwisch et al., 1986). Daher wurde untersucht, ob Stamm Hxd3 aus Erdöl Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion bezieht. Dies wäre ein Hinweis darauf, daß die bei der Rohölförderung häufig auftretende Bildung von Schwefelwasserstoff durch Verwertung von Alkanen aus dem Rohöl durch Sulfatreduzierer zustandekommt.

Anaerobe Röhrrchen (20 ml) mit 15 ml Medium und 200 µl Rohöl wurden mit Stamm Hxd3 beimpft. Dabei wurde in Parallelansätzen Rohöl aus Eddesse und aus Sinstorf eingesetzt. Es wurde jeweils ein Ansatz mit und ohne α -Cyclodextrin (5 g/l) hergestellt. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne zugesetztes Rohöl. In weiteren Kontrollen, die mit *Desulfoarculus baarsii* beimpft worden waren, sollte gezeigt werden, ob durch Verwertung von Fettsäuren aus Rohöl Sulfid gebildet wurde. *Desulfoarculus baarsii* wächst auf Monocarbonsäuren von Formiat bis Stearat, jedoch nicht auf Kohlenwasserstoffen (Tabelle 9). In Vorversuchen mit Palmitat und Rohöl war gezeigt worden, daß dieses weder für Stamm Hxd 3 noch für *Desulfoarculus baarsii* toxisch war.

Nach drei Monaten Inkubation bei 30°C wurde die Sulfid-Konzentration bestimmt (Tabelle 10). Nur Ansätze mit Rohöl und Stamm Hxd3 hatten deutlich Sulfid gebildet. Die Zugabe von α -Cyclodextrin stimulierte die Sulfidbildung.

Wachstumsversuche mit der vorgereinigten thermophilen Kultur

Die vorgereinigte thermophile Kultur wurde aus Sedimenten des Guaymas-Becken gewonnen. In diesen Sedimenten finden mit dem reichlich vorhandenem Detritus unter hohem Druck ($2,03 \cdot 10^4$ kPa) infolge hydrothermalen Erhitzung

rezente Erdölbildungsprozesse statt (Simoneit und Lonsdale, 1982; Kawka und Simoneit, 1987). Außerdem wurde in den Sedimenten des Guaymas-Becken eine intensive Sulfatreduktion gemessen (Jørgensen et al., 1990, 1992). Deshalb wurde untersucht, ob die vorgereinigte thermophile Kultur aus Rohöl Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion erhält.

In Röhrchen (20 ml) mit 15 ml Medium, der vorgereinigten Kultur und 200 µl Rohöl wurde die Sulfidbildung gemessen (B 6.2.). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Rohöl.

Nach 25 Tagen Inkubation bei 60°C hatten die Ansätze mit Rohöl ca. 10 mM Sulfid gebildet; die Ansätze ohne Rohöl dagegen hatten ca. 1 mM Sulfid gebildet. Dieser Befund wurde mit einer aus der vorgereinigten thermophilen Kultur isolierten alkanverwertenden Reinkultur bestätigt (P. Rueter, pers. Mitteilung).

Tabelle 10: Bestimmung der Sulfidbildung in anaeroben Ansätzen von Stamm Hxd3 und *Desulfoarculus baarsii* mit Rohöl als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle. Ansätzen mit einem Kulturvolumen von 16 ml wurden jeweils 200 µl Rohöl (unter N₂ autoklaviert) zugesetzt. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß das verwendete Rohöl für Stamm Hxd3 und *Desulfoarculus baarsii* nicht toxisch ist.

Versuch	Zusatz von α-Cyclodextrin [5 g/l]	Inokulum	Sulfidkonzentration [mM]
1) Rohöl (Sinstorf)	-	Hxd3	3,38
2) Rohöl (Sinstorf)	+	Hxd3	7,62
3) Rohöl (Eddesse)	-	Hxd3	5,10
4) Rohöl (Eddesse)	+	Hxd3	8,67
Kontrollen:			
Rohöl (Sinstorf)		<i>Desulfoarculus baarsii</i>	1,45
Rohöl (Eddesse)		<i>Desulfoarculus baarsii</i>	1,12
ohne Rohöl	-	Hxd3	0,69
ohne Rohöl	+	Hxd3	0,97
ohne Rohöl	-	<i>Desulfoarculus baarsii</i>	1,18

7. Prüfung der Wirkung kurzkettiger Alkane auf die Verwertung von Hexadecan durch Stamm Hxd3

In Kapitel C 2.1. wurde gezeigt, daß Alkane mit einer C-Kettenlänge von C₁ bis C₁₀ von Stamm Hxd3 nicht verwertet wurden. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die an der Alkanverwertung beteiligten Enzyme eine hohe Spezifität für die Kettenlänge ihrer Substrate besitzen. Dies ist auch von aeroben alkanverwertenden Bakterien bekannt. (Bühler und Schindler, 1984). Nunmehr sollte geprüft werden, ob kürzerkettige Alkane als mögliche Substratanaloga die Verwertung von Hexadecan spezifisch hemmten.

Die gasförmigen Alkane Methan, Ethan, Propan und Butan beeinträchtigten das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan nicht. Die Zugabe von Pentan, Hexan, Heptan, Octan oder Decan zur Hexadecanphase zeigten keine stärkere Hemmwirkung als im Versuch mit Stearat als Substrat und Pristan als Trägerphase (C 2.1.). Die kürzerkettigen Alkane sind demnach keine Antagonisten zu verwertbaren Alkanen.

8. Verwertung möglicher Intermediate in Zellsuspensionen von Stamm Hxd3

Neben Alkanen verwertete Stamm Hxd3 auch 1-Hexadecen, 1-Hexadecanol und langkettige Fettsäuren (B 2.1.). In früheren Arbeiten war die Hypothese aufgestellt worden, daß ein vermuteter anaerober Abbau von Alkanen in Denitrifizierern über Dehydrogenierung zum 1-Alken und Wasseranlagerung zum 1-Alkanol erfolgt (Parekh et al., 1977). Es sollte daher in Zellsuspensionsversuchen mit Stamm Hxd3 geprüft werden, ob die außer Alkanen verwerteten Substrate mögliche Zwischenprodukte des anaeroben Alkanabbaus sind oder als solche ausgeschlossen werden können.

In Zellsuspensionen liegen stoffwechselaktive Zellen in hoher Dichte vor; dementsprechend sind auch Umsetzungen aufgrund hoher Raten gut erkennbar und meßbar. Anhand der Sulfidbildung in Gegenwart verschiedener Substrate läßt sich daher erkennen, ob die in einem sulfatreduzierenden Bakterium zur Verwertung notwendige Aktivität bereits von Anfang an vorliegt oder erst induziert werden muß. Ein Zwischenprodukt des anaeroben Alkanabbaus sollte durch Zellen aus Alkananzuchten ohne Induktionsperiode oxidiert werden, sofern das Intermediat durch Diffusion oder Transportprozesse in die Zelle gelangen kann. In

parallelen Versuchen wurde eine Neusynthese von Enzymen durch Zusatz eines Antibiotikums unterdrückt.

8.1 Ermittlung geeigneter Antibiotika

In Vorversuchen wurde untersucht, welche Antibiotika das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Stearat am wirkungsvollsten hemmten (Tabelle 11). Erythromycin und Rifampicin waren nicht geeignet, weil Stammlösungen dieser Antibiotika nur in Ethanol (70 %) bzw. Methanol hergestellt werden konnten; ein Zusatz dieser Alkohole zum Medium hemmte das Wachstum von Stamm Hxd3. Von einer Verwendung von Chloramphenicol wurde abgesehen, weil eine Reaktion der Nitrogruppe unter den reduzierenden Bedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte. Somit war Tetracyclin das wirksamste und am besten geeignete Antibiotikum für die folgenden Versuche.

Tabelle 11: Hemmung des Wachstums von Stamm Hxd3 auf Stearat (1 mM) durch verschiedene Antibiotika. (+: gutes Wachstum; ++: gehemmtes Wachstum; -: kein Wachstum)

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]	Wachstum
Streptomycin	0,2	++
	1,0	++
	5,0	+
	40,0	-
Tetracyclin	0,2	++
	1,0	+
	5,0	-
	20,0	-
Kanamycin	2,0	++
	10,0	++
	50,0	++
	200,0	-
Kontrolle: ohne Antibiotikum	-	++

8.2. Induktionsversuche

Zellsuspensionen aus Hexadecan-Anzuchten

Frischen Zellsuspensionen aus Hexadecan-Anzuchten wurden Hexadecan, 1-Hexadecen, 1-Hexadecanol oder Stearat zugesetzt. Außerdem wurde ein Kontrollansatz ohne Substrat hergestellt. Die Sulfidbildung wurde über einen Zeitraum von 120 h quantitativ (B 6.2.) verfolgt (Abb. 15).

Mit Stearat und Hexadecan begann die Sulfidbildung ohne Verzögerung. In den Parallelansätzen in Gegenwart von Tetracyclin wurde ebenfalls deutlich mehr Sulfid gebildet als in der Kontrolle ohne Substratzusatz. Demnach ist die Fähigkeit zur Verwertung von langkettigen Fettsäuren auch beim Wachstum auf Hexadecan vorhanden. In dem Ansatz mit 1-Hexadecen begannen die Zellen erst nach ca.

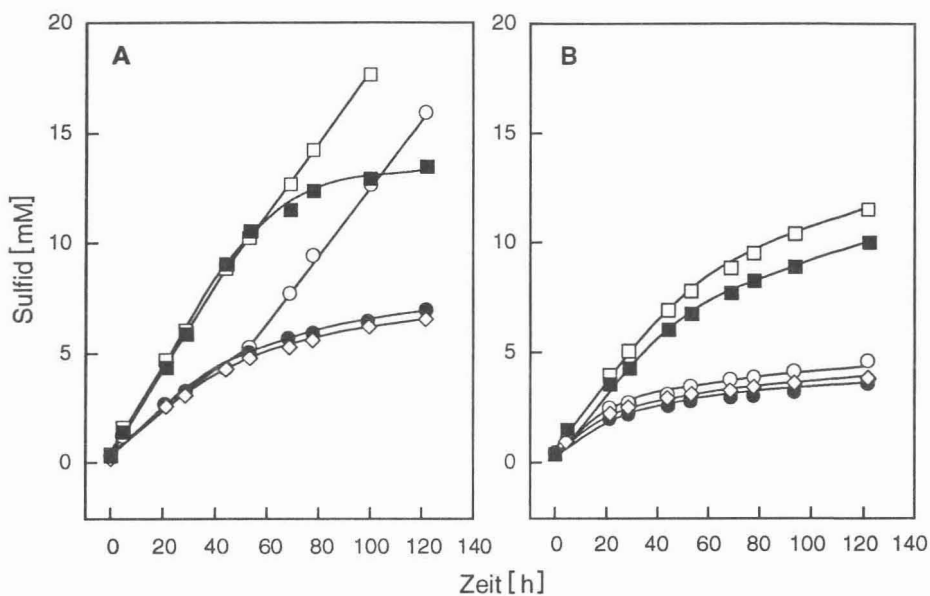


Abb. 15: Prüfung der Fähigkeit zur Verwertung von 1-Hexadecen, 1-Hexadecanol und Stearat in Zellsuspensionen aus Hexadecan-Anzuchten von Stamm Hxd3. (A) ohne Antibiotikum (B) mit Tetracyclin (100 µg/ml). ◇ = ohne Substrat; ■ = mit Stearat; ● = mit 1-Hexadecanol; ○ = mit 1-Hexadecen; □ = mit Hexadecan.

48 h deutlich mehr Sulfid zu bilden als in der Kontrolle ohne Substrat; in dem Parallelansatz mit Tetracyclin wurde während des gesamten Meßzeitraums nicht mehr Sulfid gebildet als in der Kontrolle. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Fähigkeit zum Abbau von 1-Hexadecen in Zellen aus Hexadecan-Anzuchten erst induziert wurde. Mit 1-Hexadecanol wurde während des gesamten Meßzeitraumes nicht mehr Sulfid gebildet als in der Kontrolle ohne Substrat. Die Sulfidbildung in der Kontrolle ohne Substrat wurde vermutlich durch an den Zellen haftendes Hexadecan aus der Zellanzucht verursacht.

Zellsuspensionen aus Stearat-Anzuchten

Zum Vergleich wurden auch Zellen aus Stearat-Anzuchten auf vorhandene und induzierbare Abbauaktivitäten geprüft.

Mit Stearat und 1-Hexadecanol setzte die Sulfidbildung auch in Gegenwart von Tetracyclin sofort ein. Die Fähigkeit zum anaeroben Abbau von 1-Hexadecanol wird demnach beim Wachstum auf Stearat exprimiert. Die Sulfidbildung mit 1-Hexadecen begann erst nach einer Induktionszeit von ca. 30 h. In Gegenwart von Tetracyclin wurde mit 1-Hexadecen über den gesamten Meßzeitraum nicht mehr Sulfid gebildet als in der Kontrolle ohne Substrat. Mit Hexadecan wurde weder mit noch ohne Tetracyclin mehr Sulfid gebildet als in den Kontrollansätzen ohne Substrat. Die Fähigkeit zum Hexadecanabbau wurde während des Inkubationszeitraums von 100 h nicht induziert. Somit eignen sich Zellen aus Stearat-Anzuchten nicht zur Untersuchung des Alkan-oxidierenden Systems.

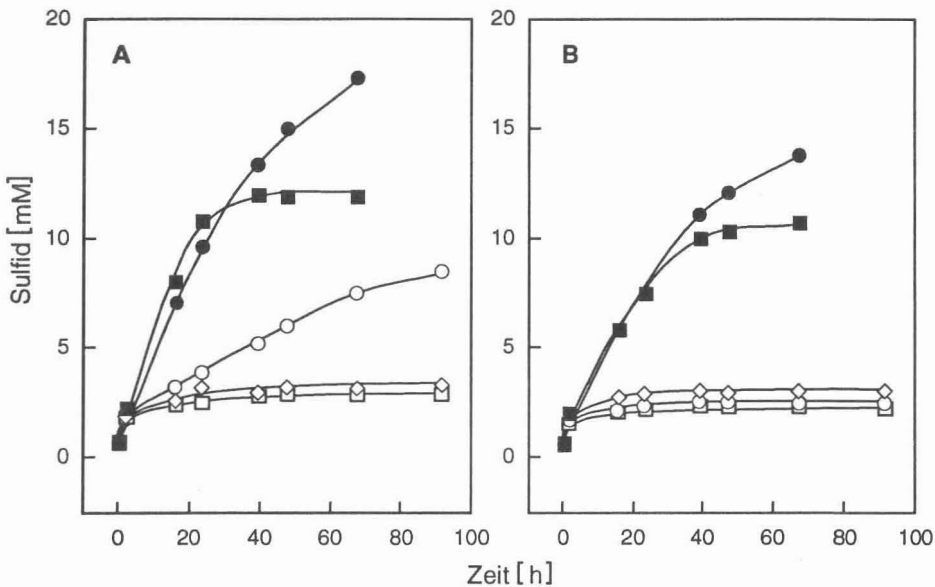


Abb. 16: Prüfung der Fähigkeit zur Verwertung von Hexadecan, 1-Hexadecen und 1-Hexadecanol in Zellsuspensionen aus Stearat-Anzuchten von Stamm Hxd3. (A) ohne Antibiotikum (B) mit Tetracyclin (100 µg/ml). ◇ = ohne Substrat; ■ = mit Stearat; ● = mit 1-Hexadecanol; ○ = mit 1-Hexadecen; □ = mit Hexadecan.

9. Einfluß der Substrate auf die Synthese von Zellfettsäuren

Die zur Verwertung von Alkanen fähigen sulfatreduzierenden Bakterien oxidierten ihre Elektronendonatoren vollständig zu CO_2 . Somit standen keine organischen Ausscheidungsprodukte aus dem Katabolismus zur Verfügung, die Hinweise auf Abbaureaktionen geben könnten. Weil jedoch der Stoffwechsel der Alkane sehr wahrscheinlich in den der Fettsäuren einmündet, war eine Beeinflussung der Zusammensetzung der Zellfettsäuren durch die Art des verwendeten Alkans zu erwarten. Daher wurden die Zellfettsäuren nach dem Wachstum auf verschiedenen Alkanen, 1-Alkenen und Fettsäuren analysiert.

Dazu wurden Zellen von Stamm Hxd3 auf den jeweiligen Substraten (Hexadecan, Heptadecan, 1-Hexadecen, 1-Heptadecen, Heptadecanat und Stearat) in Kulturvolumina von je 1 l angezogen. Die Vorkulturen waren auf den jeweils gleichen Substraten gewachsen. Die Zellfettsäuren der geernteten Zellen wurden nach dem unter B 6.7. beschriebenen Verfahren analysiert.

Analyse der Zellfettsäuren von Anzuchten auf langkettigen Fettsäuren

In der Anzucht auf Heptadecanat hatten 98 % der Zellfettsäuren, ähnlich wie das Substrat, eine ungerade C-Atomanzahl in der Kette (Methylverzweigungen nicht berücksichtigt), wobei Heptadecanat und 10-Methylheptadecanat überwogen (Abb. 17 A). Hingegen hatten in der Anzucht auf Octadecanat 97 % der Fettsäuren Ketten mit gerader C-Atomzahl; am häufigsten waren Hexadecanat und 10-Methylhexadecanat (Abb. 17 B). Dies deutet darauf hin, daß die als Substrat zugesetzten Fettsäuren direkt als Vorstufen für die Bildung der Zellfettsäuren dienen.

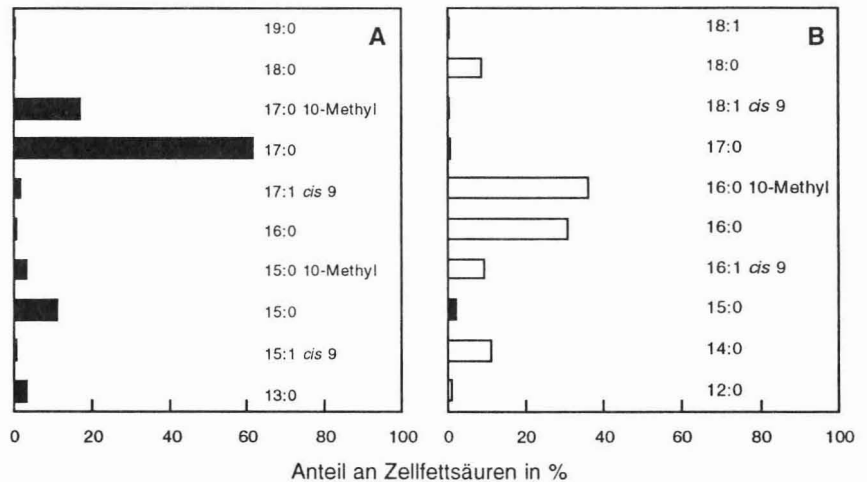


Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Zellfettsäuren in Anzuchten von Stamm Hxd3 auf Heptadecanat (A) und Octadecanat (B). ■ = Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen; □ = Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen. Die 10-Methylverzweigung wird nicht berücksichtigt, da diese nach der Synthese der Kette durch Methylierung eines C-Atoms mit Doppelbindung gebildet wird.

Analyse der Zellfettsäuren von Anzuchten auf Alkanen

Die Zellfettsäuren der Anzucht auf Hexadecan enthielten etwa 94 % Fettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen in der Kette. Pentadecanat und 10-Methylpentadecanat waren die häufigsten Fettsäuren (Abb. 18 A). In Zellen, die mit Heptadecan angezogen worden waren, hatten 95 % der Fettsäuren eine gerade C-Atomanzahl in der Kette, wobei Hexadecanat und 10-Methylhexadecanat am häufigsten waren (Abb. 18 B). Offensichtlich blieb mit Alkanen als Substraten, im Gegensatz zum Wachstum auf Fettsäuren, die Gerad- oder Ungeradzahligkeit der Kettenlänge bei der Bildung der Zellfettsäuren nicht erhalten.

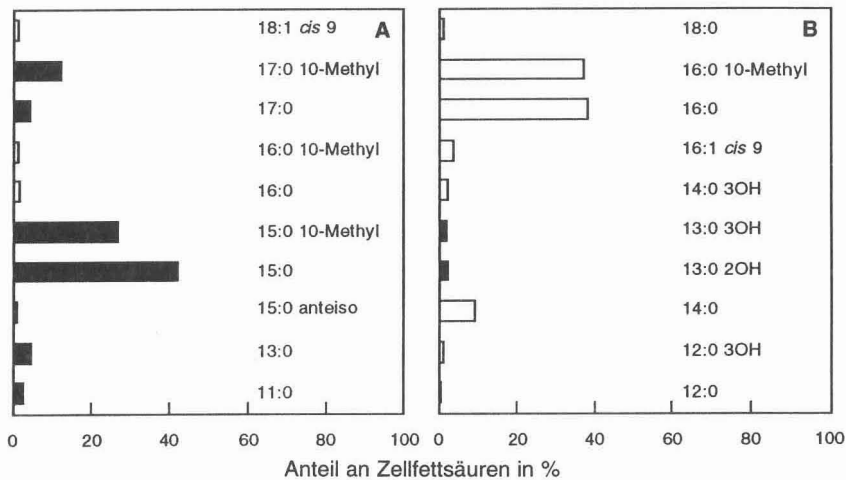


Abb. 18: Prozentuale Verteilung der Zellfettsäuren in Anzuchten von Stamm Hxd3 auf Hexadecan (A) und Heptadecan (B). ■ = Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen; □ = Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen. Die 10-Methylverzweigung wird nicht berücksichtigt, da diese nach der Synthese der Kette durch Methylierung eines C-Atoms mit Doppelbindung gebildet wird.

Analyse der Zellfettsäuren von Anzuchten auf 1-Alkenen

1-Alkene sind als mögliche Intermediate des anaeroben Alkanabbaus diskutiert worden (Parekh et al., 1977). Deshalb sollte untersucht werden, ob die

Zellfettsäuremuster durch 1-Alkene mit gerader und ungerader Anzahl an C-Atomen in derselben Weise beeinflusst werden, wie durch Alkane.

In Zellen aus der Anzucht mit 1-Hexadecen hatten über 90 % der Zellfettsäuren eine gerade C-Atomanzahl in der Kette. Hexadecanat und 10-Methylhexadecanat waren dabei die häufigsten Zellfettsäuren (Abb. 19 A). Die Analyse der Anzuchten auf 1-Heptadecen ergab, daß ca. 85 % der Zellfettsäuren eine ungerade Anzahl an C-Atomen besaßen, wobei die häufigsten Zellfettsäuren Heptadecanat, 10-Methylheptadecanat und Pentadecanat waren (Abb. 19 B). Die Gerad- oder Ungeradzahligkeit der C-Atomanzahl der 1-Alkene blieb, anders als bei Alkanen, auch in den Ketten der Zellfettsäuren erhalten.

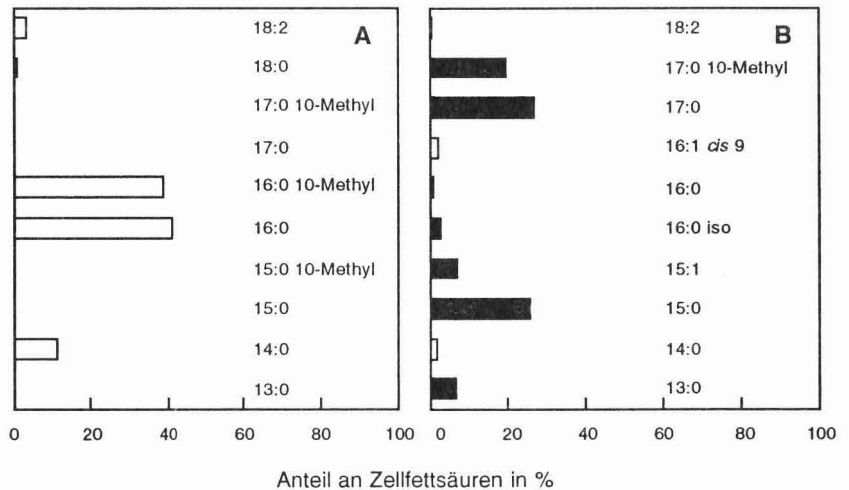


Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Zellfettsäuren in Anzuchten von Stamm Hxd3 auf 1-Hexadecen (A) und 1-Heptadecen (B). ■ = Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen; □ = Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen. Die 10-Methylverzweigung wird nicht berücksichtigt, da diese nach der Synthese der Kette durch Methylierung eines C-Atoms mit Doppelbindung gebildet wird.

10. Verwertung von Hexadecan durch Zellsuspensionen von Stamm Hxd3 in Gegenwart von CO

Aufgrund der Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3 (C 9.) wurde vermutet, daß die anaerobe Aktivierung von Alkanen eine Verlängerung der C-Kette um eine C₁-Einheit einschließt. Deshalb wurde eine Carbonylierung des Alkans durch Reaktion mit CO als einleitende Aktivierungsreaktion erwogen. Diese Reaktion wäre die Umkehrreaktion der Alkansynthese aus Aldehyden bei Grünalgen (Dennis und Kolattukudy, 1992), höheren Pflanzen (Cheesbrough und Kolattukudy, 1984) und Vertebraten (Cheesbrough und Kolattukudy, 1988). In Zellsuspensionsversuchen sollte daher geprüft werden, ob der Alkanabbau durch Zugabe von CO stimuliert wurde.

Jeweils 4 Ansätze wurden mit frischen Zellsuspensionen aus Hexadecan-Anzuchten entweder mit Hexadecan, Palmitat oder ohne Substrat hergestellt. Den jeweiligen 4 Parallelansätzen wurden entweder 0, 3, 6 oder 20 kPa CO in die Gasphase gegeben. Darauf wurde die Sulfidbildung in den Ansätzen quantitativ verfolgt (B 6.2.). In keinem der Ansätze wurde die Sulfidbildung durch die Zugabe von CO deutlich stimuliert. In Gegenwart von 3 und 6 kPa CO wurde in allen Ansätzen unabhängig vom zugesetzten Substrat etwas mehr Sulfid gebildet als in den Ansätzen ohne CO (Abb. 20). Dies könnte bedeuten, daß CO Stamm Hxd3 als Elektronendonator dient. In Ansätzen mit 20 kPa CO war die Sulfidbildung deutlich gehemmt.

11. Enzymaktivitäten im Rohextrakt von Stamm Hxd3

11.1. Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase

Stamm Hxd3 vermochte auf langkettigen Alkoholen zu wachsen (Tabelle 6) und mußte daher über die Fähigkeit zur Bildung von Alkohol-Dehydrogenase verfügen. Falls dieses Enzym nur bei Bedarf gebildet wird, sollte eine Prüfung auf dessen Aktivität in Zellen aus Alkan-Anzuchten einen Abbau über den Alkohol nahelegen oder ausschließen können. Dazu wurden Rohextrakte aus Anzuchten auf Hexadecan und aus Anzuchten auf Stearat hergestellt.

In den Enzymtests wurde dann allerdings sowohl im Rohextrakt aus Stearat-Anzuchten als auch im Rohextrakt aus Hexadecan-Anzuchten mit 1-Decanol Alkohol-Dehydrogenase in kaum unterschiedlichen Aktivitäten gemessen

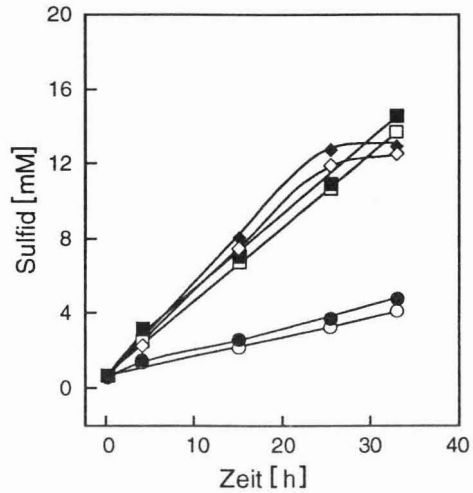


Abb. 20: Bildung von Sulfid mit Hexadecan oder Palmitat in Gegenwart von CO (3 kPa) in Zellsuspensionen aus Hexadecan-Anzuchten von Stamm Hxd3. ○ = ohne CO, ohne Substrat; ● = mit CO, ohne Substrat; ◇ = ohne CO, mit Palmitat; ◆ = mit CO, mit Palmitat; □ = ohne CO, mit Hexadecan; ■ = mit CO, mit Hexadecan.

(Tabelle 12). Ebenso wie Alkohol-Dehydrogenase war auch Aldehyd-Dehydrogenase offensichtlich konstitutiv vorhanden (Tabelle 12). Angesichts dieser Befunde ist zur Zeit nicht zu verstehen, weshalb Zellen aus Alkan-Anzuchten in Suspensionsversuchen keinen langkettigen Alkohol verwerteten (C 8.2.).

Einige weitere Messungen an Alkohol-Dehydrogenase wurden mit Rohextrakt aus Stearat-Anzuchten durchgeführt, da Stamm Hxd3 auf Stearat leichter zu kultivieren ist, als auf Hexadecan.

Tabelle 12: Aktivitäten von Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase in Rohextrakten von Stamm Hxd3 aus Stearat- und Hexadecan-Anzuchten. Der Test wurde mit Emulsionen von 1-Decanol bzw. Decanal bei 23°C durchgeführt.

Enzym	Spezifische Aktivität im Rohextrakt aus	
	Stearat-Anzuchten [nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹] ^a	Hexadecan-Anzuchten [nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹] ^a
Alkohol-Dehydrogenase	4,80	3,40
Aldehyd-Dehydrogenase	4,60	4,35

^a Auf Protein bezogen

Durch Zusatz von Salzen konnte die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase nicht oder nur minimal gesteigert werden. NH₄Cl und ZnCl₂ hemmten sogar (Tabelle 13). Dagegen konnte eine Steigerung der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität um das 1,7fache erreicht werden, wenn Glycin-Puffer pH 9,5 statt Tris/HCl, pH 9,0 verwendet wurde.

Bei der Prüfung von Alkoholen unterschiedlicher Kettenlänge (Tabelle 14) wurde mit 1-Hexanol die höchste Aktivität gemessen, während mit Ethanol und 1-Propanol keine Reaktion stattfand. Demnach ist die Alkohol-Dehydrogenase spezifisch für länger-kettige Alkohole. Mit sekundären (2-Butanol) und verzweigt-kettigen Alkoholen (Isoamylalkohol) wurden ebenfalls keine Aktivitäten gemessen.

Mit NADP⁺, Kaliumhexacyanoferrat, Phenazinmethosulfat und Methylenblau konnten keine Alkohol-Dehydrogenase Aktivitäten im Rohextrakt aus Stearat-Anzuchten nachgewiesen werden.

Der Rohextrakt verlor nach 2 Tagen Lagerung auf Eis ca. 50 % seiner Alkohol-Dehydrogenase Aktivität mit 1-Decanol. Ein Einfrieren und eine Lagerung des Extraktes über 4 Tage bei -20°C hatten keinen Aktivitätsverlust zur Folge.

Rohextrakt, der für 2,5 Stunden unter Luft inkubiert worden war, hatte die gleiche Alkohol-Dehydrogenase Aktivität wie Rohextrakt, der anaerob unter Stickstoff inkubiert worden war.

Tabelle 13: Einfluß von Salzen auf die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase im Rohextrakt von Stamm Hxd3. Die Zellen waren auf Stearat gewachsen. Der Test wurde mit einer Emulsion von 1-Decanol durchgeführt.

Salz	Konzentration im Test [mM]	Aktivität [%]
ohne	-	100
NaCl	20	110
NH ₄ Cl	20	37
MgCl ₂	2	120
ZnCl ₂	0,05	29

Tabelle 14: Aktivitäten von Alkohol-Dehydrogenase mit verschiedenen Alkoholen im Rohextrakt von Stamm Hxd3 aus Stearat-Anzuchten.

Alkohol	Aktivität [nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]
1-Butanol	4,60
1-Hexanol	10,45
1-Octanol	7,95
1-Decanol	4,60
1-Dodecanol	2,93

11.2. Enzyme der Oxidation von Propionyl-CoA

Beim Wachstum von Stamm Hxd3 auf verschiedenen Fettsäuren und Alkanen wurde bisher nie eine Ausscheidung von Propionat beobachtet. Weil jedoch bei der β -Oxidation von Fettsäuren mit einer ungeraden Zahl an C-Atomen Propionyl-CoA entsteht, muß Stamm Hxd3 über einen entsprechenden Abbauweg verfügen. Wiederum wurde untersucht, ob charakteristische Enzyme dieses Weges nur bei Bedarf exprimiert werden. So ließe sich der bei den Fettsäureanalysen (C 9.) erhaltene Hinweis erhärten, daß Alkane mit einer geraden Anzahl an C-Atomen beim Abbau Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen liefern und umgekehrt.

Dazu wurden Rohextrakte aus Anzuchten mit Heptadecanat und Anzuchten mit Stearat hergestellt und auf Malat-Dehydrogenase und Methylmalonyl-CoA:Pyruvat-Transcarboxylase untersucht (Tabelle 15). Die Transcarboxylase ist ein für die Oxidation von Propionyl-CoA charakteristisches Enzym. Die Malat-Dehydrogenase dagegen ist auch im Anabolismus an der Bildung von Succinyl-CoA aus Acetyl-CoA beteiligt. Der Test ergab allerdings, daß die Enzyme in beiden Anzuchten vorhanden waren. Angesichts der relativ geringen Aktivitätsunterschiede der Transcarboxylase in beiden Anzuchten erschien es nicht aussichtsreich, durch entsprechende Messungen an Zellen aus Alkananzuchten eindeutige Hinweise auf die Art der Umwandlung von Alkanen in Fettsäuren zu erhalten.

Tabelle 15: Aktivitäten von Malat-Dehydrogenase und Methylmalonyl-CoA:Pyruvat-Transcarboxylase in Rohextrakt aus Heptadecanat- und Stearat-Anzuchten von Stamm Hxd3.

Enzym	Aktivitäten im Rohextrakt aus	
	Heptadecanat-Anzuchten [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]	Stearat-Anzuchten [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Malat-Dehydrogenase	0,220	0,210
Methylmalonyl-CoA: Pyruvat-Transcarboxylase	0,044	0,023

12. Versuche zum enzymatischen Abbau von α -Cyclodextrin im Kulturmedium mit Hexadecan

Die Anzucht von Stamm Hxd3 auf Hexadecan erfolgte in Gegenwart von α -Cyclodextrin, um die Verfügbarkeit des wasserunlöslichen Kohlenwasserstoffs zu verbessern. Während der Inkubation bildete sich aus Hexadecan und α -Cyclodextrin ein Niederschlag, mit dem viele Zellen assoziiert waren. Um diese Zellen bei der Ernte nicht zu verlieren, sollte der Niederschlag vorher aufgelöst werden, ohne die Zellen zu schädigen. Daher lag die Entwicklung eines spezifischen enzymatischen Hydrolyseschritts nahe. Weil eine Cyclodextrin-Glykosidase nicht käuflich zu erwerben war, wurde ein aerobes Bakterium angereichert und isoliert, das mit α -Cyclodextrin in Gegenwart von Hexadecan wuchs. Aus diesem Stamm wurde Rohextrakt mit Glykosidase-Aktivität gewonnen.

Anreicherung und Isolierung

Salzwassermedium (B 3.1.) mit 4 g/l α -Cyclodextrin und Hexadecan wurden mit einer aeroben Schlammprobe aus Meeressediment beimpft. Die Ansätze wurden aerob auf einem Schüttler bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen war trotz des Vorhandenseins von Schlamm eine durch Bakterien bedingte Trübung zu erkennen. Im mikroskopischen Bild herrschten kurze bewegliche Stäbchen vor. Die Anreicherung wurde dreimal in Flüssigmedium übertragen.

Zur Isolierung wurde die vierte Folgekultur auf Agarplatten mit α -Cyclodextrin als Substrat ausgestrichen. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C wurden weiße Einzelkolonien beobachtet, welche erneut auf Agarplatten mit α -Cyclodextrin (4 g/l) ausgestrichen wurden. Letztlich wurde eine weiße, glatte Kolonie isoliert.

Kurze Charakterisierung des Isolats

Das Isolat wuchs mit α -Cyclodextrin (4 g/l), Stärke (4 g/l) und Maltose (4 g/l). Es hatte die gleichen stäbchenförmigen Zellen, die in der Anreicherung beobachtet worden waren. Beim Wachstum sank der pH-Wert des Mediums von 7,0 auf 5,0 ab. Die Säurebildung sprach für einen möglicherweise fakultativ anaeroben Stoffwechsel und unzureichende Sauerstoffversorgung oder eine Hemmung der Endoxidation durch Zucker.

Messungen von α -Cyclodextrin-Glykosidase im Rohextrakt

Um auf α -Cyclodextrin-Glykosidase zu testen, wurde ein Rohextrakt aus Anzuchten auf α -Cyclodextrin hergestellt. Als Maß für die Hydrolyse-Aktivität diente die Zeit, in der ein mit 5 g/l α -Cyclodextrin und Hexadecan gebildeter Niederschlag aufgelöst wurde. Wenn einem Testansatz mit 2 ml Volumen 50 μ l Rohextrakt zugesetzt wurde, löste sich der Niederschlag bei 30°C innerhalb von 30 min auf. Der zellfreie Kulturüberstand wurde ebenfalls auf hydrolytische Aktivität geprüft. Dazu wurden Hexadecan und α -Cyclodextrin aus einer Stammlösung direkt in den Überstand gegeben. Auch nach 15 h Inkubation bei 30°C löste sich der entstandene weiße Niederschlag nicht auf. Die α -Cyclodextrin-Glykosidase wurde also nicht in das Medium ausgeschieden, sondern blieb in oder an den Zellen. Im zellfreien Kulturüberstand wurden reduzierende Zucker (B 6.5.) in einer Konzentration von 7,2 mM bestimmt. Dies weist darauf hin, daß die α -Cyclodextrinmoleküle außerhalb der Zellen bzw. an den Zellen hydrolysiert werden.

Die hydrolytische Aktivität im Rohextrakt war auch nach sieben Tagen Aufbewahrung bei 0°C (Eisbad) unverändert. Auch ein Einfrieren bei -20°C und Auftauen im Eisbad ließ die Aktivität unverändert.

Da α -Cyclodextrin als Substrat für Massenanzuchten relativ teuer ist, wurde geprüft, ob Rohextrakte aus Anzuchten auf Maltose und Stärke ebenfalls α -Cyclodextrin hydrolisieren. Mit Rohextrakt aus Anzuchten auf Maltose oder Stärke wurde der aus Hexadecan und α -Cyclodextrin gebildete Niederschlag auch nach 15 h Inkubation bei 30°C nicht aufgelöst. In einem Kontrollansatz mit Rohextrakt aus einer Anzucht auf α -Cyclodextrin wurde der Niederschlag wie zuvor aufgelöst. Daraufhin wurden Zellen des Isolates bis zu einer optischen Dichte von 1,5 mit 1 g/l Maltose angezogen. Nachdem die optische Dichte über einen Zeitraum von 1 h konstant blieb, wurde α -Cyclodextrin aus einer sterilen Stammlösung zu einer Endkonzentration von 1 g/l zugesetzt. Bei einer optischen Dichte von 2,8 wurden die Zellen geerntet. Mit dem daraus hergestellten Rohextrakt wurde ein Niederschlag aus Hexadecan und α -Cyclodextrin genauso schnell aufgelöst wie mit Rohextrakt aus einer Anzucht, die nur auf α -Cyclodextrin gewachsen war.

Schließlich wurde untersucht, ob die α -Cyclodextrin-Glykosidase auch in Gegenwart hoher Sulfidkonzentrationen in gewachsenen Kulturen von Stamm Hxd3 aktiv ist. Dazu wurde Rohextrakt aus Zellen, die auf α -Cyclodextrin gewachsen waren, sterilfiltriert. 1 ml des Filtrats wurde einer gewachsenen 0,5 l

Kultur von Stamm Hxd3 zugesetzt. Die Sulfidkonzentration der Kultur betrug 18,5 mM. Tatsächlich löste sich der Niederschlag innerhalb von 12 h auf.

Diskussion

1. Nachweis des anaeroben Alkanabbaus durch Stamm Hxd3

Die große stoffwechselphysiologische Vielseitigkeit der sulfatreduzierenden Bakterien ist erst in den letzten zwei Jahrzehnten bekannt geworden. Lange Zeit waren nur sulfatreduzierende Bakterien der Gattungen *Desulfovibrio* und *Desulfotomaculum* bekannt, die organische Substrate mit mindestens einer C-C-Bindung nur unvollständig zu Acetat oxidieren. Diese unvollständig oxidierenden Sulfatreduzierer verwerten nur eine sehr begrenzte Anzahl von organischen Verbindungen, wie Formiat, Lactat, Pyruvat, einige Dicarbonsäuren wie Malat und Fumarat, sowie Ethanol, Glycerin, Cholin und Alanin. Mit der Isolierung von *Desulfotomaculum acetoxidans* im Jahre 1977 (Widdel und Pfennig, 1977) war das erste sulfatreduzierende Bakterium gefunden worden, das auf Acetat wächst und dieses vollständig zu CO₂ oxidiert. In der Folgezeit wurden mehrere Arten und Gattungen vollständig oxidierender sulfatreduzierender Bakterien beschrieben, die stoffwechselphysiologisch sehr vielseitig sind, wie *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* oder *Desulfonema* (Widdel, 1980; Widdel et al., 1983). Vertreter dieser Gattungen verwerten aliphatische Fettsäuren und Aromaten, deren Abbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen zuvor nicht bekannt war. Von besonderem Interesse sind dabei solche Verbindungen, deren Abbau in aeroben Bakterien durch Oxygenase-Reaktionen eingeleitet wird. Lange Zeit war nämlich bezweifelt worden, ob solche Verbindungen in Abwesenheit von Sauerstoff überhaupt abgebaut werden können. Beispiele für solche Verbindungen sind Aceton (Platen et al., 1990), Aromaten mit funktionellen Gruppen wie Benzoat oder Phenol (Bak und Widdel, 1986) und auch ein aromatischer Kohlenwasserstoff, das Toluol (Rabus et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß auch Alkane, die lange Zeit als anaerob nicht abbaubar galten, durch sulfatreduzierende Bakterien vollständig zu CO₂ oxidiert werden. Damit sind die neu isolierten sulfatreduzierenden Stämme Hxd3, Pnd3 und TD3 die ersten beschriebenen Kulturen, die nachweislich mit Alkanen als alleinigen Substraten in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen.

Frühere Berichte über einen anaeroben Alkanabbau wurden bereits unter A 3. eingehend dargestellt. Hier sollen die wichtigsten Kritikpunkte an den älteren Arbeiten aus heutiger Sicht zusammengefaßt werden.

(a) *Methoden zur Kultivierung anaerober Bakterien.* Die heute verwendeten Methoden zur Kultivierung anaerober Bakterien wurden erst Ende der 60er und Anfang der 70er Jahre entwickelt (Hungate, 1969; Bryant, 1972). Deshalb ist die Abwesenheit von Sauerstoff während der Abbauprobe insbesondere in den älteren Arbeiten zweifelhaft, zumal diese zu diesem Punkt kaum Informationen enthalten (Novelli und ZoBell, 1944; Rosenfeld, 1947; Davis und Yarbrough, 1966).

(b) *Reinheit der Kulturen.* Von Versuchen zur Prüfung auf Reinheit durch Verwendung unterschiedlicher Substrate wurde nicht berichtet.

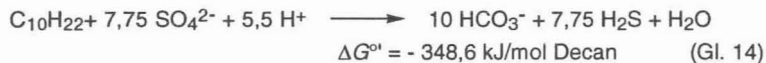
(c) *Reinheit der Substrate.* Angaben über die Reinheit der verwendeten Alkane fehlten meistens. In den Arbeiten von Rosenfeld (1947) und Novelli und ZoBell (1944) wird außerdem nicht angegeben, welcher Anteil der eingesetzten Alkane oxidiert wurde. In anderen Arbeiten wurde nur ein geringer Anteil der zugesetzten Alkane oxidiert (Davis und Yarbrough, 1966). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß Verunreinigungen aus den Substraten verwertet wurden und nicht die Alkane selbst.

(d) *Reinheit markierter Substrate.* Bei Versuchen mit radioaktiv markierten Alkanen wurde nicht gezeigt, ob die eingesetzte Radioaktivität tatsächlich vollständig im Alkan und nicht teilweise in Begleitstoffen vorlag. Somit kann in diesen Arbeiten nicht ausgeschlossen werden, daß der Abbau von markierten Verunreinigungen zu den beobachteten Ergebnissen geführt hat (Davis und Yarbrough, 1966; Ward und Brock, 1978; Hambrick et al., 1980; DeLaune et al., 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Stamm Hxd3 ca. 90 % des eingesetzten hochreinen Hexadecans (99,5 %ig) abgebaut hatte (C 3.1.). Dabei wurde die Hexadecan-Abnahme gaschromatographisch bestimmt und nicht, wie in einigen Arbeiten zuvor, durch Markierungsexperimente. Die Inkubationsversuche zum Nachweis des Hexadecanabbaus in Abwesenheit von Sauerstoff wurden in anaerob zugeschmolzenen Glasampullen durchgeführt. Dadurch wurde ausgeschlossen, daß während des langen Inkubationszeitraumes Sauerstoff in die Ansätze diffundiert oder eventuell vorhandene organische Verbindungen aus dem Stopfenmaterial verwertet wurden. In einem zusätzlichen Kontrollversuch wurde gezeigt, daß während eines Zeitraumes von mehr als einem Jahr kein Sauerstoff durch eventuell vorhandene Haarrisse in die zugeschmolzenen Glasampullen gelangte (B 7.1.; C 3.1.). Außerdem wurde in einem weiteren Kontrollversuch die Abwesenheit von aeroben alkanabbauenden Kontaminanten gezeigt. Parallel zu der Hexadecan-Abnahme wurde auch der Sulfatverbrauch in den zugeschmolzenen Ampullen bestimmt. In zusätzlichen

Wachstumsexperimenten, die in Spezialgefäßen (Abb. 7) durchgeführt wurden, wurde auch die Sulfidbildung mit Hexadecan als Substrat bestimmt. Die so ermittelten Werte sprechen für eine vollständige Oxidation von Hexadecan nach Gleichung (13). Der gemessene Sulfatverbrauch und auch die bestimmte Sulfidbildung pro mol verbrauchten Hexadecans liegen unter den mit Gleichung (13) berechneten Werten. Dies ist auf den Einbau eines Teils des verbrauchten Hexadecans in Zellmaterial und auf möglicherweise gebildete Nebenprodukte zurückzuführen.

Auch mit Stamm Pnd3 wurden Wachstumsversuche mit hochreinem Hexadecan in Flachgefäßen (Abb. 7) durchgeführt. Die dabei bestimmte Sulfidbildung spricht nach Gleichung (14) für eine vollständige Oxidation von ca. 70 % des eingesetzten Hexadecans. Ebenso wurde mit der thermophilen Reinkultur, Stamm TD3, eine anaerobe Verwertung von Decan nachgewiesen. Dabei wurde gaschromatographisch ein Verbrauch von 83 % des eingesetzten Decans ermittelt (P. Rueter, pers. Mitteilung). Mit der parallel dazu gemessenen Sulfidbildung sprechen diese Werte für eine vollständige Oxidation des eingesetzten Decans nach folgender Gleichung:



Im Zellextrakt von Stamm Hxd3 wurden CO-Dehydrogenase- und Formiat-Dehydrogenase-Aktivitäten bestimmt (Aeckersberg, 1989), was darauf hinweist, daß Acetyl-CoA über den CO-Dehydrogenase-Weg abgebaut wird (Schauder et al., 1986; Thauer et al., 1989). α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, die für eine Oxidation von Acetyl-CoA über den Citratcyclus gesprochen hätten (Schauder et al., 1987), konnte nicht gefunden werden (Aeckersberg, 1989).

2. Taxonomische Einordnung der mesophilen Bakterienisolate

Taxonomie von Stamm Hxd3

Die Sequenzierung der 16S rRNA von Stamm Hxd3 läßt eine Verwandtschaft zu Sulfatreduzierern der δ -Gruppe der Proteobakterien erkennen. Der Stamm liegt in der Gruppe der vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer, ist jedoch keiner bekannten Gattung eindeutig zuzuordnen. Die am nächsten verwandten Gattungen

sind *Desulfococcus* und *Desulfosarcina*. Diese Zuordnung steht in Übereinstimmung mit den physiologischen Merkmalen von Stamm Hxd3. Er oxidiert organische Substrate vollständig zu CO₂, wobei die Oxidation von Acetyl-CoA über den CO-Dehydrogenase-Weg verläuft. Auch die Fähigkeit zur Verwertung von aliphatischen Fettsäuren über einen großen Kettenlängenbereich teilt Stamm Hxd3 mit Vertretern der Gattungen *Desulfococcus* und *Desulfosarcina*. Dagegen unterscheidet sich Stamm Hxd3 von diesen Gattungen durch die Unfähigkeit, auf Lactat, Ethanol und H₂ zu wachsen. Das Wachstum auf Alkanen und 1-Alkenen ist eine Eigenschaft, die Stamm Hxd3 mit keiner der bekannten Arten oder Gattungen der sulfatreduzierenden Bakterien teilt. Keine der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Arten (*Desulfosarcina variabilis*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfobacterium catecholicum*, *Desulfobotulus sapovorans*, *Desulfoarculus baarsii*, *Desulfotomaculum sapomandens*) wuchs auf Alkanen oder 1-Alkenen. Außerdem wurde dies bislang von keinem sulfatreduzierenden Bakterium berichtet.

Taxonomie von Stamm Pnd3

Die Sequenzierung der 16S rRNA von Stamm Pnd3 steht noch aus. Das Fehlen einer Sporenbildung legt eine Verwandtschaft mit den mesophilen, Gram-negativen Sulfatreduzierern nahe, die in der δ-Gruppe der Proteobakterien zusammengefaßt werden. Aufgrund der großen physiologischen Ähnlichkeit zu Stamm Hxd3 (Tabelle 6) gehört Stamm Pnd3 vermutlich ebenfalls zur Gruppe der vollständig oxidierenden Sulfatreduzierer.

3. Stimulierung des Wachstums der Stämme Hxd3 und Pnd3 auf Alkanen

Das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan war mit einer Verdopplungszeit von 4 bis 5 Tagen extrem langsam. Mit Palmitat dagegen hatte Stamm Hxd3 eine Verdopplungszeit von ca. 25 h. Auch aerobe Alkanabbauer wachsen mit polaren Verbindungen deutlich schneller als mit Alkanen. So beträgt die Verdopplungszeit von *Candida tropicalis* beim Wachstum auf Glucose ca. 1 h, auf Hexadecan dagegen 2,5 h (Einsele, 1983). Die Ursache für diese Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit liegt in der extrem geringen Löslichkeit von Alkanen in Wasser (Löslichkeit von Hexadecan in Wasser: $5,2 \times 10^{-5}$ mg/l; Morgan und

Watkinson, 1994). Diese macht einen direkten Kontakt der wachsenden Zellen mit der Alkanphase notwendig. Bislang sind zwei Mechanismen bekannt, mit deren Hilfe Mikroorganismen Kontakt zu einer Kohlenwasserstoffphase herstellen und so die Aufnahme von Kohlenwasserstoffen erleichtern: (a) Anheftung der Zellen an die Kohlenwasserstoffphase (b) Pseudosolubilisierung der Kohlenwasserstoffphase.

(a) *Anheftung der Zellen an die Kohlenwasserstoffphase*. Diese erfolgt mit Hilfe von hydrophoben Bestandteilen der Zelloberfläche. Zellen von *Candida tropicalis* bilden beim Wachstum auf Alkanen Polysaccharid-Fettsäure-Komplexe, die die Anheftung der Zellen an die Alkanphase erleichtern. (Käppeli und Fiechter, 1976). *Acinetobacter calcoaceticus* dienen hydrophobe Fimbrien zur Bindung an die Kohlenwasserstoffphase (Rosenberg et al., 1982). Die Anheftung von Mikroorganismen an die Kohlenwasserstoffphase führt zur Erniedrigung der Grenzflächenspannung und damit zur Bildung von Emulsionen. Dadurch wird die Grenzfläche der Alkanphase zum Medium vergrößert.

(b) *Pseudosolubilisierung der Kohlenwasserstoffphase*. Die Ausscheidung von oberflächenaktiven Substanzen kann zur Bildung von Mikroemulsionen der Kohlenwasserstoffe führen (Pseudosolubilisierung). Die dabei gebildeten Kohlenwasserstofftropfen haben Durchmesser von 0,01 - 0,5 μm (Einsele, 1983) und sind damit deutlich kleiner als Zellen. Diese Mikrotropfen können dann von den Zellen aufgenommen werden oder an der Zelloberfläche haften. Beispiele für oberflächenaktive Substanzen sind das Emulsan von *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg und Rosenberg, 1981) und das Rhamnolipid von *Pseudomonas aeruginosa* (Koch et al., 1991). Die Bedeutung dieser oberflächenaktiven Substanzen für das Wachstum auf Alkanen belegen Versuche mit Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa*, die die Fähigkeit zur Bildung von Rhamnolipiden verloren hatten. Diese Mutanten konnten nur auf Hexadecan wachsen, wenn Rhamnolipide dem Medium zugesetzt wurden (Koch et al., 1991).

Bei Stamm Hxd3 erfolgte der Kontakt durch direkte Anheftung der Zellen an die Alkanphase, was für hydrophobe Bestandteile in der äußeren Membran spricht. Dies führte zu einer fortschreitenden Emulgierung der Alkanphase, wenn die Kulturen während des Wachstums von Zeit zu Zeit kurz geschüttelt wurden. Die durch die Anheftung bedingte Konzentrierung und teilweise Abschirmung der Zellen vom Medium kann allerdings zu Versorgungsschwierigkeiten mit Spurenelementen führen. Die beobachtete leichte Wachstumsstimulierung auf Hexadecan durch Erhöhung der Fe^{2+} - und Zn^{2+} -Konzentrationen könnte so erklärt werden.

Sehr viel stärker wurde das Wachstum von Stamm Hxd3 und Pnd3 auf Hexadecan durch Zugabe von α -Cyclodextrin stimuliert. α -Cyclodextrin setzt sich aus sechs Glucosemolekülen zusammen, die α -1,4-glycosidisch verknüpft und zu einem Ring geschlossen sind (Abb. 21). Dieser kann eine Konformation einnehmen, bei der alle OH-Gruppen nach außen weisen, wodurch in der Mitte des Moleküls eine hydrophobe Pore entsteht. In diese können sich kleine hydrophobe Verbindungen, wie Edelgase, N_2 oder O_2 , einlagern und dadurch wasserlösliche Einschlußverbindungen bilden. Neben α -Cyclodextrinen gibt es auch β - und γ -Cyclodextrine (Ring aus 7 bzw. 8 Glucosemolekülen), die entsprechend größere Poren bilden und somit auch größere Moleküle einlagern können. Cyclodextrine können als cyclische Detergentien aufgefaßt werden, welche im Gegensatz zu linearen Detergentien nicht mit Membranen interagieren können. Deshalb ist ihre Toxizität für Zellen sehr gering. Durch geldrollenartiges Aufeinanderschichten mehrerer α -Cyclodextrinmoleküle entstehen hydrophobe Kanäle, in die auch langkettige Alkane, wie das Hexadecan, eingelagert werden können. Die so entstandenen wasserlöslichen Einschlußverbindungen erhöhen die Verfügbarkeit von Hexadecan für Stamm Hxd3 und stimulieren so das Wachstum. Es ist zu vermuten, daß die Einschlußverbindungen "offene Enden" besitzen, von denen die Zellen von Stamm Hxd3 mit ihrer hydrophoben Zelloberfläche die Hexadecanmoleküle aufnehmen können. Möglicherweise sind aber auch Zellen von Stamm Hxd3 und Pnd3 in der Lage gelöste Einschlußverbindungen, ähnlich wie aerobe Alkanabbauer Mikrotropfen bei der Pseudosolubilisierung, aufzunehmen. Der bei α -Cyclodextrin-Konzentrationen von mehr als 4 g/l in Gegenwart von Hexadecan beobachtete weiße Niederschlag bildet sich vermutlich aus solchen Einschlußverbindungen. Da eine weitere Erhöhung der α -Cyclodextrinkonzentration von 4 auf 5 g/l auch das Wachstum weiter stimuliert, ist zu vermuten, daß nicht nur die gelösten, sondern auch die ausgefallenen Einschlußverbindungen die Verfügbarkeit von Hexadecan erhöhen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Stamm Hxd3 ist auch im Vergleich zu aeroben Alkanabbauern extrem langsam. Zum Beispiel erreicht *Micrococcus cerificans* auf Hexadecan Verdopplungszeiten von ca. 40 min (Einsele, 1983)

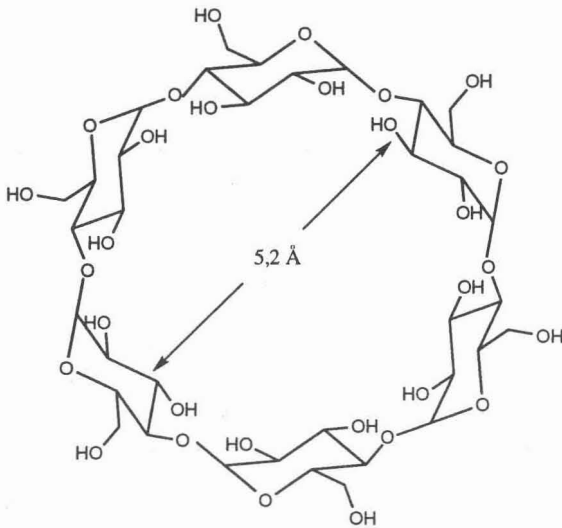
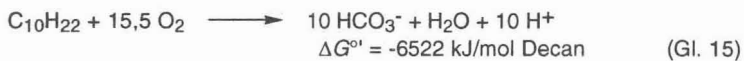


Abb. 21: Strukturformel von α -Cyclodextrin.

und ist damit 150 mal schneller als Stamm Hxd3 ohne Zusatz von α -Cyclodextrin. Genaue Vergleiche sind nicht möglich, weil Stamm Hxd3 nur während einer kurzen Zeit des gesamten Wachstums mit konstanter Rate, d. h. exponentiell wächst. Unter aeroben Bedingungen werden Alkane, wie z.B. Decan, nach folgender Gleichung zu CO_2 oxidiert:



Beim Abbau von Decan unter sulfatreduzierenden Bedingungen beträgt der ΔG° -Wert ca. -348 kJ/mol (Gl. 15), was 5,3 % des Wertes mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor entspricht. Diese deutlich höhere Energieausbeute ermöglicht aeroben alkanabbauenden Mikroorganismen vermutlich die Bildung von effektiveren Aufnahmesystemen. Außerdem stellt wahrscheinlich die einleitende Aktivierungsreaktion unter anaeroben Bedingungen eine besondere Schwierigkeit dar und ist vermutlich der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Abbau von Alkanen mit Sulfat als Elektronenakzeptor.

4. Betrachtungen zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung aliphatischer Kohlenwasserstoffe

In der Aktivierungsreaktion während der anaeroben Alkanoxidation wird wahrscheinlich zuerst eine C-H-Bindung gespalten. Deshalb soll zunächst auf gängige Mechanismen der C-H-Bindungsspaltung in der Biochemie eingegangen werden, um die besondere Problematik bei der Spaltung einer völlig isolierten C-H-Bindung zu verdeutlichen.

(a) *Abstraktion von H⁺*. Die Abspaltung eines Protons ist in C-H-Bindungen mit benachbarter Carbonylgruppe erleichtert, da das entstehende Carbanion mesomeriestabilisiert ist (Abb. 21). Derartige Reaktionen finden an Ketonen wie Dihydroxyacetonphosphat oder Thioestern wie Acetyl-CoA statt.

(b) *Abstraktion von H[•]*. Von Kohlenstoffatomen, die funktionelle Gruppen, wie Alkohol oder Aminogruppen tragen, können Hydridionen abgespalten und z. B. auf NAD(P)⁺ übertragen werden. Dabei wird gleichzeitig ein Proton von der Alkohol- oder Aminogruppe abgespalten (Abb. 23).

(c) *Abstraktion von H[•]*. Wenn Kohlenstoffatome weder OH- oder NH₂-Gruppen tragen noch zu Carbonylgruppen benachbart sind, erfolgt meistens eine homolytische Spaltung der Bindung. Diese wird durch Coenzym B₁₂- oder S-Adenosylmethionin-abhängige Enzyme katalysiert. In diesen Reaktionen wird durch Abstraktion eines H-Atoms intermediär ein Substratradikal erzeugt, das sich unter Beteiligung benachbarter funktioneller Gruppen, wie Alkohol-, Amino- oder Carboxylgruppen, intramolekular in ein Produktradikal umlagert. Dieses wird durch Wiederaufnahme des abstrahierten H-Atoms zu dem Produkt umgesetzt (Abb. 24). Allerdings sind bislang keine Coenzym B₁₂- oder S-Adenosylmethionin-abhängigen homolytischen Spaltungen von C-H-Bindungen bekannt, die durch eine oder mehrere Methylengruppen von einem funktionalisierten Kohlenstoffatom getrennt sind (Halpern, 1985; Stupperich, 1993). Die benachbarten funktionellen Gruppen erleichtern vermutlich die homolytische Spaltung der C-H-Bindung. In der 2,3-Lysin-Mutase-Reaktion bildet wahrscheinlich die Aminogruppe des Substrates mit der Aldehydgruppe von Pyridoxalphosphat eine Schiff'sche Base, die das

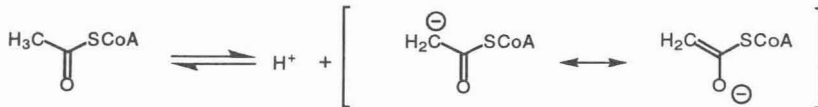


Abb. 22: Abstraktion eines Protons von Acetyl-CoA als Beispiel für eine heterolytische Spaltung einer aktivierten C-H-Bindung.

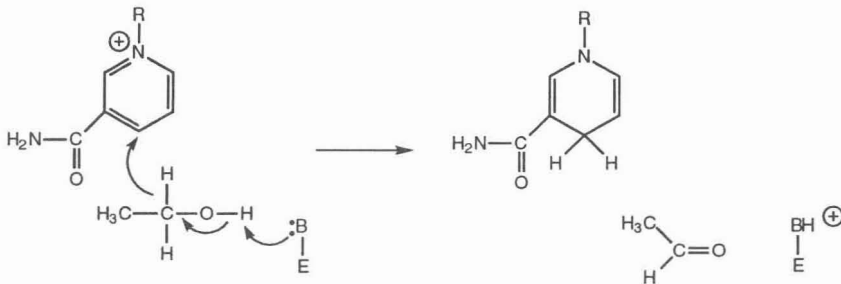


Abb. 23: Abstraktion eines Hydridions durch NAD⁺ während der Alkohol-Dehydrogenase-Reaktion als Beispiel für eine heterolytische Spaltung einer C-H-Bindung.

Substratradikal mesomeriestabilisiert (Frey, 1990; Abb. 25). Eine derartige Stabilisierung eines intermediären Substratradikals wäre bei der Aktivierung einer C-H-Bindung in Alkanen nicht möglich, da funktionelle Gruppen fehlen. So war bislang die homolytische Spaltung der völlig unpolarisierten C-H-Bindungen in Alkanen nur durch Reaktion mit hochreaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 1) bekannt.

Vor kurzem wurden jedoch bei der Untersuchung der Tetraetherlipidsynthese in *Methanobacterium autotrophicum* Reaktionen beschrieben, die eine anaerobe Aktivierung einer völlig isolierten C-H-Bindung erfordern. Diese ist durch mindestens drei Methylengruppen von Doppelbindungen oder funktionellen Gruppen getrennt. Einbauversuche mit [1,1,6-²H₃]-6,7-Dihydrogeraniol (Abb. 26) legten nahe, daß die Kopf-Kopf-Kopplung der C₂₀-Vorläufermoleküle an gesättigten Teilstrukturen stattfindet (Galliker, 1990). Ferner wurde ein modifizierter

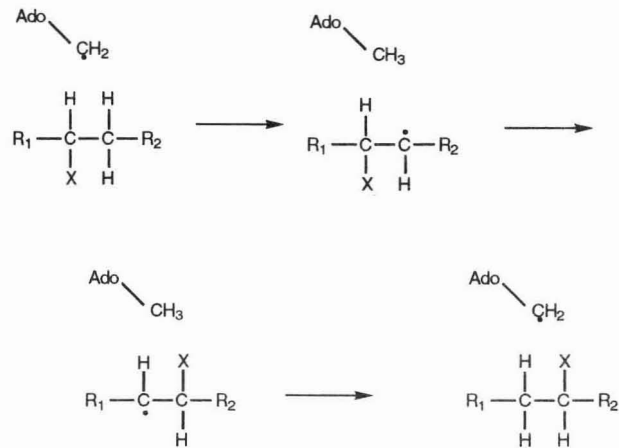


Abb. 24: Allgemeine Darstellung des Mechanismus einer Coenzym-B₁₂-katalysierten Isomerisierungs-Reaktion als Beispiel für die Abstraktion eines H-Atoms bei der homolytischen Spaltung einer C-H-Bindung.

Tetraether mit einer Methylgruppe am C₁₃-Atom an einer der beiden Biphytanylketten gefunden. Durch Einbauversuche mit [5-¹³C,5,5-²H₂]-Mevalonat konnte gezeigt werden, daß das methylierte C-Atom im Verlauf der Reaktion keinen Verlust von Protonen erfährt, da die Deuterierung während der gesamten Synthese der Biphytanylketten erhalten bleibt (Abb. 27). Somit muß die Methylierung an einer gesättigten Teilstruktur erfolgen (Galliker, 1990).

Ein weiteres Molekül, dessen Synthese eine Aktivierung unpolarer C-H-Bindungen erfordert, ist die Diabolinsäure in *Butyrivibrio fibrisolvens*, einem obligat anaeroben Bakterium. Fitz und Arigoni (1992) konnten zeigen, daß bei der Bildung von Diabolinsäure in *Butyrivibrio fibrisolvens* aus [16-²H₂]-Palmitinsäure oder [14-²H₂]-Palmitinsäure kein Verlust der Deuterierung erfolgt (Abb. 28). Dies spricht dafür, daß die Kopplungsreaktion ohne Beteiligung von Doppelbindungen stattfindet. Die genauen Mechanismen der Kopf-Kopf-Kopplung in der Tetraethersynthese, der Methylierung einer Biphytanylkette und der Diabolinsäuresynthese sind noch unbekannt. Da aber völlig unpolarisierte C-H-Bindungen aktiviert werden müssen, wird vermutet, daß diese Reaktionen über radikalische Zwischenprodukte verlaufen.

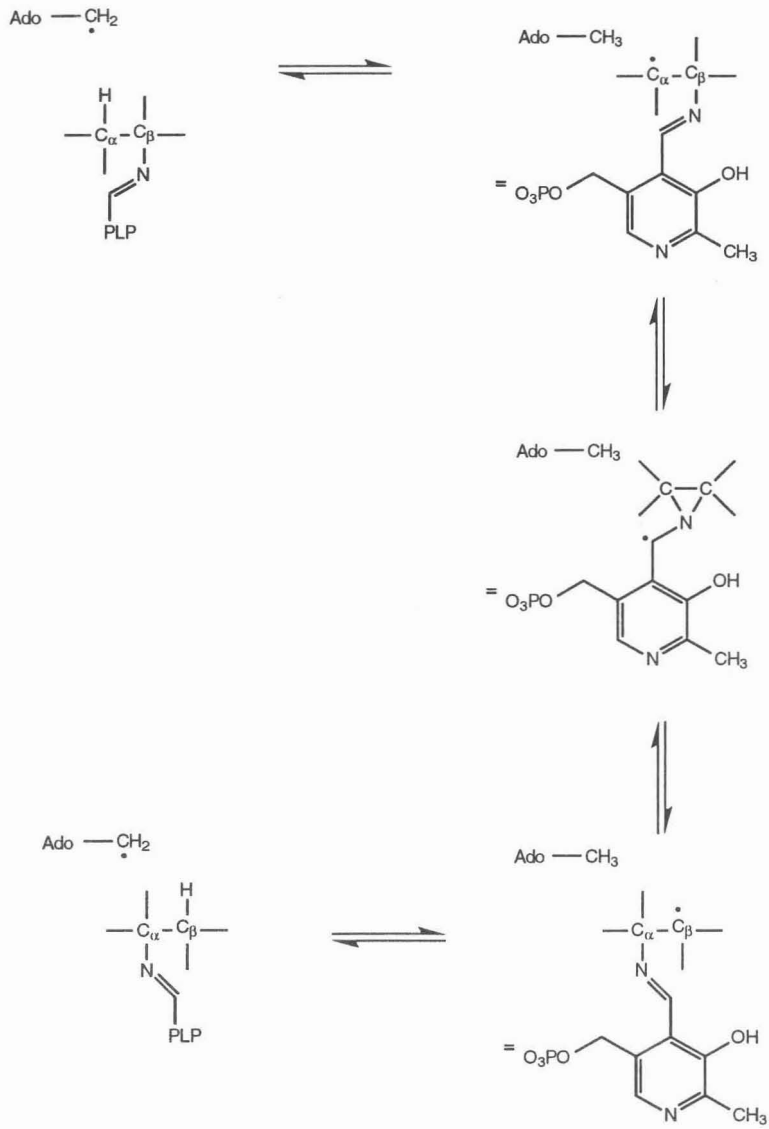


Abb. 25: Hypothetischer Mechanismus der 2,3-Lysin-Aminomutase Reaktion (nach Frey, 1990).

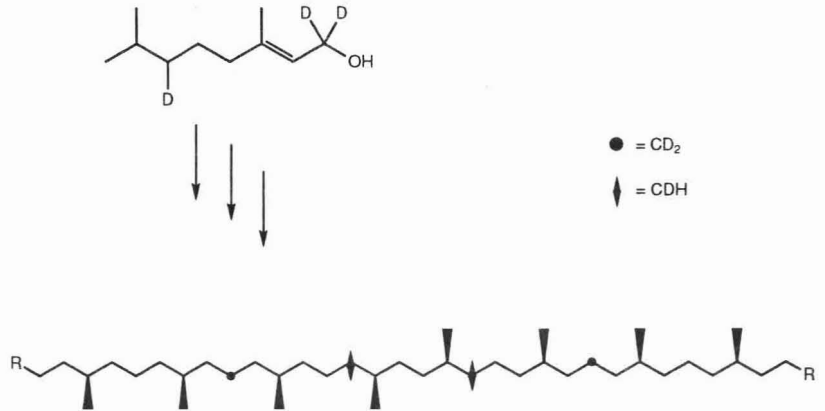


Abb. 26: Einbauversuch mit [1,1,6-²H₃]-6,7-Dihydrogeraniol bei der Synthese der Biphytanylketten eines Tetraetherlipidmoleküls in *Methanobacterium autotrophicum* (nach Galliker, 1990).

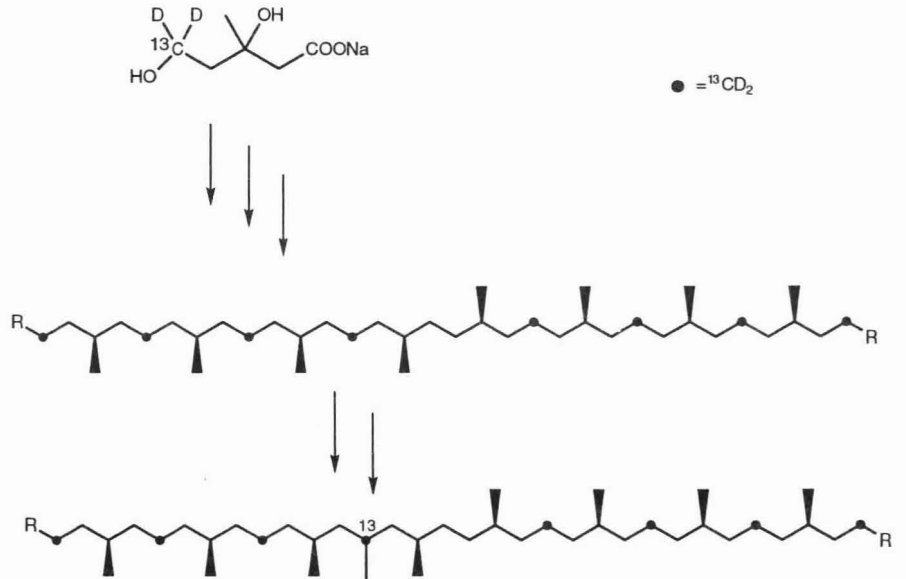


Abb. 27: Einbauversuch mit [5-¹³C-5,5-²H₂]-Mevalonat bei der Synthese der Biphytanylketten von Tetraetherlipidmolekülen in *Methanobacterium autotrophicum* (nach Galliker, 1990).

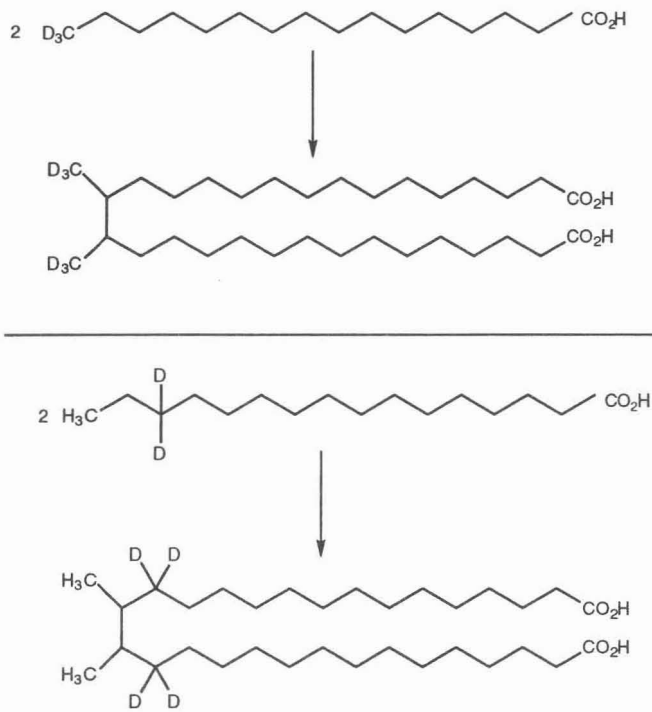


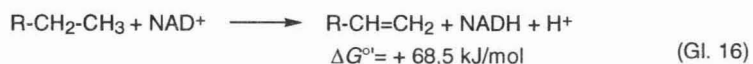
Abb. 28: Synthese von deuteriummarkierter Diabolinsäure aus [16-²H₃]-Palmitinsäure oder [14-²H₂]-Palmitinsäure in *Butyrivibrio fibrisolvens* (nach Fitz und Arigoni, 1992).

Eine in der Biogeochemie häufig diskutierte Reaktion, die eine Spaltung einer apolaren C-H-Bindung erfordert, ist die anaerobe Oxidation von Methan (Zehnder und Brock, 1979; Iversen und Jørgensen, 1985). In anaeroben Zellsuspensionen von aktiv methanbildenden Bakterien wurden max. 0,3 % der als ¹⁴CH₄ zugesetzten Radioaktivität zu ¹⁴CO₂ umgesetzt (Zehnder und Brock, 1979). Möglicherweise liegt eine an der Methanbildung beteiligte Komponente während der Reaktion in einem besonders aktiven Zustand vor, der eine Aktivierung von Methan ermöglicht.

4.1. Hypothesen zum anaeroben Aktivierungsmechanismus von Alkanen

Dehydrogenierung von Alkanen zu 1-Alkenen

Eine initiale Oxidationsreaktion von Alkanen durch eine NAD⁺-abhängige Alkan-Dehydrogenase unter Bildung eines 1-Alkens (Gl. 16) wurde erstmalig von Chouteau et al. (1962) vorgeschlagen.



In dieser Arbeit wurde 1-Hepten aus anaeroben Zellsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa*, die NAD⁺ und Heptan enthielten, isoliert und infrarotspektroskopisch identifiziert. In einer anderen Arbeit beschrieben Parekh et al. (1977) die Reinigung einer Alkan-Dehydrogenase und einer Alken-Hydroxylase aus Zellen von *Pseudomonas aeruginosa*. In anaeroben Enzymtests mit der gereinigten Alkan-Dehydrogenase wurde die Bildung von 1-Decen in Gegenwart von Decan und NAD⁺ berichtet. Darüber hinaus wurde die Bildung von Alkenen bei der Verwertung von Alkanen durch wachsende Zellen oder Zellsuspensionen in mehreren anderen Arbeiten gezeigt (Tabelle 16).

Diese Befunde sind allerdings sehr umstritten. So konnten die Ergebnisse von Parekh et al. (1977) in späteren Versuchen nicht reproduziert werden (Atlas, 1981; Griffin und Traxler, 1981). Darüberhinaus gibt es weitere Argumente, die gegen die Möglichkeit einer Dehydrogenierung von Alkanen als initiale Oxidationsreaktion sprechen. (i) Die Oxidation eines Alkanes zu einem 1-Alken mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor beinhaltet ein thermodynamisches Problem. Das Redoxpotential E_0' von 1-Decen/Decan liegt bei + 0,037 V, wohingegen das von NAD⁺/NADH -0,318 V beträgt (Dawson et al., 1986). Somit wäre die Reaktion in weiten Konzentrationsbereichen stark endergon, wie auch Gleichung 16 zeigt. Die Oxidation eines Alkans mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor müßte also durch eine zusätzliche energieliefernde Reaktion getrieben werden. Wie eine solche Reaktion in einem System mit gereinigter Alkan-Dehydrogenase, Decan und NAD⁺ ablaufen soll, ist schwer vorstellbar. (ii) Außerdem sprechen unterschiedliche Oxidationsprodukte, die bei der Verwertung von Alkanen oder den entsprechenden 1-Alkenen gefunden wurden, gegen Alkene als Zwischenprodukte des Alkan-

Tabelle 11: Identifizierung von Alkenen als möglichen Intermediaten des aeroben und vermuteten anaeroben Alkanabbaus in verschiedenen Mikroorganismen (Modifiziert nach Bühler und Schindler, 1984)

Mikroorganismus	Versuchsbedingungen	identifiziertes n-Alken	e-Akzeptoren	Referenz
Bakterien:				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	anaerobe Zellsuspension Zellextrakt	- -	Pyocyanin Pyocyanin	Senez und Azoulay (1961) Senez und Azoulay (1961)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	anaerobe Zellsuspension	1-C ₇	Pyocyanin	Chouteau et al. (1962)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	anaerobe Enzymtests mit gereinigtem Enzym	1-C ₁₀	NAD ⁺	Parekh et al. (1977)
<i>Micrococcus cerificans</i>	aerob gewachsene Zellen	1-C ₁₆	-	Wagner et al. (1967)
<i>Mycobacter phlei</i>	aerob gewachsene Zellen	1-C ₁₆	-	Wagner et al. (1967)
<i>Nocardia sp.</i>	aerob gewachsene Zellen Zellextrakt	1-C ₁₆ 1-C ₁₆	- -	Wagner et al. (1967)
<i>Nocardia salmonicolor</i>	aerobe Zellsuspensionen	7-C ₁₆	-	Abbott und Casida (1968)
Hefen:				
<i>Candida rugosa</i>	anaerober Zellextrakt	1-C ₁₀	DCPIP	Iizuka et al. (1968)
<i>Candida rugosa</i>	Zellsuspensionen und wachsende Zellen	1-C ₁₀	DCPIP	Iizuka et al. (1969)
<i>Rhodotorula sp.</i>	aerob gewachsene Zellen	1-C ₁₆	-	Wagner et al. (1967)

abbaus. So bildeten Zellsuspensionen von *Pseudomonas aeruginosa*, die zuvor mit 1-Hepten gewachsen waren, 6-Heptensäure aus 1-Hepten in Gegenwart von Chloramphenicol (Thijsse und van der Linden, 1963). In einer anderen Arbeit war gezeigt worden, daß der gleiche Organismus beim Wachstum auf Heptan Heptensäure als Zwischenprodukt bildet (Heringa et al., 1961). Die Doppelbindung stellt demnach keine Angriffsstelle für den enzymatischen Abbau dar und sollte daher auch nicht in einem Intermediärprodukt des Alkanabbaus vorliegen.

Die Einführung einer isolierten Doppelbindung in gesättigte Teilstrukturen von organischen Verbindungen findet während der Fettsäuredesaturase-Reaktion statt. Diese ist allerdings, wie eine Monooxygenase-Reaktion, O₂- und NAD(P)H-abhängig (Fulco, 1974).

Die Rückreaktion jedoch, eine Hydrogenierung einer isolierten Doppelbindung in ansonsten gesättigten Strukturen unter anaeroben Bedingungen, ist bekannt. Eine vollständige Hydrogenierung von Linolsäure zu Stearinsäure durch Mischkulturen von Pansenbakterien wurde von Poland et al. (1964) beschrieben (Abb. 29). Dabei wurde eine Anhäufung von *trans*-11-Octadecensäure beobachtet. Deshalb wurde vorgeschlagen, daß im Pansen zwei verschiedene Populationen von hydrogenierenden Bakterien leben; eine hydrogeniert Diensäuren zu Monoensäuren, während die andere Monoensäuren zu Stearinsäure hydrogeniert. Entsprechend wurde eine Umsetzung von Linolsäure zu *trans*-11-Octadecensäure aber nicht zu Stearinsäure durch Reinkulturen von *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hughes et al., 1982) oder *Eubacterium lentum* (Eyssen und Verhulst, 1984) beschrieben. Dagegen sind zwei *Fusocillus*-Stämme isoliert worden, die Ölsäure oder Linolsäure vollständig zu Stearinsäure hydrogenieren (Harfoot, 1978). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Reduktion von Ölsäure zu Stearinsäure in anaeroben Sedimenten (Rhead et al., 1971).

Die chemische Dehydrogenierung von Alkanen zu Alkenen und H₂ läuft bei Temperaturen von über 500°C mit Oxiden von Chrom, Vanadium, Molybdän und Zink und bei 300 bis 350°C mit Platin als Katalysatoren ab. In Anwesenheit von elementarem Schwefel oder elementarem Selen als Elektronenakzeptoren werden alicyclische Verbindungen bereits bei 200 bis 250°C aromatisiert. Aber auch unter milden Bedingungen sind chemische Dehydrogenierungen von gesättigten Teilstrukturen oder Alkanen bekannt. Cycloalkane wurden bei 30 bis 80°C durch Katalyse eines Rheniumkomplexes (Ar₃P)₂ReH₇ (Ar = *p*-F-C₆H₄ oder C₆H₅ oder

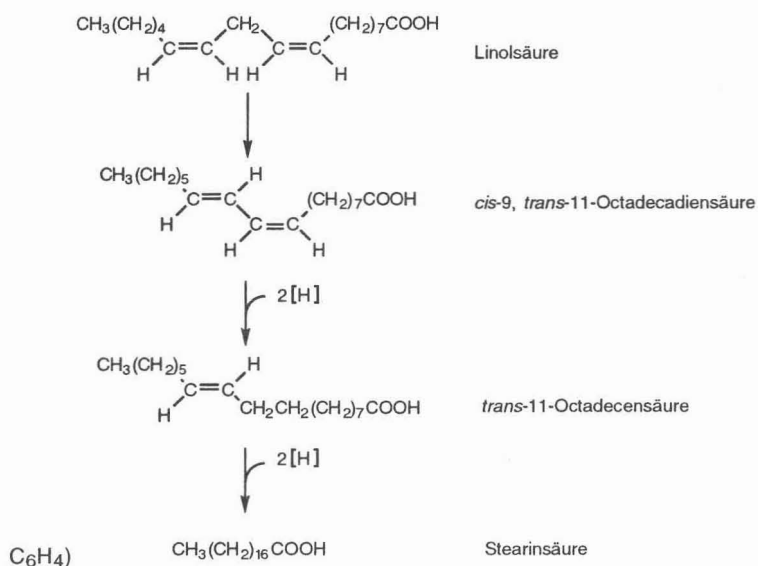


Abb. 29: Hydrogenierung von Linolsäure über *cis*-9, *trans*-11-Octadecadiensäure und *trans*-11-Octadecensäure zu Stearinsäure durch Mischkulturen von Darmbakterien (nach Polan et al., 1964).

p-CH₃-C₆H₄) mit 3,3-Dimethylbut-1-en als Elektronenakzeptor zu Cycloalkenen umgesetzt. Dehydrogenierungen von Methylcyclohexan lassen den Schluß zu, daß keine radikalischen Intermediate an der durch den Rheniumkomplex katalysierten Reaktion beteiligt sind, da das tertiäre C-Atom mit geringerer Häufigkeit umgesetzt wurde als die sekundären C-Atome (Baudry et al., 1983). Die Einführung einer isolierten Doppelbindung in 3 α -Cholestanol unter Bildung von Cholest-14-en-3 α -ol erfolgt durch eine radikalische Reaktion bei Raumtemperatur im Licht. Zunächst wird ein Ester aus 3 α -Cholestanol und *p*-Benzoyl- β -phenylpropionsäure gebildet. Darauf abstrahiert der durch Licht angeregte Benzophenonteil des Esters ein H-Atom in Position 14 des Cholestanols. Nach einer weiteren Abstraktion eines H-Radikals in Position 15 entsteht eine 14(15) Doppelbindung (Breslow und Baldwin, 1970; March S. 1165, 1992).

Stamm Hxd3 verwertet neben Alkanen auch 1-Alkene und primäre und sekundäre langkettige Alkohole. Daher wurde zunächst untersucht, ob die initiale Oxidationsreaktion des Alkans eine Dehydrogenierung zu einem 1-Alken ist, so

wie es in einigen früheren Arbeiten mit *Pseudomonas aeruginosa* (Chouteau et al., 1962; Parekh et al., 1977) behauptet wurde. Anaerobe Suspensionen von auf Hexadecan gewachsenen Zellen von Stamm Hxd3 verwerteten 1-Hexadecen erst nach einer lag-Phase von ca. 2 Tagen. In Anwesenheit von Tetracyclin, das die Proteinbiosynthese inhibiert, wurde 1-Hexadecen in Suspensionen von mit Hexadecan gewachsenen Zellen während der Inkubationsdauer von 120 h nicht verwertet. Diese Befunde sprechen gegen eine Dehydrogenierung als initiale Oxidationsreaktion des anaeroben Alkanabbaus durch Stamm Hxd3. Ebenso sprechen unterschiedliche Fettsäuremuster von Zellen, die auf Alkanen bzw. 1-Alkenen gleicher Kettenlänge gewachsen waren, gegen eine einleitende Dehydrogenierung von Alkanen (C 9.). Allerdings bleibt unklar, warum 1-Hexadecen in den Suspensionen nicht am gesättigten Ende angegriffen wurde, wie dies bei aeroben Alkanabbauern beobachtet wurde. Thijsse und van der Linden (1963) isolierten 6-Heptensäure aus Suspensionen von *Pseudomonas aeruginosa*, die mit 1-Hepten als Substrat inkubiert wurden; die Zellen waren zuvor auf Heptan gewachsen. Die Suspensionen enthielten zusätzlich Chloramphenicol, um die Neubildung von Proteinen zu inhibieren.

1-Hexadecanol wurde in Suspensionen von auf Hexadecan gewachsenen Zellen überhaupt nicht verwertet. Dagegen wurde im Rohextrakt aus Anzuchten auf Hexadecan Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität mit langkettigen Alkoholen (C₄ bis C₁₂) gefunden (mit 1-Hexadecanol konnten keine Aktivitäten bestimmt werden, da bei der Zugabe von 1-Hexadecanol zu wässrigen Lösungen (B 8.) weiße Flocken von 1-Hexadecanol entstehen, die eine photometrische Bestimmung von Aktivitäten unmöglich machten). Möglicherweise hat in den Suspensionsversuchen noch an den 1-Hexadecanolflocken haftendes Isopropanol (B 8.) die Zellen von Stamm Hxd3 geschädigt. Allerdings wurde in Suspensionen von Stearat-Anzuchten 1-Hexadecanol sofort verwertet, obwohl es auf die gleiche Weise zugegeben worden war.

Carboxylierungen und Carbonylierungen als mögliche Eingangsreaktionen des anaeroben Alkanabbaus

Erste Hinweise auf den Mechanismus der anaeroben Alkanaktivierung in sulfatreduzierenden Bakterien wurden aus der Analyse der Zellfettsäuren gewonnen. Diesen Experimenten lag die Annahme zugrunde, daß bei der Verwertung von Alkanen und 1-Alkenen intermediär gebildete langkettige Fettsäuren als Vorläufer der Zellfettsäure-Synthese dienen. In diesem Fall würden

die Zellfettsäuren nicht aus Acetyl- bzw. Malonyl-CoA-Molekülen *de novo* synthetisiert. Die Kettenlänge dieser intermediär gebildeten Fettsäuren wird durch Elongations-Reaktionen und Reaktionen der β -Oxidation nur um C_2 -Einheiten verändert. Bei Aktivierungen durch eine Einführung einer endständigen OH-Gruppe sollten aus einem Alkan oder 1-Alken mit gerader Anzahl an C-Atomen auch Zellfettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen gebildet werden; entsprechend würden aus Alkanen oder 1-Alkenen mit ungerader C-Atomanzahl auch Fettsäuren mit ungerader C-Atomanzahl entstehen. Dies ist bei aeroben alkanabbauenden Mikroorganismen tatsächlich der Fall. So überwogen in Zellen von *Candida*-Arten, die auf Tetradecan gewachsen waren, deutlich Zellfettsäuren mit gerader Anzahl an C-Atomen. Die dominierenden Fettsäuren waren Palmitat und Stearat (Souw, et al., 1976). Dagegen wurden in Zellen, die auf Pentadecan gewachsen waren, hauptsächlich Zellfettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen gefunden. Dabei waren die häufigsten Fettsäuren Pentadecanat und Heptadecanat (Souw, et al., 1977). Ein solcher Zusammenhang zwischen der Kettenlänge der verwerteten Alkane und der der analysierten Zellfettsäuren wurde darüber hinaus bei verschiedenen Arten von Bakterien und Pilzen und bei einer Grünalge beschrieben (Rehm und Reiff, 1981). Diese Resultate standen im Einklang mit dem bekannten Mechanismus der aeroben Alkanoxidation durch eine initiale Monooxygenase-Reaktion.

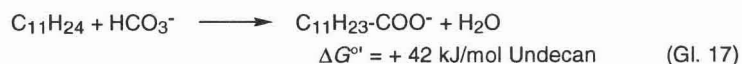
Im Gegensatz dazu enthielten Zellen von Stamm Hxd3, die auf einem Alkan mit geradzahligem C-Atomanzahl gewachsen waren, überwiegend Zellfettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen. Wenn hingegen ein Alkan mit ungerader Anzahl an C-Atomen als Substrat diente, enthielten die Zellen überwiegend Zellfettsäuren mit einer geraden Anzahl von C-Atomen. Mit Fettsäuren oder 1-Alkenen als Substrat änderte sich die Gerad- oder Ungeradzahligkeit der Kettenlänge der Zellfettsäuren gegenüber den Substraten nicht. Dies spricht dafür, daß die anaerobe Aktivierung von Alkanen in dem sulfatreduzierenden Bakterium eine neuartige Reaktion einschließt, in der die Kettenlänge der Alkane um eine C_1 -Einheit verändert wird. 1-Alkene werden dagegen wahrscheinlich durch eine andere Reaktion aktiviert, die unter Teilnahme der endständigen Doppelbindung ablaufen könnte. Die Ergebnisse der Fettsäureanalysen stehen damit auch im Einklang mit den Ergebnissen der Induktionsversuche mit den auf Alkan gewachsenen Zellen von Stamm Hxd3. Diese verwerteten 1-Alkene erst nach einer lag-Phase von ca. 2 Tagen.

Aufgrund der Ergebnisse der Fettsäureanalyse kann die anaerobe Alkanaktivierung sowohl eine Verkürzung als auch eine Verlängerung der C-Kette

des Alkans einschließen. Allerdings ist es vom mechanistischen Standpunkt aus schwierig, sich einen anaeroben Aktivierungsmechanismus vorzustellen, bei dem die Kette um eine C₁-Einheit verkürzt wird. Dagegen kann eine Verlängerung der C-Kette eines Alkans um eine C₁-Einheit durch Carboxylierungen oder Carbonylierungen eines primären C-Atoms erklärt werden. Daher sollen im folgenden Carboxylierungen und Carbonylierungen als mögliche initiale Oxidationsreaktionen des anaeroben Alkanabbaus diskutiert werden.

(a) *Carboxylierungen*. Beispiele für einen Abbau von unter anoxischen Bedingungen reaktionsträgen Molekülen sind Reaktionen an Hydroxyaromaten, Anilinen und Aceton. Phenol (Tschech und Fuchs, 1989; Lack und Fuchs, 1994), *o*- und *m*-Cresol (Roberts et al., 1990; Bisailon et al., 1991; Ramanand und Suflita, 1991; Rudolphi et al., 1991) und Anilin (Schnell und Schink, 1991) werden in *para*- oder *ortho*-Stellung zur Hydroxylgruppe carboxyliert. Die Reaktion von Phenol hat Ähnlichkeit mit der Kolbe-Schmidt-Carboxylierung von Phenolat-Anionen (Abb. 30). In diesen ist die negative Ladung durch das π-Elektronensystem des aromatischen Ringes mesomeriestabilisiert. Dabei greift CO₂ als Elektrophil die in den mesomeren Grenzstrukturen negativ geladenen C-Atome des Rings an. Auch der anaerobe Abbau von Aceton wird durch eine Carboxylierung eingeleitet (Platen und Schink, 1990). Ebenso wie bei der Carboxylierung von Phenolderivaten ist auch hier ein elektrophiler Angriff von CO₂ oder Carboxybiotin auf ein intermediär gebildetes Carbanion denkbar. Die C-H-Bindungen im Aceton sind relativ azid, da das entsprechende Carbanion, das Enolation, mesomeriestabilisiert ist.

Ein solcher Mechanismus ist bei einer hypothetischen Carboxylierung von Alkanen (Gl. 17) schwer vorstellbar, weil die völlig unpolarisierten C-H-Bindungen in Alkanen nur sehr schwer Protonen abgeben. Der pK_a-Wert von Ethan beträgt 50 (s. March, S. 252).



Auch die Rückreaktion, die Decarboxylierung von *n*-Fettsäuren, durch eine heterolytische Bindungsspaltung ist schwer vorstellbar, da funktionelle Gruppen in α- oder β-Stellung fehlen. Bekannt sind jedoch chemische Decarboxylierungen von aliphatischen Fettsäuren, die unter stark oxidierenden Bedingungen über radikalische Zwischenprodukte verlaufen (s. Vollhardt S.765). So gibt ein Carboxylation während der Kolbe-Elektrolyse ein Elektron an die Anode ab. Das

entstehende sehr instabile Carboxyradikal zerfällt spontan in CO_2 und ein Alkylradikal (Abb. 31). Die gebildeten Alkylradikale dimerisieren zu Alkanen. Analog zu dieser Reaktion verläuft die Hunsdiecker-Reaktion. Dabei reagiert das Silber Salz einer aliphatischen Fettsäure mit Bromradikalen zu Silberbromid, das sofort ausfällt, und zu einem Carboxyradikal, das in CO_2 und ein Alkylradikal zerfällt. Dieses reagiert mit einem weiteren Bromradikal zu einem Alkylbromid.

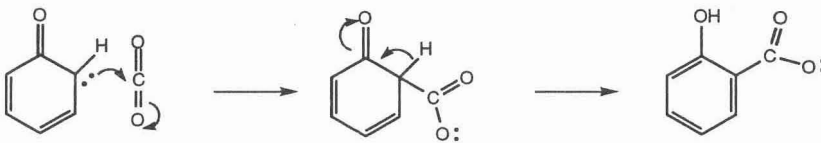


Abb. 30: Mechanismus der Carboxylierung eines Phenolations während der Kolbe-Schmitt-Synthese von Salicylat (nach Sykes, 1988).

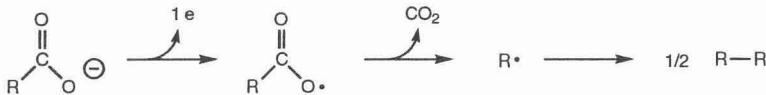
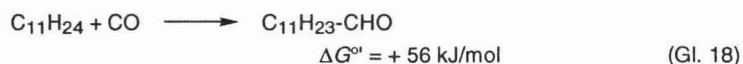


Abb. 31: Mechanismus der Decarboxylierung von aliphatischen Fettsäuren durch Abstraktion eines Elektrons vom Carboxylation (nach Vollhardt, 1987).

(b) *Carboxylierungen*. Die besondere Schwierigkeit, Fettsäuren zu Alkanen zu decarboxylieren oder Alkanen zu Fettsäuren zu carboxylieren, zeigt sich auch bei der Synthese von Alkanen in biologischen Systemen (A 1.3.; Gl. 5). Für die Bildung von Alkanen werden zwar zunächst CoA-Ester aliphatischer Fettsäuren synthetisiert. Diese werden aber nicht in freie Fettsäuren verwandelt und decarboxyliert, sondern zu den korrespondierenden Aldehyden reduziert, welche dann unter Bildung eines Alkans decarbonyliert werden. Die aus der Grünalge *Botryococcus braunii* gereinigte Aldehyd-Decarbonylase enthält vermutlich ein Porphyrin und Cobalt, was auf Co-Porphyrin als prosthetische Gruppe hinweist. Dafür spricht auch, daß mit Co-Protoporphyrin IX bei 60°C eine chemische Decarbonylierung von Octadecanal nachgewiesen wurde (Dennis und Kolattukudy, 1992). Die mikrosomale Fraktion aus der Uropygia-Drüse des Schwarzhalstauchers (*Podiceps nigricollis*), die ebenfalls Aldehyd-Decarbonylase-

Aktivität enthält, katalysierte eine Austauschreaktion zwischen ^{14}CO und der Carbonylgruppe von Octadecanal (Cheesbrough und Kolattukudy, 1988). Dies spricht dafür, daß die Decarbonylierung von Aldehyden zu Alkanen, sofern Energie zu Verfügung steht, grundsätzlich reversibel ist. Somit wäre also die Rückreaktion, die Carbonylierung von Alkanen zu Aldehyden (Gl. 18), eine hypothetische Aktivierungsreaktion von Alkanen.



In homoacetogenen, methanogenen und sulfatreduzierenden Bakterien ist eine Carbonylierung der entscheidende Schritt bei der Synthese von Acetyl-CoA über den CO-Dehydrogenase Weg. Die CO-Dehydrogenase katalysiert dabei die Reduktion von CO_2 zu CO, das vermutlich an ein Ni/Fe-Zentrum gebunden wird. Nach Übertragung einer Methylgruppe auf die CO-Dehydrogenase kommt es wahrscheinlich durch eine Migration der Methylgruppe zur Bildung einer am Metallzentrum gebundenen Acetylgruppe. Die Kohlenstoff-Metallbindung wird dann wahrscheinlich durch HS-CoA unter Bildung von Acetyl-CoA gespalten.

Chemische Carbonylierungen von Alkoholen und Alkenen sind wichtige Reaktionen zur industriellen Herstellung von Carbonsäuren und Aldehyden. Daß in diesen Reaktionen Übergangsmetallkomplexe als Katalysatoren dienen, zeigt die große Neigung von CO, bestimmte Übergangsmetalle zu ligandieren.

Die Monsanto-Reaktion dient in Analogie zur CO-Dehydrogenase-Reaktion zur Herstellung von Essigsäure aus Methanol und CO. Als Katalysatoren werden HJ und ein Rhodiumkomplex $[\text{RhI}(\text{CO})_2\text{J}_2]^-$ verwendet (Gl. 19).



Der Mechanismus der Essigsäurebildung in der Monsanto-Reaktion ist in Abb. 32 dargestellt. Das nach Reaktion von HJ mit Methanol gebildete Methyljodid addiert oxidativ an den Rhodiumkomplex $[\text{RhI}(\text{CO})_2\text{J}_2]^-$ unter Bildung von $[\text{RhIII}(\text{CO})_2\text{J}_3\text{CH}_3]^-$. Durch eine 1,2-Migration der Methylgruppe entsteht ein Acetyl-Rhodium-Intermediat. Der nun koordinativ ungesättigte Komplex addiert ein weiteres CO. In einer reduktiven Elimination entsteht aus einem ligandiertem J und der Acetylgruppe Acetyl-Jodid und der reduzierte Rhodiumkomplex. Das entstandene Acetyl-Jodid wird hydrolytisch zu HJ und Essigsäure gespalten. Neben Rhodium-Komplexen sind auch Cobalt- (Rupe-Reaktion), Nickel- und

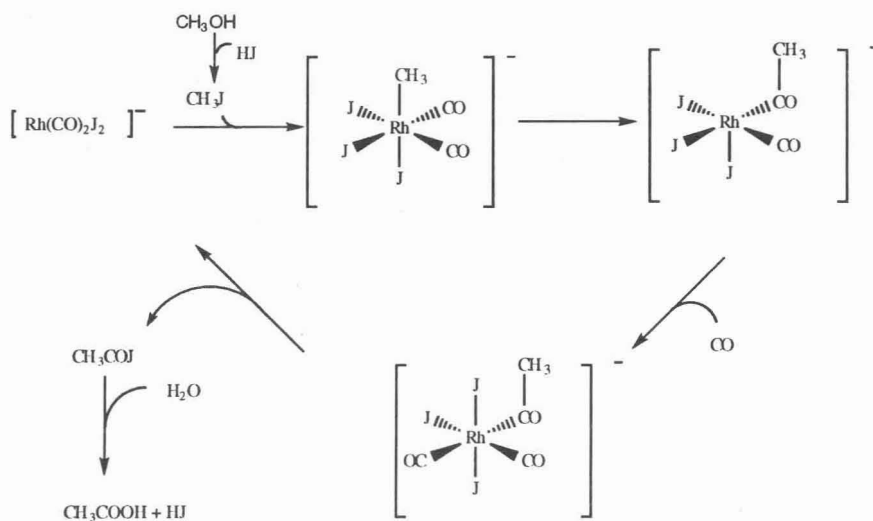


Abb. 32: Mechanismus der durch einen Rhodiumkomplex katalysierten Bildung von Essigsäure aus Methanol und CO bei der Monsanto-Reaktion (nach Forster, 1979).

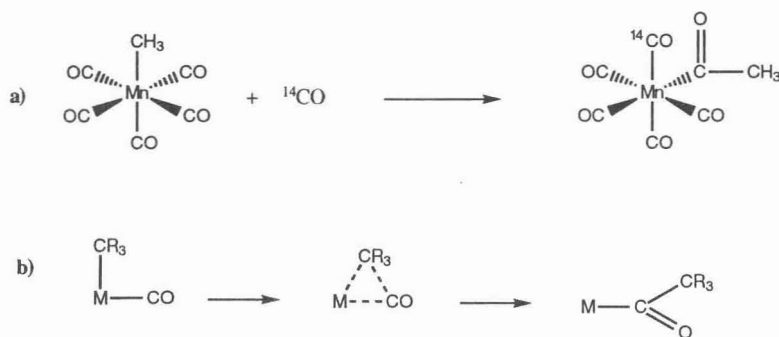


Abb. 33: Mechanismus einer Insertion von CO in eine Kohlenstoff-Metall-Bindung an einem Mangankomplex. a) Markierungsexperiment mit ^{14}C b) Hypothetisches Modell der CO-Insertion (nach March, 1992).

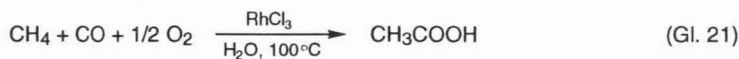
Iridium-Komplexe als Katalysatoren der Essigsäuresynthese aus CO und Methanol beschrieben worden (Thauer, 1989; Forster, 1979). Der Mechanismus der "CO-Insertion" in Metall-Alkyl-Bindungen ist an Mangan-Komplexen ausführlich studiert worden. Durch Zugabe von ^{14}CO zu dem Komplex $\text{CH}_3\text{Mn}(\text{CO})_5$ konnte gezeigt werden, daß die Carbonylgruppe aus bereits ligandiertem CO stammt und nicht aus dem zugesetzten (Abb. 33a). Das von außen kommende CO ligandiert in *cis*-Stellung zur Acylgruppe. Diese Befunde wurden mit einer 1,2-Migration der Alkylgruppe zu dem in *cis* koordinierten CO-Liganden erklärt. Die Migration verläuft vermutlich über einen Drei-Zentren-Übergangszustand (Abb. 33b).

Die reduktive Carbonylierung von Alkenen ist als Hydroformylierung bekannt und wird industriell zur Herstellung von Aldehyden und Alkoholen genutzt (Gl. 20).



Dabei dienen Komplexe von Cobalt $[\text{Co}(\text{CO})_4\text{H}]$ oder Rhodium $[\text{Rh}(\text{CO})(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{H}]$ als Katalysatoren (Pruett, 1979).

Vor kurzem wurde auch eine Carbonylierung von Alkanen mit CO unter milden Bedingungen beschrieben (Sakakura und Tanaka, 1987). Bei Raumtemperatur katalysiert ein Rhodium-Komplex $[\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ die Umsetzung von Pentan zu Hexanal; dabei wurden die Versuchsansätze mit dem Licht einer Quecksilberlampe bestrahlt. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist unbekannt. Die Autoren schlagen als initiale Reaktion eine oxidative Addition des Pentans unter Spaltung einer primären C-H-Bindung an einem koordinativ ungesättigten Rhodium-Komplex vor. Dabei wird möglicherweise die völlig unpolarisierte und sehr stabile C-H-Bindung durch Besetzung des antibindenden Molekülorbitals mit Elektronen eines Hybridorbitals aus dem Übergangsmetallkomplex geschwächt (Abb. 34). Diese Orbitale sind aufgrund ihres Energieniveaus und der diffusen Ladungsverteilung besonders gut dafür geeignet (Saillard, 1990). Möglicherweise verläuft auch die Acylbildung am Komplex durch eine 1,2-Migration der Alkylgruppe. Der Aldehyd würde sich dann nach einer reduktiven Eliminierung der Acylgruppe und des ligandierten Wasserstoffatoms bilden. Kürzlich wurde außerdem eine Carbonylierung von Methan mit CO bei 100°C unter Bildung von Essigsäure beschrieben (Lin und Sen, 1994). Allerdings ist Sauerstoff an dieser Reaktion beteiligt (Gl. 21).



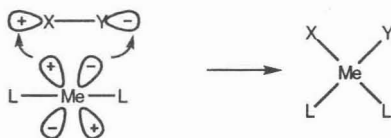


Abb. 34: Allgemeine Formulierung des Mechanismus der oxidativen Addition in unpolaren Lösungsmitteln (L = Ligand; Me = Metallzentrum) (nach Cotton et al., 1987).

Demnach ist also eine Carbonylierung von Alkanen durch eine chemische Reaktion unter milden Bedingungen möglich. Außerdem ist in biologischen Systemen eine Decarbonylierung von Aldehyden zu Alkanen beschrieben worden, die möglicherweise reversibel ist. Entsprechende Reaktionen mit CO_2 als Reaktionspartner sind nicht bekannt. Die Ergebnisse der Fettsäure-Analysen deuten auf eine Verlängerung der Alkankette um eine C_1 -Einheit während der anaeroben Alkanoxidation hin. Darüber hinaus sprechen die Ergebnisse der Induktionsversuche gegen einen Abbau von Alkanen in sulfatreduzierenden Bakterien über ein 1-Alken. Diese Befunde lassen eine Carbonylierung von Alkanen als einleitende Abbaureaktion unter anaeroben Bedingungen als die vorläufig wahrscheinlichste Hypothese erscheinen. Deshalb soll im folgenden ein Mechanismus der anaeroben Carbonylierung von Alkanen erörtert werden, der auf einem Vorschlag von D. Arigoni (pers. Mitteilung) beruht.

Möglicher Mechanismus einer initialen Carbonylierung beim anaeroben Alkanabbau

Der vorgeschlagene hypothetische Mechanismus der Alkan-Carbonylierung ist in Abb. 35 dargestellt. Dabei bildet ein nicht näher bezeichnetes Corrinoid durch homolytische Spaltung der $\text{Co(III)}\text{-X}$ -Bindung ein X-Radikal. Dieses abstrahiert von einer primären C-H-Bindung des Alkans ein H-Atom. Das entstandene Alkyl-Radikal bindet an das Cobalt-Zentrum unter Bildung eines Alkylcorrinoids. Darauf inseriert ein CO -Molekül in die Co-C-Bindung unter Bildung eines Acyl-Corrinoids. Die anschließende Eliminierung der Acylgruppe wäre auf zweierlei Weisen denkbar. Durch eine homolytische Spaltung der Acyl-Cobalt-Bindung könnte ein Carbonyl-Radikal (Acyl-Radikal) entstehen, das einem weiteren Alkanmolekül ein H-Radikal entzieht und so zum Aldehyd wird. Das entstandene X-Radikal bindet an das freigewordene Cobaltatom, wodurch der Ausgangszustand des Corrinoids

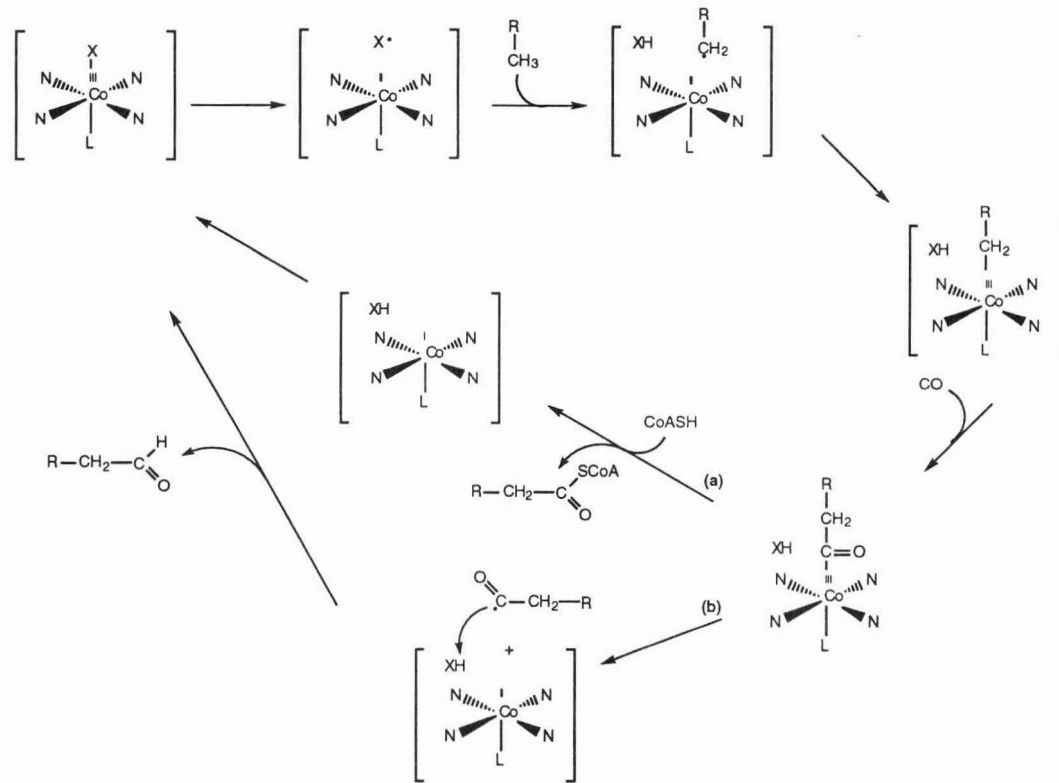
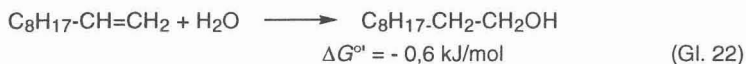


Abb. 35: Hypothetischer Mechanismus der anaeroben Alkanaktivierung durch Stamm Hxd3. Dabei wird die C-Kette des Alkans durch eine Carbonylierung um eine C₁-Einheit verlängert (L = Ligand) (modifiziert nach F. Arigoni (pers. Mitteilung)).

wiederhergestellt wird. Die zweite Möglichkeit besteht in der Spaltung der Cobalt-Acyl-Bindung durch CoAS⁻ analog zur CO-Dehydrogenase-Reaktion. Dabei entstehen der CoA-Ester der Fettsäure und ein Co(I). Hierbei bliebe offen, wie das Corrinoid in den Ausgangszustand zurückkehrt. Mechanistisch schwer verständlich bliebe bei der vorgeschlagenen Alkanaktivierung vor allem noch die Insertion von CO in die Co-C-Bindung. Wie zuvor beschrieben (D 4.1.), erfolgt die chemische Acylylbildung an Mangan-Komplexen durch eine 1,2-Migration der Alkylgruppe an ein bereits in *cis*-Position ligandiertes CO-Molekül. In einem Corrinoid sind aber alle *cis*-Positionen durch die N-Atome des Corrinoid-Ringes ligandiert. Während der CO-Dehydrogenase-Reaktion findet die C-C-Verknüpfung der Acetylgruppe vermutlich an einem Ni/Fe-Zentrum statt. Ein Corrinoid-Protein ist dabei als Methylgruppen-Überträger beteiligt (Ragsdale, 1991). Entsprechend könnte man für die Alkanaktivierung ein verfeinertes Modell mit einem weiteren Reaktionszentrum zur Knüpfung der C-C-Bindung entwickeln.

4.2. Hypothesen zur Aktivierungsreaktion des anaeroben 1-Alkenabbaus durch Stamm Hxd3

Im Fettsäuremuster von auf 1-Alkenen gewachsenen Zellen von Stamm Hxd3 blieb die Gerad- oder Ungeradzahligkeit der C-Atomzahl in der Kette der verwerteten Substrate erhalten. 1-Alkene werden demnach in dem Sulfatreduzierer durch eine völlig andere Reaktion aktiviert als Alkane, wobei vermutlich die endständige Doppelbindung mit einbezogen wird. Schink (1985) hat als initiale Abbaureaktion von 1-Hexadecen durch eine methanogene Anreicherungskultur eine Hydratisierung der Doppelbindung vorgeschlagen. Thermodynamisch läge diese Reaktion nahe am Gleichgewicht (Gl. 22).



Eine Hydratisierung von isolierten Doppelbindungen in biologischen Systemen ist bekannt. So wurde von mehreren Mikroorganismen, wie z. B. *Rhodococcus rhodochrous*, *Norcardia restrictus* oder *Saccharomyces cerevisiae* berichtet, daß sie Ölsäure zu 10-Hydroxystearat hydratisieren (Niehaus et al., 1970; Yang et al., 1993).

Bei der Hydratisierung einer endständigen Doppelbindung kann ein primärer oder ein sekundärer Alkohol entstehen. Stamm Hxd3 verwertet sowohl 1-Hexadecanol als auch 2-Hexadecanol. Mechanistisch ist die Entstehung eines sekundären Alkohols aus der Hydratisierung eines 1-Alkens leichter zu verstehen. Durch einen elektrophilen Angriff eines Protons entsteht bevorzugt ein sekundäres Carbokation, da dieses stabiler ist als das entsprechende primäre. Nach Addition eines OH⁻-Ions würde dann der sekundäre Alkohol entstehen, entsprechend der Regel von Markownikow. Der weitere Abbau könnte über ein Keton verlaufen. Allerdings würde eine Carboxylierung des Ketons zur β -Ketosäure, wie beim anaeroben Abbau von Aceton (Platen, 1990), eine Verlängerung der C-Kette um eine C₁-Einheit bedeuten. Diese Verlängerung widerspricht aber den Analysen des Zellfettsäuremusters von Zellen, die auf 1-Alkenen gewachsen sind. Die Hydratisierung eines 1-Alkens zu einem primären Alkohol wäre eine *anti*-Markownikow-Addition. Eine solche erfolgt bei der Addition von HBr an Propen. Dabei greift ein durch Licht oder Peroxide gebildetes Bromradikal das C₁-Atom an. Das entstandene sekundäre Radikal abstrahiert ein H-Atom aus HBr unter Bildung von *n*-Propylbromid und einem Bromradikal. Eine Addition von H₂O nach einem radikalischen Mechanismus würde aber die Bildung eines Hydroxyradikals einschließen, was unter anaeroben Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist. Alternativ dazu könnte möglicherweise nach einer Addition eines Protons an die Doppelbindung ein Hydroxidion durch enzymatische Steuerung an das primäre C-Atom addieren. Der entstehende primäre Alkohol könnte dann über ein Aldehyd zur korrespondierenden Fettsäure bzw. deren CoA-Ester oxidiert werden.

5. Bedeutung der Ergebnisse für die Rohölförderung

Stamm Hxd3 bildete in Wachstumsversuchen mit Rohöl als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle ca. 7 mM Sulfid, die thermophile Anreicherung, aus der Stamm TD3 isoliert wurde, sogar ca. 10 mM (C 6.). Da in parallelen Kontrollansätzen mit *Desulfoarculus baarsii*, der aliphatische Fettsäuren von C₃ bis C₁₈ verwertet, keine signifikante Sulfidkonzentration gebildet wurde, wurden durch Stamm Hxd3 und die thermophile Anreicherung wahrscheinlich Alkane aus dem Rohöl oxidiert. Das bedeutet, daß auch gesättigte Kohlenwasserstoffe, die Hauptbestandteile des Rohöls, als Substrate für die in Öllagerstätten und Ölförderanlagen beobachtete Sulfatreduktion in Frage kommen. Neben gesättigten Kohlenwasserstoffen könnten aber auch Alkylbenzole und Bestandteile der polaren Rohölfraction, wie

Naphthensäuren (cyclische Carbonsäuren) und aliphatische Carbonsäuren durch besonders angepaßte sulfatreduzierende Bakterien verwertet. Allerdings stellen Säuren nur einen relativ geringen Anteil des Erdöls. Außerdem weisen viele im Erdöl vorkommende Säuren biologisch ungewöhnliche Verzweigungen der C-Kette auf, so daß vermutlich nur ein Teil dieser Verbindungen von sulfatreduzierenden Bakterien verwertet werden kann. Mit Alkanen und Alkylbenzolen als Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion würde die vielfach beobachtete Sulfidbildung in Öllagerstätten und Ölförderanlagen nicht allein durch einen Abbau von zugesetzten Chemikalien oder Produkten eines aeroben Vorabbaus von Rohölbestandteilen verursacht. Vor allem eine Sulfidbildung in Förderanlagen, in denen keine oder nur minimale Mengen an Chemikalien eingesetzt wurden und kein Sauerstoff an das Rohöl gelangt, kann somit durch den anaeroben Abbau von Rohölbestandteilen erklärt werden. Dabei könnten mesophile sulfatreduzierende Alkanabbauer, wie die Stämme Hxd3 und Pnd3, eine Sulfidbildung in den Teilen einer Ölförderanlage verursachen, in denen das Rohöl bereits abgekühlt ist. Stamm Hxd3 wurde aus Ölschlämmen eines Öl-Wasser-Separators angereichert und isoliert. Im Falle von Öllagerstätten mit Temperaturen um 60°C ist denkbar, daß thermophile sulfatreduzierende Alkanabbauer wie Stamm TD3 die beobachtete Sulfidbildung mit verursachen. Von den bislang aus Öllagerstätten isolierten sulfatreduzierenden Bakterien wurde allerdings keine Verwertung von Alkanen berichtet (Rosnes et al., 1991a,b; Stetter et al., 1993).

Die Herkunft der in Öllagerstätten gefundenen sulfatreduzierenden Bakterien ist unbekannt. Dabei sind folgende Möglichkeiten denkbar.

(i) Isolierte mikrobielle Gemeinschaften haben seit der Bildung der Öllagerstätten überdauert. Dagegen spricht, daß die von Stetter et al. (1993) aus Öllagerstätten isolierten Stämme identisch sind mit solchen, die vorher in marinen heißen Quellen gefunden wurden.

(ii) Sulfatreduzierende Bakterien wurden mit Oberflächenwasser durch entstandene Brüche in Gesteinsformationen in die Öllagerstätten eingetragen.

(iii) Die Öllagerstätten wurden durch das Einleiten von Injektionswasser im Zuge der sekundären Ölförderung mit sulfatreduzierenden Bakterien kontaminiert. Für diese Möglichkeit spricht, daß in die von Stetter et al. (1993) untersuchten Lagerstätten bereits zum Zeitpunkt der Probenentnahmen Injektionswasser eingeleitet worden war. Außerdem ist bekannt, daß hyperthermophile Bakterien in kaltem Meerwasser überleben können (Huber et al., 1990) und dort auch in geringen Populationsdichten vorkommen (Stetter et al., 1993). Allerdings isolierten

Rosnes et al. (1991a) thermophile sporenbildende Sulfatreduzierer aus Öllagerstätten, die vorher nicht mit Injektionswasser geflutet worden waren.

Stamm Pnd3 wurde aus oberflächennahem marinem Sediment und Stamm TD3 aus Sediment des Guaymas-Basin isoliert. Außerdem wurde in Ansätzen mit Dodecan und Hexadecan, die mit marinen Sedimenten beimpft worden waren, eine deutliche Sulfidbildung beobachtet (Aeckersberg, 1989). Demnach sind alkanverwertende Sulfatreduzierer in Oberflächensedimenten vorhanden und können von dort in Ölförderanlagen und Öllagerstätten gelangen. Dieses könnte auf natürlichem Wege durch tektonische Brüche in Gesteinsformationen in die Öllagerstätten gelangen oder als Förderwasser in die Lagerstätten eingeleitet werden. Dabei wurde oft beobachtet, daß die Bildung von Schwefelwasserstoff und das dadurch verursachte "Souring" des Rohöls durch die Einleitung von Injektionswasser stimuliert wurde (Odom, 1993; Postgate, 1984). Neben dem möglichen Eintrag von alkanabbauenden Sulfatreduzierern gibt es noch mehrere alternative Erklärungen für die Stimulierung der Sulfidbildung durch Injektionswasser (s. A 4.).

Zusammenfassung

1. Mit Pentadecan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und anoxischen marinen Schlämmen als Impfmateriale wurde eine sulfatreduzierende Anreicherung gewonnen. Aus dieser wurde Stamm Pnd3, ein alkanverwertender mesophiler Sulfatreduzierer, isoliert. Thermophile sulfatreduzierende Anreicherungen wurden mit Sedimenten des Guaymas Becken und verschiedenen kurzkettigen linearen Alkanen von C₆ bis C₁₂, 3-Methyloctan oder Cyclohexan erhalten. Aus einer schnell wachsenden Anreicherung auf Decan wurde eine vorgereinigte thermophile Kultur gewonnen.
2. Zum Nachweis des anaeroben Alkanabbaus wurden Wachstumsversuche mit der in einer früheren Arbeit gewonnenen Reinkultur, Stamm Hxd3, durchgeführt. In anoxisch zugeschmolzenen Glasampullen wurden Ansätze mit Stamm Hxd3 und geringen Mengen (1,37 mmol/l) hochreinen Hexadecans (99,5 %) hergestellt. Nach der Inkubation waren ca. 90 % des zugesetzten Hexadecans abgebaut; gleichzeitig wurde Sulfat reduziert. In Kontrollversuchen wurde sichergestellt, daß weder Verunreinigungen im Hexadecan noch Spuren von Sauerstoff das Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan verursachten.
3. Stamm Hxd3 verwertete neben Alkanen mit einer Kettenlänge von C₁₂ bis C₂₀ 1-Alkene, langkettige primäre und sekundäre Alkohole und Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₄ bis C₁₈. Kurzkettige Alkane von C₆ bis C₁₂ waren für Stamm Hxd3 toxisch. Aber auch wenn kurzkettige Alkane in einer inerten Trägerphase bis auf nicht toxische Konzentrationen verdünnt wurden, wurden diese Alkane von Stamm Hxd3 nicht verwertet. Dieses spricht für eine hohe Substratspezifität der an der Alkanoxidation beteiligten Enzyme. Stamm Pnd3 wuchs auf Alkanen von C₁₄ bis C₁₇. Außerdem wurden 1-Hexadecen, 1-Hexadecanol und Fettsäuren von C₁ bis C₁₈ (mit Ausnahme von Acetat) verwertet. Die vorgereinigte thermophile Kultur dagegen verwertete auch kurzkettige Alkane von C₆ bis C₁₆ und mit 3-Methyloctan ein verzweigtes Alkan.
4. Die Sequenzierung des 16S rRNA Gens von Stamm Hxd3 zeigte eine Zugehörigkeit zur δ -Gruppe der Proteobakterien. Allerdings läßt sich Stamm Hxd3 keiner bekannten Gattung zuordnen.

5. Das langsame Wachstum von Stamm Hxd3 auf Hexadecan wurde durch die Zugabe von α -Cyclodextrin deutlich stimuliert. Vermutlich diene α -Cyclodextrin als Vermittler zwischen der unlöslichen Alkanphase und den Zellen von Stamm Hxd3.
6. Die Wachstumsstimulierung durch α -Cyclodextrin ermöglichte die Gewinnung von ausreichenden Mengen an Zellmaterial für erste Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus des anaeroben Alkanabbaus. In anaeroben Zellsuspensionen aus Hexadecananzuchten von Stamm Hxd3 wurde 1-Hexadecen erst nach einer lag-Phase von ca. 2 Tagen verwertet. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß der anaerobe Alkanabbau nicht über ein 1-Alken als Zwischenprodukt verläuft. Weitere Hinweise auf den Mechanismus des anaeroben Alkanabbaus wurden durch die Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3 gewonnen. Dabei enthielten Zellen, die auf Hexadecan gewachsen waren, zu mehr als 90 % Zellfettsäuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen in der C-Kette. In Zellen aus Heptadecan-Anzuchten wurden zu über 90 % Zellfettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen gefunden. Dagegen blieb die Gerad- oder Ungeradzahligkeit der Anzahl der C-Atome mit 1-Alkenen als Substraten auch in den Zellfettsäuren erhalten. Dies könnte bedeuten, daß die anaerobe Alkanaktivierung eine Kettenverlängerung um eine C_1 -Einheit einschließt. Dagegen werden 1-Alkene vermutlich über einen anderen Mechanismus aktiviert.
7. Sowohl Stamm Hxd3 als auch die vorgereinigte thermophile Kultur bildeten mit Rohöl als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle Sulfid. Dagegen wurden in Ansätzen mit dem fettsäureverwertenden Sulfatreduzierer *Desulfoarculus baarsii* und Rohöl keine höheren Sulfidkonzentrationen gefunden als in Kontrollansätzen ohne Rohöl. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung von alkanabbauenden Sulfatreduzierern bei der Sulfidbildung in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen, sowie bei der Entstehung von Schwefellagerstätten in unmittelbarer Nähe von Erdölvorkommen, hin.

Literaturverzeichnis

- Abbott B. J. und L. E. Casida** (1968) Oxidation of alkanes to internal monoalkenes by a *Norcadia*. J. Bacteriol. 96: 925-930.
- Aeckersberg F.** (1989) Anaerober Abbau von Alkanen durch sulfatreduzierende Bakterien. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg.
- Aeckersberg F., F. Bak und F. Widdel** (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. 156: 5-14
- Altenschmidt U. und G. Fuchs** (1992) Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. J. Bacteriol. 174: 4860-4862.
- Atlas R. M.** (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. 45: 180-209.
- Azoulay E., Chouteau J. und Davidovics G.** (1963) Isolement et caracterisation des enzymes responsables de l'oxydation des hydrocarbures. Biochim. Biophys. Acta 77: 554-567
- Bache R. und N. Pfennig** (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. Arch. Microbiol. 130: 255-261.
- Bak F. und F. Widdel** (1986) Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov.. Arch. Microbiol. 146: 177-180.
- Barth T.** (1991) Organic acids and inorganic ions in waters from petroleum reservoirs, Norwegian continental shelf: a multivariate statistical analysis and comparison with American reservoir formation waters. Appl. Geochem. 6: 1-15.
- Baudry D., M. Ephritikhine, H. Felkin und R. Holmes-Smith** (1983) The selective catalytic conversion of cycloalkanes into cycloalkenes using a soluble rhenium polyhydride system. J. Chem. Soc. Chem. Commun. : 788-789.
- Birch L. D. und R. Bachofen** (1988) Microbial production of hydrocarbons. In: Rehm H.-J. (ed) Biotechnology, Vol. 6b. Verlag Chemie Weinheim, pp 71-99.
- Bissailon J.-G., F. Lépine, R. Beaudet und M. Sylvestre** (1991) Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2131-2134.
- Blumer M., R. Guillard und T. Chase** (1971) Hydrocarbons of marine phytoplankton. Mar. Biol. 8:183-189
- Bonin P., M. Gilewicz und J. C. Bertrand** (1992) Effects of oxygen on *Pseudomonas nautica* growth on *n*-alkane with or without nitrate. Arch. Microbiol. 157: 538-545.

- Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breslow, R. und S. W. Baldwin** (1970) Conversion of cholestanol to 12-ketocholestanol and to Δ^{14} - and $\Delta^8(14)$ -cholestanol by remote oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 92: 732-734
- Britton L. N.** (1984) Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: T. D. Gibson (ed) *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, New York Basel, pp 98-129.
- Bryant M. P.** (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1324-1328.
- Butlin K.** (1953) The bacterial sulfur cycle. *Research* 6: 184-191.
- Bühler M. und J. Schindler** (1984) Aliphatic hydrocarbons. In: Kieslich K. (ed) *Biotechnology*, Vol. 6a. Verlag Chemie, Weinheim, pp 329-385.
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy** (1984) Alkane biosynthesis by decarbonylation of aldehydes catalyzed by a particulate preparation from *Pisum sativum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6613-6617.
- Cheesbrough T. M. und P. E. Kolattukudy** (1988) Microsomal preparation from an animal tissue catalyzes release of carbon monoxide from a fatty aldehyde to generate an alkane. *J. Biol. Chem.* 263: 2738-2743.
- Chouteau J., E. Azoulay und J. C. Senez** (1962) Anaerobic formation of *n*-hept-1-ene from *n*-heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature* 194: 576-578.
- Cline J. D.** (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14: 454-458.
- Cord-Ruwisch R.** (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 4: 33-36
- Cord-Ruwisch R., W. Kleinitz und F. Widdel** (1986) Sulfatreduzierende Bakterien in einem Erdölfeld - Arten und Wachstumsbedingungen. *Erdöl, Erdgas, Kohle* 102. Jahrg.: 281-289
- Cord-Ruwisch R., W. Kleinitz und F. Widdel** (1987) Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J. Petrol. Technol.* January 1987: 97-106
- Cotton F. A., G. Wilkinson und P. L. Gaus** (1987) *Basic inorganic chemistry*. John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore p 640
- Davis J. B. und E. E. Bray** (1969) Analyses of oil and cap rock from challenger (Sigsbee) Knoll. In: *Initial reports of the deep sea drilling project*, Vol. 1: Washington, U. S. Government Printing Office, pp 415-500
- Davis J. B. und D. W. Kirkland** (1979) Biopigenetic sulfur deposits. *Econom. Geol.* 74: 462-468.

- Davis J. B. und H. F. Yarbrough** (1966) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by *Desulfovibrio desulfuricans*. Chem. Geol. 1: 137-144.
- Dawson R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott und K. M. Jones** (1986) Data for biochemical research. Clarendon Press, Oxford, p 130
- DELaune R. D., G. A. Hambrick und W. H. Patrick** (1980) Degradation of hydrocarbons in oxidized and reduced sediments. Mar. Poll. Bull. 11:103-106.
- Dennis M. und P. E. Kolattukudy** (1992) A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. Biochem. 89: 5306-5310.
- Dolfing J., J. Zeyer, P. Binder-Eicher und R. P. Schwarzenbach** (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Arch. Microbiol. 154: 336-341.
- Donaldson E. C., R. M. Knapp, T. F. Yen und G. V. Chilingarian** (1989) In: E. C. Donaldson und G. V. Chilingarian (eds) Microbial enhanced oil recovery. Elsevier, Amsterdam Oxford New York Tokyo, pp 15-36
- Einsele A.** (1983) Biomass from higher *n*-alkanes. In: H.-J. Rehm und G. Reed (eds) Biotechnology, Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim - Deerfield Beach/Florida - Basel, pp 43-81
- Ekzertsev V. A.** (1960) Production of methane by microorganisms in petroleum deposits. Geochem. 4: 432-442.
- Evans P. J., D. T. Mang, K. S. Kim und L. Y. Young** (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1139-1145
- Eyssen H. und A. Verhulst** (1984) Biotransformation of linoleic acid and bile acids by *Eubacterium lentum*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 39-43.
- Felsenstein J.** (1982) Numerical methods for inferring phylogenetic trees. Quart. Rev. Biol. 57: 379-404
- Finnerty W. R., E. Hawtrey und R. E. Kallio** (1962) Alkane-oxidizing micrococci. Z. Allg. Mikrobiol. 2: 169-177
- Fitz W. und D. Arigoni** (1992) Biosynthesis of 15,16-dimethyltriacontanedioic acid (diabolic acid) from [$^{16-2}\text{H}_3$]- and [$^{14-2}\text{H}_2$]-palmitic acids. J. Chem. Soc. Chem. Commun. : 1533-1534.
- Forster D.** (1979) Mechanistic pathways in the catalytic carbonylation of methanol by rhodium and iridium complexes. Adv. Organometallic Chem. 17: 255-267.
- Frey P. A.** (1990) Importance of organic radicals in enzymatic cleavage of unactivated C-H bonds. Chem. Rev. 90: 1343-1357.
- Fulco A. J.** (1974) Metabolic alterations of fatty acids. Ann. Rev. Biochem. 43: 215-241
- Galliker P. K.** (1990). Zur Biosynthese der Etherlipide aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.

- Ganahl P. und W. Kleinitz** (1983) Sulfatreduzierende Bakterien in der Rohölförderung: Auswirkung und betriebliche Maßnahmen. Erdöl, Erdgas, Kohle 99. Jahrg (Heft 7-8): 241-251.
- Giger W., C. Schaffner und S. G. Wakeham** (1980) Aliphatic and olefinic hydrocarbons in recent sediments of Greifensee, Switzerland. Geochim. Cosmochim. Acta 44: 119-129.
- Gilewicz M., G. Monpert, M. Acquaviva, G. Mille und J.-C. Bertrand** (1991) Anaerobic oxidation of 1-*n*-heptadecene by a marine denitrifying bacterium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 252-256.
- Gill C. O. und C. Ratledge** (1972) Toxicity of *n*-alkanes, *n*-alk-1-enes, *n*-alkan-1-ols and *n*-alkyl-1-bromides towards yeasts. J. Gen. Microbiol. 72: 165-172.
- Grbic-Galic D. und T. M. Vogel** (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl. Environ. Microbiol. 53: 254-260.
- Gretz E., T. F. Oliver und A. Sen** (1987) Carbon-hydrogen bond activation by electrophilic transition-metal compounds. Palladium(II)-mediated oxidation of arenes and alkanes including methane. J. Am. Chem. Soc. 109: 8109-8111
- Griffin W. M. und R. W. Traxler** (1981) Some aspects of hydrocarbon metabolism by *Pseudomonas*. Dev. Ind. Microbiol. 22: 425-435.
- Halpern J.** (1985). Mechanisms of coenzyme B₁₂-dependent rearrangements. Science 227: 869-875.
- Hambrick G. A., R. D. DeLaune und W. H. Patrick** (1980) Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. Appl. Environ. Microbiol. 40: 365-369.
- Hansen R. W. und R. E. Kallio** (1957) Inability of nitrate to serve as a terminal oxidant for hydrocarbons. Science 125: 1198-1199.
- Harfoot C. G.** (1978) Lipid metabolism in the rumen. Prog. Lipid Res. 17: 21-54
- Heringa J. W. und A. C. van der Linden** (1962) Non-stereospecific oxidation of DL-3-methylheptane by a *Pseudomonas*. Ant. van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 28: 411-416
- Hillen, E.** (1992) Römpf Chemie Lexikon, Bd. 5. J. Falbe und M. Regitz (eds) Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Hoffmann B. and H.-J. Rehm** (1976) Degradation of long chain *n*-alkanes by *Mucorales*. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 19-30.
- Huber R., P. Stoffers, J. L. Cheminee, H. H. Richnow und K. O. Stetter** (1990) Hyperthermophilic archaeobacteria within the crater and open-sea plume of erupting Macdonald Seamount. Nature 345: 179-182

- Hughes P. E., W. J. Hunter und S. B. Tove** (1982) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoate reductase. *J. Biol. Chem.* 257: 3643-3649.
- Hungate R. E.** (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in microbiology*. New York, Academic Press. pp 117-132.
- Iida M. und H. Ikzuka** (1970) Anaerobic formation of *n*-decyl alcohol from *n*-decene-1 by resting cells of *Candida rugosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 10: 245-252.
- Ikzuka H., M. Iida, Y. Unami und Y. Hoshino** (1968) *n*-Decane dehydrogenation by a cell-free extract of *Candida rugosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 8: 145-149.
- Ikzuka H., M. Iida und S. Fujita** (1969) Formation of *n*-decene-1 from *n*-decane by resting cells of *Candida rugosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 9: 223-226.
- Iversen N. und B. B. Jørgensen** (1985) Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol. Oceanogr.* 30: 944-955.
- Janowicz A. H. und R. G. Bergmann** (1982) C-H Activation in completely saturated hydrocarbons: direct observation of $M + R-H \rightarrow M(R)(H)$. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 352-354.
- Jobson A. M. und D. W. S. Westlake** (1979) Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chem. Geol.* 24: 355-365.
- Jørgensen B. B., Zawacki L. X. und H. W. Jannasch** (1990) Thermophilic bacterial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent site (Gulf of California). *Deep-Sea Research* 37: 695-710.
- Jørgensen B. B., M. F. Isaksen und H. W. Jannasch** (1992) Bacterial sulfate reduction above 100°C in deep-sea hydrothermal vent sediments. *Science* 258: 1756-1757
- Käppeli O. und A. Fiechter** (1976) The mode of interaction between the substrate and cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis*. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 967-974
- Kawka O. E. und B. R. T. Simoneit** (1987) Survey of hydrothermally-generated petroleum from the Guaymas Basin spreading center. *Org. Geochem.* 11: 311-328
- Kester A. S. und J. W. Foster** (1963) Diterminal oxidation of long-chain alkanes by bacteria. *J. Bacteriol.* 85: 859-869.
- Kidby D. K. und D. J. Davidson** (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* 55:321
- Koch A. K., O. Käppeli, A. Fiechter und J. Reiser** (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173: 4212-4219.

- Kuhn E. P., J. Zeyer, P. Eicher und R. P. Schwarzenbach** (1988) Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 490-496.
- Lack A. und G. Fuchs** (1994) Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* 161: 132-139.
- Lin M. und A. Sen** (1994) Direct catalytic conversion of methane to acetic acid in an aqueous medium. *Nature* 368: 613-615
- Lovley D. R.** (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* 339: 297-300.
- Mah R. A., D. M. Ward, L. Baresi und T. L. Glass** (1977) Biogenesis of methane. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 309-341
- Marmur J.** (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218
- Marmur J. und P. Doty** (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5: 109-118.
- March J.** (1992) *Advanced organic chemistry.* John Wiley & Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore.
- Means J. L. und N. Hubbard** (1987) Short-chain aliphatic acid anions in deep subsurface brines: a review of their origin, occurrence, properties, and importance and new data on their distribution and geochemical implication in the Palo Duro Basin, Texas. *Org. Geochem.* 3: 177-191.
- Michaelsen M., R. Hulsch, T. Höpner und L. Berthe-Corti** (1992) Hexadecane mineralization in oxygen-controlled sediment-seawater cultivations with autochthonous microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3072-3077.
- Mille G., M. Mulyono, T. El Jammal und J.-C. Bertrand** (1988) Effects of oxygen on hydrocarbon degradation studies *in vitro* in surficial sediments. *Estuar. Coast. Shelf Science* 27: 283-295
- Miyochi M.** (1895) Die Durchbohrung von Membranen mit Pilzfäden. *Jahrb. wiss. Botan.* 28: 269-289.
- Morgan P. und R. J. Watkinson** (1994) Biodegradation of components of petroleum. In: C. Ratledge (ed.) *Biochemistry of microbial degradation.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London pp 1-32
- Muller F. M.** (1957) On methane fermentation of higher alkanes. *Ant. Van Leeuwenhoek* 23: 369-384.

- Nazina T. N., E. P. Rozanova und S. I. Kuznetsov** (1985) Microbial oil transformation processes accompanied by methane and hydrogen-sulfide formation. *Geomicrobiol. J.* 4: 103-130.
- Niehaus W. G., A. Kisic, A. Torkelson, D. J. Bednarczyk und G. J. Schroepfer** (1970) Stereospecific hydration of the Δ^9 double bond of oleic acid. *J. Biol. Chem.* 245: 3790-3797.
- Novelli G. D. und C. E. ZoBell** (1944) Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 47: 447-448.
- Odom J. M.** (1993) Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. In: J. M. Odom und Rivers Singleton, Jr. (eds) *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer Verlag, NewYork Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest pp 189-249
- Oremland R. S.** (1981) Microbial formation of ethane in anoxic estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 122-129.
- Orr W.** (1974) Changes in sulfur content and isotopic ratios of sulfur during petroleum maturation - study of Big Horn basin Paleozoic oils. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* 58: 2295-2318.
- Parekh V. R., R. W. Traxler und J.M. Sobeck** (1977) *n*-Alkane oxidation enzymes of a *Pseudomonad*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 881-884.
- Periana R. A., D. J. Taube, E. R. Evitt, D. G. Löffler, P. R. Wentrcek, F. Voss und T. Masuda** (1993) A mercury-catalyzed, high-yield system for the oxidation of methane to methanol. *Science* 259: 340-343.
- Pini, A.** (1991) Bakterieller Abbau von Xanthen unter strikt anaeroben Bedingungen. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Platen H., Temmes A. und B. Schink** (1990) Anaerobic degradation of acetone by *Desulfococcus biacutus* spec. nov.. *Arch. Microbiol.* 154: 355-361.
- Poland C. E., J. J. McNeill und S. B. Tove** (1964) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 88: 1056-1064
- Poremba K. und W. Gunkel** (1994) Ölabbauende Bakterien - Leben in hydrophober Umgebung. In: K. Hausmann und B. P. Kremer (eds) *Extremophile*. VCH Weinheim, pp 211-228.
- Postgate J. R.** (1984). Oil technology. In: *The sulphate-reducing bacteria*. London, Cambridge University Press. 2nd ed., 145-149.
- Pruett R. L.** (1979) Hydroformylation. *Adv. Organometallic Chem.* 17: 1-60.

- Rabus R., R. Nordhaus, W. Ludwig und F. Widdel** (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1444-1451.
- Ragsdale S. W.** (1991) Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 261-300.
- Ramanand K. und J. M. Suflita** (1991) Anaerobic degradation of *m*-cresol in anoxic aquifer slurries: carboxylation reactions in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1689-1695.
- Rehm H.-J. und I. Reiff** (1981) Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv. Biochem. Eng.* 19: 175-215
- Rehm H.-J. und I. Reiff** (1982) Regulation der mikrobiellen Alkanoxidation mit Hinblick auf die Produktbildung. *Acta Biotechnol.* 2: 127-138
- Rhead, M. M., G. Eglington, G. H. Draffan und P. England** (1971) Conversion of oleic acid to saturated fatty acids in Severn Estuary sediment. *Nature* 232: 327-330
- Roberts D. J., P. M. Fedorak und S. E. Hrudey** (1990) CO₂ incorporation and 4-hydroxy-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of *m*-cresol by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 472-478.
- Rosenberg M. und E. Rosenberg** (1981) Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* 148: 51-57.
- Rosenberg M., E. A. Bayer, J. Delarea und E. Rosenberg** (1982) Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 929-937
- Rosenfeld W. D.** (1947) Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria. *J. Bacteriol.* 54: 664-665.
- Rosnes J. T., T. Torsvik und T. Lien** (1991a) Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2302-2307.
- Rosnes J. T., A. Graue und T. Lien** (1991b) Activity of sulfate-reducing bacteria under simulated reservoir conditions. *SPE Production Engineering*: 217-220.
- Rožanova E. P. und T. N. Nazina** (1982) Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil pools. translated from *Mikrobiologiya* 51: 342-348.
- Ruckmick J. C., B. H. Wimberly und A. F. Edwards** (1979) Classification and genesis of biogenic sulfur deposits. *Econom. Geol.* 74: 469-474.
- Rudolphi A., A. Tschsch und G. Fuchs** (1991) Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155: 238-248.

- Saillard J.-Y.** (1990) Theoretical aspects of alkane C-H activation by organometallics. In: J. A. Davies, P. L. Watson, A. Greenberg und J. F. Liebmann (eds) Selective hydrocarbon activation. Verlag Chemie, Weinheim, pp 207-239.
- Sakakura T. und M. Tanaka** (1987) Efficient catalytic C-H activation of alkanes: regioselective carbonylation of the terminal methyl group of *n*-pentane by $\text{RhCl}(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2$. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 758-759.
- Sasser M.** (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Newsletter U. S. Fed. Cul. Coll.* 20: 1-6
- Schauder R., B. Eikmanns und R. K. Thauer** (1986) Acetate oxidation to CO_2 in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.* 145: 162-172.
- Schauder R., F. Widdel und G. Fuchs** (1987) Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria. II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. *Arch. Microbiol.* 148: 218-225.
- Schink B.** (1985a) Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 69-77.
- Schink B.** (1985b) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobic *Pelobacter acetylenicus* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 142: 295-301
- Schink B.** (1988) Principles and limits of anaerobic degradation - environmental and technological aspects. In: A. I. B. Zehnder (ed) *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley and Sons, New York pp 771-846
- Schink B. und M. Stieb** (1983) Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, Gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov.. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1905-1913.
- Schnell S. und B. Schink** (1991) Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* 155: 183-190.
- Schocher R. J., B. Seyfried, F. Vazquez und J. Zeyer** (1991) Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 157: 7-12.
- Senez J. C. und E. Azoulay** (1961) Déshydrogénation d'hydrocarbures paraffiniques par les suspensions non-proliférantes et les extraits de *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 47: 307-316.
- Shelton T. B. und J. H. Hunter** (1975) Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. *Journal WPCF* 47: 2256-2270.
- Simoneit B. R. T. und P. F. Lonsdale** (1982) Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295: 198-202

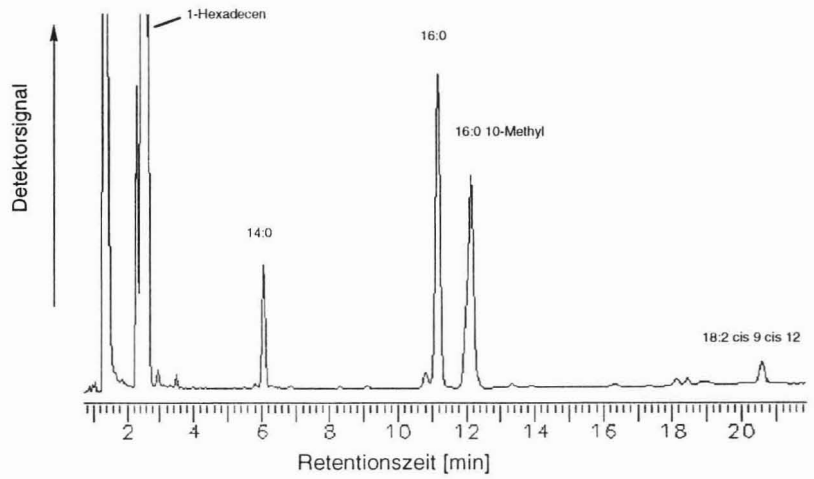
- Souw P., H. Luftmann und H. J. Rehm** (1976) Oxidation of *n*-alkanes by citric acid producing *Candida* spp. I. Oxidation and assimilation of *n*-tetradecane. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 43-54.
- Souw P. und H. J. Rehm** (1977) Oxidation of *n*-alkanes by citric acid producing *Candida* spp. II. Oxidation and assimilation of *n*-pentadecane. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 289-301.
- Stams A. J. M. und T. A. Hansen** (1984) Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. Arch. Microbiol. 139: 167-173.
- Stetter K. O., R. Huber, E. Blöchl, M. Kurr, R. D. Eden, M. Fielder, H. Cash und I. Vance** (1993) Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. Nature 365: 743-745.
- Stewart J. E. und R. E. Kallio** (1959) Bacterial hydrocarbon oxidation I. Oxidation of *n*-hexadecane by a Gram-negative coccus. J. Bacteriol. 78: 441-448.
- Stupperich E.** (1993) Recent advances in elucidation of biological corrinoid functions. FEMS Microbiol. Rev. 12: 349-366
- Swain H. M., H. J. Somerville und J. A. Cole** (1978) Denitrification during growth of *Pseudomonas aeruginosa* on octane. J. Gen. Microbiol. 107: 103-112.
- Sykes, P.** (1988) Reaktionsmechanismen der organischen Chemie. 9te Auflage, VCH Weinheim, p 342
- Synowietz C.** (1983). D'Ans · Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Bd II. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 997-1038
- Thauer R. K.** (1989) Carbonylierungs-Chemie in anaeroben Bakterien. In: P. Prëve, M. Schlingmann, W. Crueger, K. Esser, R. Thauer und F. Wagner (eds) Jahrbuch Biotechnologie Bd. 2 1988/89, Carl Hanser Verlag, München Wien pp 49 - 64.
- Thauer R. K., D. Möller-Zinkhan und A. Spormann** (1989) Biochemistry of acetat catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 43: 43-67
- Thijsse G. J. E. und A. C. van der Linden** (1963) Pathways of hydrocarbon dissimilation by a *Pseudomonas* as revealed by Chloramphenicol. Ant. van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 29: 89-100.
- Thode H. G., K. K. Wanless und R. Wallough** (1954) The origin of native sulfur deposits from isotopic fractionation studies. Geochim. Cosmochim. Acta 5: 286-298.
- Tissot B. P. und D. H. Welte** (1984) Petroleum formation and occurrence. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Traxler R. W. und J. M. Bernard** (1969) The utilization of *n*-alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* under conditions of anaerobiosis. I. Preliminary observation. Int. Biodet. Bull. 5: 21-25.

- Tscheck A. und G. Fuchs** (1989) Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Arch. Microbiol.* 152: 594-599.
- Updegraff D. M. und G. B. Wren** (1954) The release of oil from petroleum-bearing materials by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 2: 309-322.
- Vargaftik M. N., I. P. Stolarov und I. I. Moiseev** (1990) Highly selective partial oxidation of methane to methyl trifluoroacetate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.:* 1049-1050.
- Vogel T. und D. Grbic-Galic** (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 200-202.
- Vollhardt, K. P. C.** (1987) *Organic Chemistry.* W. H. Freeman and Company, New York
- Voordouw G., V. Niviere, F. G. Ferris, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake** (1990) Distribution of hydrogenase genes in *Desulfovibrio* spp. and their use in identification of species from the oil field environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3748-3754.
- Voordouw G., J. K. Voordouw, R. R. Karkhoff-Schweizer, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake** (1991) Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3070-3078.
- Voordouw G., J. K. Voordouw, T. R. Jack, J. Foght, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake** (1992) Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3542-3552.
- Voordouw G., Y. Shen, C. S. Harrington, A. J. Telang, T. R. Jack und D. W. S. Westlake** (1993) Quantitative reverse sample genome probing of microbial communities and its application to oil field production waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4101-4114.
- Wagner F., W. Zahn und U. Buhning** (1967) 1-Hexadecene, an intermediate in the microbial oxidation of *n*-hexadecane in vivo and in vitro. *Angew. Chem. Internat. Edit.* 6: 359-360
- Ward D. M. und T. D. Brock** (1978) Anaerobic metabolism of hexadecane in sediments. *Geomicrobiol. J.* 1: 1-9.
- Watson P. L.** (1983) Methane exchange reactions of lanthanide and early-transition-metal methyl complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 6491-6493.
- Weizenegger M., M. Neumann, E. Stackebrandt und W. Ludwig** (1991) *Eubacterium alactolyticum* phylogenetically groups with *Eubacterium limosum*, *Acetobacterium woodii*, and *Clostridium barkeri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 32-36

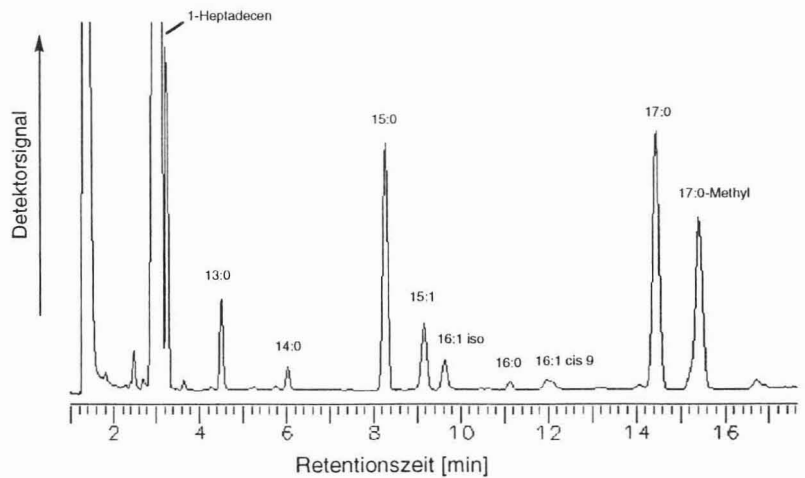
- Widdel F.** (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.
- Widdel F.** (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfurreducing bacteria. In: A. J. B. Zehnder (ed.) Biology of anaerobic microorganisms. Wiley & Sons, New York, pp 469-585
- Widdel F. und F. Bak** (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, und K. H. Schleifer (eds), The Prokaryotes Sec. Edition Volume IV. Springer-Verlag, New York, pp 3352 - 3378.
- Widdel F., G.-W. Kohring und F. Mayer** (1983) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. Arch. Microbiol. 134: 286-294.
- Widdel F. und N. Pfennig** (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*. Arch. Microbiol. 112: 119-122.
- Winters K., P. L. Parker und C. Van Baalen** (1969) Hydrocarbons of blue-green algae, geochemical significance. Science 163: 467-468.
- Yang W., L. Dostal und J. P. N. Rosazza** (1993) Stereospecificity of microbial hydrations of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. Appl. Environ. Microbiol. 58: 281-284.
- Zehnder A. und T. D. Brock** (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. J. Bacteriol. 137: 420-432.
- ZoBell C. E. und J. F. Prokop** (1966) Microbial oxidation of mineral oils in Barataria Bay bottom deposits. Z. Allg. Mikrobiol. 6: 143-162.

Anhang

Die Gaschromatogramme der Zellfettsäure-Analysen von Stamm Hxd3 nach Wachstum auf 1-Alkenen sind dargestellt. Die Analysen wurden nach der unter B 6.7. beschriebenen Methode vorgenommen. Die Zellfettsäure-Analysen von Stamm Hxd3 nach Wachstum auf Alkanen und Fettsäuren wurden freundlicherweise von Dr. R. Kroppenstedt, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, durchgeführt.



Gaschromatographische der Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3 nach Wachstum auf 1-Hexadecen.



Gaschromatographische Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3 nach Wachstum auf 1-Heptadecen.

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

Herrn Dr. Reiner M. Kroppenstedt danke ich für die Analyse der Zellfettsäuren von Stamm Hxd3.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Ludwig möchte ich mich für die Sequenzierung der 16S rRNS-Gene bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Friedhelm Bak für die Vorarbeiten zur Isolierung von Stamm Hxd3.

Mein Dank gilt nicht zuletzt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Thauer, Buckel und Schönheit in Marburg, der Arbeitsgruppen Böck, Wirth und Fiedler in München, des Max-Planck-Instituts für Marine Mikrobiologie in Bremen und besonders bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Widdel, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Ralf Rabus für seine Unterstützung in der Schlußphase der Arbeit bedanken.

In Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen wird häufig die Bildung von H_2S beobachtet. Diese führt aufgrund der Toxizität des Gases, der Bildung von unlöslichen Sulfiden und der Beschleunigung der anaeroben Korrosion zu großen Problemen. Der Nachweis von sulfatreduzierenden Bakterien in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen legte nahe, daß diese Bakterien die H_2S -Bildung verursachen. Allerdings blieb unklar, welche Verbindungen mit Sulfat als Elektronenakzeptor oxidiert wurden, da die bislang aus diesen Standorten isolierten Sulfatreduzierer kurzkettige Fettsäuren, Lactat, Benzoat oder H_2 verwerten. Diese Verbindungen aber kommen nur in sehr geringen Mengen im Erdöl vor. Es ist also von besonderer Bedeutung zu untersuchen, ob auch Kohlenwasserstoffe, die Hauptbestandteile des Erdöls, durch sulfatreduzierende Bakterien abgebaut werden.

In einer vorhergehenden Arbeit wurde aus einem Öl-Wasser-Separator eines norddeutschen Ölfeldes ein mesophiles, sulfatreduzierendes Bakterium, Stamm Hxd3, isoliert, das Alkane von C_{12} bis C_{20} verwertet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus Meeressedimenten ein weiteres sulfatreduzierendes Bakterium, Stamm Pnd3, isoliert, das auf Alkanen von C_{14} bis C_{17} wächst. Außerdem wurde unter moderat thermophilen Bedingungen eine sulfatreduzierende Anreicherung mit Decan erhalten. Weil die Möglichkeit eines Alkanabbaues in Abwesenheit von Sauerstoff bislang sehr umstritten war, wurde der anaerobe Alkanabbau in strikt anoxischen Wachstumsexperimenten mit Stamm Hxd3 und hochreinem Hexadecan (99,5%ig) bilanziert. Nach Beendigung der Inkubation wurde ein Abbau von ca. 90 % des zugesetzten Hexadecans bei gleichzeitiger Reduktion von Sulfat gezeigt. Ferner bildeten Stamm Hxd3 und die thermophile Anreicherung mit Rohöl H_2S . Dieses spricht dafür, daß alkanabbauende sulfatreduzierende Bakterien die H_2S -Bildung in Erdöllagerstätten und Erdölförderanlagen mit verursachen.

Erste Untersuchungen zum Mechanismus des anaeroben Alkanabbaus wurden mit Stamm Hxd3 durchgeführt. In Suspensionen von Hexadecananzuchten wurde 1-Hexadecen, ein mögliches Intermediat des anaeroben Alkanabbaus, erst nach einer lag-Phase von 2 Tagen verwertet. Dieses Ergebnis spricht gegen einen anaeroben Hexadecanabbau mit 1-Hexadecen als Intermediat. Außerdem wurden die Fettsäuren von Alkan-, 1-Alken- und Fettsäureanzuchten von Stamm Hxd3 analysiert. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die anaerobe Alkanaktivierung durch Stamm Hxd3 eine Verlängerung der IC-Kette um eine C_1 -Einheit einschließt, während 1-Alkene vermutlich durch einen anderen Mechanismus aktiviert werden.

