

Armin Ehrenreich

Die anaerobe Oxidation von Fe(II) durch Purpurbakterien:
Eine neue Form der bakteriellen Photosynthese
und ihre Bedeutung für den Redoxzyklus des
Eisens im Archaikum

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Ehrenreich, Armin:

Die anaerobe Oxidation von Fe(II) durch Purpurbakterien : Eine neue Form der bakteriellen Photosynthese und ihre Bedeutung für den Redoxzyklus des Eisens im Archaikum / Armin

Ehrenreich. - Aachen : Mainz, 1995

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

ISBN 3-930911-54-X

1. Auflage 1995

© Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen

Herstellung: Fotodruck Mainz GmbH

Süsterfeldstr. 83, 52072 Aachen

Tel. 0241/87 34 34

ISBN 3-930911-54-X

Die Kenntnis der Vergangenheit der Erde
ist Schmuck und Zierde des menschlichen Geistes.
(Leonardo da Vinci, 1452-1519)

Abkürzungen.....	1
A. Einleitung.....	3
A.1. Einführung in die Thematik.....	3
A.2. Eigenschaften und Zeitraum der Entstehung von gebänderten Eisenerzen....	4
A.2.1. Beschreibung der Eigenschaften von gebänderten Eisenerzen.....	4
A.2.2. Modelle zur Entstehung der gebänderten Eisenerze.....	4
A.3. Rezente eisenoxidierende und eisenreduzierende Bakterien.....	8
A.3.1. Die "Eisenbakterien".....	8
A.3.2. Acidophile, aerobe Fe ²⁺ -Oxidierer.....	11
A.3.3. Die dissimilatorische Fe(III)-Reduktion.....	14
A.4. Fossile und rezente phototrophe Prokaryonten.....	15
A.4.1. Geologische Zeugnisse phototrophen Lebens.....	15
A.4.2. Taxonomie rezenter phototropher Bakterien.....	18
A.4.2.1. Die Chloroflexaceae.....	18
A.4.2.2. Die Chlorobiaceae.....	19
A.4.2.3. Die Heliobakterien.....	20
A.4.2.4. Phototrophe Organismen unter den Proteobakterien....	20
A.4.2.4.1. Die Chromatiaceae.....	20
A.4.2.4.2. Die Ectothiorhodospiraceae.....	21
A.4.2.4.3. Die "Rhodospirillen".....	22
A.4.3. Ökologie photosynthetischer Bakterien.....	23
A.5. Biochemie der bakteriellen Photosynthese.....	24
A.5.1. Organisation der an der bakteriellen Photosynthese beteiligten Komplexe.....	24
A.5.2. Aufbau eines chemiosmotischen Potentials bei photosynthetischen Bakterien.....	26
B. Material und Methoden.....	28
B.1. Chemikalien, Gase, Enzyme.....	28
B.2. Mikrobiologische Methoden.....	29
B.2.1. Probenmaterial und Organismen.....	29
B.2.2. Kulturmedien.....	30
B.2.2.1. Aerobe Anzuchten auf LB-Medium.....	30
B.2.2.2. Medium zur Stammhaltung von <i>Geobacter</i> <i>metallireducens</i>	30
B.2.2.3. Anaerobe Anzuchten auf chemisch definierten Medien.....	31
B.2.2.4. Zusammensetzung der Stammlösungen.....	32
B.2.3. Elektronendonatoren, Elektronenakzeptoren und Kohlenstoffquellen.....	34
B.2.3.1. Eisen(II)-carbonat als Elektronendonator.....	34
B.2.3.2. Eisen(II)-sulfid als Elektronendonator.....	35
B.2.3.3. Eisenoxid für <i>Geobacter metallireducens</i>	35
B.2.3.4. Wasserstoff.....	35
B.2.3.5. Salze von Carbonsäuren und andere organische Substrate.....	35
B.2.3.6. Test auf aerobes Wachstum.....	36
B.2.4. Kultivierung von Eisen(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien.....	36
B.2.5. Kultivierung von phototrophen Organismen.....	36
B.2.6. Kultivierung von Chromatiaceae.....	37
B.2.7. Stammkulturen.....	37
B.2.8. Massenzucht.....	38
B.2.9. Isolierung von Bakterien.....	38
B.2.9.1. Agarverdünnungsreihen.....	38
B.2.9.2. Ausstriche in <i>bottle plates</i>	39
B.2.9.3. Reinheitskontrollen.....	40

B.2.10. Wachstumsversuche	40
B.2.10.1. Bestimmung der Temperaturoptima	40
B.2.10.2. Bestimmung der pH-Optima	40
B.2.10.3. Vitaminbedürfnisse.....	40
B.2.11. Zellsuspensionsversuche.....	41
B.2.12. Absorptionsspektren.....	42
B.3. Analytische Methoden.....	42
B.3.1. Bestimmung von Fe(II) und Fe(III).....	42
B.3.2. Enzymatische Glucosebestimmung.....	43
B.3.3. Enzymatische Acetatbestimmung	43
B.3.4. Proteinbestimmung nach Bradford	44
B.3.5. Proteinbestimmung nach Lowry.....	44
B.3.6. Sulfat-Bestimmung durch Ionenchromatographie	45
B.3.7. Benzoat-Bestimmung durch Ionenchromatographie.....	45
B.4. Biochemische Methoden.....	45
B.4.1. SDS-Page.....	45
B.4.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese	46
B.4.2.1. Probenaufbereitung	46
B.4.2.2. Proteintrennung in der ersten Dimension.....	47
B.4.2.3. Proteintrennung in der zweiten Dimension.....	49
B.4.2.4. Silberfärbung der zweidimensionalen Chromatogramme	51
B.4.2.5. Zusammensetzung der Stammlösungen:	51
B.4.3. Reinigung eines spezifisch exprimierten Protein aus Fe(II)- oxidierenden Zellen	54
B.5. Molekularbiologische Methoden.....	55
B.5.1. Präparation genomischer DNA.....	55
B.5.2. PCR Amplifikation von rRNA-Genen	55
B.5.3. Agarosegelelektrophorese	56
B.5.4. Reinigung von PCR-Produkten.....	56
B.5.5. Sequenzieren der PCR Produkte.....	57
B.6. Physikochemische Charakterisierung von Fe(III)-Spezies	58
C. Ergebnisse	59
C.1. Isolierung und Charakterisierung phototropher Bakterien	59
C.1.1. Autotroph wachsende Anreicherungen auf Fe(II) im Licht.....	59
C.1.2. Isolierung von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien	61
C.1.3. Morphologie und Farbe von Reinkulturen der Fe(II)- oxidierenden, phototrophen Bakterien	62
C.1.4. Temperaturoptima von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien	65
C.1.5. pH-Optima von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien....	66
C.1.6. Substratspektren der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien	67
C.1.7. Taxonomische Einordnung der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien durch Sequenzanalyse der 16S rRNA Gene.....	70
C.1.8. Verwertung verschiedener Schwefelquellen durch <i>Thiodictyon</i> spp.	74
C.1.9. Oxidation von Fe(II) durch bereits bekannte phototrophe Bakterien	75
C.2. Wachstumsversuche mit Fe(II)-oxidierenden Kulturen	76
C.2.1. Wachstumsversuche unter autotrophen Bedingungen.....	76
C.2.2. Nachweis des autotrophen Wachstums durch Bestimmen des Zellertrags	79
C.2.3. Oxidation von FeS durch die phototrophen Isolate.....	80

C.2.3. Wachstum bei gleichzeitigem Vorhandensein von Fe(II) und organischem Substrat	82
C.3. Physikochemische Charakterisierung der phototroph gebildeten Eisen(III)-Spezies	87
C.4. Reduktion von photosynthetisch oxidiertem Fe(II) durch dissimilatorische Eisenreduzierer	88
C.4.1. Reduktion des Fe(III) im Dunkeln durch <i>Geobacter</i> <i>metallireducens</i>	88
C.4.2. Eine Kokultur zwischen <i>Rhodobacter ferrooxidans</i> und <i>Geobacter metallireducens</i> mit Eisen als Überträger von Elektronen.....	92
C.5. Expressionsstudien mit Stamm L7.....	97
C.5.1. Zellsuspensionen von auf Fe(II) und H ₂ gewachsenen Zellen von Stamm L7	97
C.5.2. Suspensionsversuche mit auf Acetat gewachsenen Zellen von Stamm L7	99
C.5.3. Zellsuspensionen von auf H ₂ gewachsenen Zellen von L7.....	100
C.5.4. 2D-Gelelektrophorese von Zellen des Stammes L7 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	102
C.6. Erste biochemische Charakterisierung eines spezifisch exprimierten Proteins aus Fe(II)-oxidierenden Zellen.....	106
C.6.1. Reinigung eines bei der Fe(II)-Oxidation exprimierten Proteins.	106
C.6.2. Charakterisierung des reinen Proteins durch Gelfiltration, Spektrophotometrie und 2D-Gelelektrophorese	108
D. Diskussion	112
D.1. Energetik und Biochemie Fe(II)-oxidierender, phototropher Bakterien...	112
D.2. Biologie und Geochemie des rezenten Eisenzyklus.....	117
D.3. Relevanz von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien für die Entstehung von gebänderten Eisenerzen und den Ursprung des Lebens.....	121
D.4. Globaler Redoxzyklus des Eisens im Archaikum.....	125
D.5. Ausblick.....	129
E. Zusammenfassung	130
F. Anhang	131
F.1. Description of <i>Thiodictyon siderooxidans</i> sp. nov.....	131
F.2. Description of <i>Rhodobacter ferrooxidans</i> sp. nov.	132
F.3. 16S rRNA Sequenz von <i>Thiodictyon siderooxidans</i>	133
F.4. 16S rRNA Sequenz von <i>Rhodobacter ferrooxidans</i>	134
G. Literatur	135
Lebenslauf	151

Abkürzungen

a	Jahr
atm	Atmosphäre
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
ADP	Adenosindiphosphat
AL4	Isolat von <i>Rhodobacter ferrooxidans</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
BIF	<i>Banded Iron Formations</i> , gebänderte Eisenerze, Bändereisenerze
bp	Basenpaare
Ci	Curie
d	Tage
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl- Gruppe
dATP	Desoxyadenosintriophosphat
dCTP	Desoxycytidintriophosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriophosphat
2D-Gelelektrophorese	Zweidimensionale Gelelektrophorese
dGTP	Desoxyguanosintriophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriophosphat
E _{o'}	Standardelektrodenpotential bei pH 7 [V]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> , Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen (1000 bp)
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
L6	Isolat von <i>Rhodobacter ferrooxidans</i>

L7	Typenstamm von <i>Thiodictyon siderooxidans</i> , früher auch als Stamm Thd2 bezeichnet
LHC	<i>Light Harvesting Complex</i> , Antennenkomplex
m	Meter
M	Molar
M_r	Relative Molekülmasse
min	Minute
mol	Mol
N	Normal
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nikotinamid-adenindinukleotid(-phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotid(-phosphat)
³³ P	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 33
PMS	N- Methyl-phenazonium-methylsulfat
psi	pounds per square inch
RC	photosynthetisches Reaktionszentrum
rpm	Rotationen pro Minute
rDNA	DNA-Bereiche, die für die ribosomalen Ribonucleinsäuren codieren
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäuren
SDS	Natriumdodecylsulfat
SW2	Typenstamm von <i>Rhodobacter ferrooxidans</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UQ	Ubichinon
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/w]	Gewicht pro Gewicht

A. Einleitung

A.1. Einführung in die Thematik

Eisen ist mit 5,1 % [w/w] das vierthäufigste Element der Erdkruste (86) und das häufigste Metall der Biosphäre, das Redoxwechsel durchläuft (53, 124). Es kommt in der Natur nicht gediegen, sondern in Form seiner zahlreichen Oxide vor. Diese können im Boden und im Gestein, in Seen und Flüssen sowie auf dem Meeresboden in großer Menge gefunden werden (180). Eisen ist wahrscheinlich das dominierende Schwermetall im Kosmos, da der ^{56}Fe -Kern den energetisch stabilsten Nukleus und den Endpunkt stellarer, energieliefernder Fusionsprozesse darstellt (86). Auch der Planet Mars erhält seine charakteristische rotbraune Farbe durch das Eisenoxid Maghämät. Die in der Biosphäre häufigsten Hydroxide, Oxyhydroxide und Oxide des Eisens sind Ferrihydrit, Lepidokrokit, Goethit, Hämatit, Maghämät und Magnetit. Primärgesteine enthalten das Eisen in der Regel als Eisen(II)-Silikate wie Pyroxene, Amphibole, Biotite und Olivine, aber auch in Form von Sulfiden wie das Pyrit (180). Rezente Verwitterungsprodukte weisen meist dreiwertiges Eisen auf. Bei den während der Verwitterung auftretenden chemischen Oxidationsprozessen dient der Luftsauerstoff als Oxidationsmittel. In der anaeroben Biosphäre des Archaikums wurde das bei Verwitterungsprozessen in Lösung gebrachte Fe(II) durch die Flüsse ins Meer gespült. Ein größerer Teil des in den damaligen Ozeanen in gewaltigen Mengen gelösten Fe(II) entstammte nach neueren Ansichten allerdings vulkanischer Tätigkeit auf dem Meeresboden (112). Dieses gelöste Fe(II) sedimentierte im Verlauf des Archaikums und des frühen Proterozoikums in erster Linie als Fe(III) in Form der charakteristischen gebänderten Eisenerze, im folgenden mit BIFs abgekürzt, auf den Ozeanboden (92). Der Ursprung dieser Eisenformationen ist seit nahezu hundert Jahren ein lebhaft und kontrovers diskutiertes Thema, zu dem auch die vorliegende Arbeit beitragen will (103, 184).

A.2. Eigenschaften und Zeitraum der Entstehung von gebänderten Eisenerzen

A.2.1. Beschreibung der Eigenschaften von gebänderten Eisenerzen

Die präkambrischen BIFs stellen einen Großteil der ökonomisch verwertbaren Eisenerzvorkommen der Erde dar. Sie sind auf allen Kontinenten zu finden und durch einen typischen Eisengehalt von 30-35 % ausgezeichnet (2, 13, 48, 80, 194). Dabei bilden sie stratigrafische Einheiten, die mehrere hundert Meter Dicke und eine laterale Ausdehnung von mehreren tausend Kilometern erreichen können (31, 102, 198). Physikalisch besteht die bei weitem überwiegende Mehrheit der BIFs aus fein laminierten Strukturen, die auch in hoch metamorphen Gesteinen erhalten geblieben sind. Die einzelnen Schichten sind 0,5 - 3 cm dick und setzen sich wiederum aus Schichten im Millimeter- bzw. Submillimeter-Maßstab zusammen (7). Diese Laminierung spiegelt Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung wider. Dabei wechseln sich Silikate wie cryptokristalliner und kristalliner Quarz mit eisenreichen Materialien ab. Bei diesen handelt es sich in erster Linie um Eisensilikate wie Greenalit und verwandte Mineralien, Eisencarbonate wie Siderit und Ankerit sowie Eisenoxide wie Hämatit und Magnetit (69, 196). Die genaue Mineralogie wird als Funktion der diagenetischen und metamorphen Vorgänge weiter kompliziert (113). So wird zum Beispiel $\text{Fe}(\text{OH})_3$ als Vorläufer von Hämatit und ein Gemisch von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ und $\text{Fe}(\text{OH})_2$ als Vorläufer von Magnetit diskutiert (111, 198). Der Gehalt an Aluminium liegt in den meisten untersuchten Proben unterhalb von 1 %, die Alkalimetalle werden nicht gefunden (103). Ein wichtiger Parameter zum Verständnis dieses Gesteinstyps und seiner Entstehung in der frühen Biosphäre ist das Verhältnis von $\text{Fe}(\text{III})/[\text{Fe}(\text{II}) + \text{Fe}(\text{III})]$. Dieser beträgt im Durchschnitt 0,31 bis 0,58. Die relativ niedrigen Werte reflektieren den Gehalt an Magnetit, das ein $\text{Fe}(\text{II})/\text{Fe}(\text{III})$ Mischoxid ist, sowie die Anwesenheit von $\text{Fe}(\text{II})$ -Carbonaten und Silikaten (112).

A.2.2. Modelle zur Entstehung der gebänderten Eisenerze

Die gleichmäßige Ausdehnung der BIFs über Becken von 100.000 km² Größe und mehr legt eine chemische Präzipitation von gelöstem $\text{Fe}(\text{II})$ aus anoxischem Wasser in Becken mit Verbindung zum offenen Ozean nahe. Bei den BIFs handelt es sich mengenmäßig um das häufigste chemische Sediment des Präkambriums. Modelle, die den Eintrag von unlöslichen $\text{Fe}(\text{III})$ -Verbindungen aus vulkanischer Aktivität, durch Verwitterung oder durch Auftrieb von ozeanischem Tiefenwasser annehmen, werden somit eher unwahrscheinlich (60, 198), obwohl in der älteren Literatur (103) solche Prozesse vorgeschlagen worden sind. Eine positive Eu und eine negative Ce Anomalie bestätigen, daß das Eisen der BIFs in marinen Systemen aus hydrothermalen Quellen eingetragen und dann abgelagert wurde (92, 112, 113).

Die BIFs des Archaikums sind untereinander sehr ähnlich und vom sogenannten *Lake Superior Typ* (102). Daher wird für diese BIFs ein übereinstimmender Bildungsmechanismus angenommen. Dieser Typ von BIFs stellt mengenmäßig bei weitem den Hauptteil der Eisenablagerungen, im Gegensatz zu den unten diskutierten, mengenmäßig weit unbedeutenderen BIFs vom *Algoma Typ*.

Eine erst kürzlich zusammengefaßte Vorstellung geht von einer chemischen Fe(II)-Oxidation durch Reaktion mit freiem Sauerstoff an der Chemokline von Tiefseegebieten aus (112). Dabei erfolgte die Fe(III)-Präzipitation nach Oxidation des im Tiefenwasser gelösten Fe(II) in einem dichtestratifizierten Ozean mit anoxischem, reduzierendem Tiefenwasser und darüberliegendem, oxischem Oberflächenwasser. In diesem Modell nimmt man somit eine oxische Atmosphäre an, in der Sauerstoff vom Ort seiner Produktion zum Ort der chemischen Reaktion mit Fe(II) transportiert wurde. Dieser freie Sauerstoff in der Atmosphäre des frühen Archaikums soll bereits das Produkt einer oxygenen Photosynthese durch frühe Cyanobakterien gewesen sein. Dies muß man annehmen, da der bei der Photolyse von Wasser durch ultraviolette Strahlung gebildete Sauerstoff nicht ausgereicht hätte, die großen Mengen Fe(III) in den BIFs abzulagern (198).

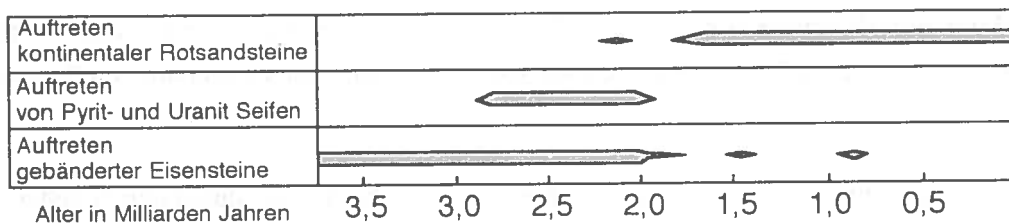


Abbildung 1: Zeitliche Abfolge der für den Oxidationszustand der Biosphäre charakteristischen Sedimente.

Die Konservierung von Pyrit- und Uranitseifen in der Zeit vor ca. 2,5-2,0 Milliarden Jahren schließt die Anwesenheit von Sauerstoff in der Erdatmosphäre aus, da in diesem Fall schnell eine oxidative Verwitterung stattgefunden hätte. Für die Anwesenheit von Sauerstoff in der Atmosphäre sind die kontinentalen Rotsandsteine charakteristisch, bei deren Entstehung in Süß- und Grundwasser gelöstes Fe(II) durch Luftsauerstoff oxidiert wurde (198).

Aufgrund anderer geochemischer Beobachtungen kann man aber das Vorkommen höherer Konzentrationen von freiem Sauerstoff in der Erdatmosphäre in der Zeit vor der Wende von

Archaikum zum Proterozoikum vor 2,5 Milliarden Jahren ausschließen. Einer der wichtigsten Hinweise auf eine anoxische Atmosphäre im Archaikum ist das Fehlen von *Red Beds*. Als solche bezeichnet man terrestrische Fe(III)-haltige Formationen, die sich aus fluvialen und alluvialen Sedimenten gebildet haben. Die in ihnen enthaltenen, Quarzsand umhüllenden Eisenoxide können sich nur durch Kontakt mit einer oxidierenden Atmosphäre gebildet haben (198). Ferner werden nur im Archaikum Konglomerate des unlöslichen Uranitits gefunden. Diese Uran(IV)-Verbindung geht bereits bei geringen Partialdrücken von O₂ in Uran(VI) über, das als Uranylkomplex schnell in Lösung geht. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 1 dargestellt.

In einer global anoxischen Atmosphäre kann eine Fe(II)-Oxidation durch freien Sauerstoff nur in der unmittelbaren Umgebung von oxygenen phototrophen Populationen stattgefunden haben. Dies ist das am weitesten verbreitete Modell für die Entstehung der BIFs: Durch phototrophe Mikroorganismen gebildeter Sauerstoff reagiert sofort mit dem umgebenden Fe(II) zu unlöslichem Fe(III). Sauerstoff konnte sich allenfalls in räumlich begrenzten "Sauerstoffoasen" ansammeln. Erst als nach langer Zeit das gesamte in den Ozeanen gelöste Fe(II) oxidiert worden war, konnte sich der Sauerstoff in der Atmosphäre sammeln und den beobachteten Übergang von reduzierend zu oxidierend bewirken (107). Dieser entscheidende Wandel der Erdatmosphäre hat nach den zuvor erklärten geochemischen Befunden an der Wende vom Archaikum zum Proterozoikum stattgefunden (73). Ein solches Modell nimmt eine Oxidation des Fe(II) im lichtdurchfluteten Oberflächenwasser von Schelfgebieten und offenen Ozeanen an (92).

Weitere Modelle zur Oxidation des Fe(II) gehen von einer abiotischen, durch ultraviolettes Licht bewirkten Reaktion von Fe(II) und Wasser zu Fe(III) und H₂ aus. Diese Reaktion hätte mengenmäßig aber nicht ausgereicht, um die Ablagerung der riesigen Eisen(III)-Formationen zu ermöglichen (17, 19, 26, 68, 139). Frühere Berichte, daß bei solch einer photochemischen Reaktion auch CO₂ zu Formaldehyd reduziert wird und es somit auch zu einer Bildung von reduziertem Kohlenstoff kommt, wurden widerrufen (139).

Eine von zahlreichen Autoren diskutierte Möglichkeit zur Oxidation von Fe(II) ist dessen direkte Verwendung als Elektronendonator für eine anoxygene Photosynthese (4, 33, 162, 197). Dabei wurde aber dem Fe(III)/Fe(II) Redoxpaar unabhängig vom vorherrschenden pH-Wert stets ein hohes Redoxpotential von +0,77 V zugeordnet. Wie in der Diskussion dieser Arbeit dargelegt, gelangt man allerdings unter Einbeziehung der bei neutralen pH-Werten auftretenden unlöslichen Oxy- und Hydroxyverbindungen des Fe(III) zu einem Redoxpotential von ca. + 0,1 V; ein solches Redoxpotential sollte prinzipiell für eine Photosynthese mit nur einem Photosystem ausreichen (52, 116, 168, 204, 205). Wäre dieses Modell einer Oxidation

von Fe(II) ohne eine Beteiligung von freiem O₂ zutreffend, könnte man das Auftreten von Fe(III) in der geologischen Zeitskala nicht mehr wie üblich als Zeichen für das Einsetzen einer O₂ Produktion durch phototrophe Organismen verwenden.

Abbildung 2 zeigt die Menge der abgelagerten BIFs im zeitlichen Verlauf des Präkambriums. Dazu sind die geologisch am besten untersuchten Formationen aus dem jeweiligen Zeitabschnitt aufgelistet (113). Die ältesten BIFs finden sich in der Isua Gruppe von West Grönland und wurden auf ein Alter von 3,8 Milliarden Jahre datiert (198). Die Ablagerung der BIFs hatte ein ausgeprägtes Maximum im Zeitraum vor 2,3 - 2,5 Milliarden Jahren. Dieses Alter haben auch die mengenmäßig größten BIFs, nämlich die des Hamersley Range von West Australien und die der Transvaal Supergruppe in Südafrika. Dieser "Hauptepisode" in der Ablagerung der BIFs im Zeitraum vor 2,2-1,8 Milliarden Jahren kommt darum in Modellen der Erdgeschichte eine bedeutende Rolle zu (79, 102, 198). Vor 1,8 Milliarden Jahren fand dann ein relativ plötzliches Ende der Ablagerung von BIFs statt. Im späten Proterozoikum und frühen Phanerozoikum abgelagerte BIFs spielen mengenmäßig eine untergeordnete Rolle und unterscheiden sich in ihrer Mineralogie und Chemie, weswegen ein unterschiedlicher Bildungsmechanismus angenommen wird. Die späteren BIFs sind vom sogenannten Algoma Typ, der mit vulkanischen Vorgängen in Verbindung gebracht wird (102).

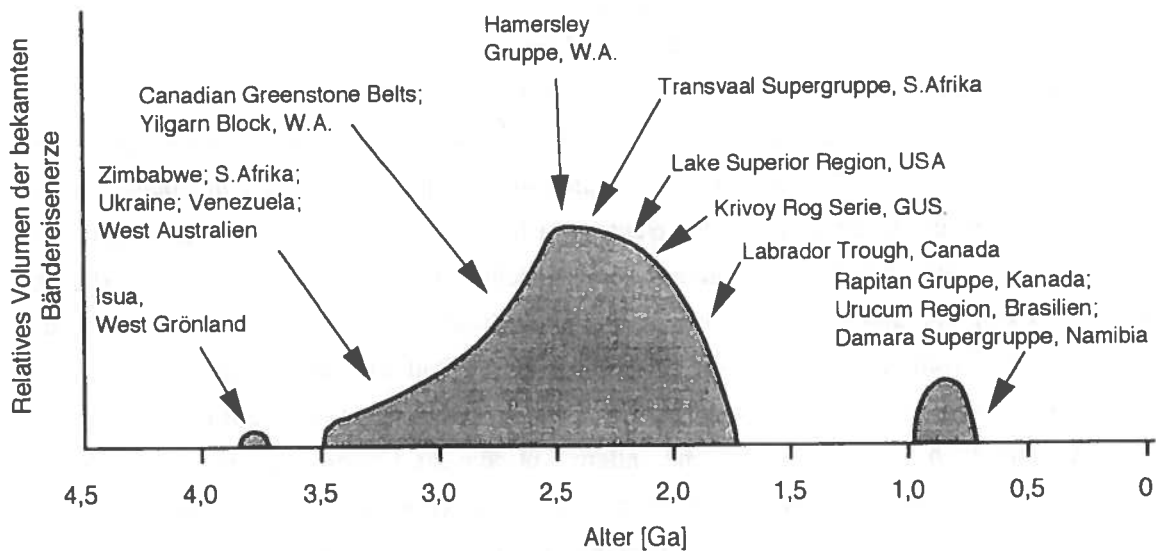


Abbildung 2: Zeitliche Verteilung der Ablagerung von BIFs.

In dieser Abbildung wird die zeitliche Verteilung der als BIFs abgelagerten Eisenmenge und der jeweiligen in der geologischen Literatur wichtigsten Formationen dargestellt. Die Lücke zwischen 3,8 und 3,5 Milliarden Jahren rührt aus einer Lücke an Funden, da so alte marine Sedimente nur sehr selten bis heute erhalten geblieben sind. Bei BIFs, die jünger als 1,5 Milliarden Jahre sind, werden vulkanische Entstehungsmechanismen diskutiert (102).

A.3. Rezente eisenoxidierende und eisenreduzierende Bakterien

A.3.1. Die "Eisenbakterien"

Schon vor mehr als hundert Jahren wurden in Habitaten mit hohem Fe(II)-Gehalt mikroskopisch kleine Organismen beobachtet, die mit Eisenoxiden und Ferromangan-Ablagerungen im neutralen Wasser von Flüssen, Teichen, Sümpfen, Drainagekanälen und vom Wasserleitungssystem vergesellschaftet sind (46, 84). In letzterem können sie mitunter zu Verstopfungsproblemen führen. Die ursächliche Beteiligung von Bakterien an Eisen-Ablagerungen unter neutralen Bedingungen wurde von den Geochemikern allerdings lange Zeit bestritten, da bereits durch chemische Oxidation mit dem Luftsauerstoff eine rasche Reaktion erfolgt (77). Heute besteht jedoch kein Zweifel mehr, daß *Gallionella* zusammen mit *Leptothrix* wesentlich zur Ablagerung von Ocker-Sedimenten, Eisenschwämmen und Seeseisen beitragen, etwa bei den umfangreichen Ockerablagerungen in einer griechischen Bucht (54, 59).

Die Gattungen *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* und *Clonothrix* wurden aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie bereits im 19. Jahrhundert beschrieben (46, 143, 165). Die älteste Definition des Begriffs "Eisenbakterien" stammte von Winogradsky. Er beobachtete in Anreicherungen, denen er Fe(II) zugegeben hatte, das Wachstum der mit Eisenoxiden inkrustierten, filamentösen Zellscheiden von *Leptothrix ochracea*. In Analogie zu seinen Arbeiten mit Schwefelwasserstoff oxidierenden Organismen nahm er an, daß diese chemoautotroph durch Oxidation des Fe(II) mit O₂ als Elektronenakzeptor wuchsen, zeigte dies aber nie experimentell (77). Nach und nach wurde jedoch klar, daß einzig *Gallionella* ein zur Autotrophie fähiges eisenoxidierendes Bakterium ist (89). Dennoch wurde der Begriff der "Eisenorganismen" (46) auf alle Organismen ausgedehnt, die Eiseneinlagerungen in oder auf den Zellen zeigten. Das heißt, es wurden auch heterotrophe Organismen dazugerechnet, die Mangan- oder Eisenoxide lediglich an ihrer Scheide oder Schleimhülle präzipitierten. Man ist sich jedoch nicht im klaren darüber, ob und zu welchem Anteil das Eisen zum Energiehaushalt dieser Organismen beiträgt oder welche andere Aufgabe die Ferromanganpräzipitate haben könnten (36, 40, 54). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Eisenbakteriums *Crenothrix polyspora* wurden mit dem Elektronenmikroskop in Standortproben zellinterne Membranstapel beobachtet. Da man solche Membranstapel im allgemeinen bei Methanoxidierenden Organismen beobachtet, nimmt man an, daß es sich bei *Crenothrix* eigentlich um einen Methanoxidierer handelt. In Aufnahmen von *Leptothrix ochracea* sieht man Verbindungen zwischen der Scheide und der Zellmembran, ihre Bedeutung ist aber vollkommen unklar (46, 77, 78). Eine systematische Erforschung wird durch eine große nomenklatorische Verwirrung

und die Tatsache erschwert, daß die meisten Formen lediglich mikroskopisch beobachtet wurden, aber keine Reinkulturen von ihnen existieren. So ist sogar die Abgrenzung der weitläufig bekannten Gattungen *Sphaerotilus* und *Leptothrix* voneinander nicht einwandfrei geklärt (35). Von dem klassischen Eisenorganismus *Leptothrix ochracea* existierte nie eine Reinkultur. Gegenwärtig neigt man zu der Ansicht, daß *Leptothrix ochracea* doch eine eigene Art und nicht eine Standortvariante von *Sphaerotilus natans* ist, wie man zuvor annahm (121). *Leptothrix ochracea* bildet in eisenhaltigen Kulturen unter Nährstofflimitierung große Mengen eiseninkrustierter Scheiden, die von den Zellen nach und nach verlassen werden. *Sphaerotilus natans* bevorzugt dagegen höhere Nährstoffkonzentrationen und verläßt seine Scheiden nicht (46, 77, 78). In neuerer Zeit kamen die Beschreibungen von *Metallogenium*, Gattungen der Familie Siderocapsaceae, *Pedomicrobium*, *Hyphomicrobium* sowie Organismen aus der *Planktomyces-Blastocaulis* Gruppe als Eisen- und Mangan-ablagernde Bakterien hinzu. Ebenso wurde diese Eigenschaft bei verschiedenen heterotrophen Bakterien, Pilzen, Algen und Protozoen gefunden (77).

Die heterotrophen Organismen oxidieren oft Fe(II) und Mn(II), wenn sie unter Nährstofflimitierung und hohen Mn(II)-Konzentrationen gehalten werden. Die Fähigkeit zur Fe(II) Oxidation geht dabei mit der Fähigkeit zur Mn(II)-Oxidation einher. Es wurde spekuliert, daß die Mn(II)-Oxidationsmechanismen einen Schutz gegen die Toxizität bestimmter Sauerstoffspezies darstellen. Eventuell kommt es auch einfach durch Erhöhen des pH-Werts und des Redoxpotentials im mikroskopischen Umfeld der Zelle zu den Ablagerungen. Ein solcher Mechanismus ist bei Mn(II)-oxidierenden Algen vorgeschlagen worden, da sie ihre nächste Umgebung durch Verbrauch von Kohlendioxid alkalisieren und gleichzeitig mit O₂ aus ihrer Photosynthese sättigen. Eine Energiekonservierung durch die Metalloxidation ist jedoch in keinem Fall gezeigt. Viele der heterotrophen, Mangan- und Eisen-ablagernden Organismen bilden saure, extracelluläre Polymere, an denen sich die Mangan- oder Ferromangan-Oxide niederschlagen. Auch *Bacillus*-Sporen enthalten im toten Sporangium oft präzipitierte Eisenhydroxide (39, 41, 138). Nach einer neueren Ansicht binden unter neutralen oder leicht sauren Bedingungen Bakterien, die saure extracelluläre Polymere bilden, unspezifisch die positiv geladenen Eisenhydroxid Partikel (58, 77, 78). Dieser Mechanismus würde allerdings nicht bei Manganoxiden funktionieren, da diese bei neutralem pH negativ geladen sind; hier könnte sich aber das Mn(II)-Ion anlagern und dann in der Polymermatrix oxidiert werden. Nach einem ähnlichen Mechanismus könnte auch Fe(II) oxidiert werden, was aber nur bei pH-Werten von 5-6 und unter mikroaeroben Bedingungen biologisch interessant wäre; bei höheren pH-Werten läuft die chemische Oxidation zu rasch. Sind erst einmal Keime von Ferromanganoxiden gebildet, dann erhöht abiotische Oberflächenkatalyse die Oxidationsrate weiter, und es kommt zu den sichtbaren Ablagerungen.

Besonders heikel ist die Beurteilung von als *Metallogenium* bezeichneten Partikeln. Diese werden in der Natur häufig an Chemoclinen beobachtet, an denen sich Eisen- oder Manganpräzipitate bilden. Mikrofossilien von identischer Morphologie wurden als *Eoastrion* auch in 2 Milliarden Jahre alten Gesteinen beschrieben. Ob die *Metallogenium* Partikel überhaupt lebende Organismen darstellen, ist allerdings Gegenstand kontroverser Diskussionen. Bisher ist es mit Färbetechniken nicht gelungen ist, in den Partikeln Nucleinsäuren oder Proteine nachzuweisen. Von einigen Wissenschaftlern wird die Ansicht vertreten, daß es sich bei den Partikeln um Eisen- und Manganpräzipitate durch Mycoplasmen handelt, die unter anderem auch Mycelpilze infizieren. Dies wird als Grund dafür gesehen, weshalb etliche *Metallogenium* Partikel nur in Anwesenheit eines Pilzes vermehrt werden können. In konträren Darstellungen werden aber auch durch den Pilz ausgeschiedene niedermolekulare Substanzen oder Exoenzyme für diese Präzipitate verantwortlich gemacht (77, 141, 212).

Gallionella ferruginea stellt den einzigen bekannten Fe(II)-Oxidierer in Reinkultur dar, der bei neutralen pH-Werten von 6,0 - 7,6 nachweislich durch die Oxidation von Fe(II) mit O₂ als terminalem Elektronenakzeptor wächst (88, 89). Der Organismus ist autotroph und assimiliert keine organischen Substrate. Seine Anreicherung und Isolierung gelang in Gradientensystemen mit Fe(II) und 1 % O₂. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt +18°C. *Gallionella ferruginea* besteht aus charakteristischen bohnenförmigen Zellen, aus deren konkaver Seite ein Bündel mit Eisenoxiden krustierter Proteinfibrillen von bis zu 400 µm Länge und 2 µm Breite entspringt. Das Bündel setzt sich aus 2 nm dicken Fibrillen zusammen, die bandförmig angeordnet und stark mit Eisenoxidpartikeln inkrustiert sind. Bei Teilung der Zellen findet eine Gabelung des einzelnen Fibrillenbandes statt, so daß mit der Zeit ein mikroskopisches Astwerk entsteht (46). Man kann diesen Organismus häufig in oligotrophen Süß- und Salzwasser beobachten. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dünnschnitten der Zellen sind neben PHB- und Glycogen-Granula auch intracytoplasmatische Membranen erkennbar. Die Autotrophie von *Gallionella* wurde durch den Einbau von ¹⁴CO₂ und den Nachweis der Aktivität der Ribulosebisphosphat-Carboxylase erhärtet (89). Weitere physiologische Untersuchungen, wie das Bestimmen des molaren Wachstumsertrages oder biochemische Charakterisierungen wurden bisher noch nicht durchgeführt, was sicherlich mit der aufwendigen und schwierigen Kultivierung zusammenhängt.

A.3.2. Acidophile, aerobe Fe²⁺-Oxidierer

Die biologische Fe²⁺-Oxidation unter sauren Bedingungen, die im allgemeinen im Bereich von pH 1,5 - 3,5 stattfindet, ist ein weit besser untersuchbares Phänomen, da Fe²⁺-Ionen in diesem pH-Bereich in Gegenwart von O₂ metastabil sind. Eine Vielzahl von Organismen aus verschiedenen Abstammungslinien der Bacteria und auch einiger extrem thermophiler Archaea konnten isoliert und charakterisiert werden (38, 110). Meist gelang die Isolierung aus sauren Minenabwässern, wo wahrscheinlich die Mehrzahl der isolierten Bakterien an Bioleaching-Prozessen mitwirkt. Innerhalb der Proteobakterien sind verschiedene Isolate von *Thiobacillus ferrooxidans* und das Isolat M-1 zu nennen, das im Gegensatz zu *Thiobacillus ferrooxidans* nicht zu einer Oxidation von Schwefelverbindungen fähig ist (182, 183). Im Bereich der Gram-positiven Organismen finden sich *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* und andere moderat thermophile Bakterien, die untereinander divers und sicherlich mehreren Genera zuzuordnen sind. An der Wurzel der Eubakterien in der Nähe von *Thermotoga* sp. ist der mesophile, Gram-negative Stamm *Leptospirillum ferrooxidans* einzuordnen. Er ist nicht zu einer Oxidation von Schwefelverbindungen fähig. Die gebogenen Stäbchen bilden spiralförmige Zellketten. Unter den thermoacidophilen Archaeobakterien finden sich *Acidianus brierleyi*, *Acidianus infernus* und *Metallosphaera sedula*., die Fe²⁺ und Schwefelverbindungen oxidieren. Diese autotrophen Organismen fixieren CO₂ wahrscheinlich nicht wie *Thiobacillus* über den Calvin-Benson Zyklus, sondern über einen reversen Tricarbonsäurezyklus (15, 20). Ihr bevorzugtes Habitat sind heiße Quellen. Die für biochemische Untersuchungen notwendigen Zellmengen lassen sich bei diesen Organismen durch elektrochemische Reduktion des gebildeten Fe³⁺ erreichen. Solche Kulturverfahren wurden in erster Linie für *Thiobacillus ferrooxidans* ausgearbeitet (14).

Biochemisch am besten untersucht ist der leicht kultivierbare acidophile Eisenoxidierer *Thiobacillus ferrooxidans* (123, 140, 166, 167, 170). Dieser Gram-negative, chemolithoautotrophe Fe²⁺-Oxidierer ohne erkennbare intracytoplasmatische Membranstrukturen wächst bei pH-Werten im Bereich von 1,5 bis 6,0 mit einem Optimum bei 2,0 (54). Der Organismus wird auch als Modell für die Mobilisierung von Metallen wie Eisen oder Kupfer durch Oxidation der unlöslichen Metallsulfide zu den löslichen Sulfaten im biologischen Leaching untersucht (12, 105, 152). Neben Fe²⁺ oxidiert *Thiobacillus ferrooxidans* auch Sulfide, S⁰ und Thiosulfat zu Schwefelsäure, was die extrem starke Ansäuerung bis auf pH 1 während des Wachstums erklärt. Isolate von *Thiobacillus ferrooxidans* sind untereinander genetisch und physiologisch so variabel, daß sie ein größeres Taxon als eine Art darstellen (15). Bei pH-Werten unterhalb 2 - 3 ist Fe²⁺ gegenüber dem Sauerstoff metastabil. Wie in der Diskussion näher erläutert, beträgt das Redoxpotential +0,77 V, da sich sowohl Fe²⁺ als auch Fe³⁺ vollständig in Lösung befinden. Bei der Reaktion werden

nur 30 kJ/mol freigesetzt, die für das autotrophe Wachstum nutzbar sind. Daher müssen von dem Organismus große Substratmengen zur Bildung von Zellsubstanz umgesetzt werden. Hätten die Zellen bei ihrem Wachstum eine Effizienz von 100 % müßte die Zelle 18,5 mol Fe^{2+} oxidieren, um 1 mol CO_2 zu fixieren, in der Realität sind es aber über 90 mol Fe^{2+} , die oxidiert werden müssen (53). Durch Inhibitorstudien wurde festgestellt, daß die Oxidation von Fe^{2+} und Schwefelverbindungen über verschiedene Elektronentransportketten erfolgt. Sulfat ist für die Fe(II) Oxidation notwendig, wahrscheinlich weil es den $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Komplex stabilisiert (123).

Die Eisenoxidation bei *Thiobacillus ferrooxidans* findet an der Zelloberfläche statt. Fe^{2+} reduziert an die äußere Membran gebundenes Fe^{3+} . Das entsprechende Enzym muß allerdings noch charakterisiert werden (70, 118, 142). Die Elektronen werden nach den neuesten Modellen auf das periplasmatische Kupferprotein Rusticyanin und weiter auf Cytochrom *c* übertragen, von wo sie an den Cytochrom *a₁*-Komplex in der Zellmembran weitergegeben werden (93, 99, 106, 181). Die von der Oxidation der Schwefelverbindungen stammenden Elektronen werden ebenfalls über Cytochrom *c* eingespeist (24). Rusticyanin ist in mit Fe^{2+} gewachsenen Zellen von *Thiobacillus ferrooxidans* das dominierende Protein, das bis zu 5% des Zellproteins ausmacht und dem Rohextrakt eine tiefblaue Farbe verleiht. Das kupferhaltige, 16,5 kDa große Protein hat ein Mittelpunktspotential von +680 mV und einen dominierenden Absorptionspeak bei 595 nm (151). Auf reduzierten Schwefelverbindungen kultivierte Zellen von *Thiobacillus ferrooxidans* enthalten kein Rusticyanin (15). Die für die CO_2 -Fixierung notwendigen Reduktionsäquivalente müssen durch reversen Elektronentransport über den Cytochrom *bc*-Komplex, Ubiquinon und Flavin auf NAD^+ bereitgestellt werden. Dabei fließen für jedes Elektron, das NAD^+ reduziert, etwa 20 Elektronen auf O_2 . Abbildung 3 faßt diese Vorstellungen von der Topologie der beteiligten Komponenten zusammen.

Bezüglich der an der Fe(II)-Oxidation beteiligten Komponenten scheint bei den verschiedenen Organismen eine große Variabilität zu herrschen. So wird bei dem acidophilen, Fe(II)-oxidierenden Stamm BC1 eine gelbe Komponente mit einem Mittelpunktspotential von +650 mV und einem Molekulargewicht zwischen 8 und 12 kDa gefunden. Diese läßt sich relativ leicht reinigen, da sie selbst bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 95% Sättigung noch in Lösung verbleibt. Der Rohextrakt von auf Fe^{2+} gezogenen Zellen von *Leptospirillum ferrooxidans* ist dagegen tief rot gefärbt. Daraus kann ein säurestabiles, ungewöhnliches Cytochrom von 17,8 kDa und einem Mittelpunktspotential von +680 mV gereinigt werden, das im reduzierten Zustand ungewöhnliche Absorptionspeaks bei 433 und 572 nm besitzt (210). Wiederum abweichend sind dagegen die Verhältnisse bei den Archaeobakterien *Metallosphaera sedula* und *Acidianus brierleyi*. Hier findet sich keine auffällige, lösliche, redoxaktive Komponente. Dafür enthalten die Zellen große Mengen eines neuen, membrangebundenen,

gelben Cytochroms. Das mit Detergenz solubilisierter, reduziertes Cytochrom zeigt Absorptionspeaks bei 433 und 572 nm (15). Zusammenfassend kann also vermerkt werden, daß an der Fe^{2+} -Oxidation in den verschiedenen Organismen eine Vielzahl von verschiedenen Redoxproteinen beteiligt ist.

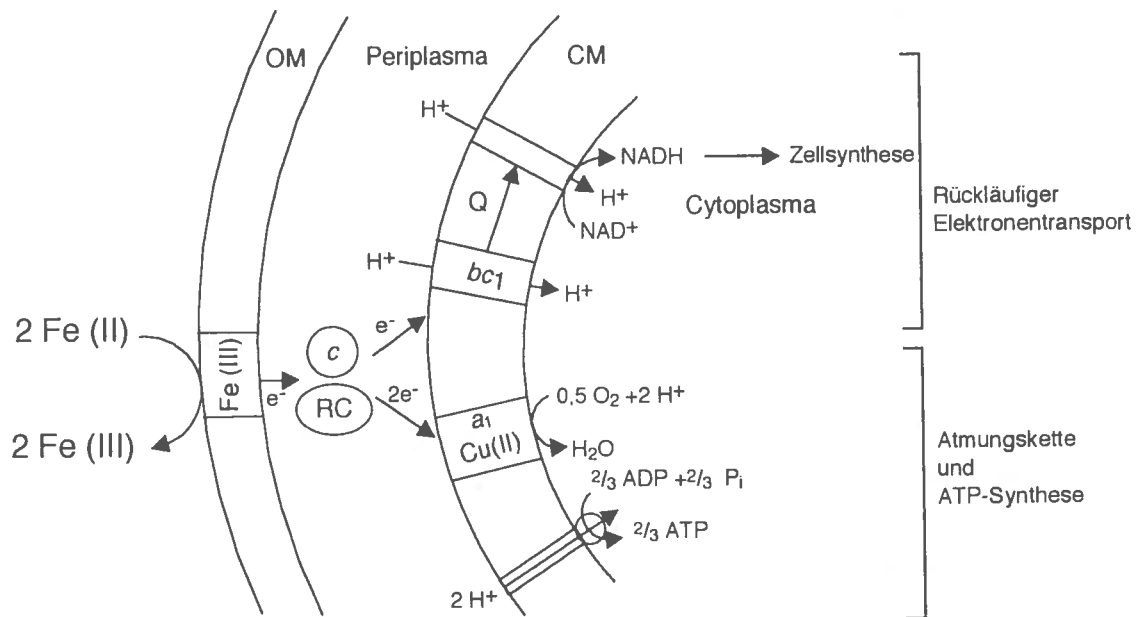


Abbildung 3: Topologie der an der $\text{Fe}(\text{II})$ -Oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* beteiligten Komponenten.

Das $\text{Fe}(\text{II})$ -oxidierende Enzym liegt in der äußeren Membran. Die Elektronen werden dann über Rusticyanin und das lösliche Cytochrom c auf die Endoxidase übertragen. Rusticyanin ist ein blaues Kupferprotein, das bei Zellen, die auf $\text{Fe}(\text{II})$ gezogen wurden, bis zu 5% des Gesamtproteins ausmacht.

A.3.3. Die dissimilatorische Fe(III)-Reduktion

Den zur Fe(II) Oxidation umgekehrten Vorgang stellt die Fe(III)-Reduktion dar (148). So wird die Fermentationsbilanz von *Bacillus polymyxa* in Anwesenheit von amorphen Eisen(III)-Hydroxyden zu oxidierteren Produkten hin verschoben. Wie stark eine Kultur Eisen reduziert, hängt dabei in hohem Maße von der Spezies des zugegebenen Fe(III) ab (53). Ähnliches konnte auch bei etlichen anderen Pilzen und Bakterien beobachtet werden. Das Ausmaß dieser Fe(III) Reduktion ist aber stets vergleichsweise klein. So transferieren etwa gärende *Vibrio* spp. 0,13 % bzw. 0,03 % der Reduktionsäquivalente aus Glucose oder Malat auf Fe(III), was eine verstärkte Bildung von organischen Säuren und eine Wachstumsstimulation zur Folge hat (53, 125). Auch *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Sulfolobus* spp. reduzieren Fe(III) mit S° als Elektronendonator, wobei allerdings kein wirkliches Wachstum nachgewiesen wurde. Dagegen können einige Organismen Fe(III) als externen Elektronenakzeptor für eine anaerobe Atmung verwenden. *Shewanella putrefaciens* oxidiert dabei nur wenige Verbindungen wie H₂ oder Formiat. Organische Säuren wie Lactat und Pyruvat werden nur zu Acetat oxidiert, andere getestete organische Verbindungen wurden nicht verwertet (44, 125). Die am besten charakterisierte Reinkultur eines dissimilatorisch Fe(III) reduzierenden Organismus, der organische Säuren wie Acetat über den Tricarbonsäurezyklus komplett zu CO₂ oxidiert, ist *Geobacter metallireducens*, ein obligat anaerobes, pleomorphes, Gram-negatives Stäbchen (81). Bei seinem Wachstum wird schwach kristallines Eisenoxid quantitativ zu Magnetit, einem Fe(III)/Fe(II)-Mischoxid, reduziert, welcher dann allerdings nicht mehr weiter angegriffen werden kann (10, 126, 127, 130, 133). Neben der Fe(III)-Reduktion ist dieser Stamm auch zur Reduktion von Manganoxiden und zur Nitrat-Ammonifikation fähig (147). Außer kurzkettigen Fettsäuren ist auch die anaerobe Oxidation von aromatischen Verbindungen wie Benzoat, Phenol oder Toluol möglich. Über Sequenzierung der 16S rRNA Gene wurde eine enge Verwandtschaft von *Geobacter metallireducens* zu *Desulfuromonas acetoxidans* festgestellt. Letztere Art war schon lange als S° reduzierender Organismus bekannt (127, 171, 174). Er erlangte Berühmtheit, weil mit seiner Hilfe erstmals der Nachweis gelang, daß Acetat in Abwesenheit von O₂ und Nitrat überhaupt endoxidiert werden kann. Nachträglich wurde dann erkannt, daß es sich bei *Desulfuromonas acetoxidans* ebenfalls um einen dissimilatorischen Fe(III)-Reduzierer handelt. In der neuesten Literatur ist ferner der mit den beiden oben genannten Organismen eng verwandte dissimilatorische Fe(III)-Reduzierer *Geobacter sulfurreducens* erwähnt, der mit Acetat oder H₂ als Elektronendonator sowohl zu einer Reduktion von S° als auch von Fe(III) fähig ist (25). Wie in der Diskussion näher erläutert wird, spielen dissimilatorisch Fe(III)-reduzierende Organismen eine bedeutende Rolle in der anaeroben Oxidation organischer Substanzen und damit im rezenten sowie wahrscheinlich im archaischen Eisenzyklus.

Dissimilatorische Eisenreduzierer reduzieren das Fe(III) durch direkten Kontakt. So wird in einen Dialyseschlauch eingeschlossenes Eisenoxid, das man in eine Kultur hängt, nicht reduziert (53). Bei *Shewanella putrefaciens* konnten in der äußeren Membran über SDS-Gelelektrophorese Proteine nachgewiesen werden, die spezifisch nur auftreten, wenn der Organismus auf Fe(III) wächst. Bei diesen könnte es sich um die Fe(III) Reduktase handeln. Somit wird für dissimilatorische Eisenreduzierer eine Eisenreduktase in der äußeren Membran und eine Elektronentransportkette durch das Periplasma vorgeschlagen, um die unlöslichen Eisenoxide anzugreifen (144-146). Über die Studie von spezifischen Mutanten wurde ferner gezeigt, daß bei *Shewanella putrefaciens* die Fähigkeit zur Reduktion von Manganoxiden und Eisenoxiden von getrennten Enzymsystemen vermittelt wird (125).

A.4. Fossile und rezente phototrophe Prokaryonten

A.4.1. Geologische Zeugnisse phototrophen Lebens

Die Spuren frühen Lebens auf der Erde setzen erstmals vor ca. 3,5 Milliarden Jahren ein. Dabei handelt es sich um eine Isotopenfraktionierung in sedimentären Carbonaten und Kerogenen (175, 176). Die seit dieser Zeit kontinuierliche Anreicherung von ^{12}C in Sedimenten rührt hauptsächlich von der Spezifität in der enzymatischen Fixierung von CO_2 im Calvin-Zyklus autotropher Organismen her. Das CO_2 einbauende Enzymsystem, die Ribulosebisphosphat-Carboxylase, bevorzugt dabei CO_2 -Moleküle, die ein ^{12}C -Atom statt eines ^{13}C -Atoms besitzen. Aufgrund dieser leichten Bevorzugung, die in erster Linie mit einer schnelleren Diffusion der leichteren Moleküle zum aktiven Zentrum des Enzyms erklärt wird, ist organische Materie mit dem ^{12}C -Isotop um 20 bis 30 ‰ angereichert. Dieser Wert läßt auch über erdgeschichtliche Zeiträume eine erstaunliche Konstanz dieses biochemischen Stoffwechselwegs und der an ihm beteiligten Enzyme vermuten. Das Isotopensignal kann man mit einiger Unsicherheit sogar bis in die 3,8 Milliarden Jahre alte Isua Formation von Grönland, dem ältesten bekannten Sedimentgestein, zurückverfolgen. Da dieses Gestein aber einer starken Metamorphose unterworfen war, ist keine eindeutige Aussage möglich (175).

Zeitgleich mit dem gesicherten Auftreten der Isotopenfraktionierung werden in der 3,5 Milliarden Jahre alten australischen Warrawoona Formation erstmals Stromatolithen und Mikrofossilien beobachtet (134, 154, 177, 199, 200). Stromatolithen können als eine Art "versteinerte mikrobielle Matte" aufgefaßt werden (28). Es sind biogene Strukturen, die durch Einfangen und Binden von Sediment oder durch Präzipitation aufgrund der metabolischen Aktivität von Mikroorganismen entstanden sind (199). So präzipitieren einige rezente Algen bei der CO_2 -Fixierung Calciumcarbonat. Diese Erscheinung kann auch zum Beweis des

biologischen Ursprungs der Stromatolithen verwendet werden; oftmals sind Stromatolithen die einzigen Carbonatausfällungen in Silikatgesteinen. Rezente Stromatolithen, die beispielsweise in der Shark Bay, Australien, beobachtet werden, sind das Produkt von Lebensgemeinschaften, die in diesem Fall hauptsächlich das einzellige Cyanobakterium *Entophysalis major* als Primärproduzenten besitzen. Das Wachstum der Stromatolithen erfolgt dadurch, daß die pustuläre Mattenstruktur über das abgelagerte Sediment wächst. Da man aber auch mikrobielle Matten kennt, die auf Schwefelpurpurbakterien oder gar chemolithotrophen Organismen beruhen (28), kann man nicht davon ausgehen, daß auch die in der anaeroben Atmosphäre des Archaikums entstandenen fossilen Stromatolithen cyanobakteriellen Ursprungs sind (199). Bei den mikrobiellen Matten im Solar Lake, Israel, kommt es nicht in der Zone, in der Photosynthese betrieben wird, d.h. den oberen 3 mm, zu Carbonat-Niederschlägen, sondern erst durch den bakteriellen Abbau der organischen Verbindungen in 30 bis 80 mm Tiefe. Die Beobachtung einer Carbonat-Präzipitation sagt somit nichts über die Biochemie der beteiligten Organismen aus (199). Analog zu rezenten, im Flachwasser gebildeten Stromatolithen in der Shark Bay haben sich vermutlich archaische Stromatolithen ebenfalls im Flachwasserbereich gebildet, da sie oftmals versteinerte Trocknungsrisse in den mikrobiellen Matten zeigen. Die Stromatolithen der Warrawoona-Formation zeigen eine enge Laminierung in 20 μ m dicken Schichten, in denen filamentöse Mikroorganismen als Mikrofossilien erhalten geblieben sind. Wie in der Diskussion näher erläutert wird, besitzen diese ältesten bekannten Fossilien noch keine für die Cyanobakterien charakteristischen Differenzierungen wie Verzweigungen der Zellfäden, Akineten oder Heterocysten. Sie erfüllen aber die für authentische Mikrofossilien notwendigen Kriterien, wie große Häufigkeit an ihrem Fundort, feste Einbettung in primäre Mineralphasen des Gesteins, gleichartige Ausrichtung der Fibrillen in den Schichten, statistische Größenverteilung und das Vorhandensein von Teilungsstadien (178, 179). Stromatolithen waren im frühen Archaikum selten, wurden im späten Archaikum und im Proterozoikum aber häufige, riffbildende Erscheinungen. Mit dem Ende des Präkambriums endete das "Zeitalter der Stromatolithen" (178). Abbildung 4 faßt die geschilderten Zeiträume noch einmal im Bild zusammen. Im unteren Kambrium übernahmen dann die Archaeocyatiden zusammen mit Algen, bis zum Aufkommen der Korallen, die ökologische Rolle der Riffbildner (185).

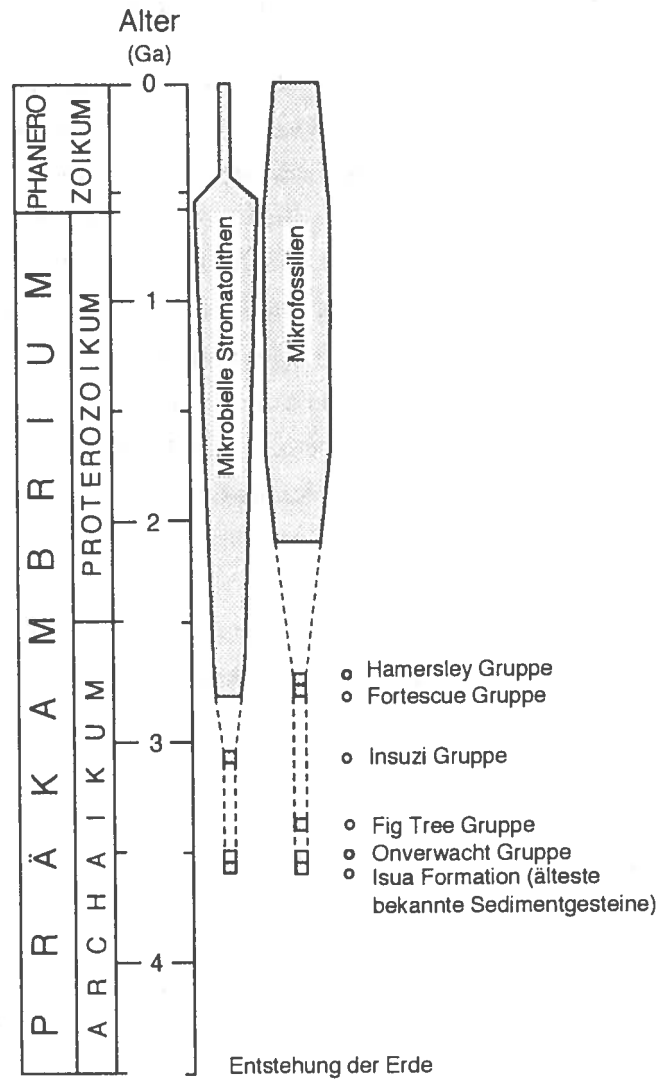


Abbildung 4: Zeitliche Verteilung des Auftretens von Stromatolithen und Mikrofossilien.

In die geologische Zeitskala wurden Funde und die ungefähre Häufigkeit von Stromatolithen und Mikrofossilien eingetragen. Während Stromatolithen mit dem Beginn des Phanerozoikums sehr schnell an Bedeutung verloren haben und rezent nur noch vereinzelt gefunden werden, kann man Mikrofossilien auch noch in jungen Sedimenten beobachten. Für das Verschwinden der Stromatolithen werden bakterienfressende Metazoen und eine aufkommende Konkurrenz durch neue, riffbildende Organismen wie die im unteren Kambrium erscheinenden Archaeocyatiden verantwortlich gemacht.

A.4.2. Taxonomie rezenter phototropher Bakterien

Rezente phototrophe Organismen mit nur einem Photosystem werden ausschließlich bei den Eubakterien gefunden. Innerhalb der Eubakterien ist die Fähigkeit zur anoxygenen Photosynthese in den unterschiedlichsten Taxa sehr weit verbreitet, und zwar in der *Chloroflexus*-Gruppe, bei den Chlorobien, den Gram-positiven Bakterien und innerhalb der Proteobakterien in der α -, β - und γ -Untergruppe (75, 209). Auch die Cyanobakterien mit ihren zwei Photosystemen gehören phylogenetisch zu den Eubakterien. Daher kann man annehmen, daß die Eubakterien von einem phototrophen Urahn abstammen, sich aber früh viele nicht-phototrophe Linien ausgebildet haben (97). Neben der Sequenz der 16S rRNA werden für die weitergehende systematische Untergliederung phototropher Organismen folgende Eigenschaften herangezogen: Fähigkeit zu photoautotrophem Wachstum auf Sulfid im Gegensatz zu photoheterotrophem Wachstum auf einfachen organischen Verbindungen; Bildung von elementarem Schwefel innerhalb oder außerhalb der Zellen; andere wachstumsphysiologische Eigenschaften wie Temperaturoptimum, Salztoleranz o.ä. (97); morphologische Kriterien wie Zellform, Form der Membranstapel, Begeißelung oder auch chemische Kriterien wie Pigmentzusammensetzung, DNA-Basenverhältnis, Fettsäurezusammensetzung, polare Lipide oder Chinone.

A.4.2.1. Die Chloroflexaceae

Die Chloroflexaceae sind eine phylogenetisch kohärente Gruppe, die auch rein chemotrophe Vertreter umfasst. Sie bestehen aus überwiegend fädigen Organismen wie *Chloroflexus aurantiacus*, *Heliobacterium oregonensis*, *Oscillochloris chrysea*, *Oscillochloris trichoides* und *Chloronema giganteum*, die in heißen Quellen überall auf der Welt gefunden werden. Einige mesophile Vertreter konnten aber auch aus dem Wasser von Seen isoliert werden. Die bei starkem Licht wachsenden, grün gefärbten Organismen enthalten ihr Antennensystem in als Chlorosomen bezeichneten Vesikeln. Die photosynthetischen Pigmente sind Bakteriochlorophyll *a* und *c*. *Chloroflexus aurantiacus* ist ein fakultativ aerober Organismus, der bevorzugt auf organischen Substraten photoheterotroph oder chemotroph wächst. Die Fixierung von CO₂ scheint über einen neuen Stoffwechselweg, den kürzlich formulierten 3-Hydroxypropionat-Zyklus, zu verlaufen (57, 190). Bei aerobem Wachstum ist *Chloroflexus* orange gefärbt. Er wächst bis zu einer Temperatur von 73°C und ist damit der thermophilste bekannte phototrophe Organismus (97, 193).

A.4.2.2. Die Chlorobiaceae

Die zweite Gruppe von anoxygenen phototrophen Organismen mit Chlorosomen stellen die mit den Chloroflexaceae nicht näher verwandten Chlorobien dar. Auch sie sind eine phylogenetisch und physiologisch kohärente Gruppe. Die unbeweglichen, strikt anaeroben, obligat photolithoautotrophen Organismen können nur in Anwesenheit von H_2S und CO_2 einfache organische Verbindungen wie Acetat assimilieren. CO_2 wird über den reduktiven Tricarbonsäurezyklus fixiert. Das H_2S wird zu Sulfat oxidiert und intermediär entstehender S^0 außerhalb der Zelle abgelagert. Die Chlorosomen enthalten die Bakteriochlorophylle *c*, *d* und *e*, während die Bakteriochlorophyll *a* enthaltenden Reaktionszentren an den Anheftungsstellen der Chlorosomen auf der Cytoplasmamembran sitzen. Die Reaktionszentren weichen von denen der Purpurbakterien ab und entsprechen in der Reihenfolge der Redoxkomponenten dem Photosystem I der Cyanobakterien. Die Reaktionszentren der Chlorobien haben im nicht angeregten Zustand ein Redoxpotential von +350 mV und reduzieren nach Lichtabsorption ein Ferredoxin mit einem Potential von -540 mV (22). Auf diese Weise können Reduktionsäquivalente in Form von NADH für die Biosynthese zur Verfügung gestellt werden. Die Carotinoide sind vom Chlorobacten- oder Isorenieraten-Typ. Der besondere Photosyntheseapparat ermöglicht es Chlorobien, noch bei Beleuchtungsstärken von 5 - 10 Lux¹ zu wachsen. Es werden zwei ökophysiologische Gruppen unterschieden:

Die grünen Spezies der Gattungen *Chlorobium* und *Prosthecochloris* wachsen bei hohen H_2S -Konzentrationen von 4 - 8 mM und Lichtintensitäten von 700 - 1500 Lux¹. Als photosynthetische Pigmente sind bei diesen Gattungen Bakteriochlorophyll *c* oder *d* sowie die Carotinoide Chlorobacten und Hydroxychlorobacten zu finden. Vertreter dieser Gruppe kommen in Sedimenten und flachen, H_2S -reichen Gewässern vor.

Die braunen Spezies der Gattungen *Pelodictyon* und *Ancalochloris* wachsen dagegen bei geringen H_2S -Konzentrationen von 0,4 - 2,0 mM und Temperaturen unterhalb von 20°C. Die typischen Carotinoide sind Isorenieraten und β -Isorenieraten, die diesen Gattungen ein breiteres Absorptionsspektrum als *Chlorobium* und *Prosthecochloris* verschaffen. *Pelodictyon* und *Ancalochloris* besitzen oft Gasvakuolen und leben planktonisch in der obersten Schicht von H_2S -haltigen Hypolimnien stratifizierter Seen. Arten dieser Gattungen sind auf die Verwertung von Restlicht unter dichten Schichten von Grünalgen- oder Cyanobakterienpopulationen spezialisiert (29, 97, 153, 193).

¹Bei Wachstumsversuchen mit phototrophen Bakterien hat sich zur Kontrolle der Beleuchtungsstärke für rein praktische Zwecke eine Messung der Beleuchtungsintensität in Lux (lx) eingebürgert. Solche Messungen geben jedoch nur grob die für phototrophe Bakterien physiologisch relevanten Bestrahlungsdichten wieder. Der Definition und Messung der Beleuchtungsintensität in Lux liegt die spektrale Empfindlichkeit des menschlichen Auges zugrunde. Phototrophe Bakterien haben jedoch ihre Hauptabsorptionsmaxima in einem Wellenlängenbereich, in dem das Auge sehr unempfindlich ist oder nicht wahrnimmt.

A.4.2.3. Die Heliobakterien

Die zu den Gram-positiven Organismen gehörenden, Endosporen bildenden Heliobakterien sind noch nicht sehr lange bekannt. Die phylogentisch in der Nähe der Gattung *Bacillus* stehenden Organismen *Heliobacterium chlorum*, *Heliobacterium gestii*, *Heliobacterium fasciculum* und *Heliobacillus mobilis* sind obligat anaerob und extrem O₂ sensitiv. Sie wachsen nur photoheterotroph, H₂S inhibiert das Wachstum (76). Die Biochemie ihrer Photosynthese scheint mit der der Chlorobien übereinzustimmen, allerdings dient Bakteriochlorophyll g als photosynthetisches Pigment. Das typische Habitat von *Heliobacterium*-Arten ist im Gegensatz zu allen anderen Gruppen von anoxygenen phototrophen Bakterien der Boden. Die späte Entdeckung (1983) von Gram-positiven, phototrophen Bakterien ist sicherlich darauf zurückzuführen, daß man bei ihrer Anreicherung, neben dem abweichenden Habitat, auf obligat anaerobe Bedingungen achten muß (97, 137, 153, 193).

A.4.2.4. Phototrophe Organismen unter den Proteobakterien

Die übrigen Gruppen der anoxygenen phototrophen Organismen werden phylogenetisch bei den Proteobakterien eingeordnet (49, 67, 109, 159, 164). Die innerhalb dieser Bakteriengruppe verbreitete Fähigkeit zur Photosynthese läßt die Vermutung zu, daß sich die gesamte Gruppe auf einen phototrophen Vertreter zurückführen läßt.

A.4.2.4.1. Die Chromatiaceae

Innerhalb der vorläufig als γ -Gruppe zusammengefaßten Organismen ist die Familie der Chromatiaceae phylogenetisch und physiologisch auffallend kohärent (159). Sie besitzen mit Ausnahme von *Thiocapsa pfennigii* vesiculäre intracytoplasmatische Membranen. Alle wachsen entweder photoautotroph auf Sulfid bzw. Schwefel oder photoheterotroph. Schwefel wird von diesen Organismen in Form intracytoplasmatischer S⁰ Kügelchen gespeichert und dient als Reservoir an Reduktionsäquivalenten (8). Im Dunkeln dient S⁰ als Elektronenakzeptor bei der Respiration von gespeicherten Kohlenhydraten, wodurch ein Erhaltungsstoffwechsel ermöglicht wird (156). Bei einigen Chromatiaceae wurde auch chemoheterotrophes Wachstum beschrieben (153). Ihre typischen Habitate sind Gewässer mit sulfidhaltigen Sedimenten und mit Zutritt von Licht bis unterhalb der Chemokline. Angehörige der Chromatiaceae können im Wasserkörper bis in Tiefen von 30 m gefunden werden (155) und bilden bei geeigneten Bedingungen mitunter Blüten von solchen Zellkonzentrationen, daß sie deutliche Purpurfärbung des Wassers bewirken (29, 97, 153, 193). Die Kultivierung einer Reihe von Chromatiaceae gelang erst, nachdem erkannt wurde, daß sie Vitamin B₁₂ als Zusatz zum Nährmedium benötigen. Der thermophilste bekannte Vertreter ist *Chromatium tepidum* mit einem Wachstumsoptimum von 48-50°C. Es können zwei ökophysiologische Gruppen unterschieden werden:

Die spezialisierteren Arten *Chromatium okenii*, *Chromatium weissei*, *Chromatium warmingii*, *Chromatium buderi*, *Thiospirillum jenense*, *Thiocapsa*, *Lamprocystis*, *Thiodictyon* benötigen strikt anaerobe Bedingungen und sind obligat phototroph. Es können typischerweise nur Acetat und Pyruvat zusammen mit H_2S und CO_2 assimiliert werden, und Sulfat wird nicht als Schwefelquelle genutzt. Diese Organismen leben bei niedrigen H_2S -Konzentrationen von 0,4-1,0 mM, geringen Lichtintensitäten und Temperaturen unter $20^\circ C$. Arten der Gattungen *Lamprobacter*, *Lamprocystis*, *Thiodictyon*, *Amoebobacter* und *Thiopedia* besitzen Gasvakuolen (55, 56, 160).

Die physiologisch vielseitigeren Arten wie kleine *Chromatium* spp., *Thiocystis violacea*, *Thiocapsa roseopersicina*, *Lamprobacter modestohalophilus*, *Amoebobacter* spp. photoassimilieren eine große Anzahl an Substraten und wachsen auch in Abwesenheit von reduzierten Schwefelverbindungen, da meist Sulfat als Schwefelquelle verwendet werden kann. Diese Arten leben bei mittleren bis hohen H_2S Konzentrationen von 2 - 8 mM und hohen Lichtintensitäten von 1000 - 2000 Lux².

A.4.2.4.2. Die Ectothiorhodospiraceae

Mit den Chromatiaceae eng verwandt sind die Ectothiorhodospiraceae, die untereinander wiederum eine phylogenetisch und physiologisch kohärente Gruppe bilden (94, 96). Es handelt sich bei ihnen um kleine Stäbchen mit lamellären intracytoplasmatischen Membranen. Gasvakuolen wurden bisher nur bei *Ectothiorhodospira vacuolata* beobachtet. Elementarer Schwefel wird außerhalb der Zelle abgelagert, bevor er zu Sulfat weiteroxidiert wird. Photoheterotrophes Wachstum erfolgt nur mit einer geringen Zahl organischer Verbindungen. Die Ectothiorhodospiraceae benötigen wie auch einige Chromatiaceae Vitamin B_{12} als Wachstumsfaktor. *Ectothiorhodospira* spp. bevorzugen saline oder alkalische Wachstumsbedingungen. *Ectothiorhodospira halophila* ist das halophilste bekannte Eubakterium und wächst in gesättigten Salzlösungen.

A.4.2.4.3. Die "Rhodospirillen"

Die früher als Rhodospirillaceae zusammengefaßten Nicht-Schwefel Purpurbakterien haben sich im Gegensatz zu den bisher besprochenen Taxa als völlig diverse Gruppe herausgestellt, deren einziges gemeinsames Merkmal die Fähigkeit zu photoheterotrophem Wachstum auf einer Vielzahl von organischen Verbindungen ist (97, 98, 108, 193). Als Wachstumsfaktoren werden von vielen Spezies im allgemeinen Biotin, Thiamin, Niacin und *p*-Aminobenzoesäure benötigt. Einige Spezies zeigen auch photoautotrophes Wachstum auf H_2 oder H_2S , das meist nur zu S^0 oxidiert wird (22, 49, 153). Nur bei wenigen Vertretern wie *Rhodobacter sulfidophilus* und *Rhodopseudomonas palustris* ist Sulfat das Endprodukt der Sulfid-

²Siehe Fußnote Seite 19

Oxidation. *Rhodobacter veldkampii*, *Rhodobacter adriaticus* und *Rhodobacter euryhalinus* lagern S° außerhalb der Zelle ab. Mit Ausnahme der zur α -Gruppe der Proteobakterien gehörigen Arten *Erythrobacter longus* und *Roseobacter denitrificans*, die aus nicht verstandenen Gründen nur unter aeroben Bedingungen phototroph wachsen, erfolgt eine Photosynthese ausschließlich unter anaeroben Verhältnissen (6, 114). Die Fähigkeit zur Photosynthese ist innerhalb der Proteobakterien ein sehr weit verbreitetes Merkmal und kann nicht für die Bildung von Taxons herangezogen werden. Das zeigt etwa die Isolierung eines photosynthetischen Bakteriums, das rein phylogenetisch als *Rhizobium*-Art zu klassifizieren wäre (61, 75, 203). Bei den bisher untersuchten Organismen liegen alle für die Synthese der Antennenpigment-Komplexe und Reaktionszentren benötigten Gene, einschließlich jener zur Synthese der Pigmente benötigten, in den jeweils homolog angeordneten *puf*- und *phu*- Operons. Die Konservierung der photosynthetischen Gencluster könnte bedeuten, daß es strukturelle oder regulatorische Einschränkungen gibt, die eine Umverteilung der Gene limitieren oder daß lateraler Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies phototropher Bakterien stattfand (211). Bei einem Teil der Organismen ist die Vielfalt der für das photoheterotrophe Wachstum verwertbaren Verbindungen erstaunlich; so können von einigen Spezialisten sogar aromatische Verbindungen verwendet werden (50).

***Rhodobacter* spp.** gelten als die vielseitigsten Organismen überhaupt. Sie wachsen unter photoheterotrophen Bedingungen auf einer Vielzahl von organischen Verbindungen wie organischen Säuren, Zuckern, Alkoholen und Aminosäuren. Photoautotrophes Wachstum ist auf H_2S , Thiosulfat, S° und H_2 möglich. *Rhodobacter capsulatus* kann ferner unter chemoautotrophen Bedingungen im Dunkeln mit O_2 als Elektronenakzeptor auf H_2 oder H_2S als Elektronendonator wachsen. Chemoheterotrophes Dunkelwachstum ist auf Zuckern, Malat, Succinat oder Acetat mit Nitrat, DMSO oder TMAO als Elektronenakzeptor beobachtet worden. Bei Abwesenheit eines Elektronenakzeptors können Pyruvat oder Zucker im Dunkeln auch fermentiert werden. Die Zellen der Gattung *Rhodobacter* sind oval bis stäbchenförmig, $0,5 \mu m$ dick und $1,2 \mu m$ lang. Meist sind die Organismen unbeweglich, manchmal werden aber auch mit Flagellen bewegliche Formen beobachtet. Einige Spezies produzieren Schleimkapseln und Zellketten. Die internen photosynthetischen Membranen liegen als Vesikel vor. Photosynthetische Pigmente sind Bakteriochlorophyll *a* und die Carotinoide der Sphaeroiden-Serie. Diese verleihen anaerob im Licht gewachsenen Kulturen ein gelbbraunes bis dunkelbraunes Aussehen. Bei Kulturen, die in Anwesenheit von Luftsauerstoff gezogen wurden, werden die Carotinoide zu den entsprechenden Ketocarotinoiden oxidiert, die eine rote bis purpurrote Farbe haben (95, 98).

A.4.3. Ökologie photosynthetischer Bakterien

Phototrophe Organismen verwenden häufig niedermolekulare, strukturell einfach aufgebaute organische Verbindungen, die Endprodukte von bakteriellen Fermentationen darstellen. Zucker werden weniger häufig und Makromoleküle wie Cellulose oder Stärke werden meist nicht verwendet. In der Natur sind insbesondere die H_2S oxidierenden, phototrophen Bakterien auf die Aktivität von sulfatreduzierenden Organismen angewiesen. Da in Meerwasser ca. 28 mM Sulfat gelöst sind, wird dieses in marinen Sedimenten meist nicht zum limitierenden Faktor. Anders ist das in Süßwasserbereichen. Da Süßwasser meist weniger als 1 mM Sulfat enthält, bildet sich eine Koexistenz zwischen H_2S oxidierenden phototrophen Organismen und Sulfatreduzierern aus, die den verfügbaren Schwefel durch *Recycling* effektiv nutzt (97). In einem im Labor etablierten artifiziellen Modellsystem aus *Escherichia coli*, *Desulfovibrio desulfuricans* und einem *Chlorobium* sp., das anaerob auf Glucose im Licht wächst, läuft eine solche Nahrungskette ab. In der stabilen syntrophen Beziehung zwischen *Desulfuromonas acetoxidans* und *Chlorobium* sp. wird S^0 weitergegeben, der als Elektronenakzeptor für *Desulfuromonas* fungiert. Für den Erhalt der Koexistenz sind katalytische Mengen Schwefel ausreichend. Die Kokultur dieser Organismen unter Laborbedingungen ist so stabil, daß man sie lange Zeit als eine Reinkultur eines *Chlorobiums* ansah. Für Habitate mit einem geschlossenen Schwefelzyklus wurde auch der Begriff Sulfuretum geprägt. Die Produktivität phototropher Schwefelbakterien hängt von der Verfügbarkeit von H_2S ab, bei einer Blüte erreicht die Fixierungsrate von Kohlenstoff meist 100 - 200 mg C $m^{-3} \cdot d^{-1}$. Bei hoher H_2S -Versorgung wurden sogar Maximalwerte von 1600 - 5700 mg C $m^{-3} \cdot d^{-1}$ beobachtet. Aufgrund dieser Werte steuern phototrophe Bakterien in H_2S -armen Seen 3 - 5 % der Jahresproduktion, in H_2S -reichen 9 - 25 % der Jahresproduktion und in permanent stratifizierten (meromiktischen) Seen bis zu 80 % der Jahresproduktion zur gesamten phototrophen CO_2 -Fixierung bei (97). Aus diesen Zahlen ist zu erkennen, daß unter geeigneten Bedingungen Ökosysteme, die auf anoxygener Photosynthese fußen, ähnliche Produktivitäten erreichen können wie Habitate, deren Primärproduzenten Organismen mit oxygener Photosynthese sind³.

³Hier soll lediglich die Leistungsfähigkeit anaerober Ökosysteme aufgezeigt werden. In einer aeroben Biosphäre entstammen natürlich alle reduzierten Verbindungen letztendlich der aeroben Photosynthese, soweit sie nicht geologischen Ursprungs sind.

A.5. Biochemie der bakteriellen Photosynthese

A.5.1. Organisation der an der bakteriellen Photosynthese beteiligten Komplexe

Die Biochemie der bakteriellen Photosynthese wurde lange Zeit eingehend an *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* untersucht. Für diese Organismen existieren zudem molekulargenetische Systeme. In früherer Zeit war auch *Rhodospirillum rubrum* von Bedeutung. Der entscheidende Durchbruch in der Photosyntheseforschung gelang jedoch zuerst mit *Rhodospseudomonas viridis*, dessen Reaktionszentrum, als erstes Membranprotein überhaupt, kristallisiert werden konnte und somit eine Röntgenstrukturanalyse ermöglichte (42, 43). Seit dieser Arbeit gehört die Biochemie der bakteriellen Reaktionszentren zu den am besten bekannten energetischen Prozessen.

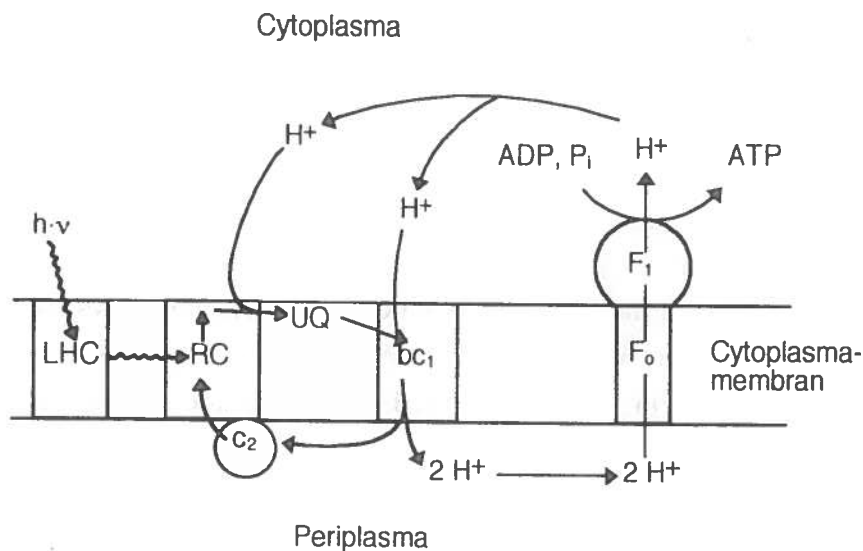


Abbildung 5: Topologie der an der photosynthetischen ATP-Bildung beteiligten Komponenten. Die Energie der durch den *Light Harvesting Complex* (LHC) absorbierten Photonen wird auf das Reaktionszentrum (RC) weitergeleitet. Dabei erfolgt eine Ladungstrennung und Reduktion von Ubichinon. Über den Ubichinonpool (UQ), den Cytochrom bc_1 -Komplex und ein lösliches Cytochrom c kehren die Elektronen dann zum Reaktionszentrum zurück. Die bei diesem Vorgang translozierten Protonen bauen einen elektrochemischen Gradienten auf, der zur ATP-Synthese verwendet wird.

An der bakteriellen Photosynthese sind 4 makromolekulare Komplexe beteiligt, nämlich das Reaktionszentrum (RC), der *Light Harvesting Complex* (LHC), die Ubichinon-Cytochrom *bc₁*-Oxidoreduktase und die H⁺-ATPase (ATP-Synthetase). Daneben dienen noch nicht-komplexegebundene Chinone und Cytochrome als Carrier (49, 91). Die Bindung der an der Photosynthese beteiligten Pigmente an die Proteine verschiebt die Absorptionsmaxima der freien Verbindungen um etwa 100 nm in den rotwelligen Bereich. Die Beteiligung von Carotinoiden an der Lichtabsorption ist wichtig, da sie grünes Licht mit Wellenlängen von 450 - 550 nm absorbieren, dessen Anteil am Spektrum mit der Wassertiefe zunimmt. Blaues Licht und rotes Licht mit Wellenlängen oberhalb von 800 nm wird absorbiert bzw. gestreut. Organismen mit Bakteriochlorophyll *b* haben die Fähigkeit, IR-Strahlung bis zu einer Wellenlänge von 1030 nm zu absorbieren. Diese Fähigkeit ist wichtig für Organismen, die im trüben Wasser leben, da die IR-Strahlung in diesem weniger gestreut wird als kurzwellige Strahlung (97). Zur Absorption von Licht besitzen die meisten Purpurbakterien zwei LHC-Komplexe, nämlich den B870-Komplex oder LHC I und den B800 - 850 Komplex oder LHC II. Der LHC I enthält zwei Proteinuntereinheiten und zwei Moleküle Bakteriochlorophyll sowie 1 bis 2 Carotinoidmoleküle. Von ihm existieren wiederum zwei Varianten, der B870 und der B896. Auch der LHC II besteht aus zwei Proteinuntereinheiten und enthält 2 bis 3 Moleküle Bakteriochlorophyll sowie ein Carotinoidmolekül. Das RC der Purpurbakterien ist von 20 bis 30 Molekülen LHC I umgeben, die zusammen den Core-Komplex bilden. Diese Core-Komplexe sind dann meist noch von variablen Mengen LHC II umgeben (49, 100). Absorbiertes Licht erzeugt den am tiefsten liegenden Singulett Zustand des absorbierenden Bakteriochlorophylls. Durch Zufallswanderung entlang des Energiegefälles vom B800 über B850, B870 und B896 wandern die Excitonen dann innerhalb von 35 bis 50 ps zum RC. Ist das RC bereits angeregt, wird die Energie wieder als langwellige Strahlung abgegeben (49).

A.5.2. Aufbau eines chemiosmotischen Potentials bei photosynthetischen Bakterien

Die detergenzsolubilisierten RC von *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodospirillum rubrum* enthalten 4 Moleküle Bakteriochlorophyll *a*, 2 Moleküle Bakteriopheophytin, 1 Molekül Nicht-Haem Eisen sowie 2 Moleküle Ubichinon und bestehen aus zwei membrandurchspannenden, symmetrisch angeordneten Untereinheiten L und M sowie einer stabilisierenden cytoplasmatischen Untereinheit H. Die RC besitzen untereinander hohe Sequenzhomologien. In *Rhodopseudomonas viridis* ersetzen Bakteriochlorophyll *b* und Bakteriopheophytin *b* jeweils das Bakteriochlorophyll *a* und Bakteriopheophytin *a* und Menachinon eines der beiden Ubichinone. Bei den Reaktionszentren von *Chromatium vinosum*, *Chromatium tepidum*, *Thiocapsa pfennigii*, *Rhodopseudomonas viridis* und *Ectothiorhodospira* spp. ist ein *c*-Typ Cytochrom mit 4 Haemgruppen fest mit dem RC assoziiert und vermittelt den Elektronentransfer vom Cytochrom c_2 zum Bakteriochlorophyll-Dimer des *special pairs* (22, 51). Treffen nun Photonen auf das Reaktionszentrum, wird die primäre photochemische Reaktion initiiert, nämlich die Bildung eines starken Reduktanten und eines starken Oxidanten, die anschließend Ubichinon reduzieren bzw. Cytochrom c_2 oxidieren. Die Rekombination dieser beiden Spezies über den zyklischen Elektronenfluß dient zum Aufbau eines Protonengradienten, aus dessen freier Energie mit Hilfe der H^+ -ATPase ATP erzeugt werden kann. Dabei kehren die Elektronen über das Chinon (UQ/UQH₂ +30 bis +90 mV), den Cytochrom bc_1 Komplex (c_j : $E_m = +260$ mV) und das mobile Cytochrom c_2 ($E_m = +340$ mV) zum RC ($E_m = +450$ mV) zurück.

Bei der in Abbildung 6 dargestellten primären photochemischen Reaktion wird das *special pair* aus Bakteriochlorophyll durch Absorption eines Lichtquanten angeregt und gibt ein Elektron innerhalb von ca. 0,9 ps an das nächste Bakteriochlorophyll weiter. Dieses reicht das Elektron dann innerhalb von 3 ps an das Bakteriopheophytin weiter, von wo es in 150 ps an Chinon A und in 0,3 ms dann auf Chinon B übergeht. Chinon B dissoziiert nach Reduktion durch zwei Elektronen und Aufnahme von zwei Protonen ab. Obwohl das RC zwei symmetrische Ketten der prosthetischen Gruppen enthält, wird nur eine der beiden für den Elektronentransport benutzt. Der Grund für diese selektive Nutzung ist noch unbekannt. Die reduzierten Chinone transportieren die Elektronen und Protonen zum Cytochrom bc_1 -Komplex. Dort werden die Protonen, die dem Aufbau des elektrochemischen Gradienten dienen, an der Außenseite der Cytoplasmamembran freigesetzt. Ein Q-Zyklus sorgt für die Translokation von zusätzlichen Protonen. Der bc_1 -Komplex enthält 4 identifizierbare Redoxzentren und zwar Cytochrom c_1 , ein *low potential* und ein *high potential* Cytochrom *b* (b_{556} , b_{561}) und ein *high potential* Rieske-Typ Fe-S Zentrum. Der Komplex ist dem bc_1 -Komplex aus Mitochondrien und dem b_6f -

Komplex aus Chloroplasten höherer Pflanzen sehr ähnlich (100). Nach dem Durchlaufen dieses Komplexes kehren die Elektronen über das mobile Cytochrom c_2 zum Reaktionszentrum zurück. Da die an diesen Redoxprozessen beteiligten Potentiale nicht zur Reduktion von NAD^+ ($E_m = -320 \text{ mV}$) ausreichen, werden die für den Metabolismus notwendigen Reduktionsäquivalente durch reversen Elektronentransport mit einer NADH:Ubichinon Oxidoreduktase beschafft. Das somit bei der bakteriellen Photosynthese gebildete NADH und ATP dient dann der CO_2 -Fixierung über den Calvinzyklus.

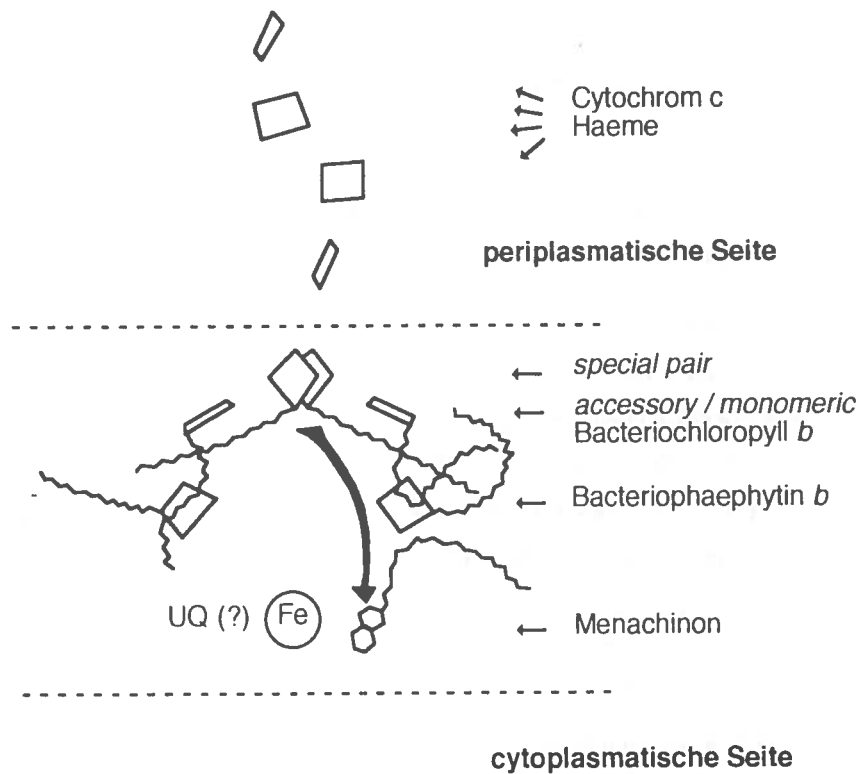


Abbildung 6: Molekulare Vorgänge der photosynthetischen Ladungstrennung bei *Rhodospseudomonas viridis*.

Bei Absorption eines Lichtquantens durch das *special pair* wird ein Elektron über das akzessorische Bakteriochlorophyll, das Bacteriopheophytin und das Menachinon auf das Ubichinon (UQ) übertragen. Nach Aufnahme des zweiten Elektrons und von zwei Protonen dissoziiert UQH_2 ab. Über ein an der periplasmatischen Seite sitzendes Cytochrom mit 4 Haemgruppen werden die Elektronen dann nachgeliefert (100).

B. Material und Methoden

B.1. Chemikalien, Gase, Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten die Qualität "reinst" bzw. "zur Analyse" und wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Aldrich (Steinheim), Riedel de Haën (Seelze) und Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Die Enzyme für die enzymatische Bestimmung von Glucose und Acetat stammten von Boehringer (Mannheim). Die zur Sequenzierung verwendeten Enzyme stammten von USB (Bad Homburg).

Die für die Sequenzierung der rDNA benötigten Primer wurden bei der Firma Biometra (Göttingen) im Auftrag synthetisiert. Folgende Primer wurden verwendet:

GM1	5'-CCAGCAGCCGCGGTAAT-3'
GM1rev	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
GM3	5'-AGAGTTTGATCA ^A / _C TGGC-3'
GM4	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
GM5	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
GM6	5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'
GM7	5'-AGGATTAGATACCCT-3'
GM8	5'-TGGGTATCTAATCCT-3'
GM9	5'-TGTGGTTTAATTCGA-3'
GM10	5'-TCGAATTAACCACA-3'
GM11	5'-GAGGAAGGTG ^T / _G GGATAGACG-3'
GM12	5'-CGTCATCCC ^C / _A CACCTTCCTC-3'
GM13	5'-GGAT ^T / _A TCGCTAGTAATCG-3'
691R	5'-GAT ^C / _A TCTACG ^A / _G ATTTAC-3'

Die folgenden Gase der Firma Messer-Griesheim (München oder Ritterhude) wurden verwendet: N₂ (99,999 %), CO₂ (99,995 %), N₂/CO₂-Gemisch (90/10 [v/v]), N₂/CO₂-Gemisch (80/20 [v/v]), H₂/CO₂-Gemisch (80/20 [v/v]).

B.2. Mikrobiologische Methoden

B.2.1. Probenmaterial und Organismen

Als Inokulum für die Anreicherung von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Organismen dienten Süßwasser-Sedimentproben aus Teichen im Schaumburger Wald, Bezirk Hannover, im Schöngesinger Forst, bei München und aus dem Nymphenburger Park in München. Zudem wurden aufgrund ihrer braunen Farbe als stark eisenhaltig erkennbare Proben aus Feldgräben in Lübeck verwendet. Dabei wurden in den Anreicherungen nur die obersten Zentimeter des Sediments eingesetzt, da nur diese eine ausreichende Lichtversorgung am Standort vermuten ließen. Die zur Probennahme benützten Gefäße wurden bis an den Rand gefüllt und möglichst ohne Luftblasen verschlossen, um soweit wie möglich anoxische Bedingungen aufrechtzuerhalten. Eine Reinkultur von *Desulfobacula toluolica* wurde freundlicherweise von Ralf Rabus zur Verfügung gestellt (169).

Thiodictyon elegans DSM 232, *Thiodictyon bacillosum* DSM 234, *Lamprocystis roseopersicina* DSM 229, *Amoebobacter pendens* DSM 236, *Amoebobacter roseus* DSM 235, *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710, *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158, *Rhodopseudomonas palustris* DSM 123, *Rubrivivax gelatinosus* DSM 1709, *Chlorobium limicola* DSM 245, *Geobacter metallireducens* DSM 7210, *Escherichia coli* DSM 498 und *Bacillus subtilis* DSM 10 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen.

B.2.2. Kulturmedien

B.2.2.1. Aerobe Anzuchten auf LB-Medium

Für aerobe Anzuchten von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* wurde komplexes LB-Medium verwendet. Dazu wurden in destilliertem Wasser folgende Substrate gelöst:

Pepton aus Casein	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

Festen Nährböden wurde 15 g/l Agar zugesetzt.

Aerobe Anzuchten von Flüssigkulturen von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* wurden in Erlenmeyerkolben durchgeführt, die zu einem Zehntel ihres Volumens mit Medium gefüllt waren und durch starkes Schütteln belüftet wurden

B.2.2.2. Medium zur Stammhaltung von *Geobacter metallireducens*

Für die Stammhaltung von *Geobacter metallireducens* wurde folgendes Medium eingesetzt, das lösliches Eisen(III)-citrat als Elektronenakzeptor enthält:

Eisen(III)-citrat	13,7 g/l
-------------------	----------

Das Eisen(III)-citrat wird zunächst unter Erwärmen gelöst und der pH auf 6,0 eingestellt.

NH ₄ Cl	1,5 g/l
NaH ₂ PO ₄	0,6 g/l
KCl	0,1 g/l

Diese Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert. Zum Erkalten des Mediums wurde dieses über ein steriles Wattefilter mit N₂/CO₂ (90/10 [v/v]) begast, in ein Durchflußwasserbad gebracht und unter langsamem Rühren abgekühlt (37, 206).

Nachdem das Medium Raumtemperatur erreicht hatte, wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugegeben (siehe B.2.2.4.):

Spurenelement-Lösung	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Thiamin-Lösung	1 ml/l
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
Natriumbicarbonat-Lösung	22 ml/l

B.2.2.3. Anaerobe Anzuchten in chemisch definierten Medien

Für anaerobe Anzuchten von phototrophen Organismen und *Geobacter metallireducens* wurde das folgende chemisch definierte Grundmedium verwendet:

KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
NH ₄ Cl	0,3 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
CaCl ₂	0,1 g/l

(In sulfatfreien Medien wurde das MgSO₄·7H₂O durch 0,4 g/l MgCl₂·6H₂O ersetzt.)

Diese Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert. Zum Abkühlen des Mediums wurde dieses über ein steriles Wattefilter mit N₂/CO₂ (90/10 [v/v]) begast, in ein Durchflußwasserbad gebracht und unter Begasung langsam gerührt.

Wenn das Medium Raumtemperatur erreicht hatte, wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugegeben:

Spurenelement-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Thiamin-Lösung	1 ml/l
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
Natriumbicarbonat-Lösung	22 ml/l

Wenn man *Geobacter metallireducens* kultivieren wollte, erfolgte zusätzlich eine Zugabe von:

Selenit-Wolframat-Lösung 1 ml/l

Wenn man schwefelabhängige Chromatiaceae kultivieren wollte, erfolgte zusätzlich eine Zugabe von:

Natriumsulfid-Lösung 1 ml/l

Wenn man *Thiodictyon siderooxidans* in Abwesenheit von Eisen (II) kultivieren wollte, erfolgte zusätzlich eine Zugabe von:

Ascorbat-Lösung 4 ml/l

Der pH Wert des Mediums wurde mit steriler 2 M HCl oder 1 M Na₂CO₃-Lösung auf 7,0 gebracht; zur Kultivierung der schwefelabhängigen Chromatiaceae wurde das Medium auf pH 7,3 eingestellt.

B.2.2.4. Zusammensetzung der Stammlösungen

Spurenelement-Lösung:

Zuerst muß EDTA eingewogen und gelöst werden, um ein Ausfallen von Eisenoxiden zu verhindern. Gegebenenfalls werden die ausgefallenen Eisenoxidflocken durch leichtes Erwärmen in Lösung gebracht.

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

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Selenit-Wolframat Lösung:

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

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

Vitamingemisch:

4-Aminobenzoensäure	40,0 mg/l
D(+)-Biotin	10,0 mg/l
Nicotinsäure	100,0 mg/l
Ca-D(+)-Panthotenat	50,0 mg/l
Pyridoxin·2HCl	150,0 mg/l

Die Vitamine wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Thiamin-Lösung:

Thiamin·2H ₂ O	10,0 mg/l
---------------------------	-----------

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

Vitamin B₁₂-Lösung:

Cyancobalamin	5,0 mg/l
---------------	----------

Das Vitamin wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert

Natriumbicarbonat-Lösung:

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

Die Lösung wurde mit CO₂ gesättigt und in Portionen von 22 ml in 50 ml Serumflaschen unter CO₂-Atmosphäre autoklaviert. Eine Portion konnte dann zur Herstellung von 1 l Medium verwendet werden.

Natriumsulfid-Lösung (Reduktionsmittel):

Vor der Herstellung der Sulfid-Lösung wurden die Natriumsulfidkristalle vorsichtig gewaschen, um Oxidationsprodukte zu entfernen.

$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 240 g/l

Die Lösung wurde unter N_2 Atmosphäre autoklaviert und aufbewahrt.

Ascorbat-Lösung (Reduktionsmittel):

L(+)-Ascorbinsäure 176 g/l

Die Ascorbat-Lösung wird unverzüglich mit NaOH auf pH 7,0 gebracht, sterilfiltriert und unter N_2 aufbewahrt.

Das fertige Medium wurde routinemäßig luftblasenfrei auf 50 ml Schraubverschlußflaschen verteilt. Kulturgefäße mit Gasraum wurden mit N_2/CO_2 (90/10 [v/v]) nach der Hungate Technik begast und mit Gummistopfen verschlossen. Dadurch wurde ein Aufrechterhalten des pH-Wertes gewährleistet (206).

B.2.3. Elektronendonatoren, Elektronenakzeptoren und Kohlenstoffquellen

B.2.3.1. Eisen(II)-carbonat als Elektronendonator

Das Eisen(II)-carbonat wurde kurz vor dem Animpfen durch Zugabe von steriler 1 M FeSO_4 -Lösung mit einer Endkonzentration von 10 mM im Kulturgefäß hergestellt. Die FeSO_4 -Stammlösung wurde unter N_2 aufbewahrt. Die zugegebenen Fe^{2+} -Ionen bildeten mit dem Carbonat und dem Phosphat der Lösung einen flockig-weißen Niederschlag, der im Verlauf von mehreren Tagen kristallisierte. Dabei sank der pH-Wert auf 6,5, was meistens auch erwünscht war. Er konnte durch Zugabe von Na_2CO_3 bis zu einer Endkonzentration von 8 mM aus einer 1 M Stammlösung wieder neutralisiert werden.

B.2.3.2. Eisen(II)-sulfid als Elektronendonator

Eine FeS-Suspension wurde durch aseptisches Mischen von etwa gleichen Teilen einer sterilfiltrierten 0,2 M FeSO₄-Lösung und einer unter N₂ autoklavierten 0,2 M Na₂S Lösung unter N₂-Begasung hergestellt. Nach Sedimentation des schwarzen Präzipitats wurde der klare Überstand gegen ein gleiches Volumen sterilen Mediums ausgetauscht. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, bis der pH des Mediums neutral blieb. Die anschließend erhaltene Suspension wurde auf eine Dichte von 0,2 mol FeS/l eingestellt. Vor der Entnahme von Aliquots über Pipetten wurde die Suspension durch Schwenken homogen verteilt. Sie wurde den Kulturen mit einer Dichte von 5 mmol FeS/l zugegeben.

B.2.3.3. Eisenoxid für *Geobacter metallireducens*

Amorphes Eisenoxid-Hydrat als Elektronenakzeptor zur axenischen Kultivierung von *Geobacter* wurde hergestellt, indem man dem Grundmedium 10 mM FeSO₄ zusetzte und den gebildeten weißen Eisen(II)-carbonat-Niederschlag durch Einleiten von steriler Luft oxidierte, bis er eine beige Farbe hatte. Das Durchleiten der Luft erfolgte mittels einer Pasteurpipette, in der sich ein steriler Wattestopfen befand.

B.2.3.4. Wasserstoff

Für das Wachstum auf Wasserstoff wurden Kulturen mit einem Gasraum vom halben Volumen des Kulturgefäßes mit H₂/CO₂ (80/20 [v/v]) nach der Hungate-Technik steril begast.

B.2.3.5. Salze von Carbonsäuren und andere organische Substrate

Salze von Carbonsäuren wurden als 1 M Stammlösungen aus den freien Säuren und NaOH hergestellt, auf pH 8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert oder autoklaviert. Von anderen organischen Substraten wie Zuckern oder Aminosäuren wurden 1 M Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert.

B.2.3.6. Test auf aerobes Wachstum

Um die Kulturen auf Verwendung von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu prüfen, wurden 0,1 ml einer gewachsenen Kultur bei 41°C mit 9 ml Medium, das 0,8 % geschmolzenen Agar und 3 mM Acetat enthielt, gemischt. Der Ansatz wurde abgekühlt, bis sich das Medium verfestigt hatte, und die Reagenzgläser (160 x 16 mm) mit einem Stopfen ohne Begasung verschlossen. Der Stopfen verhindert ein Austrocknen des Ansatzes. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 18°C.

B.2.4. Kultivierung von Eisen(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien

Eisen (II) oxidierende phototrophe Organismen wurden in 20 ml Röhrchen oder flachen Flaschen (Meplats-Flaschen 100, 250 und 500 ml), die zu 4/5 mit Medium gefüllt waren, kultiviert. Der Gasraum wurde mit N₂/CO₂ (90/10 [v/v]) nach der Hungate-Technik begast und die Kultur mit Butyl-Stopfen verschlossen. Als Elektronendonator wurde, wenn nicht anders angegeben, Eisen(II)-carbonat verwendet. Die Kulturen wurden auf einer Plexiglasplatte waagrecht liegend inkubiert und mit zwei Glühlampen (jeweils 25 W) beleuchtet. Diese waren in 30 cm Abstand ober- und unterhalb der Plexiglasplatte installiert. Die Inkubationstemperatur betrug 18°C.

B.2.5. Kultivierung von phototrophen Organismen

Die Kultivierung von *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Rhodopseudomonas palustris* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einem Medium mit 10 mM Acetat bei pH 7,0. Die Kulturen wurden in luftblasenfrei verschlossenen 50 ml Fläschchen in ca. 30 cm Abstand von 25 W Glühlampen bei 28°C angezogen. Die Kultivierung von *Rhodobacter ferrooxidans* ohne Eisen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 2 mM Acetat bei pH 7,0 unter den gleichen Bedingungen bei 18°C.

B.2.6. Kultivierung von Chromatiaceae

Die Kultivierung von *Thiodictyon elegans*, *Thiodictyon bacillosum*, *Lamprocystis roseopersicina*, *Amoebobacter pendens*, *Amoebobacter roseus* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einem Medium mit 1 mM Sulfid und 2 mM Acetat bei pH 7,3. Die Kulturen wurden in 20 ml Röhren auf einer Plexiglasplatte waagrecht liegend inkubiert und mit Halogenlampen (12 V, 20 W) mit Regulierung über einen elektronischen Dimmer schwach beleuchtet. Die Inkubationstemperatur betrug 18°C. Kulturen von *Thiodictyon siderooxidans* ohne Eisen erfolgten in einem mit 4 mM Ascorbat reduzierten Medium bei pH 7,0 unter den gleichen Bedingungen.

B.2.7. Stammkulturen

Stammkulturen von *Thiodictyon siderooxidans* wurden in 20 ml Röhren, die mit 10 ml Medium befüllt waren, angelegt. Als Elektronendonatoren dienten 10 mM Eisen(II)-carbonat und Wasserstoff. Die Kulturen wurden wie beschrieben inkubiert. Sie bleiben bei 18°C im Licht für mindestens 2-3 Monate lebensfähig. Um ein schnelles Anwachsen zu gewährleisten, sollte man sie allerdings einmal im Monat überimpfen. Verwendung von Wasserstoff als zusätzliches Substrat beschleunigte die Wachstumsgeschwindigkeit und ergab größere Zellmengen für das Überimpfen; zudem blieben die Kulturen vitaler.

Stammkulturen von *Rhodobacter ferrooxidans* wurden ebenfalls in 20 ml Röhren, die mit 10 ml Medium gefüllt waren, angelegt. Als Elektronendonatoren dienten 10 mM Eisen(II)-carbonat und zusätzlich 1 mM Acetat. Die Kulturen wurden wie beschrieben inkubiert. Sie blieben bei 18°C im Licht für mindestens 3 Monate lebensfähig. Die Verwendung von Acetat als zusätzliches Substrat beschleunigte die Wachstumsgeschwindigkeit der Kulturen und lieferte ebenfalls größere Zellmengen für das Überimpfen.

B.2.8. Massenanzucht

Die Kultivierung von großen Zellmengen *Thiodictyon siderooxidans* erfolgte in 10 l Steilbrustflaschen. Diese waren für die Zellernte mit einem Steigrohr versehen, durch das die gewachsene Kultur nach Anlegen eines Gasdrucks von 0,1 atm herausgedrückt werden konnte. Die Flaschen wurden mit 10 l mineralischem Grundmedium befüllt und autoklaviert (170 l Autoklav, Fa. Tecnomara, Fernwald). Nach Abkühlen unter N₂-Begasung wurden folgende Lösungen zugegeben:

Spurenelement-Lösung	10 ml
Ascorbat-Lösung	40 ml
Natriumbicarbonat-Lösung	220 ml

Die Massenkultur wurde mit einer möglichst frischen 250 ml Kultur, die auf Eisen und Wasserstoff angezogen worden war, beimpft und alle zwei Tage über ein Reduzierventil (Drägerwerk, Lübeck) mit 100 mbar H₂/CO₂ (90/10 [v/v]) begast. Das Begasen sollte nicht unterlassen werden, da sonst das entstehende Vakuum ein implodieren der großen Glasflasche verursachen kann. Die Kultur wurde anschließend bei 18°C im Licht von zwei 25 W Glühlampen für ca. 2 Wochen inkubiert und erreichte dabei eine tief purpurne Farbe. Die Ernte erfolgte über das Steigrohr unter aeroben Bedingungen. Die Zellen wurden für 15 min bei 10.000 x g abzentrifugiert (Beckman J2-MC mit JA-10 Rotor).

B.2.9. Isolierung von Bakterien

B.2.9.1. Agarverdünnungsreihen

Agar zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen wurde mit bidestilliertem Wasser kalt gewaschen, um lösliche Verunreinigungen zu entfernen. Dazu wurden 3,3 g Agarpulver (Difco) in ca. 300 ml bidestilliertem Wasser suspendiert, 15 min gerührt und nach anschließender Sedimentation vom Überstand befreit. Dieser Waschprozeß wurde 5 mal wiederholt und der Agar-Bodensatz nach dem letzten Durchgang in 100 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Der Agar wurde in einem siedenden Wasserbad vorsichtig geschmolzen und in 3 ml Portionen auf Reagenzgläser (160 x 16 mm) verteilt. Die Reagenzgläser wurden mit Alu-Kappen verschlossen und autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen wurden 6 Röhren mit gewaschenem Agar in einem siedenden Wasserbad erhitzt, bis der Agar vollkommen geschmolzen war. Anschließend wurde der Agar in einem 60°C Wasserbad flüssig gehalten. In den Agar wurden dann 6 ml auf 41°C vorgewärmtes Medium mit Substrat pipettiert. Das Gemisch wurde bei 41°C im Wasserbad flüssig gehalten. Das erste Agarröhrchen wurde mit einem Tropfen aus der zu verdünnenden Anreicherungskultur angeimpft. Das Röhren wurde einmal umgeschwenkt, um den Inhalt gleichmäßig zu vermischen. Anschließend wurde wiederum ein Tropfen in das nächste Röhren gegossen und so weiter verfahren, bis die Reihe komplett war. Die fertigen Röhren wurden in einem Eiswasserbad abgekühlt und mit N_2/CO_2 (90/10 [v/v]) begast.

Zur Herstellung von Agarverdünnungsreihen mit Fe(II) als Substrat wurden dem geschmolzenen Agar 0,11 ml einer 1 M $FeSO_4$ -Lösung zugegeben. Dazu wurden dann in 8 ml vorgewärmtes Medium mit 2 mM Acetat und 4 mM Ascorbat gegeben und die Verdünnungsreihe wie oben beschrieben durchgeführt. Bei dieser Prozedur präzipitierende Fe(II)-Verbindungen blieben infolge der Viskosität des Agars gleichmäßig verteilt.

Die Röhren wurden umgedreht inkubiert, so daß kein Kondenswasser auf den Agar tropfen konnte. Zur Beleuchtung wurde eine 25 W Glühbirne in 25 cm Abstand verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 18°C.

B.2.9.2. Ausstriche in *bottle plates*

Zur Herstellung von anaeroben Ausstrichen nach der *bottle plate* Technik wurden in ein Reagenzglas mit 3 ml sterilem 3% igem Agar 6 ml Medium mit Substrat zugesetzt (siehe B.2.9.1). Nach dem Vermischen durch einmaliges Umschwenken wurde der Inhalt des Reagenzglases in eine sterile *bottle plate* gegossen und die Flasche so schnell wie möglich mit N_2/CO_2 (90/10 [v/v]) begast. Nach dem völligen Erkalten des Mediums wurde die Probe mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette in "Zickzack" Linien ausgestrichen und die Flasche wieder begast und verschlossen.

B.2.9.3. Reinheitskontrollen

Waren nach dem zweimaligen Isolieren einer Einzelkolonie die Zellen im mikroskopischen Bild einheitlich und die Kolonien in der zweiten Verdünnungsreihe homogen, so wurde die Reinheit der Kultur auf Medium geprüft, dem 0,5 g/l Hefeextrakt, 3 mM Pyruvat, 2 mM Glucose oder 4 mM Acetat zugesetzt worden war.

B.2.10. Wachstumsversuche

B.2.10.1. Bestimmung der Temperaturoptima

Zum Bestimmen der Temperaturoptima wurden in einem 4 °C Kühlraum 5 Wasserbäder (MA6, Fa. Lauda) mit verschiedenen Temperaturvorgaben aufgestellt. Die Kulturen wurden darin inkubiert und an aufeinanderfolgenden Tagen das Wachstum der Kulturen beobachtet und protokolliert.

B.2.10.2. Bestimmung der pH-Optima

Zum Bestimmen der pH-Optima wurden unterschiedliche Mengen steriler 1 M Na₂CO₃ (60, 100, 150 µl) oder 1 M HCl (30 µl) in jeweils zwei auf gleiche Weise angesetzte und beimpfte Kulturen (20 ml) pipettiert. Danach wurde in einer der beiden Proben der pH-Wert gemessen, der sich eingestellt hat. An aufeinanderfolgenden Tagen wurde das Wachstum der Kulturen beobachtet und protokolliert.

B.2.10.3. Vitaminbedürfnisse

Zum Ermitteln der Vitaminbedürfnisse der Stämme wurden diese zunächst drei Passagen auf vitaminfreiem Medium kultiviert. Gegenüber den Kontrollen wurde beobachtet, ob die Geschwindigkeit des Wachstums nachließ. Anschließend wurden mit diesen Kulturen als Inokulum Folgepassagen angeimpft, denen jeweils eines der normalerweise zugegebenen Vitamine (siehe B.2.2.4.3) fehlte. Die Kulturen wurden unter diesen Bedingungen jeweils weiter überimpft, bis bei dem Fehlen einzelner bestimmter Vitamine überhaupt kein Wachstum mehr erkennbar war. Die dabei als notwendig erkannten Vitamine wurden bei anderen Kulturen als einzige Vitamine zugegeben und das Wachstum gegenüber Kontrollen beobachtet.

B.2.11. Zellsuspensionsversuche

Zellen von *Thiodictyon siderooxidans* wurden zwei Passagen auf demselben Substrat kultiviert, das anschließend in den jeweiligen Zellsuspensionen verwendet werden sollte. Für die Herstellung von Zellsuspensionen wurden nur wachsende Kulturen verwendet.

Um Suspensionen von Zellen, die auf Eisen und Wasserstoff gewachsen waren, herzustellen, wurde *Thiodictyon siderooxidans* als 250 ml Kultur in flachen 500 ml Flaschen mit 10 mM Fe(II) unter H₂/CO₂ (80/20 [v/v]) kultiviert. Makroskopische Aggregate dieser Zellen wurden mit Hilfe eines Scheidetrichters im Anaerobenzelt geerntet, da sie schneller sedimentierten als die Eisenminerale. Die Aggregate wurden dann noch zweimal in entgastem Puffer S (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,0) gewaschen, um Bestandteile des Mediums wie Bicarbonat zu entfernen.

Um Zellsuspensionen mit Zellen, die auf Wasserstoff oder Acetat gewachsen waren, herzustellen, wurde *Thiodictyon siderooxidans* in mit 4 mM Ascorbat reduziertem Medium kultiviert, im Anaerobenzelt in Zentrifugenbecher für den JA-10 Rotor gefüllt und durch Zentrifugation bei 10.000 x g geerntet.

Die auf dem jeweiligen Substrat kultivierten Zellen wurden in 75 ml entgastem Puffer S (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, Puffer pH 7,0) resuspendiert. Das NaCl diente dem Einstellen einer ähnlichen Ionenstärke wie im Medium. Die Konzentration der Zellen hatte etwa die zehnfache Dichte der Originalkultur. Die Zellen wurden in Puffer S resuspendiert, dem je nach Ansatz 1 mM FeSO₄ und 1 mM NaHCO₃ zugegeben worden war.

B.2.12. Absorptionsspektren

Absorptionsspektren wurden mit einem Beckman (Palo Alto, California) DU 640 Spektralphotometer aufgenommen.

Zur Ermittlung der Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Rhodobacter ferrooxidans* wurden diese in einer konzentrierten Saccharoselösung suspendiert. Dazu wurde 1 ml Kultur zu einer Lösung von 5 g Saccharose in 3 ml Wasser gegeben.

Weil *Thiodictyon sideroxidans* Aggregate bildet und Gasvakuolen besitzt, wurden Zellen aus einer mit Glucose gewachsenen Kultur in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 suspendiert und durch Ultraschall (2 x 15"; 50 W; 20 kHz) mit einem Sonoplus HD 70 Gerät (Bendelin, Berlin) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 10.000 x g) in einem Beckman JA-21 Rotor entfernt. Der pigmentierte Überstand wurde für eine Stunde bei 150.000 x g zentrifugiert (Beckman Optima Ultrazentrifuge, 70.1 Ti Rotor) und die Membranfraktion im obengenannten Puffer resuspendiert.

B.3. Analytische Methoden

B.3.1. Bestimmung von Fe(II) und Fe(III)

Fe(II) bildet mit *o*-Phenanthrolin einen roten Komplex, dessen Konzentration photometrisch bei 510 nm bestimmbar ist (63).

Der Ansatz enthielt 2 mM *o*-Phenanthrolinhydrochlorid und 0,7 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0. Das Testvolumen betrug 1 ml. Die in der Probe befindliche Fe(II)-Menge ist in einem Bereich von 10 bis 60 μ M Fe(II) proportional zur Absorption bei 510 nm. Die Menge Fe(III) wurde dann als Differenz zwischen der bestimmten Fe(II) Konzentration und der nach einer Reduktion des gesamten Eisens zu Fe(II) gemessenen Konzentration errechnet. Zur Reduktion wurde dem Ansatz vor der Komplexbildung Hydroxylammoniumchlorid in einer Endkonzentration von 0,28 M zugegeben, wodurch alles Eisen als Fe(II) vorlag.

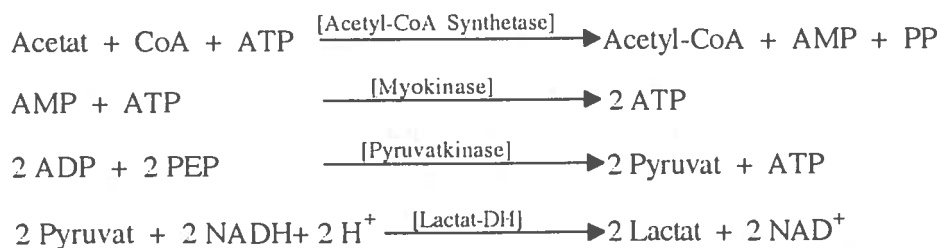
Die Proben für die Eisenbestimmung wurden über eine mit N₂ gespülte Spritze durch die Gummistopfen der Kulturgefäße entnommen. Um die präzipitierten Eisenminerale möglichst gleichmäßig zu verteilen, wurde die Kultur vorher geschüttelt. Fe(II) ist unterhalb von pH 2 gegenüber Luftsauerstoff beständig. Die entnommene Probe wurde deshalb mit 1 M HCl auf eine geschätzte Konzentration von 10 bis 60 μ M Fe(II) verdünnt.

B.3.2. Enzymatische Glucosebestimmung

Glucose wurde in einem gekoppelten Test bestimmt, bei dem das Enzym Glucose-Oxidase Glucose mit Sauerstoff quantitativ zu Gluconat und Wasserstoffperoxid umsetzt. Letzteres oxidiert dann in einer durch das Enzym Peroxidase katalysierten Reaktion ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat)) zu einem grünen Farbstoff (117). In dem mit 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, gepufferten Ansatz von 1 ml befanden sich 4 U Peroxidase (aus Meerrettich, Grad II, 100 U/mg), 8 U Glucose-Oxidase (aus Schimmelpilz, Grad II, 100 U/mg), 0,5 mg ABTS und max. 40 nmol Glucose. Die gebildete Menge ABTS wurde über die Extinktion bei 436 nm ermittelt. Die Proben wurden vorher mit dem Kaliumphosphat-Puffer bis zu der erfaßbaren Konzentration verdünnt und die Eisenphosphatpräzipitate abzentrifugiert.

B.3.3. Enzymatische Acetatbestimmung

Acetat wurde in einem enzymatisch gekoppelten Test unter Verwendung von Acetyl-CoA-Synthetase und den Hilfsenzymen Myokinase, Pyruvatkinase und Lactat-Dehydrogenase bestimmt. Dabei wird bei der Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat durch die Acetyl-CoA Synthetase AMP aus ATP freigesetzt. Ein AMP wird durch die Myokinase mit einem ATP zu zwei ADP umgesetzt. Von der Pyruvatkinase kann dann die entsprechende Menge Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt werden. Die gebildete Pyruvatmenge wird über die Lactat-Dehydrogenase ermittelt, indem man den Verbrauch an NADH durch Extinktionsmessung bei 365 nm verfolgt (47).



In dem mit 100 mM Tris, pH 8,0, gepufferten Testansatz von 1 ml befanden sich 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0,5 mM Coenzym A, 2,5 mM ATP, 0,5 mM NADH und 2,5 mM Phosphoenolpyruvat. Ferner waren 1,4 U Myokinase, 11 U Lactat-DH, 8 U Pyruvatkinase und 0,3 U Acetyl-CoA-Synthetase enthalten.

Nachdem man ca. 15 min bis zu einer Stabilisierung der Extinktion bei 365 nm gewartet hat, gab man die Probe zu. Man wartete abermals etwa 15 min bis die Extinktion nicht mehr weiter abnahm und las das Ergebnis ab.

Der Test lieferte bei Acetatkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 1 mM einen linearen Zusammenhang zwischen dem Endpunkt der Extinktionsabnahme und der Acetatkonzentration.

B.3.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Für eine schnelle Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford verwendet (101). Dazu wurden einem Testansatz von 1 ml mit $\leq 0,5 \mu\text{g}$ Protein 0,2 ml Coomassie-Reagenz-Lösung der Firma BioRad (München) zugegeben. Nach 15 min wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin.

B.3.5. Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinbestimmung in Kulturen wurden diese in 20 ml Portionen aufgeteilt und die Eisenpräzipitate mit den Zellen 10 min bei 10.000 x g im JA-20 Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils in 20 ml 2 M HCl aufgenommen und das Eisen unter leichtem Schwenken gelöst. Zu dem Ansatz wurde Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben, um das Protein auszufällen. Der Ansatz wurde für 30 min im Eiswasserbad inkubiert. Das Protein wurde dann durch 10 minütige Zentrifugation bei 30.000 x g pelletiert und noch einmal mit 0,5 M TCA gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml 0,1 M NaOH aufgenommen und das Protein durch einminütiges Kochen in Lösung gebracht.

Zu 0,2 ml dieser Lösung wurde 1 ml Cu-Tartrat Reagenz (0,5 g CuSO₄·5 H₂O, 1,0 g K-Na-Tartrat auf 100 ml 0,1 N NaOH) gegeben und 10 min inkubiert. Dann wurden 0,1 ml Folin-Reagenz hinzugefügt. Der Ansatz wurde abermals 30 min inkubiert und die Absorption bei 578 nm bestimmt. Diese verhielt sich bis zu einer Obergrenze von 100 μg Protein proportional zur Proteinmenge im Ansatz (135). Als Standard diente Rinderserumalbumin.

B.3.6. Sulfat-Bestimmung durch Ionenchromatographie

Die quantitative Bestimmung von Sulfat erfolgte an einer HPLC-Anlage (Sykam, Gilching) mit einer LCA 09 Anionenaustauschsäule (4,6 x 125 mm), einer sauren Leitfähigkeitssuppressor-Einheit und einem Leitfähigkeitsdetektor. Die Säulentemperatur betrug 60-65°C. Als Elutionsmittel wurde eine Lösung von 10 mM K₂CO₃ und 10 % Ethanol [v/v] in Wasser bei einer Flußrate von 1 ml/min verwendet (5). Sulfat eluierte bei 4,7 min. Eine Analyse war bei Konzentrationen oberhalb von ca. 0,5 mM möglich.

B.3.7. Benzoat-Bestimmung durch Ionenchromatographie

Die quantitative Bestimmung von Benzoat erfolgte ebenfalls mit einer HPLC-Anlage der Firma Sykam. Zur Auftrennung aromatischer Verbindungen wurde eine Sphaerisorb ODS2 *reversed phase* Säule (4,6 x 125 mm) verwendet. Die Säulentemperatur betrug 25°C. Die Detektion erfolgte mit einem Durchflußphotometer bei 230 nm. Als Elutionsmittel diente eine Lösung von 35 % Acetonitril und 0,75 mM H₃PO₄ in Wasser. Bei einer Flußrate von 1 ml/min eluierte das Benzoat mit einer Retentionszeit von ca. 7 min.

B.4. Biochemische Methoden

B.4.1. SDS-Page

Zur SDS-Gelelektrophorese von Proteinen wurden nach der Methode von Laemmli (120) 15 %ige Polyacrylamidgele in einer Mini-PROTEAN® (Biorad, München) Kammer gemäß den Angaben des Herstellers benutzt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie-Färbelösung (0,2 % [w/v] Serva-Blau R250® in 30 % Methanol und 7,5 % Essigsäure in Wasser) für eine Stunde. Anschließend wurde mit einem Gemisch aus 30 % Methanol und 7,5 % Essigsäure in Wasser für drei Stunden entfärbt.

B.4.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Zellproteinen erfolgte mit dem horizontalen Multiphor® II Elektrophorese-System (Pharmacia, Freiburg) nach einer von Görg et al. (82, 83) ausgearbeiteten Methode. Dabei wurden zur isoelektrischen Fokussierung in der ersten Dimension Gele mit immobilisierten pH-Gradienten benützt. Diese wie auch die SDS-Gele mit einem Porengradienten des Polymers (12 - 15 % Polyacrylamid), wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers in einer Vertikalkassette auf Gelbond PAGfilm® selbst gegossen. Der Vorteil der Verwendung immobilisierter pH-Gradienten gegenüber herkömmlichen Methoden lag in der sehr hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Auch war keine Vorfokussierung wie bei der O'Farrell-Technik erforderlich. Die Verwendung 0,5 mm dicker Trägerfolien zur Stabilisierung der Gele erlaubte das Anlegen höherer Spannungen als bei der herkömmlichen Technik mit dickeren Gelen, da eine effektivere Kühlung möglich wurde. Dies wiederum erlaubte eine schärfere Trennung als bisher.

B.4.2.1. Probenaufbereitung

Zur Gewinnung von bakteriellem Zellprotein (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Desulfobacula toluolica*) wurden 20 mg Zellen (Naßgewicht) in 1 ml Puffer H (50 mM HEPES, 1 mM DTT, pH 7,0) suspendiert und durch zweimalige Passage durch eine French-Pressse bei 18.000 psi aufgebrochen. Durch 5-minütige Zentrifugation mit einer Eppendorffzentrifuge wurden die Zelltrümmer entfernt. 0,5 ml des Überstands wurden in ein neues Eppendorffcup transferiert und mit 0,5 ml Aceton/Mercaptoethanol (siehe B.4.2.5.) sowie mit 0,5 ml 30 % TCA vermischt. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis gehalten, damit das Protein präzipitieren konnte. Das durch 10 min Zentrifugation mit einer Eppendorffzentrifuge erhaltene schmutzigweiße Pellet wurde mit Aceton/Mercaptoethanol gewaschen und kurz an der Luft getrocknet, um Reste von Aceton/Mercaptoethanol zu entfernen. Dann wurde das Pellet in 1 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und in ca. 10 h gelöst.

Bei Zellen von *Thiodictyon siderooxidans* war das Pellet allerdings, wahrscheinlich durch einen hohen Anteil an Membranen, tief purpurn gefärbt. Diese stören aber die 2D-Gelelektrophorese empfindlich. Deshalb mußte das Pellet für ein bis zwei Stunden mit Aceton/Mercaptoethanol auf Eis extrahiert werden. Dabei wurde das Aceton/Mercaptoethanol jeweils ausgetauscht, wenn es purpurn geworden war. Am Ende der Extraktion hatte das Pellet eine leicht bräunliche Farbe. Es wurde an der Luft kurz getrocknet, um das Aceton/Mercaptoethanol zu entfernen, und in ca. 10 h in 1 ml Solubilisierungspuffer aufgelöst.

B.4.2.2. Proteintrennung in der ersten Dimension

Das zur Auftrennung in der ersten Dimension verwendete Gelsystem hatte einen pH Gradienten von 4 - 7. Das Gel enthielt 4% Acrylamid, 8 M Harnstoff, 0,5 % Triton X-100, 10 mM DTT. Das Gel mit den Abmessungen 110 x 250 x 0,5 mm wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers in einer Gießkassette (Pharmacia) nach den Angaben von Görg et al. (82, 83) gegossen, gewaschen, getrocknet, durch Auflegen einer Plastikfolie geschützt und mit Hilfe einer Papierschneidevorrichtung in 5 mm breite Streifen geschnitten. Die auf diese Weise erhaltenen Streifen mit einem im Polymer fixierten pH-Gradienten werden IPG-Streifen genannt. Diese wurden portionsweise eingeschweißt und hielten sich bis zu zwei Monate bei -20°C. Bei Bedarf wurden die Streifen in einer speziellen Rehydratisierungskassette über Nacht mit Rehydratisierungslösung in die funktionsfähige Form gebracht und sofort für eine isoelektrische Fokussierung eingesetzt. Die Rehydratisierungslösung enthielt zur vollständigen Denaturierung und Solubilisierung der Proteine die im elektrischen Feld nicht wandernden Agenzien 8 M Harnstoff, 0,5 % [w/v] Triton X-100 und 10 mM DTT. Die gequollenen Streifen wurden der speziellen Rehydratisierungskassette entnommen. Diese enthielt, im Gegensatz zu den zum Gießen von Gelen verwendeten Kassetten, keinen Gelbond Film und wurde mit einer zweilagigen Parafilmichtung zusätzlich zur Silikondichtung versehen, um ein vollständiges Rehydratisieren der Acrylamidschicht auf den IPG-Streifen auf 0,5 mm zu gewährleisten. Die Streifen wurden mit feuchtem Filterpapier vorsichtig abgetupft, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs zu vermeiden. Dann wurden die Streifen luftblasenfrei in 1 cm Abstand voneinander auf den auf 15°C temperierten Kühlblock gelegt, auf den man als Kontaktflüssigkeit einige ml Kerosin aufgebracht hatte, so daß sich ein Film auf dem Kühlblock bildete. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit 6 Streifen gleichzeitig durchgeführt. Auf die jeweiligen Enden der Streifen wurden Elektrodenstreifen aus Filterpapier, die mit Anodenlösung bzw. Kathodenlösung getränkt waren, gelegt. Der Probenauftrag erfolgte mit speziell dafür vorgesehenen Plastikrähmchen in 2 cm Entfernung von der Anode. In diese wurden insgesamt 20 µl Probe pipettiert. Um eine Präzipitation des Proteins zu verhindern, wurde eine 1:1 Mischung aus Probenprotein im Solubilisierungspuffer und Ultrodex® (Pharmacia, Freiburg) Suspension aufgetragen.

Der Probeneinlauf erfolgte für 2 h bei 150 V. Dann wurden die Probenrähmchen entfernt und die Fokussierung wurde für 3 h bei 300 V fortgesetzt. Die eigentliche isoelektrische Fokussierung bei 3500 V dauerte 15-18 h. Die Stromstärke war über das Netzgerät (Pharmacia, Freiburg) stets auf 2 mA und die Leistung auf 5,0 W begrenzt. Nach beendeter Fokussierung konnten die Streifen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Zur Herstellung des pH-Gradientengels wurden die Komponenten gemäß der folgenden Auflistung zusammenpipettiert. Dabei wurde das spezifische Gewicht der sauren Lösung durch Zugabe von Glycerin erhöht, damit sich der gegossene Gradient bis zum Auspolymerisieren nicht vermischte. Jeweils 7,5 ml jeder Lösung wurden in die entsprechende Kammer des Gradientenmischers gegeben und das Gel gegossen.

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

Da die Polymerisation von Acrylamid vom pH-Wert abhängig war, wurde vor Zugabe von Acrylamid und Glycerin zur effektiven Polymerisation die saure Lösung mit ca. 3 Tropfen 1 N NaOH auf ca. pH 7,0 titriert. Die basische Lösung hatte bereits den gewünschten pH-Wert.

Nachdem das Gel zügig bis zu einer Gesamthöhe von 11 cm gegossen worden war, wurde die Gelkassette 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sich der Gradient horizontal ausrichten konnte. Dann wurde 1 h bei 50°C im Trockenschrank auspolymerisiert. Das polymerisierte Gel wurde anschließend der Kassette entnommen und 6 x 10 min unter leichtem Schwenken mit je 0,5 l Wasser von nicht polymerisierten Bestandteilen befreit. Dabei war darauf zu achten, daß sich das gequollene Gel beim Schütteln nicht von dem Gelbond Film löste. Anschließend wurde das Gel noch 30 min in 2 %iger Glycerinlösung gewaschen und dann in einem staubfreien Schrank bei Raumtemperatur mit einem Ventilator für genau 16 h getrocknet. Zu stark getrocknete Gele quollen anschließend nicht mehr richtig, auch war ihre Haltbarkeit begrenzt.

B.4.2.3. Proteintrennung in der zweiten Dimension

Die Trennung in der zweiten Dimension bestand aus einer SDS Gelelektrophorese der isoelektrisch fokussierten Proteine auf einem horizontalen Gradientengel mit 12-15 % Polyacrylamid. Die Abmessungen betragen 190 x 250 x 0,5 mm. Um die Fokussierungsstreifen aus dem nichtionischen System zur Denaturierung von Proteinen in das anionische System der SDS-Gelelektrophorese zu überführen, wurden die Streifen zunächst in einem Reagenzglas für 15 min in 10 ml Äquilibriumspuffer mit 65 mM DTT leicht geschwenkt. Da die zur vollständigen Reduktion des Proteins notwendigen hohen DTT Konzentrationen die Silberfärbung stören würden, mußte das DTT in einem zweiten Äquilibriumsschritt mit einem Überschuß Jodacetamid wieder entfernt werden. Dabei wurden auch die freien SH-Gruppen der Cysteine blockiert, so daß eine Reoxidation nicht mehr möglich war. Dazu wurden die Streifen für 15 min in 10 ml Äquilibriumspuffer überführt, der 260 mM Jodacetamid enthielt. Dem Äquilibriumspuffer wurden zum Sichtbarmachen der späteren Lauffront 30 µl Bromphenolblau-Lösung zugegeben.

Während des Äquilibriumens wurde das gegossene SDS-Gel mit einem Kerosinfilmm als Kontaktflüssigkeit auf den auf 15°C temperierten Kühlblock der Multiphor Kammer gelegt. Als Pufferreservoir wurden ExelGel® SDS-Anoden- und Kathoden-Polyacrylamid Pufferstreifen (Pharmacia, Freiburg) an die Ränder des Gels gelegt, auf die dann die gleichen Elektroden wie zur isoelektrischen Fokussierung aufgesetzt wurden.

Nach dem Äquilibriumieren der Fokussierungsstreifen wurden die mit einem feuchten Filterpapier abgetupften Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten entlang dem Kathodenstreifen auf das *stacking* Gel gelegt. Dann wurden für 45 min 200 V angelegt. Die Stromstärke betrug in der Anfangsphase ca. 20 mA pro SDS-Gel. Nach dieser Zeit war das Protein vollständig aus dem Fokussierungsstreifen in das *stacking* Gel eingelaufen und eine scharfe Lauffront auf dem Gel sichtbar. Da sich der Fokussierungsstreifen durch elektroosmotische Effekte in das SDS-Gel einbohrt, mußte er nach der Einlaufphase entfernt werden. Das ungleichmäßige Einbohren des Fokussierungsstreifens würde eine Verzerrung Lauffront bewirken, da die Geldicke entlang der Lauffront nicht gleichförmig bliebe. Nach der Einlaufzeit mußte deshalb auch der Fokussierungsstreifen vom SDS-Gel entfernt und der Kathoden-Pufferstreifen auf seine Linie gerückt werden. Dabei wurde das Gel mit einem sauberen Papiertuch sorgsam abgetupft und auch der Kathoden-Pufferstreifen an der Unterseite mit einem Filterpapier von Feuchtigkeit befreit, damit er durch das Gewicht der Elektroden während des Laufes nicht wegrutschte.

Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde dann sofort mit 500 ml eines Gemisches aus 40 % Methanol und 10 % Eisessig in Wasser für mindestens eine Stunde in flachen Färbewannen fixiert.

Zur Herstellung des SDS-Gels mit Porengradienten wurden die Komponenten nach folgender Tabelle zusammenpipettiert und jeweils 10 ml der schweren und der leichten Lösung in den Gradientenmischer gegeben:

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

Zunächst wurden 6 ml der Sammelgellösung in die senkrecht stehende Gelkammer mit GelBond Folie pipettiert. Anschließend wurde das Gradientengel mit Hilfe des Gradientenmischer zügig in die Gelkammer gegossen und für 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen, damit sich der Gradient horizontal ausrichten konnte. Nachdem es für 30 min bei 50 °C im Trockenschrank auspolymerisiert war, konnte man es sofort in die Gelelektrophorese einsetzen oder über Nacht im Kühlschrank aufbewahren. Nach Entnahme des Gels aus der Kassette konnte es auch mehrere Wochen im Plastikbeutel eingeschweißt aufbewahrt werden.

B.4.2.4. Silberfärbung der zweidimensionalen Chromatogramme

Für die Silberfärbung der erhaltenen zweidimensionalen Chromatogramme wurde ein modifiziertes Protokoll nach Blum et. al. (16) verwendet. Da Silberfärbungen allgemein eine sehr hohe Empfindlichkeit besitzen, durfte das Gel niemals mit den bloßen Fingern berührt werden. Auch Filterpapiere zum Abtupfen von Wasser etc. mussten von hoher Reinheit sein. Die Färbeschritte wurden unter leichtem Schütteln mit einem Linearschüttler Modell GFL 3014 (GFL, Hannover) und jeweils 500 ml der Färbelösungen durchgeführt. Für die Färbung wurde das Gel für mindestens 1 Stunde (aber nicht über Nacht) in wässrigen Lösungen von 40 % [v/v] Methanol und 10 % [v/v] Eisessig fixiert und für dreimal 20 min in 30 % [v/v] Methanol gewaschen. Nach 1 min Inkubation in der unten angegebenen Thiosulfatlösung wurde das Gel dreimal kurz mit bidest. Wasser abgespült und für 20 min in die Silbernitratlösung zum Färben gelegt. Danach wurde das Gel abermals dreimal kurz mit bidestilliertes Wasser gewaschen und für 5 min in die Entwicklerlösung gelegt. Dabei wurden die Proteine als schwarze Flecken sichtbar. Das entwickelte Gel wurde zweimal für 1 min in bidest. Wasser gewaschen und dann für 5 min in die Stop-Lösung gelegt, um ein weiteres Nachdunkeln der Färbung zu verhindern. Abschließend wurde das Gel ohne Schütteln für mindestens 30 min, besser aber über Nacht, in bidest. Wasser gewaschen.

B.4.2.5. Zusammensetzung der Stammlösungen:

Solubilisierungspuffer:

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

Aceton/Mercaptoethanol:

Mercaptoethanol in Aceton	10 mM
Lösung bei -20°C lagern.	

Rehydratisierungslösung:

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

Anodenlösung:

Glutaminsäure 10 mM

Kathodenlösung:

Lysin 10 mM

Ultrodex Suspension:

Ultrodex 30 mg/l Solubilisierungspuffer

Die Suspension wurde zum Quellen 10 h im Kühlschrank aufbewahrt.

Acrylamidlösung:

Um die durch Hydrolyse des Acrylamids bei der Lagerung entstandene Acrylsäure und Ammoniumionen zu entfernen, wurden zwei Spatelspitzen Serdolit MB-3 zugegeben und der Ansatz 15 min gerührt. Dann wurde das Ionenaustauscherharz mit einem Faltenfilter abfiltriert und die Lösung mit einem Exsikkator entgast.

Acrylamid 288 g/l

Methylenbisacrylamid 12 g/l

Äquilibrierungspuffer:

Tris-HCl, pH 8,8 50 mM

Harnstoff 6 M

Glycerin 300 g/l

SDS 20 g/l

Unmittelbar vor dem Äquilibrieren wurden 30 μ l Bromphenolblau-Lösung sowie 65 mM DTT **oder** (siehe B.4.2.3.) 260 mM Jodacetamid zugegeben.

Bromphenolblau-Lösung:

Sammelgelpuffer 10 ml

Bromphenolblau 30 mg

Sammelpuffer:

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

Trennpuffer:

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

Thiosulfatlösung:

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

Silbernitratlösung:

Silbernitrat	2 g/l
Formaldehydlösung (37 %ig)	0,2 ml/l
Natriumthiosulfat	0,004 g/l

Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	30 g/l
Formaldehydlösung (37 %ig)	0,5 ml/l
Natriumthiosulfat	0,004 g/l

Stopplösung:

Glycin	5 g/l
--------	-------

B.4.3. Reinigung eines spezifisch exprimierten Proteins aus Fe(II)-oxidierenden Zellen

Zellen von *Thiodictyon sideroxidans* wurden in 10 l Massenkulturen auf Wasserstoff angezogen. Nach ca. 2 Wochen wurden 5 g Naßzellen geerntet. Die 15 min bei 10.000 x g abzentrifugierten Zellen wurden bei -80°C bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

1. *Präparation des Rohextraktes*: Die eingefrorenen Zellen (5g) wurden bei 4°C aufgetaut, in 40 ml Puffer I aufgenommen (50 mM HEPES, pH 7,0, 2 mM DTT) und mit einer French Press bei 16.000 psi (American Instruments Co. Inc., Silver Spring, USA) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde für 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um ganze Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

2. *DEAE-Sepharose-Chromatographie*: Der Rohextrakt wurde auf eine DEAE Fast Flow®-Säule (2,6 x 14 cm), die mit Puffer I vorgespült worden war, aufgetragen. Der Durchlauf enthielt eine braun-gelbe Bande, die aufgefangen wurde. Beim Spülen mit 1 M KCl eluierte zudem noch eine schwach rote Bande, die ebenfalls aufgefangen wurde.

3. *Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung*: Der Durchlauf von der DEAE Säule wurde auf Eis unter langsamem Rühren mit fein pulverisiertem Ammoniumsulfat auf 70 % Sättigung gebracht (22 g Ammoniumsulfat auf 50 ml Anfangsvolumen). Zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung wurde der Ansatz noch für ca. 1 h gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wurde durch 20 min Zentrifugation bei 20.000 x g abzentrifugiert und der Überstand durch Zugabe von 11 g fein pulverisiertem Ammoniumsulfat auf 100 % Sättigung gebracht. Das ausgefallene Protein wurde durch abermalige 20 minütige Zentrifugation bei 20.000 x g gesammelt.

4. *Gelfiltration mit einer Superose 12 Säule*: Das Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung wurde in einem Dialyseschlauch (Spectrum Medical Industries, Los Angeles) mit der Ausschlußgröße 6 - 8 kDa gegen 4 l Puffer II (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl) über Nacht dialysiert. Die dabei erhaltenen 5 ml Dialysat wurden in 1 ml Portionen über eine Superose 12® Säule (10 x 300 mm) (Pharmacia, Freiburg) geschickt. Die Säule wurde bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 1 ml/min entwickelt und der Hauptpeak mit Hilfe der UV-Absorption aufgefangen. Der eluierte, bräunliche Peak wurde gegen 100 ml Puffer I mit 50 % [v/v] Glycerin dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

B.5. Molekularbiologische Methoden

B.5.1. Präparation genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus einer Bakterienkultur füllte man diese in ein Eppendorfcup, fügte Proteinase K und SDS (Endkonzentrationen 0,1 mg/ml) hinzu und inkubierte eine weitere Stunde bei 37°C. Das Detergenz SDS lysierte dabei die Zellmembran, während Proteinase K störende Proteine weitgehend hydrolysierte. Zur Abtrennung von Protein wurde der Ansatz für 1 - 5 min mit einem halben Ansatzvolumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 [v/v/v], auf pH 7 - 8 äquilibriert) auf dem Vortex-Mischer geschüttelt, 2 - 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Eppendorfcup überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Anschließend wurden zur Fällung der DNA 0,1 Volumenteile 5 M NaCl und 2,5 Volumenteile 100 %iger Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde mindestens 1 Stunde bei -80°C gekühlt und 15 min mit der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl bidest. Wasser gelöst. Von der DNA Lösung wurden 2 - 5 µl auf einem Agarosegel aufgetragen.

B.5.2. PCR Amplifikation von rRNA-Genen

1 µl einer DNA-Präparation wurde unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:10 sowie 1:100 in eine PCR Reaktion zur Amplifikation des 16S rRNA Gens eingesetzt. Die PCR Reaktionen wurden in einem 50 µl Ansatz in einem PHC-3 Thermocycler (Techne Inc., USA) durchgeführt. Die Komponenten im Ansatz waren 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine, 200 µM von jedem dNTP, 1 % Triton X-100, 1,25 U AmpliTaq® Polymerase, 20 - 50 pmol Primer GM3 und GM4 (18).

Die Mixtur wurde mit 2 Tropfen Nujol-Öl (Perkin-Elmer) bedeckt, da sonst der PCR-Ansatz während der sechsständigen Reaktion ausgetrocknet wäre. Man setzte den PCR Ansatz in den Thermocycler, erwärmte 5 min auf 96°C und gab erst dann die DNA-Polymerase hinzu. Das Temperaturprogramm bestand aus 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierungsphase bei 96°C, 2 min Assoziationsphase bei 40°C und 3 min Elongationsphase bei 71°C. Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 0,1 Volumenteile jedes PCR-Ansatzes (5 µl) in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

B.5.3. Agarosegelelektrophorese

Die durch PCR amplifizierte DNA würde per Agarosegelelektrophorese analytisch aufgetrennt. Zur Auftrennung von Nukleinsäuren in den Größenbereichen von 0,8 - 10 kb sind Agarosegele einer Konzentration von 0,7 % [w/v] geeignet. Man kochte 3,5 g reine Agarose in 500 ml TBE Puffer (45 mM Tris-Borat, pH 8,0; 1 mM EDTA) auf und gab anschließend 0,1 μ g Ethidiumbromid pro ml zu. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agarose in eine mit Klebeband abgedichtete Agaroseflachgel-Apparatur (Bio-Rad, München) gegossen. Für ein Gel (15 x 10 x 0,5 cm) wurden ca. 80 ml Agarose eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in TBE - Puffer mit 0,1 μ g Ethidiumbromid pro ml für 1 - 2 h bei 130 V durchgeführt.

B.5.4. Reinigung von PCR-Produkten

Voraussetzung für den Einsatz von PCR-Produkten für die direkte Sequenzierung war deren Reinigung. Die Methode beruht auf der Bindung von DNA an Silikatoberflächen bei hohen Ionenstärken. 40 μ l aus einem PCR-Ansatz wurden mit 120 μ l 6 M NaJ-Lösung und 5 μ l Glassmilk® (Geneclean II® Kit, BIO 101 Inc., La Jolla) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde die DNA bindende Glassmilk Matrix abzentrifugiert (5 s bei 14.000 rpm) und der Überstand entfernt. Die Glassmilk Matrix wurde dreimal mit NEW WASH-Lösung (Geneclean II® Kit) durch Schütteln in dieser gewaschen. Oligonucleotide, kurze PCR-Produkte, das Enzym und die Ionen des PCR-Ansatzes konnten so entfernt werden. PCR-Produkte von etwa 500 bp und mehr blieben an die Glassmilkmatrix gebunden. Durch zweimaliges Waschen in 20 μ l bidestilliertem Wasser eluierten sie. Dazu wurde das Glassmilk-Pellet mit Wasser auf dem Vortex-Mischer geschüttelt, 1 - 2 min stehengelassen, die Glassmilk abzentrifugiert und das DNA-haltige Eluat abgenommen. Die Elution wurde wiederholt und die Eluate vereinigt. Mit übertragene Glassmilk mußte abzentrifugiert werden, da sie die Sequenzierung der PCR-Produkte erheblich stört.

B.5.5. Sequenzieren der PCR Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde unter Verwendung von universellen Primern mit der Didesoxynucleotid Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (172, 173) durchgeführt.

Dazu wurden 20-200 ng PCR-Produkt und 5 pmol des jeweiligen PCR Primers eingesetzt. Der Ansatz mit 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl und 5 g/l Triton-X100 wurde 5 min bei 95°C inkubiert, um doppelsträngige DNA zu denaturieren, und anschließend für 20 min auf 37°C gehalten, um die Hybridisierung von Primer und DNA zu ermöglichen.

Als Primer für die Sequenzierung der rDNA des Isolats SW2 dienten:

GM1rev, GM4, GM6, GM8, GM9, GM10, GM11, GM12, 691R

Als Primer für die Sequenzierung der rDNA des Isolats L7 dienten:

GM1, GM1rev, GM3, GM4, GM5, GM6, GM7, GM9, GM10, GM13, 691R

(siehe B.1.)

Anschließend erfolgte die Sequenzierungsreaktion. Dazu versetzte man den Ansatz in einem Endvolumen von 15 µl mit 6,5 mM DTT, 13,5 nM dGTP, dATP, dTTP, 5 µCi [α -³³P] dCTP und 2 U Sequenase® Version 2.0. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde der Sequenzierungsansatz in Portionen von 6 µl auf die vier Terminationsansätze für G, A, T, C aufgeteilt, die neben 80 µM aller dNTPs auch 8 µM des jeweiligen ddNTPs und 50 mM NaCl enthielten. Die Sequenzierungsreaktion wurde durch Zugabe von 4 µl der Stopplösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau) beendet. Unmittelbar vor dem Auftragen auf das Trenngel wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert, da alle bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente einzelsträngig vorliegen mußten, um scharfe Banden im Gel zu produzieren.

Die Auftrennung und Radiographie der bei der Sequenzreaktion entstandenen DNA-Fragmente erfolgte in 38 x 50 cm Sequi-Gen II® Sequencing Cells (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers.

B.6. Physikochemische Charakterisierung von Fe(III)-Spezies

Eine physikochemische Untersuchung der durch die phototrophen Organismen gebildeten Eisen(III)-Spezies wurde freundlicherweise durch Frau Marianne Hanzlik vom Institut für Allgemeine und Angewandte Geophysik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Dazu wurden abzentrifugierte und in Wasser gewaschene Proben des durch die Isolate SW2 und L7 gebildeten Fe(III) auf ein Kupfernetz von 3 mm Durchmesser, das mit einem kohlenstoffverstärkten Formvar-Film versehen war, aufgebracht und getrocknet. Die eigentlichen Untersuchungen wurden an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt. Die Hellfeldaufnahmen sowie die Feinbereichsbeugungsbilder, die zur Materialidentifizierung notwendig sind, wurden an einem EM 10 Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einer Beschleunigungsspannung von 100 kV erhalten. Zur Absicherung der hierbei gewonnenen Ergebnisse und zur chemischen Charakterisierung erfolgten noch energiedispersive Röntgenanalysen an einem JEOL 2000 FX Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV, das mit einem Röntgenmikroanalyse-System TN 5500 mit Si(Li)-Detektor ausgestattet war.

C. Ergebnisse

C.1. Isolierung und Charakterisierung phototropher Bakterien

C.1.1. Autotroph wachsende Anreicherungen auf Fe(II) im Licht

Süß- und Salzwassersedimente, die für Anreicherungen unter anaeroben Bedingungen in Gläser abgefüllt und im Licht inkubiert wurden, zeigten wie erwartet eine Entwicklung von phototrophen, Schwefelwasserstoff-oxidierenden Bakterien. Diese entwickelten sich als charakteristische purpurne oder grüne, oft kreidig erscheinende Flecke. Als Inokula für die Anreicherung phototropher Organismen wurden auch Schlammproben aus Gräben verwendet, in denen sich hohe Konzentrationen an rostig-braunen Eisenpräzipitaten befanden. Einige Proben, die aus solchen Gewässern stammten, färbten sich zunächst nach etwa 1 - 2 Wochen durch die Bildung von FeS-Präzipitaten schwarz. Dieses Sulfid entstand durch die Aktivitäten von sulfatreduzierenden Bakterien, die auf im Sediment enthaltenen Substraten wuchsen. Nach etwa 4 Wochen zeigten sich Ablagerungen von Rost an der der Lichtquelle zugewandten Seite des Glases. Deshalb lag es nahe, als Ursache für die Bildung der Eisenoxide phototrophe Organismen zu vermuten. Betrachtete man von der Wand des Glases abgekratzte Proben unter einem Epifluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm, so waren keine rot fluoreszierenden Zellen zu entdecken. Diese hätten bei Anwesenheit von Organismen, die Chlorophyll *a* enthalten, zu entdecken sein müssen. Chlorophyll *a* kommt in allen bekannten Organismen mit oxygener Photosynthese wie eukaryontischen Algen oder Cyanobakterien vor. Deshalb konnte man vermuten, daß das Eisen von phototrophen Organismen oxidiert worden war, die nur ein Photosystem enthalten.

Um die Möglichkeit einer anaeroben Oxidation von Fe(II) zu prüfen, wurden Proben der rostig gewordenen Sedimente als Inokula für anaerobe Anreicherungen in einem definierten Mineralmedium verwendet, das 10 mM FeSO₄ als Elektronenquelle und CO₂ und Bicarbonat als Kohlenstoffquelle enthielt. Auch hier entwickelte sich an der lichtzugewandten Seite Rost. Dieser Vorgang spielte sich aber nur bei Inkubationstemperaturen unterhalb von 20°C ab. Das nach Zugabe des FeSO₄ zunächst als weißer, flockiger Niederschlag ausfallende FeCO₃ wurde im Licht im Verlauf von 2-3 Wochen orange bis braun. Der orangefarbene Niederschlag wies auf die Anwesenheit von Eisen(III)-Verbindungen hin. Tatsächlich konnte die Bildung von Eisen(III)-Verbindungen über chemische Bestimmung bestätigt werden. Wie Kontrollen zeigten, war die Fe(II)-Oxidation lichtabhängig und erfolgte nur in beimpften Medien. Sie erfolgte auch, wenn man die Anreicherungen in Behälter legte, in die nur Licht durch einen Infrarotfilter drang. Auf diese Weise erhielten die Kulturen nur Licht oberhalb einer

Wellenlänge von etwa 780 nm. Da Chlorophyll *a* in Organismen mit oxygener Photosynthese bis etwa 680 nm, Bakteriochlorophyll *a* aber bei 780 nm und darüber noch absorbiert, konnte man vermuten, daß die beobachtete anaerobe Fe(II)-Oxidation in der Tat durch phototrophe Bakterien mit nur einem Photosystem durchgeführt wurde. So konnte ausgeschlossen werden, daß die Fe(II)-Oxidation über freien Sauerstoff als Intermediat verlief.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde eine anaerobe Oxidation von Fe(II) im Licht in vielen anderen Ansätzen mit Inokula unterschiedlicher Herkunft beobachtet. Von solchen Anreicherungen konnten durch Überführen von 10 % Inokulum Passagen hergestellt werden, die Fe(II) zunehmend schneller oxidierten. Die Oxidation erfolgte dabei immer mit einer charakteristischen Abfolge an Farben: Das bei seiner Herstellung rein weiße Fe(II)-Präzipitat wurde durch Zugabe des Fe(III) haltigen Inokulums schmutzig-weiß. Nach einsetzender Oxidation des Fe(II) durch die Bakterien ging diese schmutzig weiße Farbe in eine grünliche über, die relativ langsam immer dunkler wurde, bis eine dunkelgrüne Färbung erreicht worden war. Diese dunkelgrüne Farbe wich dann meist recht zügig einer Orangefärbung, die das Ende der Fe(II)-Oxidation anzeigte. Eine chemische Eisenbestimmung ergab, daß bei Erreichen der orangen Färbung 85-95 % des Eisens in Form von Fe(III) vorlag. Die ersten Anreicherungen von Fe(II)-oxidierenden phototrophen Organismen bildeten meist umso schneller Fe(III)-Präzipitate, je eisenhaltiger das Gewässer war, aus dem das Inokulum stammte. In Proben aus Gewässern, in denen keine Fe(III)-Präzipitate zu entdecken waren, fand zum Teil keine Fe(III)-Bildung statt, sondern nur eine Entwicklung üblicher heterotropher oder sulfidoxidierender phototropher Organismen. Die schnellsten Anreicherungen benötigten zur vollständigen Oxidation des Fe(II) zu Beginn ca. 2 Wochen. Nach weiterer Kultivierung mit jeweils 5 % Inokulum wurde die Fe(II)-Oxidation zunehmend schneller, bis nur noch 5 bis 8 Tage benötigt wurden. Mikroskopisch dominierten in dieser Anreicherung zwischen den massiven flockigen und kompakten Fe(III)-Präzipitaten besonders in der Anfangsphase auffallend große, gasvakuolenhaltige Stäbchen, die sich zwischen den Eisenpräzipitaten befanden oder an diese angeheftet waren. In anderen, weniger schnell wachsenden Anreicherungen konnten dagegen vornehmlich bewegliche, keulenförmige Zellen, die morphologisch *Rhodospseudomonas palustris* glichen, erkannt werden. Ein dritter dominierender Zelltyp waren lange, unregelmäßige Stäbchen, die oft mit einem Zellende an die Eisenflocken angeheftet waren, oft aber auch frei im Medium treibend gesehen wurden.

C.1.2. Isolierung von Fe(II)-oxidierenden, phototropen Bakterien

Zur Isolierung der in den Anreicherungen für die Fe(II)-Oxidation verantwortlichen Organismen wurden Eisenflocken und Flüssigkeit aus der fünften Passage als Inokulum für Agarverdünnungsreihen verwendet. Diese enthielten Fe(II) als Elektronenquelle und zusätzlich 2 mM Acetat als Kohlenstoffquelle, um ein besseres Anwachsen zu gewährleisten. Solche Verdünnungsreihen wurden aufrecht stehend in ca. 50 - 60 cm Abstand von einer 25 W Glühbirne bei 20°C inkubiert. Nach ca. 2 - 3 Wochen entwickelten sich im Agar überwiegend gelbbraune und rote, glasig durchscheinende Kolonien, wie sie bei der Isolierung phototropher Organismen auf löslichen organischen Substraten auftreten. Etwa die Hälfte dieser linsenförmigen Kolonien bildeten im Verlauf ihres Wachstums langsam einen kompakten Überzug aus gelbbraunen Eisenoxiden. Wenn man diese Kolonien mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette abimpfte, waren sie nur als Ganzes aufzusaugen. Für die mikroskopische Untersuchung und Übertragung in Folgekulturen wurden die Kolonien in einem aus abgeschnittenen Pasteurpipetten gefertigten Miniaturmörser zerrieben.

Die gelbbraunen Kolonien wiesen stets den gleichen Zelltyp auf, nämlich kleine, unbewegliche, im Phasenkontrast unregelmäßig erscheinende Stäbchen. Von ihnen wurden aus allen positiven Anreicherungen zahlreiche Isolate erhalten. Etliche dieser Isolate waren unter autotrophen Bedingungen zu einer vollständigen Oxidation des Fe(II) innerhalb eines Monats fähig. Die Fe(II) Oxidation wurde durch Acetat noch beschleunigt. Eingehend untersuchte Isolate werden in dieser Arbeit mit SW2, L6 und AL4 bzw. *Rhodobacter ferrooxidans* bezeichnet.

Die roten Kolonien enthielten regelmäßig keulenförmige, bewegliche Zellen, die *Rhodopseudomonas palustris* ähnelten. Isolate dieser Zellen konnten allerdings weder unter autotrophen Bedingungen noch in Anwesenheit von organischem Substrat eine vollständige Oxidation des zugesetzten Fe(II) durchführen. Die Oxidation des Fe(II) blieb stets auf einer grünen Zwischenstufe stehen.

In den schnellsten autotroph wachsenden Anreicherungen wurden zu Beginn des Wachstums stets die gasvakuolenhaltigen Stäbchen als der dominierende Zelltyp beobachtet. Erst nach fast vollständiger Oxidation des Fe(II) kam es zu einem signifikanten Auftreten anderer Zelltypen. Wurden solche Anreicherungen als Inokulum für Agarverdünnungsreihen verwendet, fand man keine Kolonien des gasvakuolenhaltigen Zelltyps. Allerdings wurden in Anreicherungen, die mit Wasserstoff als zusätzlicher Elektronenquelle begast worden waren, an der Oberfläche treibende, makroskopische Zellaggregate beobachtet, die ausschließlich aus Zellen dieses Typs bestanden. Mit einer verjüngten Pasteurpipette wurden solche Zellaggregate aufgenommen und zweimal in frischem, sterilem Medium gewaschen. Mit einem aus Pasteurpipetten angefertigten

Miniaturmörser wurden die Kolonien dann zerrieben und als Inokulum für Agarverdünnungsreihen eingesetzt. Diese enthielten neben Fe(II) und 2 mM Acetat auch 4 mM Ascorbat als ein zusätzliches Reduktionsmittel. Die Agarröhrchen wurden bei 20°C in 50-60 cm Entfernung von einer 25 W Glühbirne inkubiert. Nach 4 Wochen Inkubation wurden in 3 parallel angesetzten Verdünnungsreihen neben Kolonien von anderen phototrophen Bakterien 4 einzelne Kolonien des gasvakuolenhaltigen Stammes entdeckt. Diese oxidierten Fe(II) in Flüssigkulturen unter autotrophen Bedingungen vollständig. Eine nochmalige Reinigung des Isolats gelang unter den genannten Inkubationsbedingungen in einer Agarverdünnungsreihe, die ausschließlich Acetat und Ascorbat enthielt. Eine auf diese Weise gewonnene Reinkultur des gasvakuolenhaltigen Isolats wird im weiteren L7 bzw. *Thiodictyon siderooxidans* genannt.

C.1.3. Morphologie und Farbe von Reinkulturen der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien

Zellen des Isolats L7 waren 2-3 μm lange und ca. 1,2 μm dicke unbewegliche Stäbchen. Morphologisch glichen sie exakt den Zellen der Schwefelwasserstoff-oxidierenden Art *Thiodictyon elegans*, die zu den Chromatiaceae gehört. Frisch angeimpfte Kulturen enthielten lange Stäbchen ohne Gasvakuolen. Am Ende der Wachstumsphase bildeten sich große, unregelmäßig geformte Gasvakuolen, und die Zellen rundeten sich zunehmend ab. Abbildung 7 zeigt Zellen aus jeder der Wachstumsphasen. Kulturen, die mit Wasserstoff als zusätzlicher Elektronenquelle begast worden waren, bildeten nach einiger Zeit auch vereinzelt überlange Zellen. Die Zellen des frischen Isolats zeigten eine stark ausgeprägte Tendenz zur Bildung von kurzen Ketten und großen z.T. auch makroskopisch sichtbaren Zellaggregaten. Diese Zellaggregate, wie auch Zellen, die auf organischem Substrat gewachsen waren, hatten eine tief violette Farbe. Nach ca. einjähriger Kultivierung unter Laborbedingungen ging die Aggregatbildung aber zunehmend verloren, und die Zellen lagen überwiegend einzeln im Medium vor. Zwar waren in Zellaggregaten oftmals Fe(III)-Präzipitate eingeschlossen, die die Zellen trotz ihrer Gasvakuolen nach unten zogen, doch zeigte die Mehrzahl der Zellen keine Assoziation mit dem Eisen. Trotz der auffallend großen gasvakuolenhaltigen Zellen war das mikroskopische Bild einer unter autotrophen Bedingungen auf Fe(II) gewachsenen Kultur, anders als beim gewohnten Anblick von Bakterienkulturen, in erster Linie durch das abgelagerte Fe(III) beherrscht. Die Zahl der Zellen war im Verhältnis zur Produktmenge relativ gering, da jedes Fe^{2+} -Ion nur ein einziges Elektron für die Photosynthese zur Verfügung stellt. Daß dieser Bakterientyp, wie auch die kleineren, stäbchenförmigen Isolate Bakterienchlorophyll *a* enthielten, und damit photosynthetische Bakterien waren, ist in den Absorptionsspektren in

Abbildung 8 zu sehen. Beide Isolate enthalten kein Chlorophyll *a*, das für Organismen mit oxygenen Photosynthese charakteristisch ist.

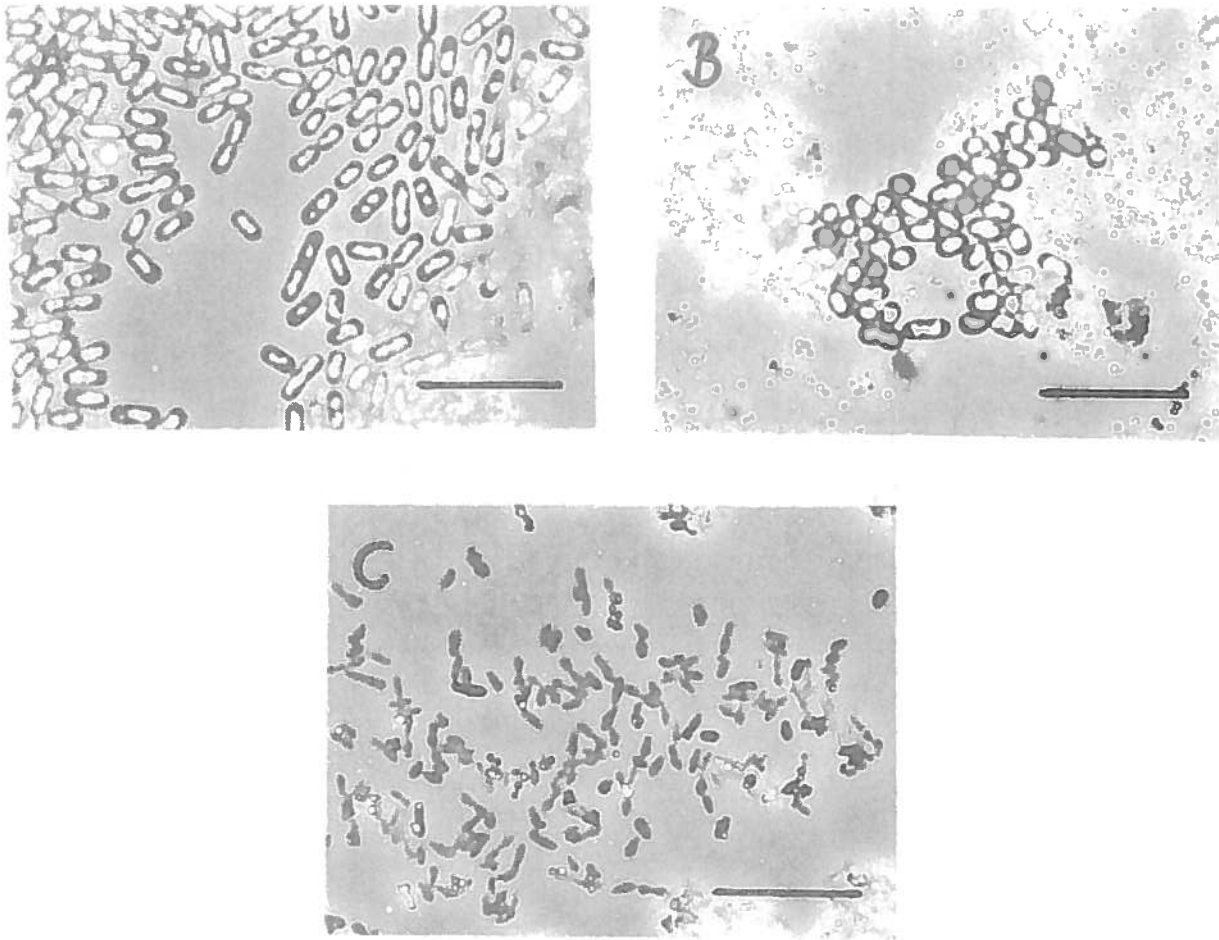


Abbildung 7: Phasenkontrastaufnahmen der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien.

Die gebildeten Eisenoxide sind als granuläre oder amorphe Präzipitate sichtbar. Um die Zelldichte in den Kulturen zu erhöhen, wurden dem Isolat L7 H_2 und dem Isolat SW2 1 mM Acetat als zusätzliche Elektronenquelle zugegeben. Der Balken bezeichnet jeweils $10 \mu m$.

- (A) Isolat L7 in einer wachsenden Kultur
- (B) Isolat L7 in einer stationären Kultur
- (C) Isolat SW2

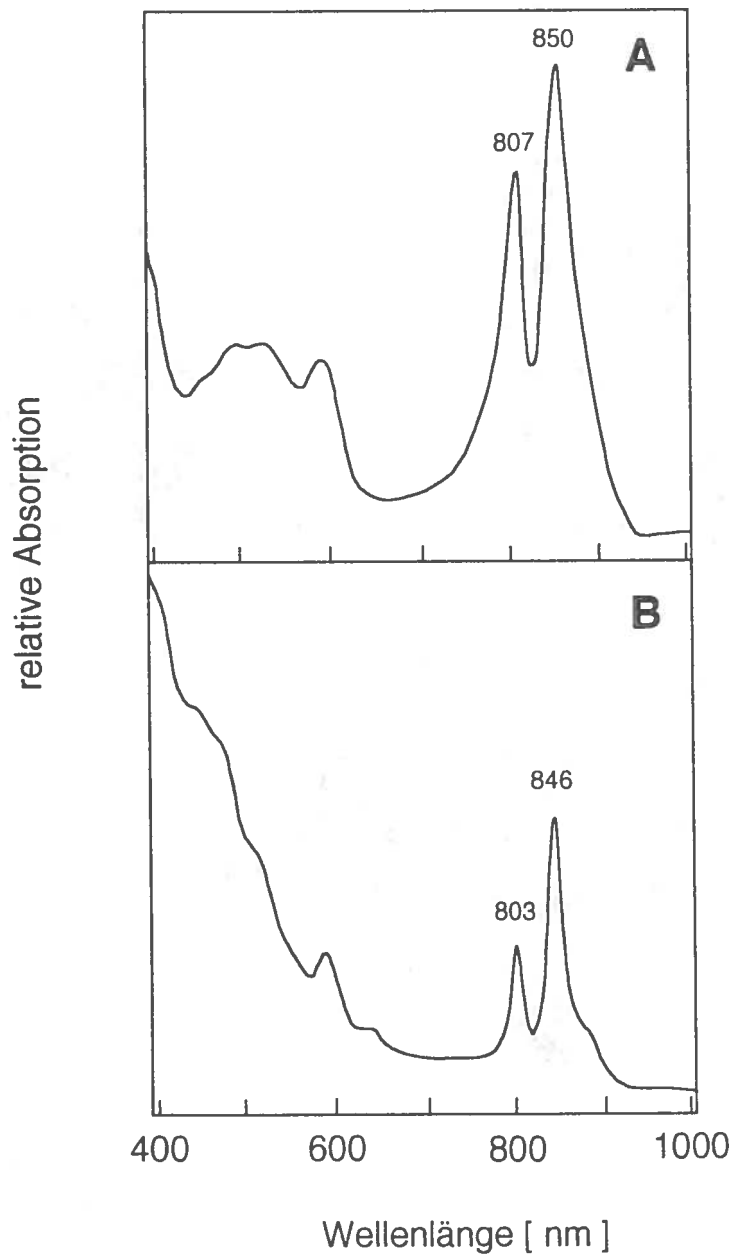


Abbildung 8: Absorptionsspektren eisenoxidierender, phototropher Organismen.

A: Absorptionsspektrum des Isolats L7.

B: Absorptionsspektrum des Isolats SW2.

Von dem Isolat L7 wurde die durch Aufbrechen der Zellen und Ultrazentrifugation erhaltene Membranfraktion untersucht, da die ganzen Zellen im Medium Aggregate bildeten. Von dem Isolat SW2 wurde die Absorption von ganzen Zellen untersucht. Dazu wurden dem Medium 5 g Saccharose pro 3 ml Kultur zugegeben, um Lichtstreuung durch Zellen zu minimieren.

Aus etwa 40 Isolaten des kleinen stäbchenförmigen Zelltyps, der im Phasenkontrast unregelmäßig kontrastiert erschien, wurden die Stämme SW2, L6 und AL4 ausgewählt, da sie bei den verwendeten Inkubationsbedingungen unter autotrophen Verhältnissen am schnellsten Fe(II) oxidierten. Etliche der Isolate stammten aus Gewässern, die nicht auffallend reich an Eisen waren. Die Zellen bildeten, je nach Wachstumsbedingungen, kleine Stäbchen mit 1,5 bis 3 μm Länge und einem Durchmesser von 0,5 μm . Die Morphologie von *Rhodobacter ferrooxidans* ist in Abbildung 7C zu sehen. Kulturen, die in Anwesenheit von organischem Substrat gewachsen waren, enthielten Kurzstäbchen, während autotroph auf Eisen gewachsene Kulturen aus unregelmäßigen Langstäbchen bestanden. Auf organischem Medium gewachsene Kulturen hatten eine gelbbraune Farbe, die an *Rhodobacter* spp. erinnerte. Auffällig war besonders bei dem Isolat SW2, daß sich die Zellen mit einem Zellpol an Eisenpartikel anhefteten, so daß in autotrophen Kulturen keine freien Zellen zu beobachten waren. Dagegen waren Zellen des Isolats AL4, das, soweit getestet, die gleichen physiologischen Charakteristika besaß, überwiegend frei im Medium zu beobachten. Das Isolat L6 kam dagegen, bei wiederum gleichen physiologischen Eigenschaften, teils frei im Medium und teils angeheftet vor.

C.1.4. Temperaturoptima von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien

Eine auffällige Beobachtung war, daß alle Anreicherungen bei Temperaturen unterhalb von 20°C wesentlich besser Fe(II) oxidierten als oberhalb dieser Temperatur. So war die Fe(II)-Oxidation in Anreicherungen, die bei 28°C inkubiert worden waren, meist sehr langsam. Die einzige Ausnahme war eine Anreicherung von marinen phototrophen Fe(II)-Oxidierern. Bei 37°C konnte in keinem einzigen Fall eine anaerobe Fe(II)-Oxidation im Licht beobachtet werden.

Bei dem vakuolenhaltigen Isolat L7 war die Fe(II)-Oxidation nur unterhalb von 25°C zu beobachten. Die Mindesttemperatur zur Fe(II)-Oxidation war 15°C. Die Temperaturoptima der Isolate SW2, AL4 und L6 lagen in sehr ähnlichen Bereichen. Von chemotrophen, neutrophilen Fe(II)-Oxidierern wie *Gallionella ferrooxidans* war ebenfalls bekannt, daß sie Fe(II) am besten bei Temperaturen unterhalb von 20°C oxidieren. Zum Vergleich wurde das Wachstum der phototrophen Isolate einmal in einer autotrophen Fe(II)-Kultur und einmal auf organischem Substrat untersucht. Neben rein praktischen Erkenntnissen zur Inkubationstemperatur konnte dabei untersucht werden, ob der von dem Organismus auf organischen Substraten bevorzugte Temperaturbereich mit jenem Temperaturbereich übereinstimmt, bei dem Fe(II) oxidiert wird.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist ein relativ gutes Wachstum der Isolate auf organischem Medium noch bei tieferen Temperaturen zu beobachten als in mineralischem Medium mit Fe(II).

Tabelle 1. Temperaturoptima der phototrophen, Fe(II)-oxidierenden Isolate.

Die autotrophen Fe(II) Kulturen und Kulturen auf Glucose wurden in jeweils 2 Parallelen über 20 Tage bei der angegebenen Temperatur inkubiert und das Wachstum protokolliert. Symbole: - kein Wachstum; (+) langsames Wachstum; + gutes Wachstum.

Isolate	Elektronen- donator	Inkubationstemperatur (°C)				
		12	15	20	25	30
L7	Fe(II)	-	(+)	+	(+)	-
	Glucose	+	+	(+)	-	-
SW2	Fe(II)	-	(+)	+	+	-
	Glucose	-	+	+	(+)	-
AL4	Fe(II)	-	+	+	+	-
	Glucose	+	+	+	+	+
L6	Fe(II)	-	+	+	+	-
	Glucose	-	+	+	+	-

C.1.5. pH-Optima von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien

Da Fe^{2+} eine schwache Ionensäure darstellt, verursachte die Zugabe von Eisen(II)-sulfat zum Medium einen deutlichen pH-Abfall. So sank der pH bei Zugabe von 10 mM FeSO_4 von 7,0 auf 6,5. Um diesen pH-Abfall auszugleichen, wurde den Kulturen 8 mM Na_2CO_3 zugegeben. Im Laufe der Arbeit stellte sich jedoch heraus, daß der bisher verwendete pH-Wert von 7,0 für die Isolate SW2, L6 und AL4 die obere Grenze darstellte. Nur das Isolat L7 zeigte bei pH 7,0 noch ein gutes Wachstum. Der für die weitere Kultivierung optimale pH-Wert wurde in Ansätzen mit verschiedenen vorgegebenen pH-Werten getestet. Wenn in Fe(II)-Kulturen alles Fe(II) zu Fe(III) oxidiert war, lag der pH-Wert immer ca. 0,3 pH-Einheiten tiefer als zu Beginn des Wachstums. Bei der Fe(II)-Oxidation werden die leicht sauren pH-Werte bevorzugt, was damit zusammenhängen könnte, daß sich im sauren mehr gelöstes Fe(II) im Medium befand. Die Isolate SW2, AL4 und L6 wuchsen auf organischem Substrat bei pH 7,0 genauso schnell wie bei pH 6,5. Das Isolat L7 konnte auf organischem Substrat selbst bei pH 7,4 noch sehr gut

kultiviert werden. In Tabelle 2 ist die Kultivierbarkeit der einzelnen Isolate unter autotrophen Bedingungen bei verschiedenem vorgegebenen pH-Werten dargestellt.

Tabelle 2. pH-Optima der phototrophen, Fe(II)-oxidierenden Isolate.

Die autotrophen Fe(II)-Kulturen wurden in 2 Parallelen über 20 Tage bei entsprechender Temperatur inkubiert und ihr Wachstum protokolliert. Symbole: - kein Wachstum; (+) langsames Wachstum; + gutes Wachstum.

Isolate	pH-Wert zu Beginn				
	6,2	6,5	6,9	7,2	8,2
L7	(+)	+	+	+	-
SW2	(+)	+	(+)	-	-
AL4	+	+	(+)	-	-
L6	(+)	+	(+)	-	-

C.1.6. Substratspektren der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien

Alle Fe(II)-oxidierenden Isolate waren auch zu photoheterotrophen Wachstum fähig. Zur näheren Charakterisierung der Eigenschaften der einzelnen Isolate wurden die Substrate ermittelt, auf denen photoheterotrophes Wachstum stattfinden konnte. Die Isolate SW2, AL4 und L6 zeigten hierbei ein übereinstimmendes Substratspektrum. Wie Tabelle 3 zeigt, wurde eine Vielzahl von niedermolekularen Verbindungen einschließlich von Aminosäuren und Zuckern verwertet.

Wachstumseigenschaften der *Rhodobacter ferrooxidans* spp.: Hierbei ähnelt die Art der verwendeten Substanzen den von *Rhodobacter* spp. verwerteten. Ungewöhnlich war nur, daß mehrere Dicarbonsäuren wie Malat, Succinat, Fumarat u.a., die sonst von phototrophen Organismen assimiliert werden können, nicht als Kohlenstoffquelle dienen. Auffallend war ferner die Verwertung der Disaccharide Maltose, Cellobiose und Saccharose durch Stamm SW2, was bei phototrophen Organismen nicht häufig vorkommt. Autotrophes Wachstum erfolgte nicht nur auf Fe(II), sondern auch auf Wasserstoff und Formiat, aber nicht auf Sulfid, Schwefel oder Thiosulfat. Sauerstoff diente als Elektronenakzeptor bei heterotrophen Wachstum der Stämme auf Acetat oder Pyruvat. Auf festen Nährböden bildeten sich dabei

kleine kirschrote Kolonien. Diese Erscheinung ist wiederum für *Rhodobacter* spp. typisch, da sie Sphaeroiden als Hauptcarotinoid besitzen, das von Sauerstoff zu einer roten Verbindung oxidiert wird. Die Synthese von Bakteriochlorophyllen wird bei nahezu allen phototrophen Bakterien durch Sauerstoff reprimiert. Fermentatives Wachstum auf Glucose oder die Verwendung von Fe(III) als Elektronenakzeptor konnte niemals beobachtet werden.

Wachstumseigenschaften von L7: Die autotrophe Oxidation von Fe(II) bei L7 war im Gegensatz zum Isolat SW2 nicht langsamer als die Fe(II)-Oxidation nach Zugabe einer organischen Kohlenstoffquelle. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, wurden die für großzellige Chromatien üblichen einfachen organischen Säuren assimiliert. Eine signifikante Beschleunigung der Fe(II)-Oxidation konnte bei L7 durch Zugabe von Wasserstoff als zusätzlicher Elektronenquelle erreicht werden. Durch den Wasserstoff wurde auch die in den Kulturen gebildete Zellmasse erhöht, was die Verwendung kleinerer Inokula beim Animpfen von Folgekulturen zuließ. Der Wasserstoff war zudem in Experimenten, bei denen kein Substrat verschleppt werden durfte, durch Begasen leicht wieder zu entfernen.

L7 ist ein strikt anaerobes Bakterium, das zum Wachstum ein Reduktionsmittel benötigt. In Kulturen mit Fe(II) übernimmt dieses die Rolle des Reduktionsmittels, in photoheterotrophen Kulturen mußte man 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel zugeben.

Wachstumseigenschaften bekannter *Thiodictyon* spp.: Das Isolat L7 ähnelte morphologisch der Spezies *Thiodictyon elegans*. Da für diese Art in der Literatur keine Substratspektren zu finden waren, wurden auch mit diesem phototrophen Bakterium Wachstumstests mit organischen Verbindungen durchgeführt. *Thiodictyon bacillosum*, die zweite beschriebene Spezies dieser Gattung, wurde ebenfalls geprüft. Wie Tabelle 3 zeigt, wurden wie häufig bei der physiologischen Gruppe der großzelligen Chromatien relativ wenige organische Verbindungen assimiliert. Ungewöhnlich war nur, daß Glucose bei allen drei Spezies beschriebenen Spezies (einschließlich *Thiodictyon elegans*) ein gutes Substrat darstellte. Fermentatives Wachstum auf Glucose oder heterotrophes Wachstum mit Sauerstoff, Nitrat oder Fe(III) als Elektronenakzeptor wurde niemals beobachtet.

Tabelle 3: Substratspektren der drei Isolate SW2, AL4, L6 sowie von Stamm L7. Zum Vergleich wurden *Thiodictyon elegans* und *Thiodictyon bacillosum* geprüft
 Die Substrate wurden in den in Klammern angegebenen Konzentrationen zugegeben. Als Inokulum dienten jeweils 3 Tropfen einer Vorkultur, die auf Acetat gewachsen war. Bei L7 wurde 4 mM Ascorbat und bei *Thiodictyon elegans* und *Thiodictyon bacillosum* jeweils 1 mM H₂S als Reduktionsmittel verwendet; ng: nicht getestet.

Elektronendonatoren	Stämme				<i>T.</i>	
	SW2	AL4	L6	L7	<i>bacillosum</i>	<i>T. elegans</i>
Fe(II) (10)	+	+	+	+	-	-
Wasserstoff	+	+	+	+	-	+
Sulfid (1)	-	-	-	-	+	+
Thiosulfat (4)	-	-	-	-	ng	ng
Formiat (5)	+	+	+	-	ng	ng
Acetat (4)	+	+	+	+	+	+
Propionat (2)	+	+	+	-	-	+
Butyrat (2)	+	+	+	-	-	-
Valerat (2)	-	-	-	-	-	-
Capronat (2)	-	+	-	-	-	-
Caprylat (2)	-	-	-	-	-	-
Pyruvat (4)	+	+	+	+	+	+
Lactat (4)	+	+	+	-	+	+
Malat (4)	-	-	-	-	+	-
Succinat (4)	-	-	-	-	+	-
Fumarat (4)	-	-	-	-	ng	ng
Citrat (4)	-	-	-	-	-	-
Benzoat (2)	-	-	-	-	ng	ng
Gluconat (2)	-	-	-	-	ng	ng
Methanol (2)	-	-	-	ng	ng	ng
Ethanol (2)	-	-	-	-	-	-
Glycerol (4)	+	+	+	+	ng	ng
Sorbitol (2)	+	+	+	-	ng	ng
Glycin (4)	-	+	+	ng	ng	ng
Alanin (4)	+	+	+	ng	ng	ng
Serin (4)	+	+	+	ng	ng	ng
Aspartat (4)	+	+	+	-	-	-
Glutamat (4)	+	+	+	-	ng	ng
Glucose (2)	+	+	+	+	+	+
Fructose (2)	+	+	+	-	-	-
Mannose (2)	+	+	+	-	ng	ng
Galaktose (2)	-	ng	ng	-	-	-
Ribose (2)	-	ng	ng	-	-	-
Xylose (2)	-	ng	ng	+	-	-
Maltose (2)	+	ng	ng	-	+	+
Cellobiose (2)	+	ng	ng	-	-	-
Saccharose (2)	+	ng	ng	-	-	-

C.1.7. Taxonomische Einordnung der Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien durch Sequenzanalyse der 16S rRNA Gene

Da das autotrophe Wachstum im Licht auf Fe(II) als Elektronenquelle eine neue Photosyntheseform darstellt, galt es zu prüfen, ob sich die Isolate aufgrund konservativer Nucleotidsequenzen in bekannte Taxa einordnen lassen oder neue Organismengruppen darstellen. Neben rein nomenklatorischen Schlußfolgerungen erlauben solche Sequenzanalysen auch Aussagen über biochemische Verwandtschaften des Photosyntheseapparats, denn dessen Aufbau und Komponenten zeigen innerhalb der bisher bekannten Gattungen keine grundsätzlichen Unterschiede. Die zur Zeit wichtigste Methode zur Aufklärung der taxonomischen Position eines Organismus, ist die Sequenzierung des 16S rRNA Gens (21). Durch Homologievergleiche mit den Sequenzen anderer Organismen kann daraus mit speziellen Computerprogrammen ein Stammbaum rekonstruiert werden (64, 87, 122). Die 16S rRNA Sequenzen von L7 und SW2 wurden über universell passende Primer mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert und wiederum mit einem Satz universeller Primer direkt von den PCR-Produkten ausgehend sequenziert (18).

Abbildung 9 zeigt die Position des Isolates SW2 im Stammbaum der α -Gruppe der Proteobakterien. Die gezeigten Stammbäume wurden freundlicherweise durch Dr. W. Ludwig von der TU München aus den rDNA Sequenzen errechnet. Die nächsten photosynthetischen Verwandten von SW2 sind *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides*. Diese Verwandtschaft war auch anhand des vorherrschenden Carotinoids zu erkennen. Kulturen der Isolate SW2, AL4 und L6 färbten sich in Anwesenheit von Sauerstoff langsam rötlich, was auf die Anwesenheit von Sphaeroiden hinwies. Diese Vermutung wurde durch Carotinoidanalysen der Isolate SW2, AL4 und L6 (Kristina Straub, persönliche Mitteilung) bestätigt. Da Sphaeroiden für die Gattung *Rhodobacter* charakteristisch ist und auch die 16S rRNA Analyse sowie morphologische und physiologische Merkmale für eine solche Verwandtschaft sprechen, wurden daher die untereinander sehr ähnlichen Isolate SW2, AL4 und L6 als *Rhodobacter ferrooxidans* bezeichnet. Der Stamm SW2 wurde als Typenstamm an die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen übersandt.

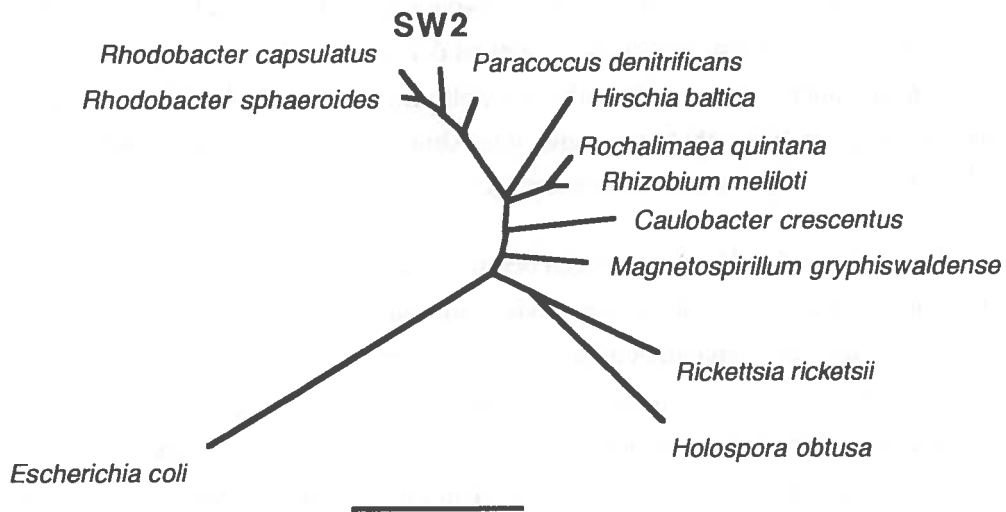


Abbildung 9: Phylogenetische Verwandtschaft von *Rhodobacter ferroxidans* SW2. Die phylogentische Einordnung des Isolats SW2 erfolgte anhand der 16S rRNA Sequenz innerhalb der α Gruppe der Proteobakterien. Die Zugehörigkeit zur Gattung *Rhodobacter* ist erkennbar. Die eingetragene Strecke entspricht 10 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA Sequenzen.

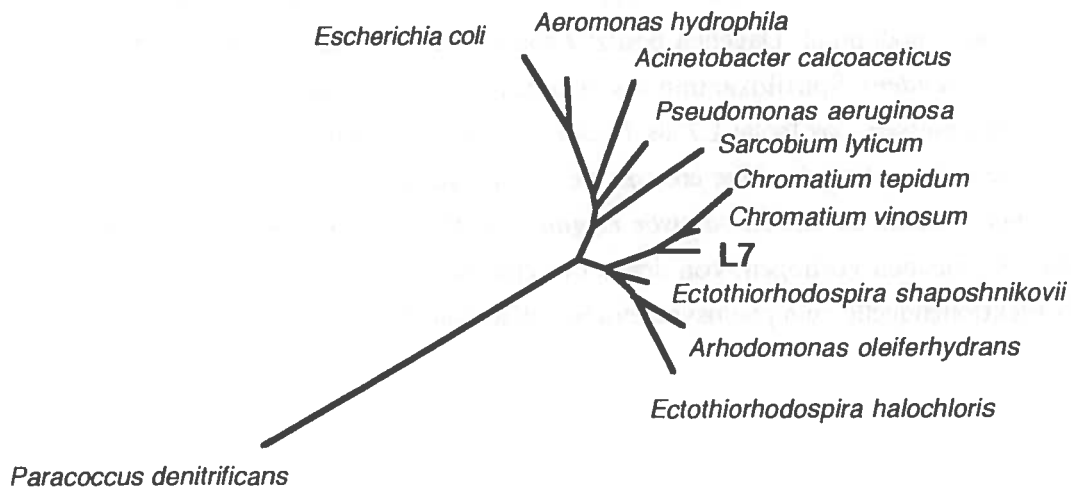


Abbildung 10: Phylogentische Verwandtschaft von *Thiodictyon siderooxidans*. Die phylogentische Einordnung des Isolats L7 erfolgte anhand der 16S rRNA Sequenz innerhalb der γ Gruppe der Proteobakterien. Die Zugehörigkeit des Isolats zu den Chromatiaceen wird erkennbar. Die eingetragene Strecke entspricht 10 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA Sequenzen.

Bei Isolat L7 ließ bereits seine charakteristische Morphologie eine verwandtschaftliche Nähe zur Gattung *Thiodictyon* vermuten. Insbesondere Zellen der Art *Thiodictyon elegans* waren weder im Assoziationsverhalten noch in ihrer Farbe und Zellform von dem Isolat L7 zu unterscheiden. Die Sequenzierung der 16S rRNA bestätigte, wie Abbildung 10 zeigt, die Zugehörigkeit des Isolats L7 zu den Chromatiaceae und damit zur γ -Gruppe der Proteobakterien.

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen befanden sich nur zwei Vergleichssequenzen von Chromatiaceae, nämlich von *Chromatium vinosum* und von *Chromatium tepidum*, in der Datenbank. Aufgrund der vorhandenen Daten war somit nicht zu erkennen, ob der Stamm L7 verwandtschaftlich zu *Thiodictyon bacillosum* und *Thiodictyon elegans* gehörte oder eine eigene Gattung darstellte. Daher wurden in der DSM durch Dr. Fred. A. Rainey die 16S rRNA Sequenzen der Organismen *Thiodictyon elegans*, *Thiodictyon bacillosum* sowie der ebenfalls vakuolenhaltigen Isolate *Lamprocystis roseopersicina* und *Amoebobacter pendens* ermittelt. Von den beiden letzteren wußte man bereits aufgrund älterer Arbeiten, die noch auf Oligonucleotidkatalogen basierten, daß eine Verwandtschaft zur Gattung *Thiodictyon* bestand (67).

Wie Abbildung 11 zeigt, steht das Isolat L7 tatsächlich den beiden Schwefelwasserstoff-oxidierenden *Thiodictyon* spp. am nächsten. Zusätzlich wurde von Kristina Straub noch die Carotinoid Zusammensetzung des Isolats L7 sowie der anderen beiden *Thiodictyon* spp. ermittelt. L7 enthält ebenso wie *Thiodictyon elegans* und *Thiodictyon bacillosum* als Hauptcarotinoid Rhodopinal. Dagegen besitzt *Lamprocystis roseopersicina* Lycopenal und *Amoebobacter pendens* Spirilloxanthin als Hauptcarotinoid. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es angemessen, das Isolat L7 als *Thiodictyon siderooxidans* und nicht als Art einer neuen Gattung zu klassifizieren. Hier eröffnet sich die interessante Möglichkeit vergleichender biochemischer Studien, da mit *Thiodictyon elegans* und *Thiodictyon siderooxidans* zwei eng verwandte Organismen vorliegen, von denen der eine Schwefelwasserstoff und der andere Fe(II) als Elektronenquelle zum photosynthetischen Wachstum benützt.

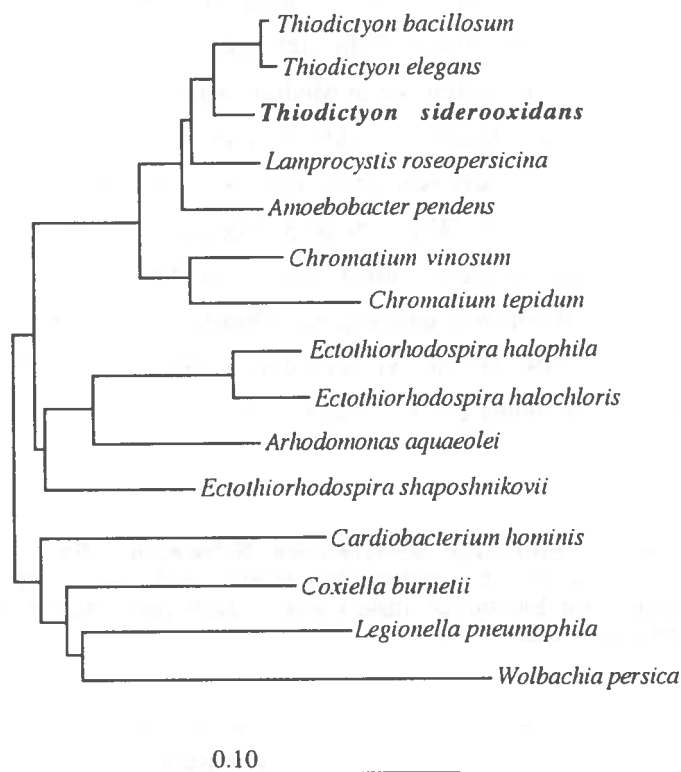


Abbildung 11: Detaillierte phylogenetische Verwandtschaften von *Thiodictyon siderooxidans* innerhalb der Chromatiaceae.

Die phylogenetische Einordnung von *Thiodictyon siderooxidans* innerhalb der γ Gruppe der Proteobakterien. Die Zugehörigkeit zur Gattung *Thiodictyon* wird bestätigt. Der Organismus stellt somit keine Spezialentwicklung innerhalb der Chromatiaceae dar. Die eingetragene Strecke entspricht 10 % evolutionärer Distanz der 16S rRNA Sequenzen.

C.1.8. Verwertung verschiedener Schwefelquellen durch *Thiodictyon* spp.

Bislang war man der Ansicht, daß in der physiologischen Gruppe der großzelligen Chromatien, zu der auch die Gattung *Thiodictyon* gezählt wird, nur reduzierte Schwefelverbindungen als Schwefelquellen verwertet werden. Diese Organismen sind nicht zu einer assimilatorischen Sulfatreduktion fähig. Da aber *Thiodictyon siderooxidans* in Medien mit einem hohen Gehalt an Fe(II) und Fe(III) wuchs, die eine Anwesenheit von gelöstem Sulfid ausschlossen, wurden die in der Gattung *Thiodictyon* verwertbaren Schwefelquellen genauer untersucht. Dazu wurden die Organismen eine Passage auf sulfatfreiem Medium kultiviert und dann in Medien mit der jeweiligen Schwefelquelle übertragen. In Abwesenheit von Sulfid wurde Ascorbat als Reduktionsmittel eingesetzt. In einer Kontrolle ohne Schwefelquelle fand nach der zweiten Passage kein Wachstum mehr statt. Wie Tabelle 5 zeigt, konnten alle *Thiodictyon* spp. die reduzierten Schwefelverbindungen Sulfid, FeS und Thiosulfat verwerten. Zu einer assimilatorischen Sulfatreduktion war dagegen nur *Thiodictyon siderooxidans* fähig. Dieser interessante Unterschied wies auf die verschiedenen ökologischen Nischen der Fe(II)-oxidierenden und H₂S-oxidierenden *Thiodictyon* spp. hin.

Tabelle 5. Durch *Thiodictyon* spp. verwertbare Schwefelquellen.

Die Kulturen wurden in mit Ascorbat reduzierten Medien mit jeweils 0,5 mM der jeweiligen Schwefelquelle übertragen. Als Elektronenquelle wurde in allen Versuchen 2 mM Acetat verwertet. Symbole: + gutes Wachstum; - kein Wachstum.

Schwefelquelle	Stämme		
	<i>Thiodictyon siderooxidans</i>	<i>Thiodictyon elegans</i>	<i>Thiodictyon bacillosum</i>
H ₂ S	+	+	+
FeS	+	+	+
S ₂ O ₃ ²⁻	+	+	+
SO ₄ ²⁻	+	-	-
ohne S-Quelle	-	-	-

C.1.9. Oxidation von Fe(II) durch bereits bekannte phototrophe Bakterien

Das Vorkommen der Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation in zwei nur entfernt verwandten Typen von Purpurbakterien warf die Frage auf, ob bereits bekannte Reinkulturen phototropher Bakterien ebenfalls zu einer anaeroben Oxidation von Eisen fähig waren. Dies war insbesondere deshalb interessant, weil in enzymatischen Tests beobachtet wurde, daß reines, oxidiertes Cytochrom *c* ($E_m = +250$ mV) bereits durch Fe(II)-Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ schnell reduziert wird (Daten nicht gezeigt). Cytochrom *c* befindet sich im Periplasma jedes phototrophen Bakteriums, Rein energetisch betrachtet sollte daher jedes phototrophe Bakterium im Prinzip zur anaeroben Oxidation von Fe(II) ($E_o' = +200$ mV) fähig sein. Daher wurden einige den Isolaten ähnliche oder mit diesen verwandte Typenstämme auf die Fähigkeit zur Fe(II) Oxidation unter autotrophen Bedingungen sowie bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wasserstoff oder organischem Substrat getestet.

Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, kam eine anaerobe Oxidation von Fe(II) in Anwesenheit von 2 mM Acetat als organischem Substrat auch bei *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris* und *Rubrivivax gelatinosus* vor. Dabei fand jedoch keine vollständige Oxidation bis zum orange-braunen Stadium, sondern eine langsame Oxidation bis zu einem grünen bis dunkelgrünen Stadium statt. Die Kulturen wuchsen in Anwesenheit von Fe(II) wesentlich langsamer als ohne Eisen. Die Fe(II)-Oxidation blieb auch in Folgekulturen unter gleichen Bedingungen stets unvollständig. Übertrug man eine unter heterotrophen Bedingungen an Fe(II) adaptierte Kultur in rein mineralisches Medium mit Fe(II), dann erfolgte keine Fe(II)-Oxidation und kein Wachstum. Man kann sich die unvollständige Fe(II)-Oxidation als ungewollte Nebenreaktion einer periplasmatischen Redoxkomponente des Photosynthesystems vorstellen. Dabei sollten dann allerdings Fe(III)-Präzipitate im periplasmatischen Raum auftreten. Diese könnten dann der Grund für das verlangsamte Wachstum in Anwesenheit von Eisen sein.

Rhodobacter capsulatus war unter autotrophen Bedingungen in Anwesenheit von H_2 fähig, Fe(II) vollständig im Licht zu oxidieren. Diese Fähigkeit blieb beim Übertragen der Kultur unverändert erhalten. Allerdings erfolgte keine Fe(II)-Oxidation und kein Wachstum, wenn man eine solche Kultur auf mineralisches Medium mit Fe(II) ohne H_2 übertrug.

Tabelle 6: Fe(II)-Oxidation durch verschiedene phototrophe Organismen.

Verschiedene Reinkulturen von phototrophen Organismen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Fe(II) zu oxidieren. Als Inokulum dienten auf Acetat gezogene photoheterotrophe Kulturen. Der Grad der Fe(II)-Oxidation wurde nach 4 Wochen Inkubation bei 20°C beurteilt. Als zusätzlicher Elektronendonator wurde 2 mM Acetat angeboten bzw. die Kulturen mit H₂ begast. Symbole: - keine sichtbare Fe(II)-Oxidation; (+) Fe(II)-Oxidation bis zu einem grünen Stadium; + Fe(II)-Oxidation bis zum orangen Stadium.

Organismen	Fe(II)-Oxidation		
	autotroph	auf H ₂	auf Acetat
<i>Thiodictyon elegans</i>	-	-	-
<i>Thiodictyon bacillosum</i>	-	-	-
<i>Lamprocystis roseopersicina</i>	-	-	-
<i>Amoebobacter roseus</i>	-	-	-
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	-	+	(+)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	-	-	(+)
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	-	-	(+)
<i>Chlorobium limicola</i>	-	-	-

C.2. Wachstumsversuche mit Fe(II)-oxidierenden Kulturen

C.2.1. Wachstumsversuche unter autotrophen Bedingungen

Die bisher nur anhand der zunehmenden orange-braunen Färbung verfolgte anaerobe Oxidation von Fe(II) im Licht sollte nun quantitativ gemessen werden. Dazu wurde in flachen 500 ml Flaschen je eine 500 ml Kultur der Isolate L7, SW2, AL4 und L6 mit 10 mM Fe(II), pH 7,0, und mit 5 % Inokulum von autotrophen Vorkulturen angesetzt. Jeden Tag wurde nach gründlichem Umschütteln eine Probe mit einer mit N₂ gespülten Einwegspritze entnommen. Als Kontrolle wurde eine auf die gleiche Weise beimpfte Kulturflasche im Dunkeln inkubiert. In den gezogenen Proben wurde das Verhältnis von Fe(III)/Fe(II) ermittelt. Jeder Meßwert, der in den Wachstumskurven aufgetragen ist, stellt den Mittelwert aus zwei Meßpunkten dar. Da sowohl Fe(II) als auch Fe(III) in flockigen Präzipitaten vorlag, die sich außerdem zum Teil in beträchtlichem Ausmaß an der Glaswand niederschlugen, war es nicht einfach, die exakten Mengen beider Eisenspezies pro Kulturvolumen über kleine Aliquots zu ermitteln. Es gelingt jedoch problemlos, das Verhältnis der beiden Eisenspezies zueinander zu messen.

Abbildung 12 stellt die Fe(II)-Oxidation durch Stamm L7 dar. Dieses Isolat ist unter autotrophen Bedingungen am schnellsten zu einer Fe(II)-Oxidation fähig. Nach Ablauf einer Lag-Phase unterschiedlicher Dauer wurden 10 mmol Fe(II)/l innerhalb von 10 Tagen oxidiert. Damit wuchs L7 mit Fe(II) als Elektronendonator nicht viel langsamer als seine Schwefelwasserstoff oxidierenden Verwandten *Thiodictyon elegans* und *Thiodictyon bacillosum*. Die Dunkelkontrolle zeigte, daß durch die Manipulationen bei der Probenentnahme kein Sauerstoff in die Kultur gelangte und Fe(II) chemisch oxidierte.

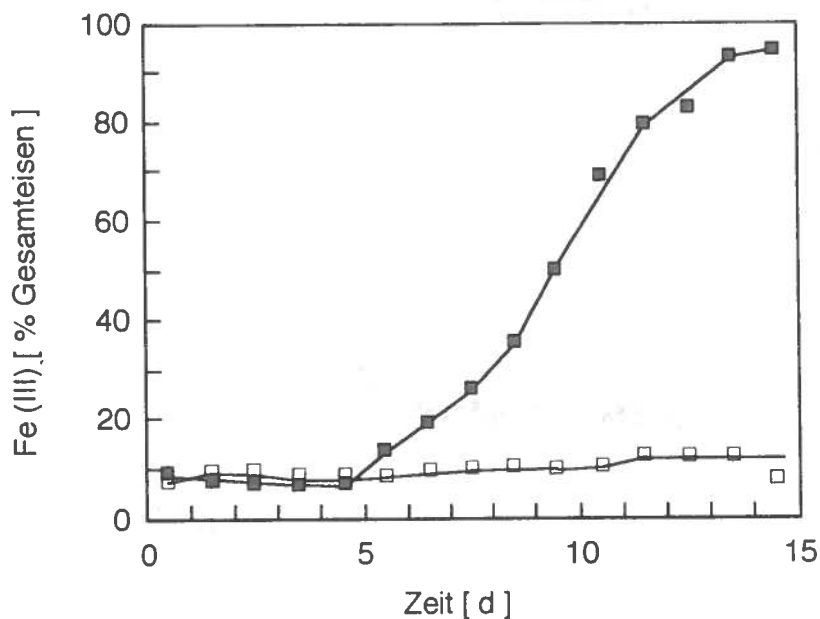


Abbildung 12: Wachstum einer autotrophen Kultur des Isolats L7.

In einer im Licht inkubierten Kultur mit 10 mM Fe(II) wurde der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt:

- : Kultur von L7, im Licht inkubiert.
- : Kultur von L7, im Dunkeln inkubiert.

Abbildung 13 zeigt das Wachstum der Isolate SW2, AL4 und L6 unter autotrophen Bedingungen. Dieses dauerte nach Ablauf verschieden langer Lag-Phasen ca. 20 Tage, also ungefähr doppelt so lange wie das entsprechende Wachstum von Isolat L7. Die Länge der Lag-Phase war, wie auch bei Isolat L7, stark vom Alter des Inokulums abhängig. Die Geschwindigkeit der Fe(II)-Oxidation während der Wachstumsphase war dagegen unter den vorgegebenen Bedingungen konstant.

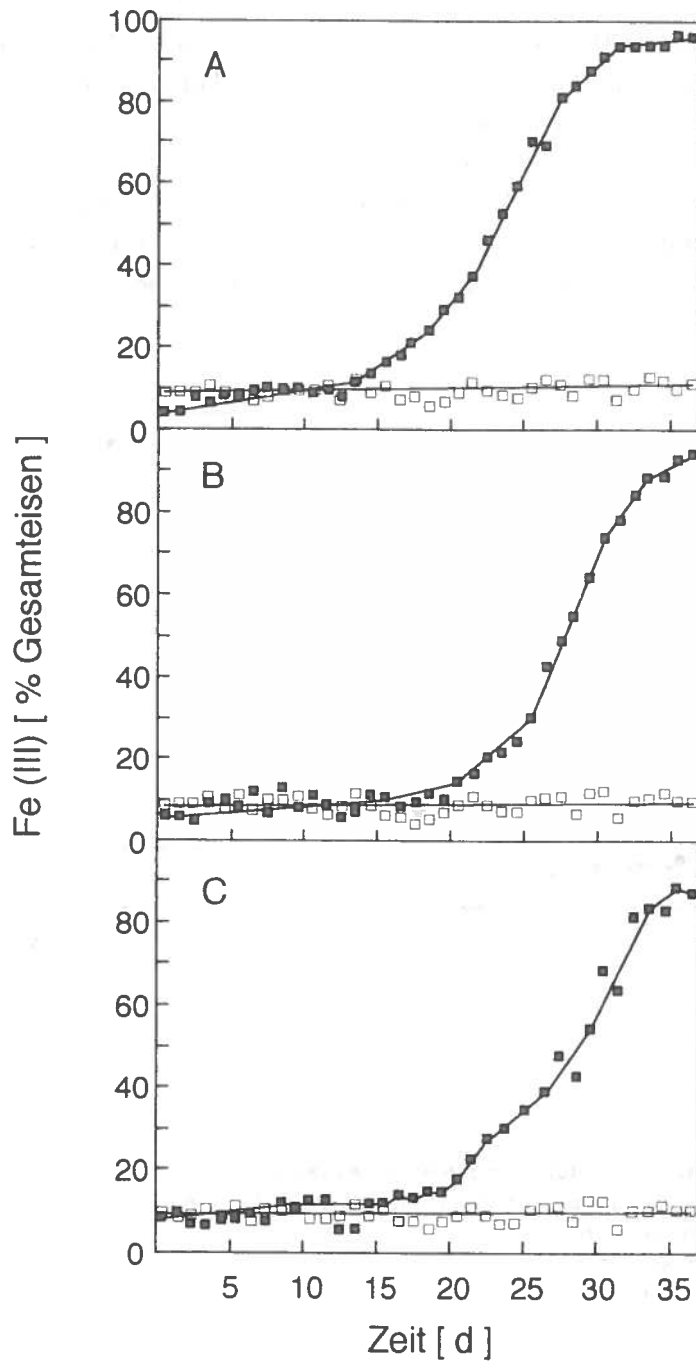
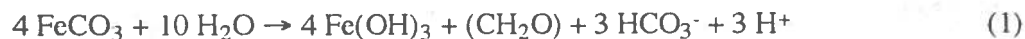


Abbildung 13: Wachstum von autotrophen Kulturen der Isolate (A) SW2, (B) AL4, (C) L6.
Bei im Licht inkubierten Kulturen mit 10 mM Fe(II) wurde der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.
■: Kulturen im Licht inkubiert.
□: Kulturen im Dunkeln inkubiert.

C.2.2. Nachweis des autotrophen Wachstums durch Bestimmen des Zellertrags

Zum Nachweis des autotrophen Wachstums mit Fe(II) als Elektronendonator im Licht sollten über die Messung des Zellproteins die Wachstumserträge bestimmt werden. In einem Vorversuch mit Stamm L7 wurde ein Verhältnis von Protein zu Trockenmasse von 0,55 bis 0,60 ermittelt. Dieser Wert stimmt auch mit dem für *E. coli* angegebenen überein (149) und wurde auch als Berechnungsgrundlage für die Ermittlung der Zelltrockenmasse bei den Isolaten SW2 und AL4 verwendet. Der theoretische Wert des Zellertrages von 7,5 g/mol wurde aus folgender Reaktionsgleichung abgeleitet, in welcher (CH₂O) die ungefähre Zusammensetzung der Zellsubstanz darstellt:



Diese Gleichung wurde mit den vorherrschenden Mineralien in einem mit Bicarbonat gepufferten Medium und bei einem pH-Wert nahe der Neutralität formuliert. Eine Ausfällung der Phosphate durch Eisen(III)-Mineralien wurde nicht berücksichtigt. Da zur Zeit die genaue Natur der gebildeten Eisen(III)-Verbindungen unbekannt ist, wird das gebildete Fe(III) der Einfachheit halber als Eisen(III)-Hydroxid dargestellt. Wie aus Tabelle 7 zu ersehen ist, stimmen die Wachstumserträge der autotrophen Kulturen recht gut mit dem theoretischen Wert überein. Die Fe(II)-Oxidation wurde bei dem Isolat L7 durch Wasserstoff etwa um das doppelte beschleunigt. Dabei wurde durch den Wasserstoff ein siebenfach höherer Zellertrag als in Kulturen mit Fe(II) als einzigem Elektronendonator erzielt, was nochmals die Fähigkeit von L7 zu autotrophen Wachstum unterstreicht.

Tabelle 7. Anaerobe Oxidation von Fe(II) und Synthese von Zellmasse durch die Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Isolate unter autotrophen Bedingungen.

Die Zellmasse wurde anhand des Proteingehalts der Kulturen bestimmt. Dazu wurden die Eisenpräzipitate und Zellen abzentrifugiert und das Eisen in HCl gelöst. Das Protein wurde mit TCA gefällt und das erhaltene Pellet gewaschen. Das Pellet wurde in verdünnter NaOH aufgenommen und die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt. ng: nicht getestet, da der verbrauchte H₂ nicht gemessen wurde

	Stamm			
	L7	L7	SW2	AL4
eingesetztes Fe(II) (mmol/l)	10,0	10,0	10,0	10,0
Zusätzlicher Elektronendonator	-	H ₂	-	-
Oxidiertes Fe(II) (mmol/l)	9,5	9,6	9,5	9,3
produzierte Zelltrockenmasse (mg/l)	72	500	72	82
Wachstumsertrag (g/mol)	7,6	ng	7,6	8,8

C.2.3. Oxidation von FeS durch die phototrophen Isolate

Neben dem hauptsächlich als FeCO₃ präzipitierenden Fe(II) gibt es mit FeS und FeS₂ zwei weitere Eisen(II)-Verbindungen von ökologischer Bedeutung. Diese beiden Substanzen unterscheiden sich vom FeCO₃ dadurch, daß sie völlig unlöslich sind. Auf FeS als Substrat wurden Anreicherungen erhalten, die diese tiefschwarze Verbindung in ein hellbraunes Sediment verwandelten.

Deshalb lag es nahe, die Fe(II)-oxidierenden Isolate auch auf ein Wachstum auf FeS zu prüfen. Dabei wurde ein Süßwassermedium ohne Sulfat verwendet, um so eine spätere quantitative Bestimmung zu erleichtern. Es wurden 5 mmol FeS pro l als Substrat unter autotrophen Bedingungen eingesetzt. Diese Konzentration stellt ungefähr die Grenze dar, bei der in flachen Flaschen noch genug Licht für eine Photosynthese in die Kultur dringen kann. Die Isolate AL4, SW2 und L6 entfärbten die FeS-Suspension innerhalb von 14 Tagen. Das Isolat L7 verwertete ebenfalls FeS, allerdings langsam innerhalb von zwei Monaten. Folgepassagen mit 20 % Inokulum oxidierten die FeS-Suspension dann innerhalb von 3 Wochen. Obwohl nie ein Wachstum auf freiem H₂S beobachtet werden konnte und auch Thiosulfat nicht als Elektronenquelle verwendet wurde, konnte man beim Wachstum auf FeS lichtbrechende Tröpfchen in den Zellen erkennen, die genauso aussahen wie die Schwefeltröpfchen in jungen Kulturen von *Thiodictyon elegans*. Das bedeutet, daß L7 Enzyme zur Oxidation von Schwefelverbindungen besitzen muß. Auch *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodospseudomonas*

palustris entfärbten unter autotrophen Bedingungen die schwarze FeS Suspension innerhalb eines Monats. Folgepassagen des Isolats L7, mit 10 % Inokulum, oxidierten die FeS-Suspension dann innerhalb von 2 Wochen. Sterile Kontrollen, die im Licht inkubiert worden waren, blieben dagegen schwarz. Auf FeS gewachsene Kulturen wurden als Inokulum zur quantitativen Bestimmung der gebildeten Endprodukte verwendet. Dazu wurden in sulfatfreiem Medium genau 5 mM FeS als Substrat unter phototrophen Bedingungen eingesetzt. Das Inokulum betrug 10 % und bei L7 20%, um eine kurze Wachstumszeit zu erreichen. Tabelle 8 zeigt, daß der Schwefelanteil des FeS quantitativ in Sulfat überführt wurde. Daß die Werte über 5 mM liegen, rührte von über das Inokulum eingetragenen Sulfat her. Man kann die FeS-Verwertung dieser Isolate somit in folgender Gleichung darstellen:

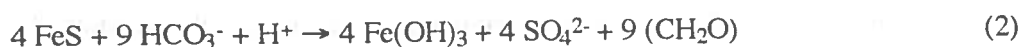


Tabelle 8. Oxidation von FeS durch phototrophe Fe(II)-oxidierende Isolate.

Die Kulturen wurden in sulfatfreiem Medium mit einer Suspension von FeS hergestellt und mit 10% (Stämme SW2, L6, AL4) bzw 20% (Stamm L7) Inokulum beimpft. Nachdem die schwarze Farbe verschwunden war und mikroskopisch in Zellen von L7 keine Schwefelgranula mehr sichtbar waren, wurde das Sulfat quantitativ durch Ionenchromatographie bestimmt und eine Eisenbestimmung durchgeführt.

Stamm	Inkubationsbedingungen	gemessene Produkte	
		Sulfat [mM]	Fe(II) oxidiert
AL4	Dunkel	0,8	-
	Licht	5,2	+
	Licht	4,4	+
L6	Dunkel	0,7	-
	Licht	5,3	+
	Licht	5,2	+
SW2	Dunkel	0,8	-
	Licht	5,3	+
	Licht	5,4	+
L7	Dunkel	1,0	-
	Licht	5,7	+
	Licht	5,8	+

C.2.3. Wachstum bei gleichzeitigem Vorhandensein von Fe(II) und organischem Substrat

Wenn man Kulturen in Medien mit Fe(II) organisches Substrat als zusätzlichen Elektronendonator und Kohlenstoffquelle zugab, stellte man nach vollständiger Oxidation des Fe(II) im Mikroskop eine deutliche Erhöhung der Zelldichte fest. Insbesondere bei den Isolaten SW2, AL4 und L6 wurde ferner eine drastische Erhöhung der Geschwindigkeit der Fe(II)-Oxidation beobachtet: 10 mM Fe(II) wurden in 5 Tagen vollständig oxidiert, sofern nicht mehr als 2 mM Acetat zugesetzt wurden. Das Isolat L7 bildete dagegen in Anwesenheit von Acetat oder Glucose zwar deutlich mehr Zellmasse als unter autotrophen Bedingungen, die Steigerung der Oxidationsgeschwindigkeit des Fe(II) war aber deutlich geringer als mit Wasserstoff als Cosubstrat. Für die Frage der Induzierbarkeit der Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation war es zudem von Interesse zu beobachten, ob das Eisen vor, während oder nach der Verwertung des organischen Substrates oxidiert wird. Um die allgemeine Gültigkeit der dabei gemachten Aussagen zu bestätigen, wurden jeweils mit Glucose bzw. Acetat zwei grundsätzlich verschiedene organische Substrate angeboten. Bei der Verwertung von Acetat sind besondere Assimilationsreaktionen erforderlich, da die Zelle von einem C₂-Körper ausgehend Gluconeogenese und andere Biosynthesen betreiben muß. Glucose kann dagegen leicht in die wichtigsten Zellbausteine überführt werden.

Abbildung 14 zeigt das Wachstum von Stamm SW2 auf 5 mM Glucose und 10 mM Fe(II). Man erkennt, daß beim Zusatz von Glucose in einer relativ hohen Konzentration von 5 mM während des Wachstums auf dem organischen Substrat keine Oxidation des Fe(II) stattfand. Man könnte sich allerdings auch einen Spezialfall vorstellen, in dem Glucose ein der bekannten Katabolitrepression analoges Phänomen bewirkt haben könnte. Dabei hätte Glucose dann die Verwertung aller anderen Substrate reprimiert. Daher sollte die Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation auch bei Verwendung von anderen organischen Substraten geprüft werden. Ein analoger Versuch unter Verwendung von geringen Acetat-Konzentrationen als organischem Substrat war auch deshalb von Interesse, da während der Kultivierung beobachtet wurde, daß sich die Fe(II) Oxidation bei den Isolaten SW2, AL4 und L6 drastisch steigern läßt, wenn man den Kulturen 1 mM Acetat zugab. In der Dunkelkontrolle wurde sichergestellt, daß während der Inkubationszeit keine Fe(II)-Oxidation etwa durch Eintrag von Luftsauerstoff stattfand. Außerdem konnte festgestellt werden, daß das Isolat SW2 nicht zu einem heterotrophen Dunkelwachstum auf Glucose durch Fermentation fähig war.

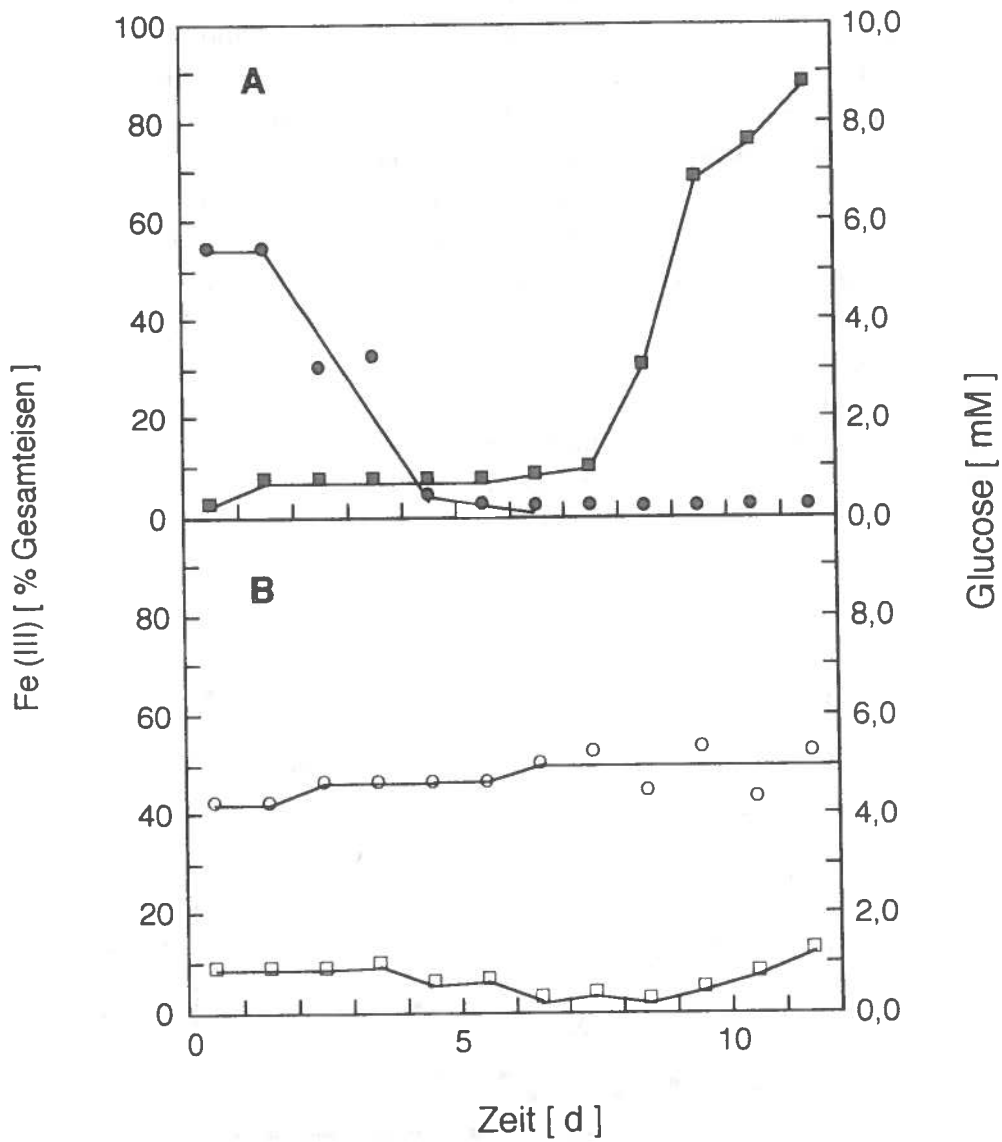


Abbildung 14: Wachstum einer Kultur des Isolats SW2 auf Eisen und Glucose.

A : Im Licht inkubierte Kultur.

B : Im Dunkeln inkubierte Kultur.

Von einer Kultur mit 10 mM Fe(II) und 5 mM Glucose wurde der Verlauf der Glucosekonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Als Inokulum diente eine unter gleichen Bedingungen gezogene Vorkultur.

●: Glucosekonzentration

■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

○: Glucosekonzentration der Dunkelkontrolle

□: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen der Dunkelkontrolle

Wie die Abbildungen 15 und 16 zeigen, wurde sowohl bei Verwendung einer hohen Acetatkonzentration von 5 mM als auch bei Verwendung einer niedrigen Acetatkonzentration von 1 mM das organische Substrat zuerst verwertet und während dieser Zeit das Fe(II) nicht oxidiert. Die Dunkelkontrollen zu diesen Versuchen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet, da sie nur bestätigen, daß im Dunkeln keine Fe(II)-Oxidation stattfand. Die Oxidation von Fe(II) erforderte also offensichtlich die Anwesenheit spezifischer Redoxkomponenten und kann nicht auch durch redoxaktive Proteine nebenbei bewerkstelligt werden, da sonst wenigstens eine langsame Oxidation des Fe(II) schon bei dem Wachstum auf organischem Substrat sichtbar gewesen wäre. Die starke Beschleunigung der Fe(II)-Oxidation durch Zugabe organischer Substrate bei den Isolaten SW2, AL4 und L6 beruhte offensichtlich nur darauf, daß nach dem anfänglichen Wachstum auf dem organischen Substrat eine größere Zahl aktiv wachsender Zellen für die Fe(II)-Oxidation zur Verfügung stand als in rein autotrophen Kulturen. Die eigentliche Fe(II)-Oxidation fand nach Verbrauch des organischen Substrates unter autotrophen Bedingungen statt.

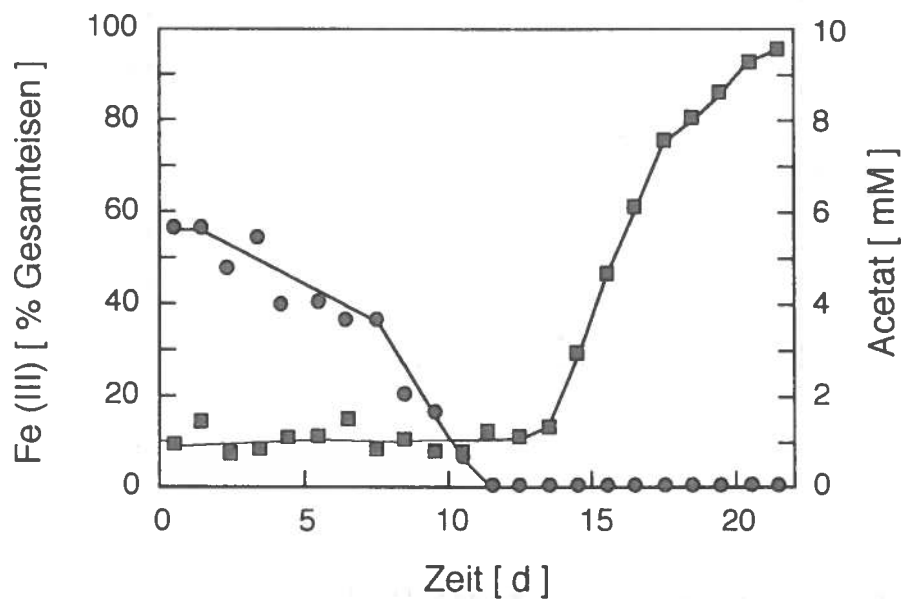


Abbildung 15: Wachstum des Isolats SW2 auf Eisen und einer hohen Acetatkonzentration.

Von einer im Licht inkubierten Kultur mit 10 mM Fe(II) und 5 mM Acetat wurde der Verlauf der Acetatkonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

- : Acetatkonzentration
- : Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

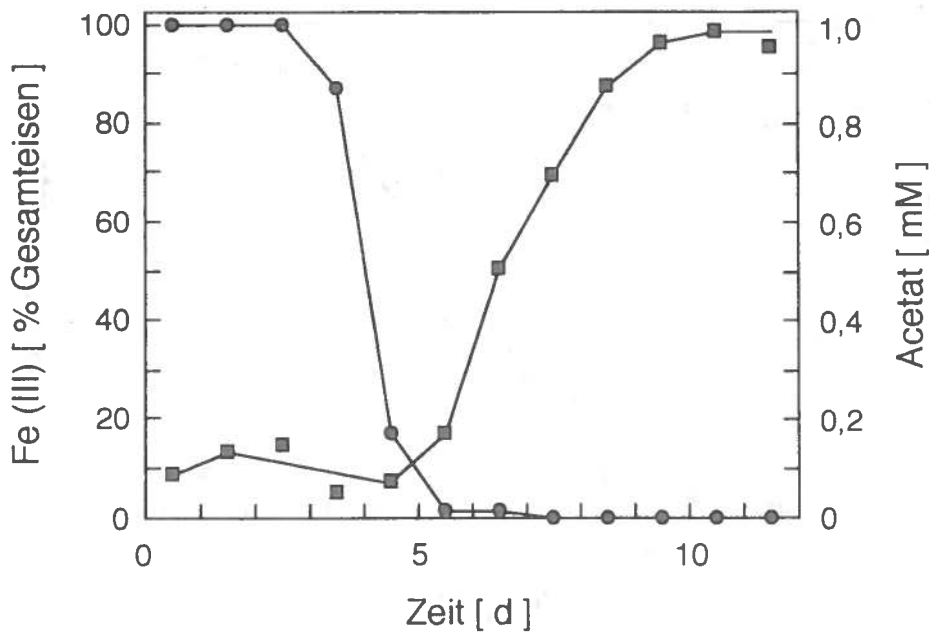


Abbildung 16: Wachstum des Isolats SW2 auf Eisen und einer niedrigen Acetatkonzentration.

Von einer im Licht inkubierten Kultur mit 10 mM Fe(II) und 1 mM Acetat wurde der Verlauf der Acetatkonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

- : Acetatkonzentration
- : Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

Das Isolat L7 verwertete dagegen, wie in den Abbildungen 17 und 18 erkennbar ist, Fe(II) gleichzeitig mit dem organischen Substrat, unabhängig davon, ob Glucose oder Acetat zugesetzt wurde. Diese Feststellung ist bei der Beurteilung der Zellsuspensionsexperimente von Bedeutung (siehe C.5.2.). Die gleichzeitige Verwertung eines organischen Elektronendonators und eines organischen Substrats wurde auch bei Schwefelwasserstoff-oxidierenden Chromatien beobachtet (56). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Dunkelkontrollen verzichtet, da sie wiederum nur bestätigen, daß im Dunkeln weder Fe(II)-Oxidation noch Glucoseverbrauch stattgefunden hat

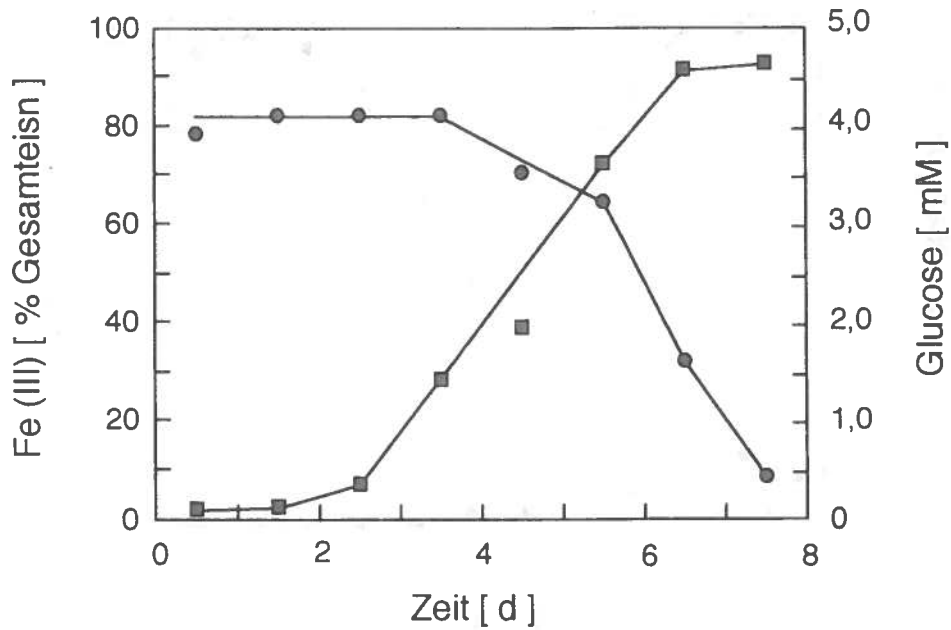


Abbildung 17: Wachstum einer Kultur des Isolats L7 auf Eisen und Glucose.

Von einer im Licht inkubierten Kultur mit 10 mM Fe(II) und 5 mM Glucose wurde der Verlauf der Glucosekonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen bestimmt.

- : Glucosekonzentration
- : Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

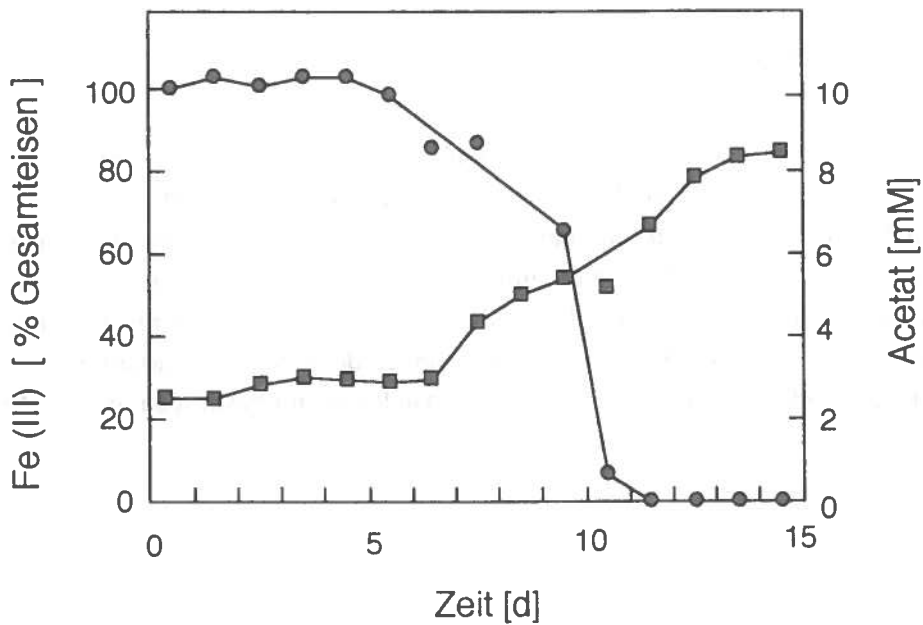


Abbildung 18: Wachstum des Isolats L7 auf Eisen und Acetat.

Von einer im Licht inkubierten Kultur mit 10 mM Fe(II) und 10 mM Acetat wurde der Verlauf der Acetatkonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

- : Acetatkonzentration
- : Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

C.3. Physikochemische Charakterisierung der phototroph gebildeten Eisen(III)-Spezies

Um die durch die oben beschriebenen Isolate gebildeten Eisen(III)-Spezies näher zu charakterisieren, sollte eine physikochemische Analyse durchgeführt werden. Dabei sollte sich zeigen, ob auch stärker kristallines Eisen wie Goethit oder Hämatit gebildet wurde. Insbesondere war von Interesse, ob sich die durch die phototrophen Eisenoxidierer SW2 und L7 gebildeten Eisen(III)-Spezies voneinander unterschieden. Die Eisen(III)-Präzipitate von Kulturen dieser Organismen hatten nämlich eine unterschiedliche Farbintensität. Durch SW2 und alle ähnlichen Isolate gebildetes Fe(III) wies eine leuchtend orange Farbe auf, während durch L7 gebildetes Fe(III) eine blässere, kroidigere Färbung aufwies. Die Charakterisierung wurde dankenswerterweise durch Frau Marianne Hanzlik vom Institut für Allgemeine und Angewandte Geophysik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Proben zeigen morphologisch unterschiedliche Bereiche mit kugeligen Aggregaten und fedrigen Anhäufungen. Elementaranalysen ergaben, daß durch L7 und SW2 gebildete Fe(III)-Präzipitate zu ca. 95% aus Eisen-Phosphor-Verbindungen bestanden, die sehr schlecht kristallisiert bzw. amorph waren. Nur an einigen wenigen Stellen war der Phosphoranteil deutlich geringer. Bereiche mit einem niedrigen Phosphoranteil lagen zwischen den fedrigen Aggregaten und bestanden aus einem extrem feinkörnigen Material. Beugungsaufnahmen deuteten auf Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) hin. Durch Stamm L7 gebildetes Eisenpräzipitat enthielt davon etwas mehr als solches von Stamm SW2. Neben Maghemit gab es noch Spuren von wahrscheinlich Lepidokrokit ($\gamma\text{-FeOOH}$). Magnetische Hysterese-messungen an der Probe L7 lassen auf einen sehr geringen (ca. 5%) ferromagnetischen Anteil schließen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen.

C.4. Reduktion von photosynthetisch oxidiertem Fe(III) durch dissimilatorische Eisenreduzierer

C.4.1. Reduktion des Fe(III) im Dunkeln durch *Geobacter metallireducens*

Mit der Bildung von Fe(III) durch phototrophe Bakterien unter anoxischen Bedingungen steht ein potentieller Elektronenakzeptor für chemotrophe anaerobe Abbauprozesse zur Verfügung. Daher wurde geprüft, ob das durch die Isolate L7 oder SW2 gebildete Fe(III) durch Fe(III)-reduzierende Bakterien als Elektronenakzeptor verwertet werden konnte. Als Fe(III)-reduzierendes Bakterium wurde *Geobacter metallireducens* verwendet (129). Dazu wurden in flachen 500 ml Flaschen autotrophe 250 ml Kulturen von L7 und SW2 angelegt. Nach Erreichen einer orange-braunen Färbung wurde den Kulturen 2,0 mM Acetat als Kohlenstoffquelle für *Geobacter* zugegeben, und der Ansatz wurde mit *Geobacter* inokuliert. Die Kulturen wurden dann bei 30°C im Dunkeln inkubiert, um eine erneute photosynthetische Oxidation des durch die dissimilatorische Fe(III) Reduktion von *Geobacter* gebildeten Fe(II) auszuschließen. Acetat wurde deshalb als Kohlenstoffquelle verwendet, weil es von *Geobacter* sehr gut verwertet werden kann, aber von SW2 im Dunkeln nicht assimiliert wird. Für die Oxidation von 1 mol Acetat durch *Geobacter* werden 8 mol Fe(III) benötigt (30) :

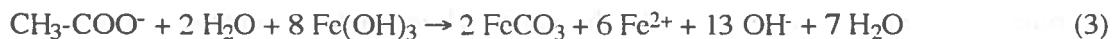


Abbildung 20 zeigt die Oxidation von Acetat durch *Geobacter* mit Fe(III) aus einer autotrophen Kultur von SW2 mit 10 mmol Eisen/l. Vor dem Zusatz von *Geobacter* waren ca. 8 mM Fe(III)/l gebildet worden. Man kann erkennen, daß das Fe(III) vollständig zu Fe(II) reduziert wurde. Das mikrobiell oxidierte Fe(III) wurde nicht wie durch Lauge gefälltes Fe(OH)₃ zu Magnetit als Hauptprodukt umgesetzt (132), sondern vollkommen zu Fe(II) reduziert. Die orange-braune Fe(III) Suspension wurde dabei farblos und es wurden mikroskopische, farblose Kristalle sichtbar, die wahrscheinlich aus Siderit bestanden (siehe Abbildung 19). Abbildung 21 zeigte die Acetatoxidation durch *Geobacter* mit Fe(III) aus einer autotrophen Kultur von L7 mit 10 mM Eisen. Bezüglich der Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Reduktion des Fe(III) bestanden also zwischen den durch die Isolate L7 und SW2 gebildeten Eisen(III)-Spezies keine Unterschiede.

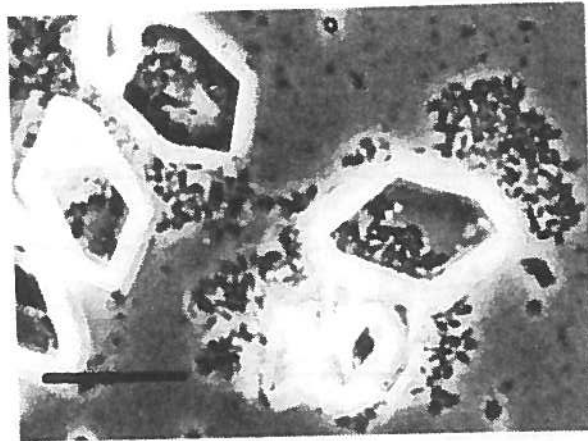


Abbildung 19: Bildung von Sideritkristallen nach der Fe(III)-Reduktion durch *Geobacter*.

Zu einer autotrophen Kultur von SW2 mit 10 mM Fe(II) wurden nach Beendigung des Wachstums 2 mM Acetat zugegeben und der Ansatz mit *Geobacter metallireducens* beimpft. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 30°C. Der undurchsichtige orange-braune Niederschlag verschwand im Verlauf des Wachstums und das Medium wurde farblos. In Proben der Kultur wurden farblose Kristalle sichtbar, die wahrscheinlich aus Siderit und Eisen(II)-Phosphaten bestanden. Der Balken bezeichnet 10 μm .

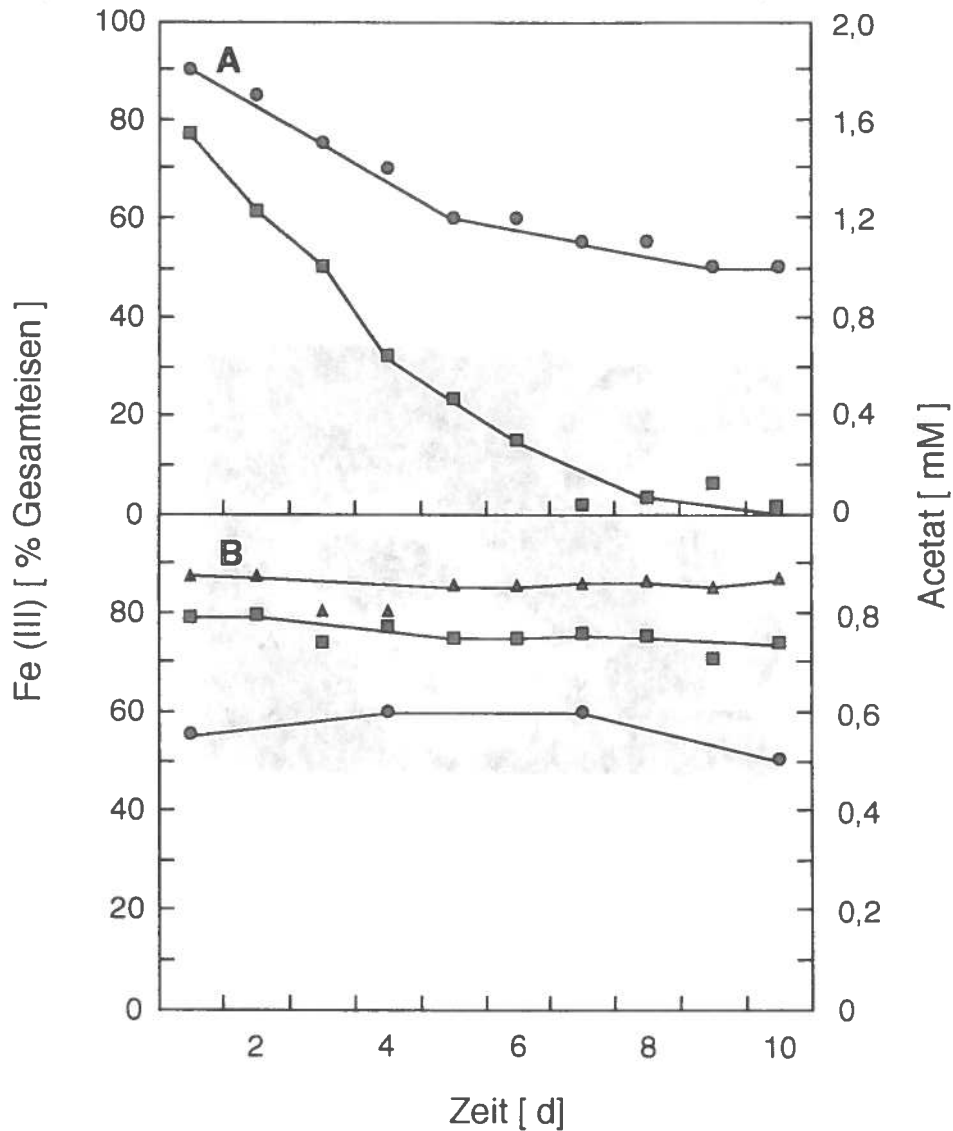


Abbildung 20: Wachstum von *Geobacter metallireducens* auf durch SW2 oxidiertem Eisen.

Zu einer gewachsenen Kultur von Stamm SW2 mit 10 mmol Gesamteisen/l wurde Acetat zugegeben und der Ansatz mit *Geobacter* beimpft. Die Kultur wurde dann bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Der Verlauf der Acetatkonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Das durch die phototrophen Organismen gebildete Fe(III) kann wieder vollständig als Elektronenakzeptor verwendet werden.

A: ●: Acetatkonzentration
■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen

B: ●: Acetatkonzentration in einem Kontrollansatz ohne Zugabe von *Geobacter*.
■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen in einem Kontrollansatz ohne Zugabe von *Geobacter*.
▲: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen in einem weiteren Kontrollansatz mit *Geobacter* ohne Zugabe von Acetat.

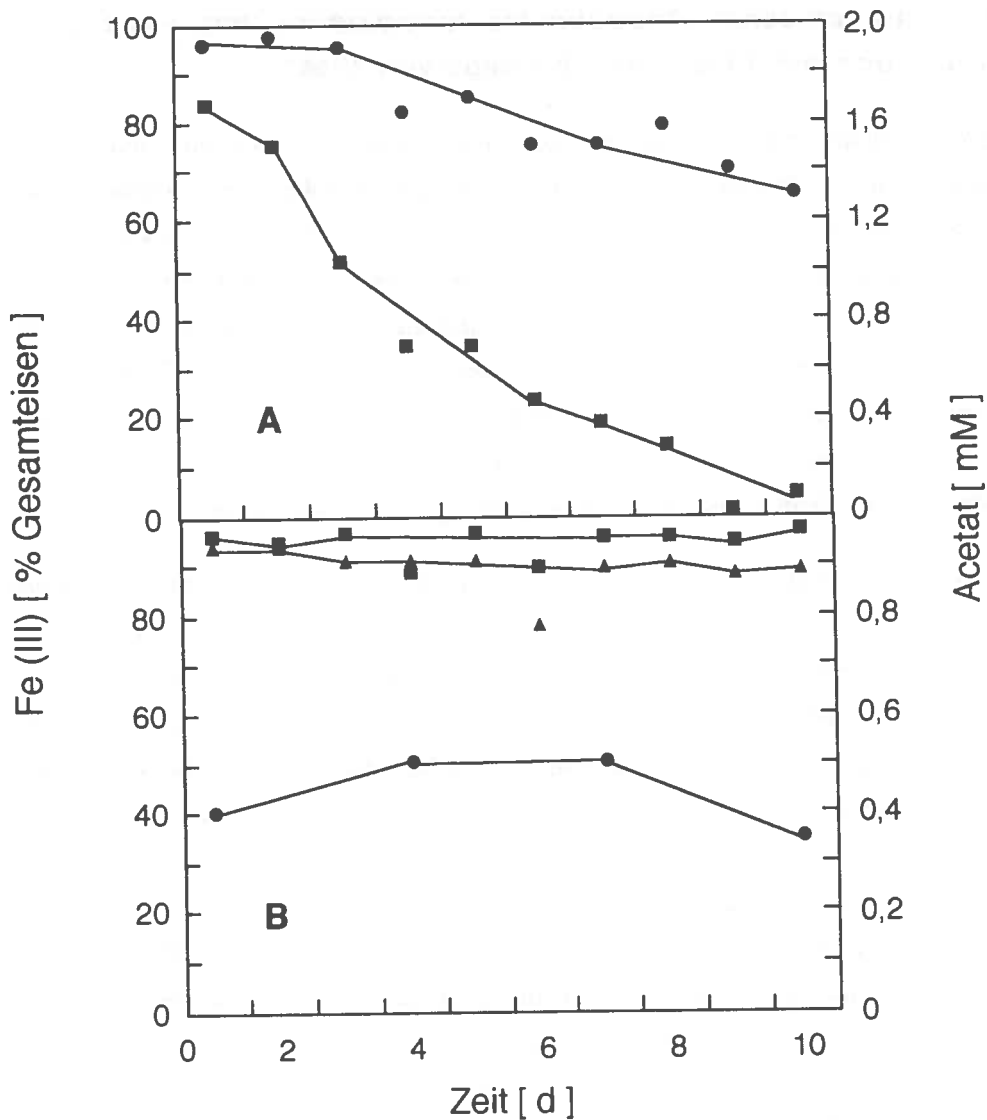


Abbildung 21: Wachstum von *Geobacter metallireducens* auf durch L7 oxidiertem Eisen.

Zu einer gewachsenen Kultur von Stamm L7 mit 10 mmol Gesamteisen/l wurde Acetat zugegeben und der Ansatz mit *Geobacter* inokuliert. Die Kultur wurde dann bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Der Verlauf der Acetatkonzentration und der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Das durch die phototrophen Organismen gebildete Fe(III) kann wieder vollständig als Elektronenakzeptor verwendet werden.

- A: ●: Acetatkonzentration
 ■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen
- B: ●: Acetatkonzentration in einem Kontrollansatz ohne Zugabe von *Geobacter*.
 ■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen in einem Kontrollansatz ohne Zugabe von *Geobacter*.
 ▲: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen in einem weiteren Kontrollansatz mit *Geobacter* ohne Zugabe von Acetat.

C.4.2. Kokultur zwischen *Rhodobacter ferrooxidans* und *Geobacter metallireducens* mit Eisen als Überträger von Elektronen

In Analogie zu bekannten Kulturen zwischen *Desulfoomonas acetoxidans* und *Chlorobium limicola* kann man sich eine Kokultur zwischen einem phototrophen, Fe(II)-oxidierenden und einem dissimilatorisch Fe(III)-reduzierenden Organismus vorstellen. In der Kokultur zwischen *Chlorobium* und *Desulfoomonas* oxidiert das *Chlorobium* Schwefelwasserstoff im Licht zu elementarem Schwefel und *Desulfoomonas* reduziert diesen dann als Elektronenakzeptor in einem Respirationsvorgang wieder zu Schwefelwasserstoff. In dem auf Eisen basierenden analogen Fall sollte durch das Isolat SW2 das Fe(II) im Licht zu Fe(III) umgesetzt werden, welches dann *Geobacter metallireducens* als Elektronenakzeptor bei der Oxidation von organischem Substrat dient. Diese Idee ist in Abbildung 22 nochmals verdeutlicht.

Als organisches Substrat wurde Benzoat gewählt, da diese Verbindung zwar von *Geobacter* gut verwertet wird, dagegen von SW2 nicht assimiliert werden kann, wie die Substrattests zeigten. Zudem ist eine Dissimilation von Benzoat nur über eine Respiration und nicht etwa durch Fermentation möglich. Nachteilig an diesem Substrat ist eine gewisse Giftigkeit. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß Stamm SW2 bei höheren Benzoatkonzentrationen als 1 mM sehr langsam wächst. Gutes Wachstum von SW2 war lediglich unterhalb von 0,5 mM Benzoat zu beobachten. Daher sollte keine wesentlich höhere Benzoat-Konzentration in dem Versuch eingesetzt werden. Das Isolat L7 zeigte gegenüber Benzoat eine noch größere Empfindlichkeit, so daß die Kokulturrexperimente hier nicht möglich waren. Zur Etablierung der Kokultur wurde *Geobacter* mehrere Passagen auf synthetisch hergestelltem Eisen(III)-hydroxid gezogen, um das bei der Stammkulturhaltung verwendete lösliche Eisen(III)-citrat zu verdünnen. Dann wurden je 1 ml einer solchen *Geobacter* Kultur und 1 ml einer ausgewachsenen SW2-Kultur zu 10 ml Süßwassermedium, das Selenit und Wolframat als zusätzliche Spurenelemente sowie 5 mM Fe(II) enthielt, gegeben und 1 mM Benzoat als Substrat zugesetzt. Da, was zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt war, diese Benzoatkonzentration bereits leicht inhibierend wirkt, entwickelte sich das mikrobielle Wachstum nur sehr langsam. Nach ca. einmonatiger Inkubation bei 20°C im Licht wurde das Benzoat dann durch Ionenchromatographie bestimmt. Dabei wurde in den im Licht inkubierten Röhren nur noch wenig der von SW2 nicht assimilierbaren Substanz gefunden. Dagegen war in einer im Dunkeln inkubierten Kontrolle und ebenso in einer Kontrolle ohne *Geobacter* noch die ursprüngliche Menge Benzoat zu finden. Diese Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 8 zusammengefaßt.

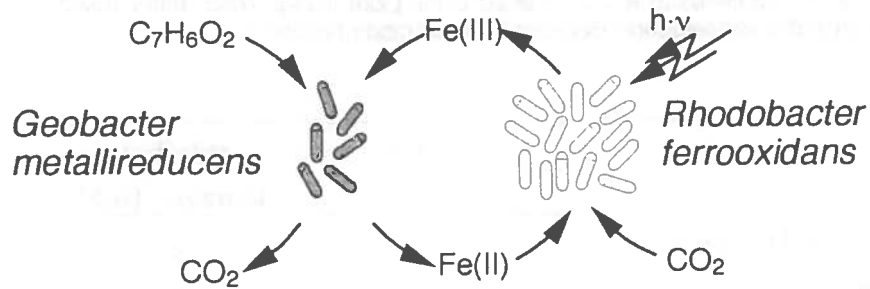


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Kokultur zwischen anaeroben Eisenoxidierern und Eisenreduzierern.

Geobacter metallireducens ist zur Verwendung seines Substrats Benzoat auf das durch *Rhodobacter ferrooxidans* zur Verfügung gestellte $Fe(III)$ als Elektronenakzeptor angewiesen. Das durch dissimilatorische $Fe(III)$ -Reduktion gebildete $Fe(II)$ dient *Rhodobacter ferrooxidans* wiederum als Elektronendonator für die CO_2 -Fixierung.

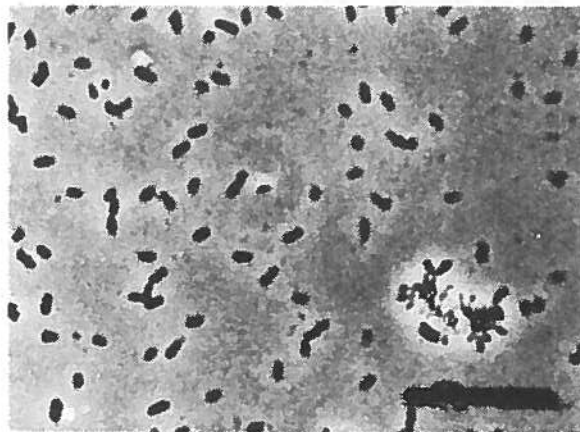


Abbildung 23: Kokultur zwischen *Geobacter metallireducens* und dem Isolat SW2.

Die Kokultur wurde in Anwesenheit von 5 mM $Fe(II)$ und insgesamt 1,1 mM Benzoat im Licht bei 20°C inkubiert. Um das eingesetzte Benzoat zu oxidieren, mußte das Eisen mindestens 6 mal einen anaeroben Redoxzyklus durchlaufen haben. Der Balken bezeichnet 10 μm .

Tabelle 8: Etablierung einer Kokultur zwischen SW2 und *Geobacter*

Kokulturen mit ca. 1 mM Benzoat wurden bei 20°C ins Licht gelegt. Nach einer Inkubationszeit von einem Monat wurde die verbleibende Benzoat-Konzentration bestimmt.

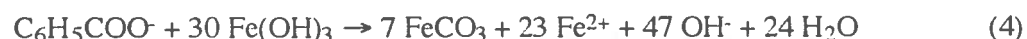
	Licht	verbleibendes Benzoat [mM]
SW2 und <i>Geobacter</i>	+	0,3
SW2 allein	+	1,1
<i>Geobacter</i> allein	+	1,2
SW2 und <i>Geobacter</i>	-	1,0

Das Röhrechen mit der positiven Kokultur diente dann als Inokulum für weitere Passagen in Süßwassermedium mit 5 mM Fe(II). Als Substrat wurden 0,4 mM Benzoat zugesetzt. Die Kokultur blieb über drei Passagen stabil. In Abbildung 23 ist zu sehen, daß sich in den Kokulturen weit mehr Zellen befanden, als sich allein bei der autotrophen Oxidation von 5 mM Fe(II) hätten bilden können. In diesem Falle hatten nur vereinzelt einige Zellen zu sehen sein sollen. Dies war ein weiterer Beweis dafür, daß die Kokultur zu einer syntrophen Benzoatoxidation fähig war. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von Benzoat auf der HPLC deckten sich mit den mikroskopischen Beobachtungen: Hohe Zelldichten wurden ausschließlich dann beobachtet, wenn ein Benzoatabbau stattgefunden hatte. Die Benzoat-Verwertung in den Kokulturen war, wie Kontrollen zeigten, sowohl von der Anwesenheit von Fe(II) als auch von der Inkubation im Licht abhängig. Nur einer der beiden Organismen allein konnte den Benzoat-Abbau nicht durchführen.

Mit zwei solcher 10 ml Kokulturen wurde dann eine 250 ml Kultur mit 5 mM Fe(II) und 0,4 mM Benzoat in einem 500 ml Kolben angelegt und jeden Tag Benzoat und das Verhältnis von Fe(II) zu Fe(III) gemessen. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis dieser Messungen. Als eine zunehmende Oxidation des Fe(II) meßbar wurde, wurde zu dem mit dem Pfeil bezeichneten Zeitpunkt nochmals Benzoat in einer Konzentration von ca. 0,6 mM zugesetzt. Es ist erkennbar, daß eine meßbare Oxidation des Fe(II) erst erfolgte, als das Substrat Benzoat aufgebraucht war. Offensichtlich fehlte dann die fortwährende dissimilatorische Reduktion des photosynthetisch gebildeten Fe(III) durch *Geobacter*, so daß die Menge an Fe(III) durch die Photosynthese von Stamm SW2 zunahm. Bei abermaliger Zugabe von Substrat hielten sich, solange noch Benzoat vorhanden war, die Fe(III) Reduktion und die Fe(II) Oxidation bei der vorgegebenen Lichtintensität ungefähr die Waage. Eine vollständige Oxidation des Eisens erfolgte erst dann, als wiederum kein Substrat mehr vorhanden war. Dieser Effekt war auch in

dem in Bild B der Abbildung 24 dargestellten Kontrollversuch zu erkennen. Wenn das Benzoat als Elektronendonator für *Geobacter* fehlte, unterbleibt die fortwährende Reduktion von Fe(III). Somit ist nur die Fe(II)-Oxidation durch *Rhodobacter* zu erkennen. In Bild C der Abbildung 24 wird gezeigt, daß eine durch das Inokulum bedingte Eisenkonzentration von 0,5 mM nicht ausreichte, um das Wachstum in Kokultur zu ermöglichen. Gleichzeitig wurde damit sichergestellt, daß *Rhodobacter ferrooxidans* nicht zu einer photoheterotrophen Oxidation des Benzoats befähigt ist.

Insgesamt wurden bei dem in Bild A der Abbildung 24 gezeigten Versuch 1,0 mM Benzoat oxidiert. Da *Geobacter metallireducens* eine vollständige Oxidation der organischen Substanz durchführt, gilt folgende Reaktionsgleichung:



Dies bedeutet, daß für die vollständige Oxidation von 1,0 mM Benzoat 30 mM Fe(III) benötigt würden. Da aber nur 5 mM Fe(II) in das System eingesetzt wurden, mußte das Eisen mindestens 6 mal den Redoxzyklus zwischen Fe(II) und Fe(III) durchlaufen haben. In dem System mit *Geobacter* und Stamm SW2 fungierte das Eisen somit in analoger Weise als Transporter von Redoxäquivalenten wie der Schwefel im System *Desulfuromonas* und *Chlorobium*. Dabei verblieb offensichtlich alles Eisen im Redoxsystem und wurde nicht als Magnetit oder andere inerte Verbindung abgelagert, da sich keine auf Magnetit hindeutenden, schwarzbraunen Ablagerungen bildeten. Magnetit wird in der Literatur als das Endprodukt der Fe(II)-Reduktion beschrieben (132).

Abbildung 24: Verlauf des Fe(III)-Gehalts und der Benzoatkonzentration in einer Kokultur von *Geobacter metallireducens* und *Rhodobacter ferrooxidans*.

A: Kokultur im Licht in Anwesenheit von Benzoat.

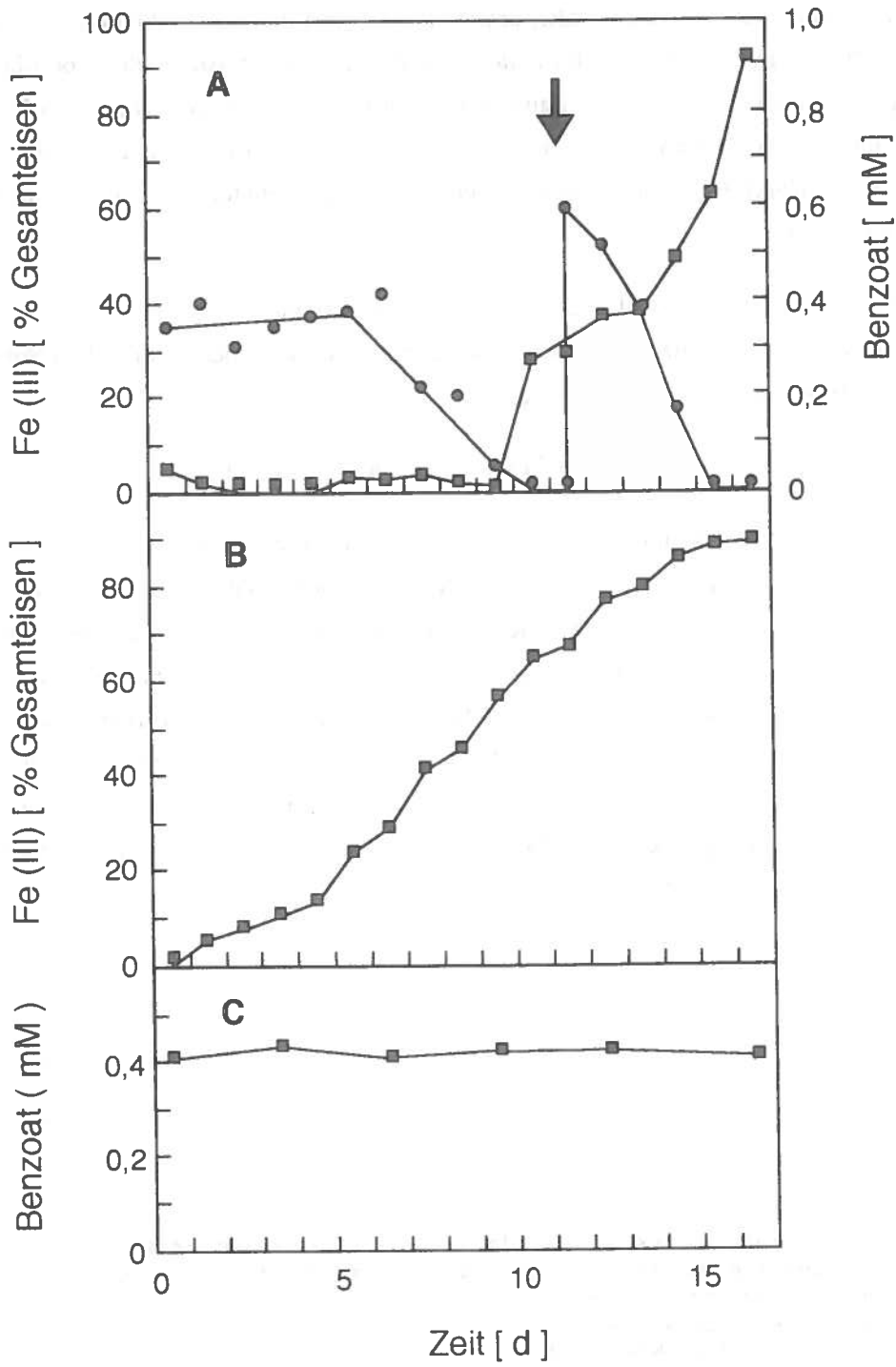
B: Kokultur im Licht ohne Zugabe von Benzoat.

C: Kokultur im Licht mit einer Fe(II)-Konzentration von nur 0,5 mM

Von einer im Licht inkubierten Kokultur mit 5 mM Fe(II) und 0,4 mM Benzoat wurde der Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. In Ansatz A. wurde zu dem mit einem Pfeil bezeichneten Zeitpunkt nochmals 0,6 mM Benzoat zugegeben.

●: Benzoatkonzentration

■: Anteil von Fe(III) am gesamten Eisen



C.5. Expressionsstudien mit Stamm L7

C.5.1. Zellsuspensionen von auf Fe(II) und H₂ gewachsenen Zellen von Stamm L7

In einem Zellsuspensionsexperiment sollte noch einmal die Abhängigkeit der Fe(II)-Oxidation von Licht und die Verwendung von CO₂ als Elektronenakzeptor aufgezeigt werden.

Kulturen, die ausschließlich auf Fe(II) gewachsen waren, bildeten so wenig Zellmasse, daß diese nicht von den Fe(III)-Präzipitaten abgetrennt werden konnte. Alle Versuche, das Eisen durch Komplexbildung (mit 100 mM Citrat oder 2 % Oxalat) zu lösen und dennoch lebende Zellen zu erhalten, schlugen fehl. Daher wurden Kulturen verwendet, die auf H₂ und Fe(II) angezogen worden waren. Diese wurden als 250 ml Kulturen in flachen 500 ml Flaschen angesetzt und der Gasraum wurde mit H₂/CO₂-Gemisch begast. Es bildeten sich recht große, makroskopische Zellaggregate, die nach umschütteln schneller sedimentierten als die Eisenniederschläge. Daher waren diese Zellen mit einem Scheidetrichter abtrennbar. Später verlor der Stamm zunehmend seine Fähigkeit, Zellaggregate zu bilden. Dann konnte man die Zellen aus Kulturen, die auf Fe(II) und H₂ gewachsen waren, einfach dadurch gewinnen, daß man die Kulturflaschen nach Oxidation des Fe(II) aufrecht hinstellte. Die Eisen(III)-Präzipitate sanken dann ab und die vakuolenhaltigen Zellen trieben im Medium und konnten abzentrifugiert werden. Leider funktionierte dieses Verfahren mangels Zellmasse nicht bei Kulturen, die einzig auf Fe(II) gewachsen waren, da hier die wenigen gebildeten Einzelzellen großteils im Sediment gefangen blieben. Die geernteten Zellen wurden in Puffer S (siehe B.2.11.) gewaschen, um sie von Fe(III) und HCO₃⁻ aus der Kultur zu befreien. Um die Zellen beim Abzentrifugieren nicht zu beschädigen, wurden sie bei 5000 rpm 15 min in einem JA-10 Rotor (Beckman Instruments, Palo Alto) abzentrifugiert. Bei der mikroskopischen Kontrolle erschienen die Zellen zwar unbeschädigt, hatten jedoch ihre schönen Vakuolen eingebüßt. Die Suspensionen wurden in abgeschwächtem Licht im Brutkühlschrank bei 18°C für 24 h inkubiert. Während der Inkubation wurden alle 2 Stunden Proben genommen und das Fe(II) bestimmt. Am Ende des Versuchs wurde die in die einzelnen Suspensionen eingesetzte Zelldichte über Bestimmung der Proteinkonzentration ermittelt. Zum Aufschließen der Zellen wurden dazu die Suspensionen auf 0,1 M NaOH eingestellt, für 6 min im Kochwasserbad erhitzt und anschließend nach der Methode von Bradford die Proteinkonzentration bestimmt.

In Abbildung 25 ist zu sehen, daß die Suspensionsversuche die Ergebnisse aus den Wachstumsversuchen bestätigen. Fe(II) wurde nur im Licht oxidiert, nicht dagegen im Dunkeln. Wenn man einen Ansatz aus dem Licht ins Dunkel brachte, dann wurde die Fe(II)-Oxidation augenblicklich gestoppt. Dies spricht dafür, daß die Fe(II)-Oxidation direkt durch die photosynthetische Elektronentransportkette erfolgt. In dem Ansatz ohne zugegebenes Bicarbonat erfolgte nur eine sehr langsame Oxidation des Fe(II). Die noch vorhandene Aktivität war sicherlich auf nicht abgewaschene Reste an Bicarbonat zurückzuführen. Es war aber klar erkennbar, daß CO₂ als Elektronenakzeptor zur Fe(II)-Oxidation notwendig ist.

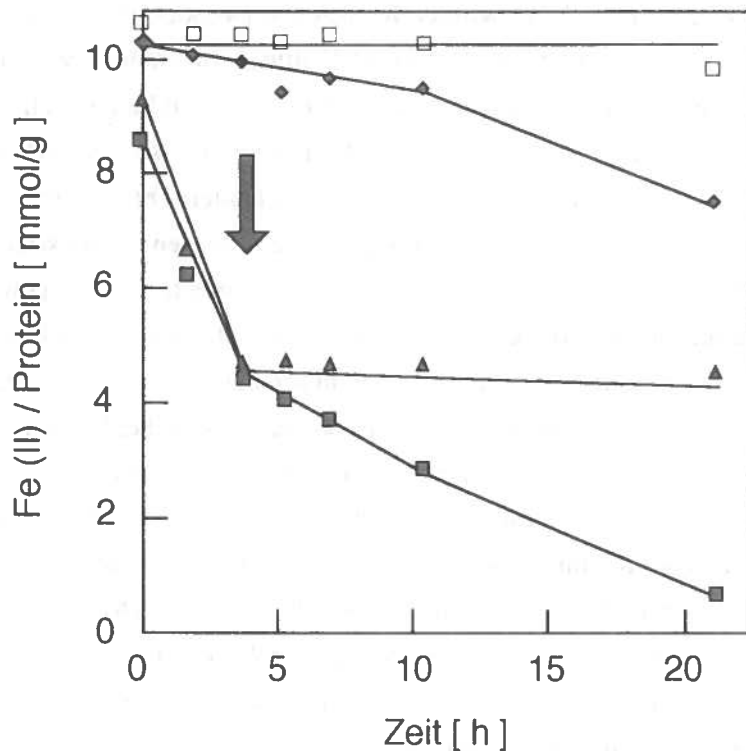


Abbildung 25: Zellsuspensionsexperiment von auf Fe(II) und H₂ kultivierten Zellen von Stamm L7.

Zellaggregate aus einer auf 10 mM Fe(II) und H₂ als Elektronendonatoren gewachsenen Kultur wurden mit einem Scheidetrichter geerntet, gewaschen und in ca. 10 facher Zelldichte in Puffer S (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,0) suspendiert. Als Substrate wurden 1 mM Fe(II) und 1 mM HCO₃⁻ zugegeben. Der zu verschiedenen Zeitpunkten gemessene Fe(II)-Gehalt wurde auf den Proteingehalt des betreffenden Ansatzes bezogen.

■: Suspension im Licht

□: Suspension im Dunkeln

▲: Suspension, die zu dem durch den Pfeil angegebenen Zeitpunkt aus dem Licht genommen und im Dunkeln weiterinkubiert wurde

◆: Suspension ohne Zugabe von CO₂

C.5.2. Suspensionsversuche mit auf Acetat gewachsenen Zellen von Stamm L7

Während in Kulturen von Stamm SW2 organische Substrate die Fe(II)-Oxidation unterdrücken wurde Fe(II) in Kulturen von Stamm L7 gleichzeitig mit Acetat verwertet (siehe C.2.4.). Somit könnte die Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation in Stamm L7 auch konstitutiv vorhanden sein. Deshalb sollte in einem Zellsuspensionsversuch untersucht werden, ob photoheterotroph auf Acetat angezogene Zellen von L7 augenblicklich zur Fe(II)-Oxidation fähig waren.

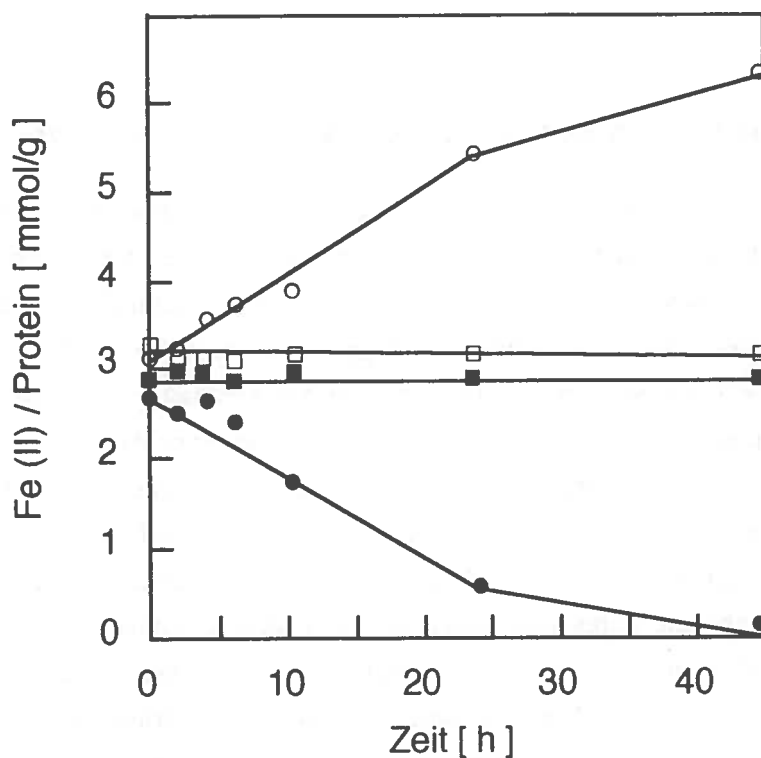


Abbildung 30: Zellsuspensionsexperiment mit auf Acetat kultivierten Zellen von Stamm L7.

Zellen, die auf 5 mM Acetat gewachsen waren, wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in 10 facher Zelldichte in Puffer S (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,0) suspendiert. Als Substrat wurde 1 mM Fe(II) und 1 mM HCO₃⁻ zugegeben.

- : Verhältnis Fe(II) / Protein einer Suspension im Licht
- : Verhältnis Acetat / Protein einer anderen Suspension im Licht
- : Verhältnis Fe(II) / Protein einer Suspension im Dunkeln
- : Verhältnis Acetat / Protein einer anderen Suspension im Dunkeln

Die Zellsuspensionsansätze enthielten 1 mM Acetat oder 1 mM FeSO₄ und jeweils 1 mM NaHCO₃. Die dunklen Symbole in Abbildung 30 zeigen, daß diese Zellen innerhalb der Meßdauer kein Fe(II) oxidierten. Zur Kontrolle, ob die Zellen bei der Herstellung der Suspensionen stoffwechselaktiv geblieben waren, wurde in aus der gleichen Zellcharge hergestellten Ansätzen der photoheterotrophe Acetat-Verbrauch gemessen. In der Dunkelkontrolle wurde Acetat durch die Zellen ausgeschieden. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um ein Gärungsendprodukt, das aus Speicherstoffen gebildet wurde. In einer Kontroll suspension im Licht ohne zugegebenes Bicarbonat wurde kein Acetat verbraucht (nicht gezeigt).

Aus diesem Versuch war erkennbar, daß auch in dem Isolat L7 das Fe(II)-oxidierende System induziert werden muß.

C.5.3. Zellsuspensionen von auf H₂ gewachsenen Zellen von L7

Für die Reinigung von Redoxkomponenten, die für die Fe(II)-Oxidation spezifisch sind, war es notwendig, Isolat L7 in großen Mengen anzuziehen. Dabei war es notwendig, Medien mit möglichst geringem Eisenanteil zu verwenden, da sonst eine gleichmäßige Beleuchtung des großen Kulturgefäßes schwierig zu bewerkstelligen gewesen wäre. Zudem ergaben sich Probleme bei der Zellernte oder beim Zellaufschluß in Anwesenheit von größeren Mengen an Eisenpartikeln. Daher sollte untersucht werden, ob auch bei einer Anzucht von Zellen auf reinem Wasserstoff in mit Ascorbat reduziertem Medium die Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation exprimiert wurde. Hierfür wurden Zellen auf Wasserstoff angezogen und in Zellsuspensionsexperimenten mit 1 mM FeSO₄ und 1 mM NaHCO₃ eingesetzt. Wie in Abbildung 27 erkennbar ist, waren auch Zellen, die auf Wasserstoff angezogen worden waren, zu einer sofortigen Oxidation des Fe(II) fähig. Allerdings verlief diese Oxidation, bezogen auf die Zellmasse, nur mit ca. der halben Geschwindigkeit der Fe(II)-Oxidation durch Zellen, die auf Fe(II) und Wasserstoff angezogen worden waren. Da eine Anzucht von zur Fe(II)-Oxidation fähigen Zellen auf Wasserstoff einfach durchführbar war, wurde sie für die Gewinnung von Zellmasse für Proteintrennungen (siehe C.6.1) verwendet.

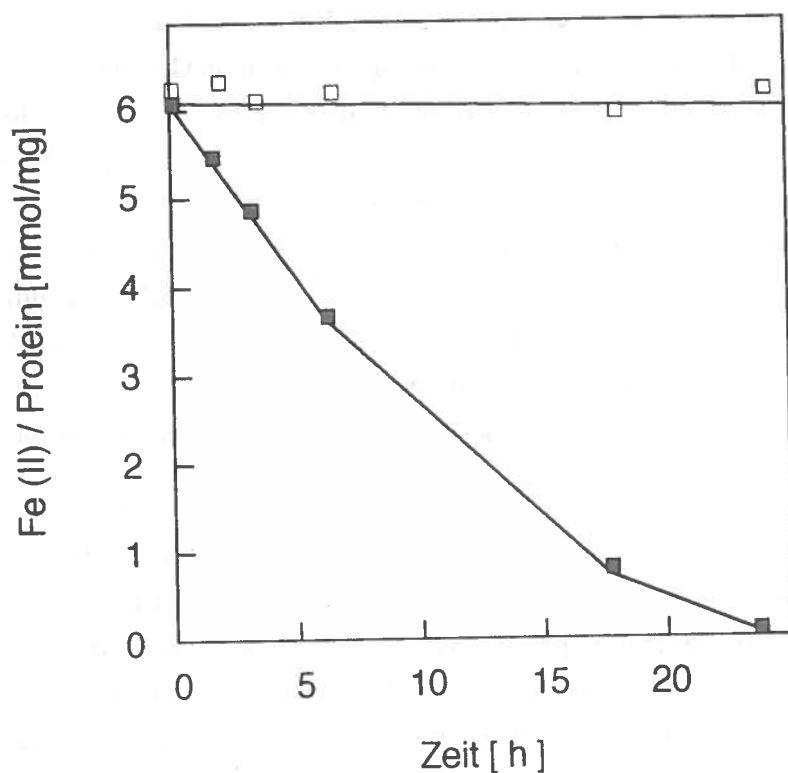


Abbildung 27: Zelluspensionsexperiment mit auf H_2 kultivierten Zellen von Stamm L7.

Zellen, die auf H_2 gewachsen waren, wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in 10 facher Zelldichte in Puffer S (50 mM HEPES, 20 mM NaCl, pH 7,0) suspendiert. Als Substrat wurde 1 mM Fe(II) und 1 mM HCO_3^- zugegeben.

- : Fe(II) / Protein einer Suspension im Licht.
- : Fe(II) / Protein einer Suspension im Dunkeln.

C.5.4. 2D-Gelelektrophorese von Zellen des Stammes L7 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Für zukünftige biochemische Untersuchungen des eisenoxidierenden Systems sollte mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese nach Proteinen gesucht werden, die spezifisch und in relativ großen Mengen in Fe(II)-oxidierenden Zellen exprimiert werden. Dabei wurde die Beobachtung genutzt, daß auf den Substraten H₂ und Fe(II) angezogene Zellen im Gegensatz zu den nur auf Acetat gezogenen Zellen die Fähigkeit zur Fe(II)-Oxidation exprimierten. In Abbildung 28 ist eine 2D-Gelelektrophorese von Gesamtextrakten aus Zellen zu sehen, die auf H₂ und Fe(II) gewachsen waren. In der Horizontalen wurde eine Auftrennung der Proteine durch isoelektrische Fokussierung, in der Vertikalen durch SDS-Gelelektrophorese vorgenommen. Die Position der Proteine in dem Chromatogramm wurde durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die eingesetzten Zellen waren, wie aus den Zellsuspensionsversuchen bekannt war, zu einer schnellen Fe(II)-Oxidation fähig. Das mit dem Pfeil markierte Protein mit einer Molekülmasse von etwa 8 - 10 kDa war in den Fe(II)-oxidierenden Zellen in großen Mengen vorhanden.

Führte man eine 2D-Gelelektrophorese von ganzen Zellen, die auf Acetat gewachsen waren, durch, so entstand das in Abbildung 29 sichtbare Chromatogramm. Als Beispiel soll wieder das mit dem Pfeil markierte Protein dienen. Dieses war bei photoheterotrophem Wachstum offensichtlich wesentlich schwächer exprimiert. Der Umweg über das 2D-Chromatogramm zur Identifizierung von an der Fe(II)-Oxidation beteiligten Komponenten mußte gegangen werden, da eine Reinigung einer Fe(II)-oxidierenden Komponente nach ihrer Aktivität nicht möglich schien. Gelöstes Fe(II) war nämlich ein gutes Reduktionssmittel für etliche Redoxkomponenten. Daher sollte eine spezifische Identifizierung der an der Elektronentransportkette beteiligten Komponenten über Aktivitätstests extrem schwierig sein.

Ferner wurden Zellen, die aus einer Massenkultur auf H₂ ohne Zusatz von Fe(II) stammten, aufgeschlossen und über 2D-Gelelektrophorese untersucht. Wiederum erkennt man an der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle einen Proteinfleck (siehe Abbildung 4). Das Protein wurde deutlich stärker exprimiert als in photoheterotroph gezogenen Zellen, jedoch nicht ganz so stark wie beim Wachstum in Anwesenheit von Eisen. Die unterschiedlichen Intensitäten dieser Proteinflecke stehen im Einklang mit den beobachteten unterschiedlichen Fe(II)-Oxidationsraten ganzer Zellen (siehe C.5.1., C.5.2., C.5.3.).

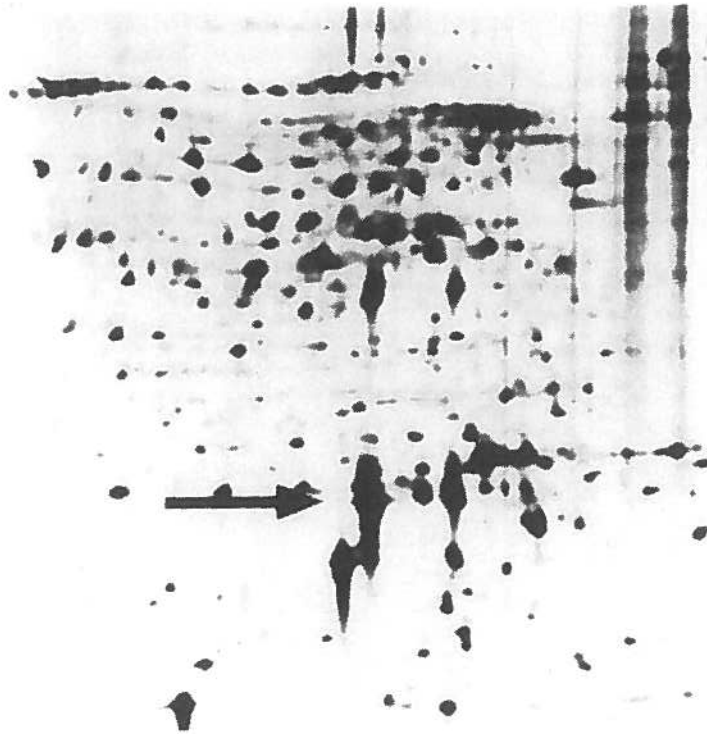


Abbildung 28: 2D-Chromatogramm von auf Fe(II) und H₂ gewachsenen Zellen des Isolats L7.

Zellen wurden auf 10 mM Fe(II) und H₂ angezogen und die Zellaggregate von den voluminösen Fe(III) Niederschlägen mit Hilfe eines Scheidetrichters abgetrennt. Nach dem Öffnen der Zellen in einer French Presse wurden die Proteine mit TCA gefällt, die Lipide mit Aceton extrahiert und das Zellprotein einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen. Der Pfeil deutet auf ein ca. 8 kDa großes, redoxaktives Protein, das in Zellen, die zu einer Fe(II)-Oxidation fähig sind, stark in Erscheinung tritt.

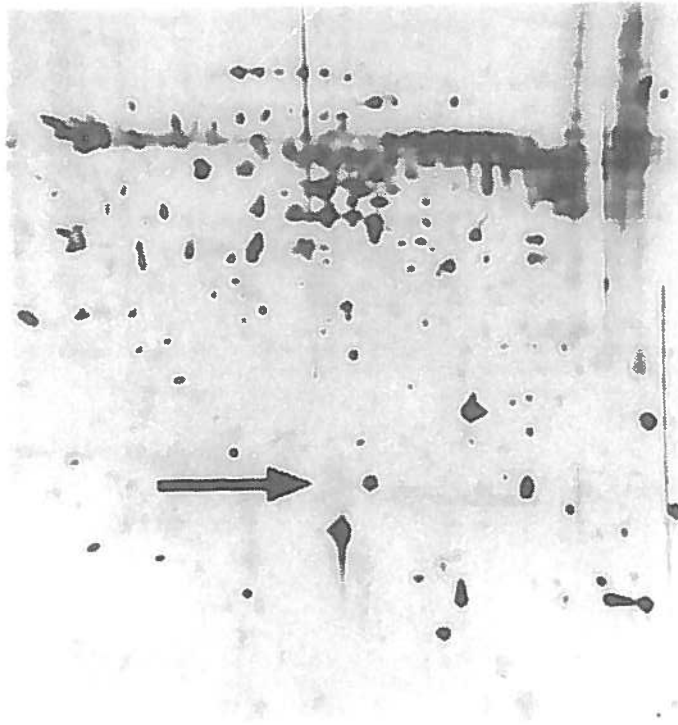


Abbildung 29: 2D-Chromatogramm von photoheterotroph auf Acetat gewachsenen Zellen des Isolats L7.

Zellen wurden auf 5 mM Acetat in Gegenwart von 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel angezogen und die Zellaggregate durch Zentrifugation geerntet. Nach dem Aufschluß der Zellen in einer French Presse wurden die Proteine mit TCA gefällt, die Lipide mit Aceton extrahiert und die Zellproteine nach Auflösung in Solubilisierungspuffer einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen. An der mit dem Pfeil gekennzeichneten Stelle läuft ein redoxaktives Protein, das in photoheterotroph gezogenen Zellen, die kein Fe(II) oxidieren können, nur schwach exprimiert wurde.

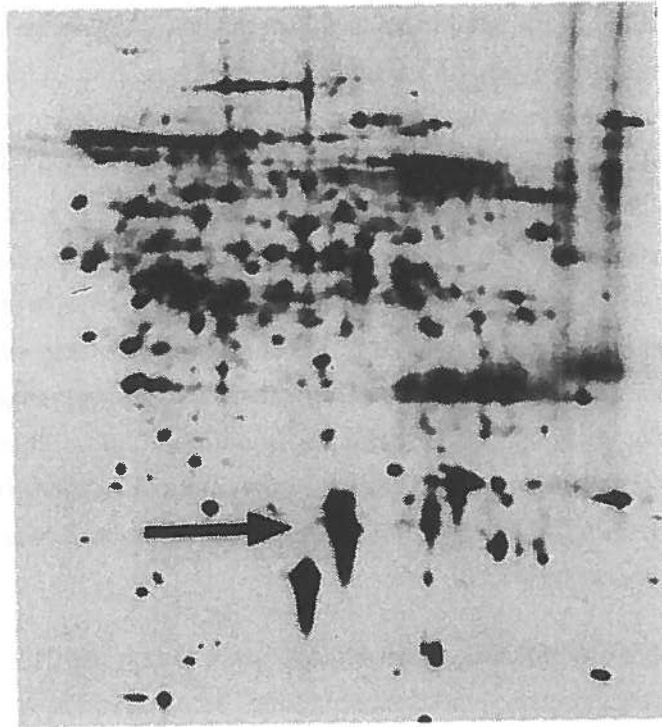


Abbildung 30: 2D Chromatogramm von auf H₂ gewachsenen Zellen des Isolats L7. Zellen wurden auf H₂ in Gegenwart von 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel angezogen und durch Zentrifugation abgetrennt. Nach dem Öffnen der Zellen in einer French Presse wurden die Proteine mit TCA gefällt, die Lipide mit Aceton extrahiert und das Zellprotein einer 2D-Gelelektrophorese unterworfen. Der Pfeil deutet auf ein ca. 8 kDa großes, redoxaktives Protein. Dieses tritt auf H₂ gezogenen Zellen, die zu einer Fe(II)-Oxidation mit geringerer Rate fähig sind, etwas schwächer als bei mit Fe(II) und H₂ gewachsenen Zellen in Erscheinung.

C.6. Erste biochemische Charakterisierung eines spezifisch exprimierten Proteins aus Fe(II)-oxidierenden Zellen

C.6.1. Reinigung eines bei der Fe(II)-Oxidation exprimierten Proteins

Bei der Herstellung von Rohextrakten aus mit H₂ gezogenen Zellen von Stamm L7 fiel auf, daß der Überstand nach einer Zentrifugation bei 100.000 x g kräftig braun gefärbt war. Dieser Ultrazentrifugationsüberstand enthielt nur noch die löslichen Proteine, aber nicht mehr die Membranen mit ihren photosynthetischen Pigmenten. Dagegen war ein Ultrazentrifugationsüberstand aus photoheterotroph gewachsenen Zellen weit weniger intensiv gefärbt. Daher wurde vermutet, daß Zellen, die auf H₂ und Fe(II) gewachsen waren, ein braunes Protein enthielten, das an der Fe(II)-Oxidation beteiligt war. Trennte man die löslichen Proteine bei pH 7 auf einer DEAE-Ionenaustauschersäule auf, so befand sich die braune Färbung vollständig im Durchlauf. Eine weitere, rötlich-braune Bande wurde beim Spülen der Säule mit 1 M KCl eluiert. Diese konnte zwar aufgefangen und zur Messung eines Spektrums im mit Luft oxidierten sowie mit Dithionit reduzierten Zustands verwendet werden, für eine weitere Reinigung war aber zu wenig Protein vorhanden. In dem in Abbildung 33 gezeigten Spektrum des mit Dithionit reduzierten Proteins sind deutlich Absorptionsbanden bei 418, 520 und 551 nm zu sehen. Diese sind für ein Cytochrom *c* charakteristisch, wie es für *Chromatium vinosum* beschrieben worden ist (85).

Der intensiv braun gefärbte Durchlauf der DEAE-Säule konnte bis zu 70 % Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt werden, ohne daß die braune Farbe präzipitierte. Damit war eine gute Methode gefunden, um das Protein weiter zu reinigen, denn es band weder bei hohem noch bei niedrigem pH-Wert an Anionen- oder Kationenaustauschersäulen. Eine weitere Reinigung des Proteins konnte dann durch Gelfiltration über eine Superose 12[®]-Säule erreicht werden. Abbildung 31 zeigt auf einem SDS-Gel aufgetrennte Proben der einzelnen Reinigungsschritte. Am Ende der Reinigungsprozedur wurde das Protein gegen Puffer I (siehe B.4.3.) mit 50% Glycerin dialysiert und bei -20°C aufbewahrt. Leider zerfiel es bei der Lagerung unter den verwendeten Bedingungen in kleinere Bruchstücke, wie bei der SDS-Gelelektrophorese zu erkennen war. Daher wurde nur frisch gereinigtes Protein für die 2D-Gelelektrophorese verwendet, um zu überprüfen, ob es sich bei ihm um das in den vorausgegangenen 2D-Gelelektrophoresen beobachtete 8 kDa Protein handelte.

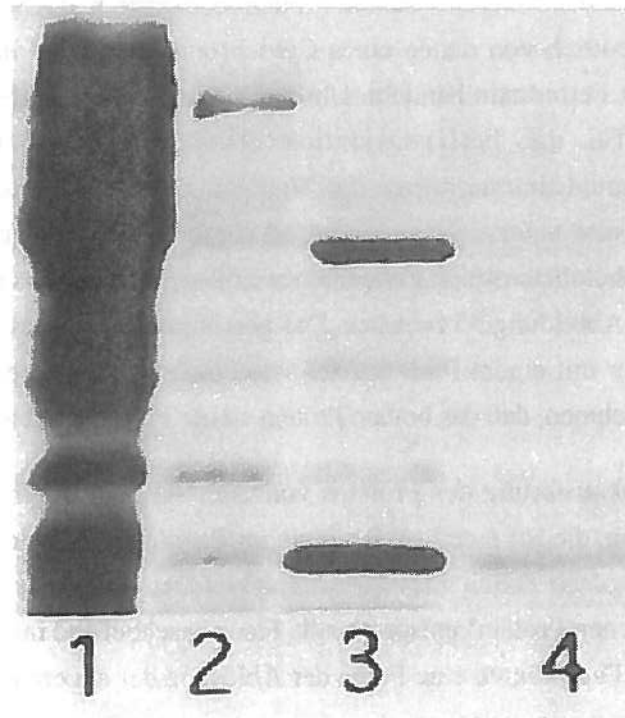


Abbildung 31: Darstellung der Anreicherung des braunen Proteins durch SDS-Gelelektrophorese.

Ausgehend von 4,5 g auf H_2 gezogenen Zellen wurde das für die charakteristische braune Farbe des Zellextraktes verantwortliche Protein angereichert. Bei den einzelnen Anreicherungsschritten wurden Proben entnommen und in einer denaturierenden SDS Gelelektrophorese mit einem Polyacrylamidgehalt von 15% aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. Spuren:

- 1: Zellextrakt
- 2: Durchlauf aus der DEAE-Säule
- 3: Überstand der Ammoniumsulfat-Fällung (70% Sättigung)
- 4: Vereinigte braune Fraktionen der Gelfiltration

C.6.2. Charakterisierung des reinen Proteins durch Gelfiltration, Spektrophotometrie und 2D-Gelelektrophorese

Abbildung 34 zeigt das Elutionsverhalten des braunen Proteins zusammen mit dem von Eichsubstanzen auf einer Superose 12[®]-Säule. Das Protein besaß ein Molekulargewicht von ca. 8 kDa. Die in Abbildung 32 dargestellten Absorptionsspektren im mit Luft oxidierten und mit Dithionit reduzierten Zustand zeigten, daß das Protein redoxaktiv war. Die Absorptionsmaxima unterschieden sich deutlich von denen eines Cytochroms. Aufgrund der braunen Färbung konnte es sich um ein Ferredoxin handeln. Um zu überprüfen, ob dieses Protein mit dem in C.5.4. erwähnten, für die Fe(II)-Oxidation charakteristischen Fleck in der 2D-Gelelektrophorese übereinstimmte, wurde das Wanderungsverhalten des braunen Proteins in der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde 1 µg des stark angereicherten Proteins zu dem Rohextrakt von photoheterotroph gewachsenen Zellen gegeben. Das Chromatogramm aus diesem Versuch ist in Abbildung 35 zu sehen. Das gereinigte "braune Protein" erschien an der gleichen Stelle wie der mit einem Pfeil bezeichnete Fleck aus den Abbildungen 28 und 30. Somit konnte man annehmen, daß das braune Protein an der Fe(II)-Oxidation beteiligt war.

Weiterhin war die Lokalisierung des Proteins von Interesse. Dazu gab es eine interessante vorläufige Beobachtung, die auf eine Lokalisierung im Periplasma hinwies: Schüttelte man die auf H₂ und Fe(II) gezogenen Zellen mit dem Komplexbildner Oxalat die äußere Membran ab, so fehlte der dem "braunen Protein" entsprechende Fleck anschließend im 2D-Chromatogramm (Daten nicht gezeigt). Dies könnte eine Folge der Ablösung der äußeren Membran durch den Komplexbildner gewesen sein, was man in zukünftigen Untersuchungen noch prüfen sollte.

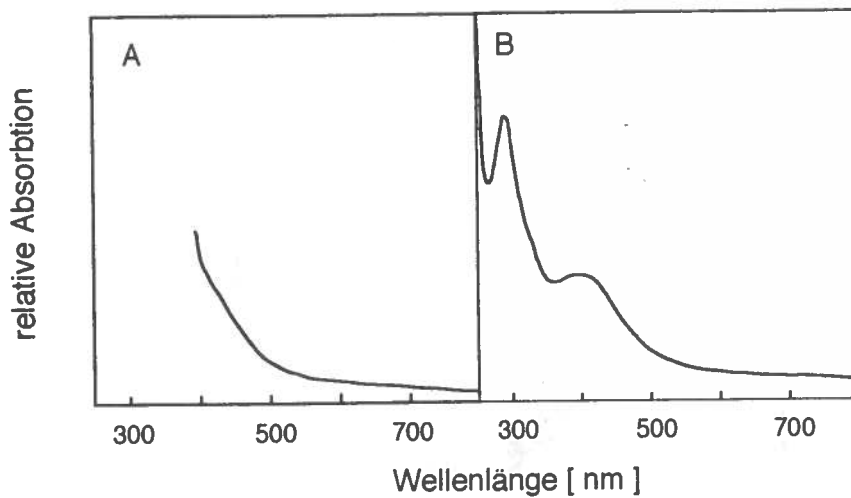


Abbildung 32: Absorptionsspektren des braunen Proteins aus Stamm L7.

Das Absorptionsspektrum der stark angereicherten Fraktion (enthält 1 mg/ml Protein) des "braunen Proteins" wurde aufgenommen:

A: die mit Luft oxidierte Fraktion aus der Reinigung.

B: die mit einigen Kristallen Dithionit reduzierte Fraktion.

Die Spektren unterscheiden sich im oxidierten und reduzierten Zustand, was auf den redoxaktiven Charakter des Moleküls hinweist. Dem Spektrum nach handelt es sich nicht um ein Cytochrom.

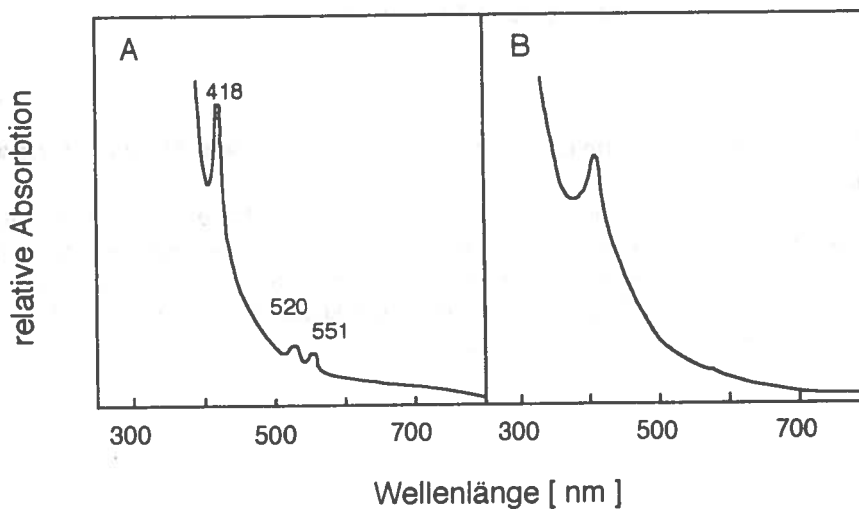


Abbildung 33: Absorptionsspektrum der cytochromhaltigen "Fraktion 2".

Das Absorptionsspektrum der rötlich-braun gefärbten "Fraktion 2" aus dem DEAE Eluat wurde aufgenommen:

A: die luftoxidierte DEAE-Fraktion.

B: die mit einigen Kristallen Dithionit reduzierte Fraktion.

Im Spektrum der reduzierten Verbindung sind die α , β und γ -Bande eines Cytochroms erkennbar.

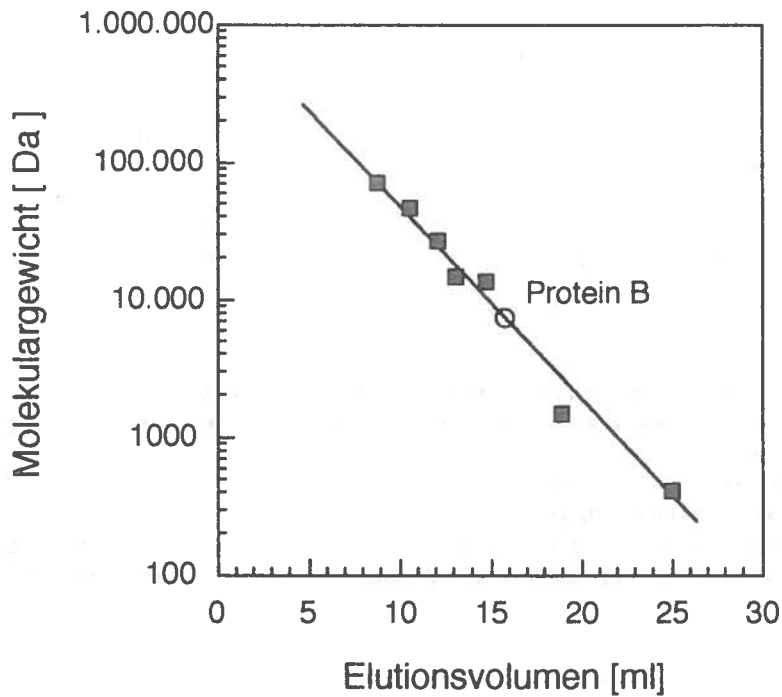


Abbildung 34: Bestimmung der Molekülmasse des braunen Proteins aus Stamm L7 an einer Superose 12[®]- Säule.

Das Elutionsverhalten des gereinigten braunen Proteins sowie als Molekulargewichtsmarker verwendete Moleküle wurde auf einer Superose 12[®]-Säule (1,5 x 30 cm) in 50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7,0, bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min ermittelt. Eichsubstanzen: Albumin (64 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ribonuclease A (13,7 kDa), Cytochrom c (12,5 kDa), B₁₂ (1360 Da), Riboflavin (380 Da).

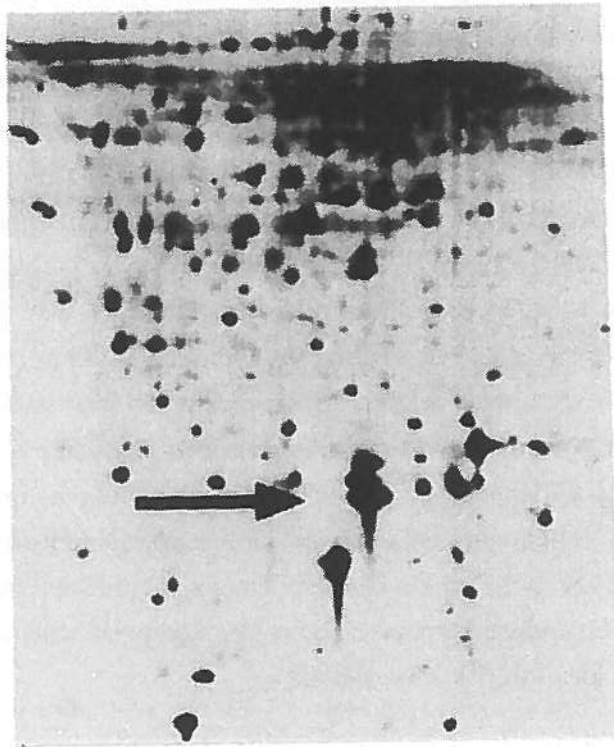


Abbildung 35: 2D-Chromatogramm von photoheterotroph gewachsenen Zellen von L7, dem das gereinigte braune Protein zugegeben worden war.

Zellen wurden auf 5 mM Acetat in Gegenwart von 4 mM Ascorbat als Reduktionsmittel angezogen und die Zellaggregate durch Zentrifugation geerntet. Nach dem Öffnen der Zellen in einer French-Pressen wurden die Proteine mit TCA gefällt, die Lipide mit Aceton extrahiert und das Zellprotein nach Zugabe von 1 μ g des stark angereicherten "braunen Proteins" einer 2D Gelelektrophorese unterworfen. Das durch den Pfeil markierte zugegebene Protein läuft an identischer Position, wie der in bei Fe(II) und H₂ kultivierten Zellen beobachtete, stark exprimierte Spot (siehe Abbildung 28). Zum Vergleich der Expression ohne das zugegebene Protein sei auf Abbildung 29 verwiesen. Man kann daraus abgehen, daß es sich um identische Proteine handelt.

D. Diskussion

D.1. Energetik und Biochemie Fe(II)-oxidierender, phototropher Bakterien

Die Existenz von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien mit nur einem Photosystem wird aus Überlegungen zur Redoxchemie des Eisens heraus verständlich. Die in den Lehrbüchern der Mikrobiologie immer wieder gefundene Feststellung, daß das Redoxpaar Fe(III)/Fe(II) ein Potential von $E_0 = +0,77$ V besitzt, gilt nur, wenn sich beide Ionenspezies in Lösung befinden, was aber nur bei pH-Werten unterhalb von 3 der Fall ist. Bei pH-Werten oberhalb von 3 beginnt mit zunehmender Konzentration an Hydroxid-Ionen Fe(III)-Hydroxid als unlösliches Präzipitat auszufallen, das ein Löslichkeitsprodukt von $pK_s = 37,0 - 39,4$ besitzt. Damit nimmt die Konzentration an gelösten Fe^{3+} -Ionen mit steigendem pH-Wert sehr stark ab und das Redoxpotential verschiebt sich zu negativeren Werten. In Abbildung 36 kann man die Verschiebung des Redoxpotentials bei sich veränderndem pH-Wert verfolgen. Zur Errechnung dieser Werte wurde ein Medium mit einer Konzentration an anorganischem Kohlenstoff [$CO_2 + HCO_3^- + CO_3^{2-}$] von 20 mM und eine Konzentration an Gesamteisen von 1 mM angenommen. Fe(II) liegt bei pH-Werten oberhalb von pH 5,5 hauptsächlich als $FeCO_3$ vor, die im Gleichgewicht befindliche, gelöste Fe^{2+} -Konzentration beträgt bei pH 7 ungefähr $3 \mu M$. Dieser Wert wurde aus dem Löslichkeitsprodukt und aus den Dissoziationskonstanten von gelöstem CO_2 und HCO_3^- errechnet (10, 72, 191, 198, 204).

Das für die in dieser Arbeit untersuchten Purpurbakterien relevante Redoxpaar wäre somit das System $Fe(OH)_3 + HCO_3^-/FeCO_3$ mit einem $E' = +0,1$ V (bei Standardaktivitäten, $E_0' = +0,2$ V). Bei der Errechnung dieses Wertes wurde die Ausfällung von Eisenphosphaten allerdings nicht berücksichtigt, da die in diesem Medium benützte Phosphatkonzentration mit 3,7 mM relativ niedrig liegt. Der Wert von $E' = +0,1$ V liegt deutlich höher als der von H_2S (z.B. S^0/H_2S , $E' = -0,18$ V bei einer Sulfidkonzentration von 1 mM), das von vielen phototrophen Bakterien verwertet wird. Wie Abbildung 37 zeigt, liegt das Redoxpotential von Fe(III)/Fe(II) bei pH 7 nahe an dem Wert für Dimethylsulfid (Dimethylsulfoxid/Dimethylsulfid, $E_0' = +0,16$ V), das von einigen Purpurbakterien verwendet wird (213). Das Mittelpunktpotential des Reaktionszentrums im nicht angeregten Zustand liegt etwa bei +0,45 V. Somit kann für den nicht-Zyklischen Elektronentransport der Photosynthese mit Fe(II) als Elektronendonator das in Abbildung 38 gezeigte Schema postuliert werden.

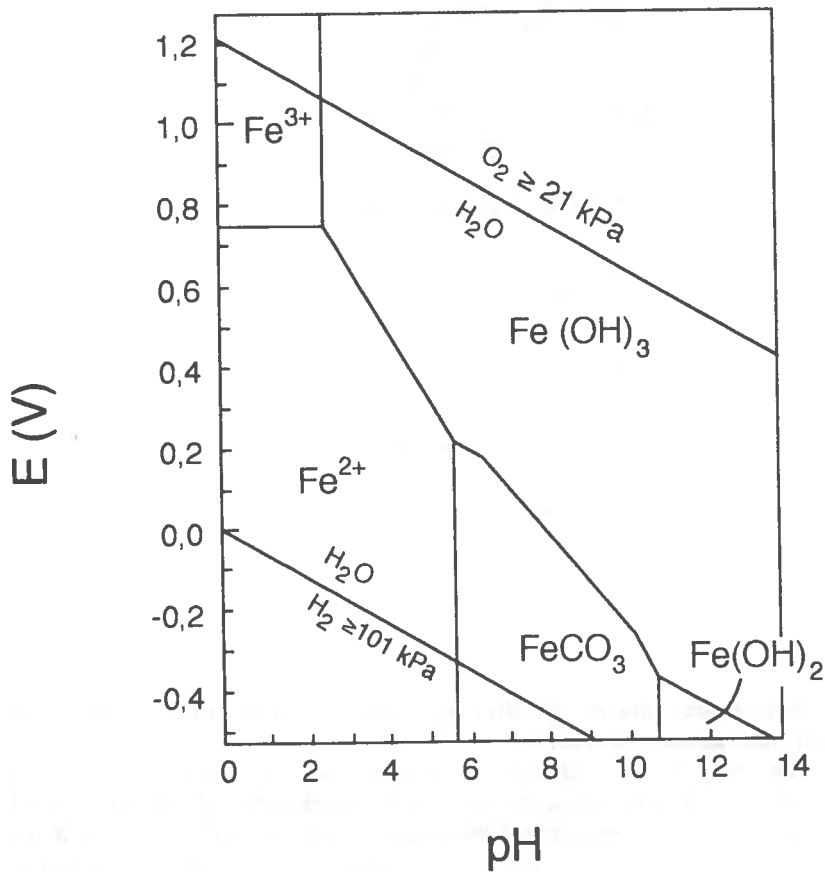


Abbildung 36: Stabilitätsdiagramm von zwei- und dreiwertigen Eisenspezies

Das berechnete Mittelpunkt Potential des Fe(III)/Fe(II)-Redoxpaares wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Die Berechnungen nehmen eine Eisenkonzentration von 1 mM und eine Konzentration an anorganischem Kohlenstoff [$\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$] von 20 mM an. Die Ionenstärke an nicht-reagierenden Ionen beträgt 0,05. Zum Vergleich wurden außerdem die Redoxpaare $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ und $2\text{H}^+/\text{H}_2$ eingezeichnet.

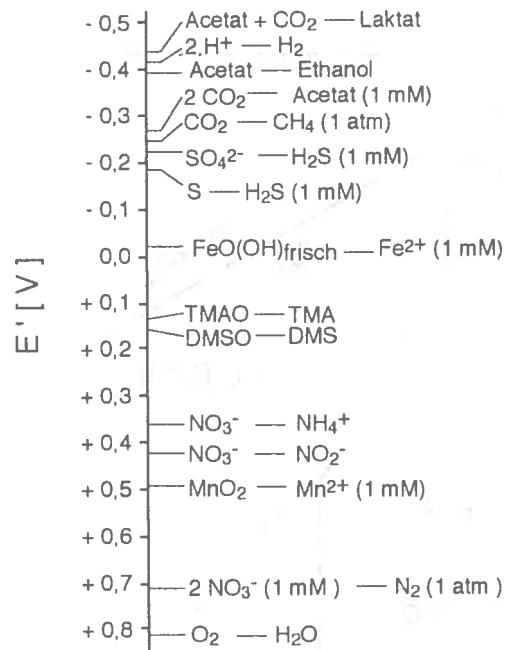


Abbildung 37: Lage des Redoxpaares Fe(III)/Fe(II) im Vergleich mit anderen für die Mikrobiologie relevanten Redoxpaaren bei pH 7,0.

Bei einigen der Redoxpaaren liegt eine der Oxidationsstufen in unlöslicher Form vor. Da in diesem Fall das Redoxpotential stark von der Konzentration der anderen Oxidationsstufe abhängt, wurden für letztere möglichst physiologische oder experimentelle Bedingungen gewählt, z.B. 1 mM oder ein Druck von 1 bar. Bei Reaktionen mit mehr als zwei Elektronen sind Durchschnittspotentiale angegeben.

Dazu nimmt man ein Einspeisen der Elektronen auf der Redoxstufe von Cytochrom c_2 an, das ein Mittelpunktpotential zwischen +250 und +350 mV besitzt (22, 23, 210). Die Elektronen gelangen somit an der gleichen Stelle in die photosynthetische Elektronentransportkette wie in Sulfid-oxidierenden, phototrophen Bakterien (11, 65, 104). Dort ist wahrscheinlich ein Flavocytochrom für die Sulfidoxidation verantwortlich. Flavocytochrom c_{552} aus *Chromatium vinosum* besteht aus 2 Untereinheiten in der Zusammensetzung $\alpha\beta$. Die größere Untereinheit (47 kDa) enthält ein einzelnes FAD als prosthetische Gruppe ($E_m' = 0$ V), das über Cystein kovalent gebunden ist; die kleinere Untereinheit (20 kDa) besitzt zwei Hämgruppen ($E_m' = +32$ mV), die die Elektronen von der Flavingruppe akzeptieren (45). Von dem Flavocytochrom fließen die Elektronen sehr wahrscheinlich über ein kleines, lösliches Cytochrom c_{550} (entspricht bei *Chromatium vinosum* dem Cytochrom c_2 (74, 85)) auf das direkt an das Reaktionszentrum gebundene Cytochrom c_{555} (186-189).

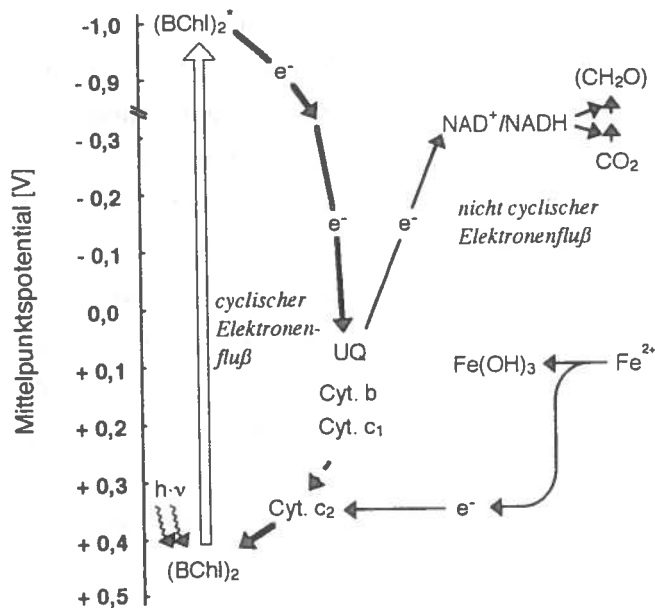


Abbildung 38: Elektronentransport und Redoxpotentiale bei der Verwendung von Fe(II) als Elektronendonator für die anoxygenen Photosynthese.

Da über Sequenzanalysen der 16S rRNA die eisenoxidierenden, phototrophen Organismen in bestehende Taxa eingeordnet werden konnten, dürfte auch ihr Photosyntheseapparat homolog organisiert sein. In das bekannte Schema der energetischen Verhältnisse der bakteriellen Photosynthese läßt sich Fe(II) als Elektronendonator einfach einfügen.

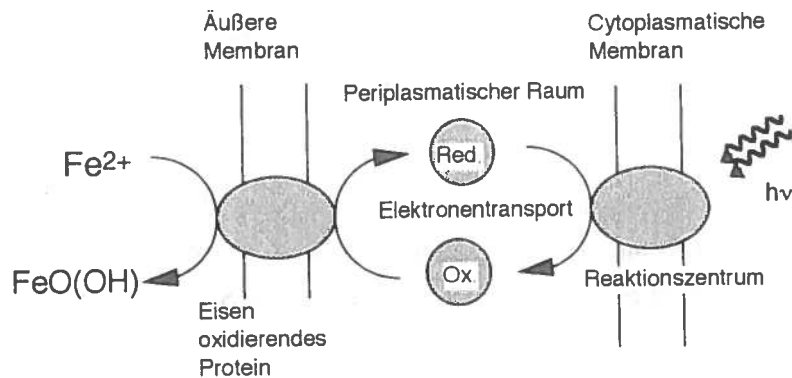


Abbildung 39: Hypothetische topologische Anordnung des Fe(II)-oxidierenden Systems in Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien.

Da das bei der Fe(II)-Oxidation entstehende Fe(III) unter neutralen Bedingungen unlösliche Präzipitate bildet, die das Cytoplasma oder den periplasmatischen Raum schnell verstopfen würden, muß man eine Fe(II)-Oxidation an der äußeren Membran und einen Elektronentransport durch das Periplasma annehmen.

Ist dieses Bild richtig, so sind für eine Verwendung von Fe(II) als Elektronendonator keine entscheidenden Modifikationen an der Zusammensetzung und den Mittelpunktspotentialen der Redoxkomponenten erforderlich. Auch für das Mittelpunktspotential des Reaktionszentrums kann der bisher bekannte Wert von etwa +450 mV (22) angenommen werden. Zusätzlich müßte eine direkt mit dem Eisen reagierende Komponente vorhanden sein, die in der äußeren Membran lokalisiert ist (siehe Abbildung 39). Daß keine entscheidenden Änderungen der an der Photosynthese beteiligten Komponenten notwendig sind, paßt vortrefflich in das Bild, das sich aus der phylogenetischen Position der bisher isolierten Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Organismen ergibt. Mit *Thiodictyon siderooxidans* befindet sich eine auf Fe(II)-Oxidation spezialisierte Spezies mitten unter Sulfid-verwertenden Verwandten. Die enge Verwandtschaft zu *Thiodictyon elegans* ermöglicht somit, eine Fe(II)-oxidierende Spezies und eine Sulfid-oxidierende Spezies direkt auf ihren Gehalt an Redoxkomponenten hin zu untersuchen (192, 201, 202). Es könnten die jeweils gebildeten Redoxproteine isoliert, charakterisiert und ihr Laufverhalten im 2D-Chromatogramm untersucht werden, um für die Fe(II)-Oxidation spezifische Komponenten zu charakterisieren. Weiterhin könnten Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert worden sind, einfach auf den relativen Gehalt der charakterisierten Redoxproteine hin untersucht werden. Auch eine grobe Lokalisierung (membranständig, cytoplasmatisch) der isolierten und charakterisierten Redoxkomponenten wäre auf diese Weise möglich. Es können kleine Mengen an Zellfraktionen in 2D-Gelelektrophoresen eingesetzt und auf ihren Gehalt an den jeweiligen bekannten Spots hin ausgewertet werden. So sollte sich ein vergleichendes Bild der einzelnen Elektronentransportketten zeichnen lassen, besonders wenn man bedenkt, daß Komponenten, die eine Schlüsselfunktion in diesem Elektronentransport einnehmen, auch in größeren Mengen in der Zelle vorliegen sollten.

Die grundsätzliche Gangbarkeit dieser Strategie aufzuzeigen, war das Ziel der unter C.5.4. erwähnten Arbeiten mit 2D-Chromatogrammen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bei *Thiodictyon siderooxidans*. Dies ist sicherlich nur als allererster Schritt aufzufassen, könnte aber bei einer konsequenten Weiterverfolgung dieser Gedanken zu brauchbaren Ergebnissen führen.

Die Topologie der Fe(II)-oxidierenden Komponenten sollte die Besonderheit aufweisen, daß sie auf der Oberfläche der äußeren Membran lokalisiert ist. Das ergibt sich aus der Unlöslichkeit des Oxidationsproduktes Fe(III) unter neutralen Bedingungen. Wäre eine Fe(II)-Dehydrogenase periplasmatisch, so sollten die anfallenden unlöslichen Eisen(III)-hydroxide nach kurzer Zeit zu einer Verstopfung des Periplasmas führen. Aus einer stöchiometrischen Berechnung des Zellwachstums ergibt sich, daß ungefähr 14 g Eisen(III)-hydroxyd pro g

Zelltrockenmasse abgelagert werden. Mit einer Lokalisation der Eisen(III)-oxidierenden Komponenten auf der Zelloberfläche steht im Einklang, daß mikroskopisch niemals eine Krustierung oder Deformierung der wachsenden Zellen durch Eisen(III)-oxide beobachtet wurde. Ein anderer denkbarer Weg, eine Präzipitation im Periplasma zu vermeiden, wäre die Bildung von chelierenden Verbindungen, die das Fe(III) aus der Zelle herausschaffen. Dies wäre metabolisch allerdings sehr aufwendig, da große Mengen einer chelierenden Substanz gebildet werden müßten. Da aber die in autotrophen Kulturen gebildete Zelltrockenmasse ungefähr mit dem theoretisch erwarteten Wert übereinstimmt (siehe C.2.2.), können keine größeren Mengen gelöster organischer Substanz, welcher Natur auch immer, durch die Organismen gebildet worden sein. Diese hätten sich als "fehlende" Zelltrockenmasse in der Bilanz zu erkennen geben müssen. Im Falle einer relativ kleinen Menge eines mehrfach wiederverwerteten Chelators, müßte eine Antwort auf die Frage gefunden werden, wie aus diesem das Fe(III) außerhalb der Zelle freigesetzt werden kann. Der einfachste Weg diese Probleme zu umgehen ist, eine Topologie des eisenoxidierenden Systems ähnlich wie bei *Thiobacillus ferrooxidans* anzunehmen. Dies beinhaltet ein eisenoxidierendes Enzym in der äußeren Membran, wie sie in der Einleitung bereits erwähnt wurde (24, 70). Ein mögliches Arbeitsmodell des Elektronentransports zum photosynthetischen Reaktionszentrum bei der Eisenphotosynthese wird in Abbildung 39 vorgestellt. Die Oxidation des Fe(II) sollte dabei durch ein Protein in der äußeren Membran erfolgen. Der Elektronentransport durch das Periplasma könnte dabei durch eine oder mehrere lösliche Redoxkomponenten bewerkstelligt werden.

In weiterführenden Untersuchungen sollte sich ein solches Fe(II)-oxidierendes Protein durch radioaktive Markierung der Oberflächenproteine und Präparation der äußeren Membran und jeweils anschließende 2D-Chromatographie nachweisen lassen (62). Auch der Nachweis von weiteren Elektronentransportkomponenten könnte durch Reinigung und Charakterisierung im 2D-Chromatogramm erfolgen. Das "braune Protein" ist bereits eine mögliche Komponente, die an der Elektronentransportkette vom Fe(II) zum Reaktionszentrum beteiligt sein könnte.

D.2. Biologie und Geochemie des rezenten Eisenzyklus

Das in primären Gesteinen als Fe(II) vorliegende Eisen unterliegt im Verlauf der Verwitterung in der heutigen, oxidierenden Atmosphäre einem chemischen Oxidationsprozeß. Die resultierenden Eisen(III)-oxide haben eine sehr geringe Löslichkeit. Meßbare Konzentrationen von Fe³⁺-Ionen in Lösung existieren nur unter stark sauren Bedingungen, wie sie z.B. bei der biologischen Pyritoxidation durch *Thiobacillus ferrooxidans* vorliegen (9, 15).

Präzipitation, Lösung und Repräzipitation von Eisenoxiden in der Umwelt hängt stark von Faktoren wie pH, E_h , Temperatur, Wasseraktivität und der Anwesenheit von Komplexbildnern ab (180). Aus diesem Grund können die verschiedenen Eisenoxide als Indikatoren für die Umgebung, in der sie abgelagert wurden, dienen. So kommt der gelb-braune Goethit (α -FeO(OH)) in nahezu allen Böden und Oberflächenformationen wie z.B. Flüssen und Seen vor, wohingegen der rote Hämatit (α -Fe₂O₃) oftmals die Böden der tropischen und subtropischen Regionen färbt. Lepidokrokit (γ -FeOOH) ist im allgemeinen weniger verbreitet als Goethit, kommt aber häufig als orange Akkumulation an bestimmten Orten vor, die durch die Anwesenheit von Fe²⁺-Ionen, aus denen Lepidokrokit durch Oxidation gebildet wurde, gekennzeichnet sind. Der metastabile Lepidokrokit wandelt sich sehr langsam (in ca. 10³ Jahren) in den stabilen Goethit um. In carbonatreichen Lösungen bildet sich bei der Fe(II) Oxidation kein Lepidokrokit, sondern stattdessen sofort Goethit.

Das Vorkommen von Ferrihydrit (Fe(OH)₃) ist auf solche Situationen beschränkt, wo Fe(II) im Vergleich zur Lepidokrokit-Bildung schnell oxidiert wird oder Kristallisationsinhibitoren anwesend sind. Solche Inhibitoren können organische Verbindungen, Phosphate oder Silikate sein. Die Inhibitoren stabilisieren Ferrihydrit und verhindern seine Transformation in stabilere Mineralien. Ferrihydrit ist nur schwach kristallin und besitzt eine sehr geringe Partikelgröße (180). Typische Umgebungen, in denen Ferrihydrit vorkommt, sind Quellen, Drainagerohre, Eisenoxid-Präzipitate im Grundwasser, feuchte Böden sowie Süß- und Salzwassersedimente. Die Oxidation von Fe(II) zu Ferrihydrit erfolgt auf anorganischem Wege, sowie durch aerobe Fe(II)-oxidierende Bakterien wie *Gallionella ferruginea* (36, 46, 54, 77, 180). In der Natur wird Ferrihydrit als notwendige Vorstufe für die Bildung von Hämatit in der festen Phase angesehen (69), kann aber durch einen Lösungs- und Präzipitationsprozeß auch wieder in Goethit übergehen. Dies ist möglich, da die Löslichkeit von Ferrihydrit (pK_s 37 - 39) höher ist als die von Goethit ($pK_s \geq 42$). Die Umwandlung ist unter neutralen Bedingungen langsam (Monate bis Jahre), kann aber durch reduzierende organische Verbindungen wie Cystein auf Tage beschleunigt werden. Daher kann man Ferrihydrit als relativ junges Eisenoxid ansehen, das an Orten mit einer aktiven Eisenumsetzung vorkommt.

Die Eisen(III)-oxide können unter anaeroben Bedingungen, wie sie etwa in nassen Böden, aquatischen Sedimenten oder in Grundwasseradern auftreten, durch dissimilatorische, mikrobielle Eisenreduktion wieder in Fe(II) überführt werden (10, 78, 128, 133, 161, 163). Dabei werden Elektronen aus organischer Substanz auf Fe(III) als Elektronenakzeptor übertragen (34, 131). Diese dissimilatorische Eisenreduktion findet in stratifizierten Sedimenten nach dem Verbrauch von Sauerstoff und Nitrat als Elektronenakzeptoren statt. Sie ist energetisch günstiger als eine Sulfatreduktion oder Methanogenese. Neben der dissimilatorischen Fe(III)-Reduktion gibt es auch eine dissimilatorische Mn(IV)-Reduktion, bei

der in analoger Weise Mn(IV) als Elektronenakzeptor dient und zu Mn(II) reduziert wird (84, 150). Durchschnittlich machen Mangan(IV)-oxide an den meisten Standorten nur 10 % der Menge der Eisen(III)-oxide aus (125, 129). Die Abfolge von Elektronenakzeptoren in Sedimenten ist in Abbildung 40 zusammengefaßt.

An vielen Orten sind Eisen(III)-oxide häufige, wenn nicht die häufigsten potentiellen Elektronenakzeptoren im anoxischen Bereich. Die Fe(III)-Reduktion stellt somit einen sehr wichtigen Prozeß in der Mineralisierung organischer Substanz dar (171). In überfluteten Reisfeldern kann die Fe(III)-Reduktion für bis zu 35 - 65% der Oxidation von organischen Verbindungen verantwortlich sein. Wenn nasse Böden anaerob werden, kann es durch Reduktion der Fe(III)-oxide und Akkumulation von Eisen(II)-Verbindungen zur Ausbildung von grauen, ausgebleichten Zonen kommen (3). Diese Erscheinung wird im Englischen auch als *soil gleying* bezeichnet. Dissimilatorische Fe(III)-Reduktion findet ferner in Grundwasseradern tief unter der Erdoberfläche statt. Die Reduktion der extrem unlöslichen Eisen(III)-oxide zu den besser löslichen Eisen(II)-Verbindungen setzt Fe²⁺-Ionen in das umgebende Grundwasser frei (136). Dies ist auch von technischer Bedeutung, da die gelösten Fe²⁺-Ionen bei Kontakt mit Luft auf chemischem oder biologischem Wege wieder zu Eisen(III)-oxiden oxidiert werden, was zu einer Verstopfung von Rohrleitungen und Brunnenanlagen führen kann. Normalerweise gelangt das Fe(II)-haltige Grundwasser aber früher oder später in ein Oberflächengewässer oder tritt an einer Quelle aus. Kommt es dabei in Kontakt mit Luftsauerstoff, so können aerobe, Fe(II)-oxidierende Bakterien wie *Gallionella ferruginea* oder *Leptothrix ochraceae* dieses wiederum zu Eisen(III)-Oxiden oxidieren (59). Sie müssen allerdings mit einer schnellen chemischen Oxidation konkurrieren (36, 88, 89, 136).

Bei der Reoxidation von Fe²⁺-Ionen entstehen dabei wiederum Ferrihydrit, Lepidokrokit oder Goethit, je nach der Oxidationsgeschwindigkeit und dem pH-Wert an der Stelle der Oxidation. Gelangt das Fe(II)-haltige Wasser dagegen in stagnierende, stratifizierte Gewässer mit einer ausreichenden Lichtversorgung, könnte man dort einen geschlossenen Redoxzyklus des Eisens erwarten. Dieses wäre ein den bekannten Sulfureten analoges Ökosystem (174, 182, 183). Dabei sollten anaerob Fe(II)-oxidierende phototrophe Organismen das Eisen im Licht zu Fe(III) oxidieren, welches dann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe C.4.), ein hervorragender Elektronenakzeptor für dissimilatorische Fe(III)-Reduzierer wäre. Dieser Prozeß würde abermals Fe(II) als Elektronendonator für eine Photosynthese zur Verfügung stellen (52). Ein ähnliches Modell wird im folgenden (siehe D.4.) in einem vergrößerten Maßstab für den Ozean des Archaikums vorgeschlagen. Eine weitere, interessante Möglichkeit wäre die Existenz von mikrobiellen Matten, in denen dieser vorgeschlagene anaerobe Eisenzyklus auch heute noch auf engstem Raum abläuft. In dem bisher gewohnten Bild von mikrobiellen Matten unterteilen sich diese grob in drei Schichten, nämlich eine obere Schicht aus Cyanobakterien, eine mittlere

Schicht aus grünen Schwefelbakterien oder Schwefel-Purpurbakterien und eine untere Schicht aus sulfatreduzierenden Bakterien. Bei auf Eisen basierenden mikrobiellen Matten würde unter der Schicht aus Cyanobakterien eine aus Fe(II)-oxidierenden phototrophen Organismen und dissimilatorischen Fe(III)-Reduzierern zu finden sein (28). Wegen der Unlöslichkeit von Eisen(III)-Verbindungen sollte man das gemeinsame Vorkommen von anaeroben Fe(II)-Oxidierern und Fe(III)-Reduzierern in einer Schicht dieser Matten erwarten. Solche Matten sollten vornehmlich in stark eisenhaltigen Gewässern zu finden sein. Falls auf Eisen basierende mikrobielle Matten existieren würden, wären sie kleine Modellsysteme für mikrobielle Vorgänge im Archaikum (90, 162). Daß es grundsätzlich zu syntrophen Erscheinungen auf der Basis von Eisen als Elektronenüberträger kommen kann, wurde durch die Kokulturrexperimente in dieser Arbeit gezeigt (siehe C.4.).

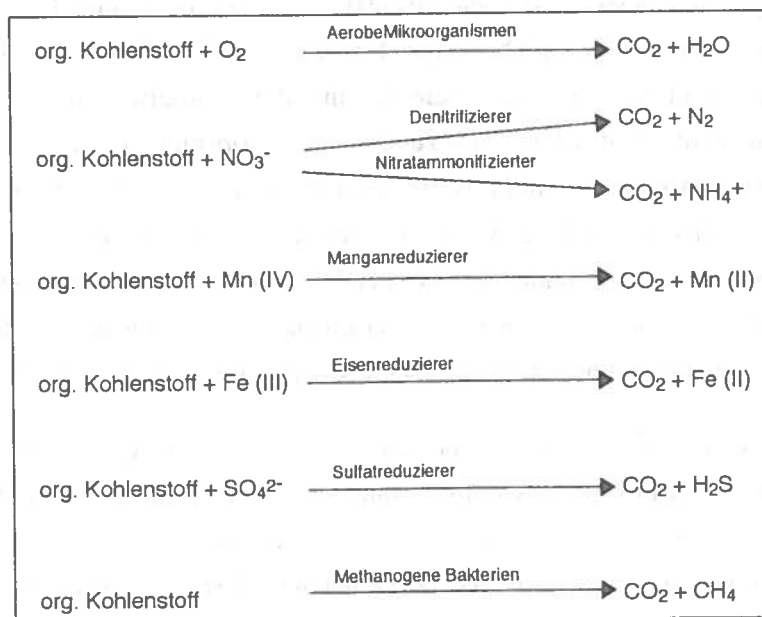


Abbildung 40: Abfolge der Reduktion anorganischer Elektronenakzeptoren im Sediment.

Die Abbildung faßt die bei der Dissimilation organischer Materie stattfindenden mikrobiellen Vorgänge zusammen. Dabei wurde entweder eine stabile Schichtung des Sediments oder eine zeitliche Abfolge der Vorgänge angenommen. Elektronenakzeptoren, die eine höhere freie Energie liefern, werden bevorzugt verwendet. Erst beim Fehlen jeglicher Elektronenakzeptoren setzt eine Methanogenese ein.

D.3. Relevanz von Fe(II)-oxidierenden, phototrophen Bakterien für die Entstehung von gebänderten Eisenerzen und den Ursprung des Lebens

Wie bereits in der Einleitung (siehe unter A.2.2.) dargelegt, wurden Modelle zur Entstehung der BIFs, die eine indirekte biologische Oxidation des im archaischen Ozean gelösten Fe(II) annahmen, durch mehrere Autoren favorisiert (119, 198). Dabei ging man davon aus, daß photosynthetisch produzierter O_2 ein Intermediat dieses Oxidationsprozesses darstellt. Auf diese Weise ergab sich ein Bild, in dem O_2 unmittelbar in der Umgebung oxygener phototropher Organismen mit Fe(II) in seiner Umgebung reagierte und es in Fe(III) überführte, das sich nach seiner Sedimentation in Form von BIFs ansammelte. Erst als das Oberflächenwasser der Ozeane nach langer Zeit weitgehend frei von gelöstem Fe(II) war, begann sich der Sauerstoff in der Erdatmosphäre zu sammeln. Dieser wichtige Übergang in der Chemie der Erdatmosphäre definiert aufgrund geochemischer Befunde, wie dem bereits genannten Auftreten von *red beds* und Uranitit-Konglomeraten (siehe A.2.2.), den Übergang vom Archaikum zum Proterozoikum vor 2,5 Milliarden Jahren.

Da man für das Potential des Redoxpaares Fe(III)/Fe(II) in der mikrobiologischen Literatur vereinfachend oft +0,77 V angenommen hat und dieser Wert von dem Redoxpotential des Sauerstoffs (+0,81 V) nicht allzu verschieden ist, glaubte man, daß auch bei einer direkten Verwendung von Fe(II) als Elektronendonator für eine Photosynthese zwei hintereinander geschaltete Photosysteme erforderlich wären. Dann kämen für eine Photosynthese mit Fe(II), ebenso wie für eine oxygene Photosynthese, nur die Cyanobakterien oder ausgestorbene, direkte evolutive Vorläufer in Frage. Lediglich das für die Wasserspaltung verantwortliche System hätte für die Oxidation des relativ einfachen Substrates Fe(II) noch nicht vorhanden sein müssen. Die aus zwei hintereinandergeschalteten Photosystemen bestehende Photosynthese stellt allerdings einen der am höchsten entwickelten Elektronentransportprozesse der Biochemie dar. Damit steht im Einklang, daß Cyanobakterien die am stärksten differenzierten Prokaryonten darstellen. Neben der Photosynthese mit zwei Photosystemen finden sich in dieser Gruppe auch oft morphologische Differenzierungen wie polare und verzweigte Zellfäden, Heterocysten oder Akineten.

Da aber bereits das älteste bekannte Sedimentgestein, die 3,8 Milliarden Jahre alte Isua Formation aus West Grönland, ein gebändertes Eisenerz ist, müßte man das Vorhandensein dieser hoch differenzierten Biochemie bereits im frühen Archaikum annehmen. Dies würde aber bedeuten, daß der Ursprung des Lebens und eine Evolution aller wichtigen Stoffwechselwege weit vor der Zeit der geologischen Überlieferung zu suchen wäre (198) und daß nach der

Evolution der Cyanobakterien bzw. ihrer evolutiven Vorläufer bis zum Aufkommen eukaryontischer Mikroorganismen vor ca. 1 Milliarde Jahren kein entscheidender Fortschritt in der Evolution mehr stattgefunden hätte. Eine in der Literatur vorgeschlagene Lösung dieses Problems besteht darin, für die Entstehung der BIFs mehrere verschiedene Wege zur Oxidation des Fe(II) anzunehmen. Da noch keine Informationen über die Geschwindigkeit, mit der sich die BIFs im frühen Archaikum bildeten, vorliegen, könnten sich die mengenmäßig wesentlich kleineren, früheren BIFs sehr langsam durch Oxidation des Eisens mit O₂ aus der Photolyse von Wasserdampf gebildet haben. Die für diesen Prozeß zu großen BIFs des Hamersley Basins sind nach diesen Modellen vor 2,5 Milliarden Jahren dann relativ schnell durch photosynthetisch produzierten O₂ gebildet worden. Allerdings ist dann das Vorkommen von bis zu 3,5 Milliarden Jahren alten Stromatolithen mit fädigen Mikrofossilien, sowie der über das ¹²C / ¹³C-Verhältnis geführte Nachweis der vor 3,5 Milliarden Jahren einsetzenden, global bedeutenden Verbreitung von autotrophem Leben rätselhaft (175, 176, 178). Da sich Stromatolithen, wie in der Einleitung bereits dargelegt (siehe A.4.1.), durch autotrophe Organismen in der photischen Zone des Oberflächenwassers gebildet haben, sollten die in ihnen als Mikrofossilien erhalten gebliebenen Organismen bereits eine Photosynthese betrieben haben (199). Da eine Verwendung von Schwefelwasserstoff als Elektronendonator wegen der vorherrschenden hohen Fe(II)-Konzentrationen nicht vorstellbar ist, müßten diese Organismen photoheterotroph gewachsen sein. Die mit Hilfe des δ¹³C-Wertes der Kerogene in der 3,5 Milliarden Jahre alten Warrawoona-Formation beobachtete Autotrophie (177) müßte man dann ausschließlich chemolithotrophen Organismen zuschreiben. Es fehlen jedoch Hinweise, daß es zu jener Zeit genügend Substrate für ein derart üppiges chemolithotrophes Wachstum gab. Dafür, daß es sich bei den frühen phototrophen Organismen nicht um Cyanobakterien handelte, spricht auch die Beobachtung, daß die Mikrofossilien zwar teilweise von fadenförmiger Morphologie waren, aber die für die rezenten Cyanobakterien charakteristischen morphologischen Differenzierungen wie verzweigte oder polare Zellfäden, Heterocysten oder Akineten fehlten. Ferner ist auch der Durchmesser der Zellfäden deutlich geringer als der von Zellfäden aus späteren Formationen und die Zahl an morphologisch verschiedenen Typen wesentlich kleiner (177). Auch unter den rezenten anoxygenen, phototrophen Bakterien gibt es fadenförmige Vertreter, wie etwa die Gattung *Chloroflexus*, die die Beobachtung fadenförmiger Morphotypen bei den Mikrofossilien erklären könnte. Stärker differenzierte Mikrofossilien tauchen erst im späten Archaikum auf. Morphologische Typen, die Vertretern aus den rezenten Taxa *Oscillatoria* spp. und *Lyngbya* spp. entsprechen, wurden erstmals in den 2,7 Milliarden Jahre alten Fortescue Sedimenten gefunden, so daß spekuliert wird, daß etwa zu diesem Zeitpunkt die oxygene Photosynthese einsetzte (115, 177). Dies deckt sich dann erstaunlich gut mit dem Zeitpunkt, an dem die Erdatmosphäre den in der Einleitung ausgeführten Wandel von reduzierend zu oxidierend vollzogen hat (siehe A.2.2.).

Bezieht man in diese Überlegungen mit ein, daß das unter neutralen Bedingungen vorliegende Redoxpaar $\text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{HCO}_3^-/\text{FeCO}_3$ ein Redoxpotential von ca. +0,1 V hat, so ergibt sich ein vollkommen neues Bild. Da das oxidierte Reaktionszentrum von Purpurbakterien ein Mittelpunktpotential von etwa +0,45 V hat, wäre eine biochemisch einfache Photosynthese mit nur einem Photosystem, die Fe(II) als Elektronendonator verwendet, energetisch möglich. Fe(II) war, wie aus der Mächtigkeit der bis heute geologisch erhaltenen BIFs zu schließen ist, in den Ozeanen des Archaikums ein allgegenwärtiger Elektronendonator. Die in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten Purpurbakterien unterstützen die Annahme, daß die BIFs die Folge einer anoxygenen Photosynthese mit Fe(II) als Elektronendonator sind.

In der Literatur wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine Photosynthese, die Fe(II) als Elektronendonator verwendet, einer der ersten energieliefernden Prozesse in der Biologie überhaupt gewesen sein könnte (162). Für diese Photosynthese in ihrer einfachsten Form, wäre nur ein einziges Protein, nämlich ein primitives Reaktionszentrum und eine geschlossene Zellmembran notwendig. Die Voraussetzungen für diesen Prozeß, das Vorhandensein von Licht und Fe(II), waren im frühen Archaikum allgegenwärtig. Im Gegensatz dazu würde eine Energiekonservierung durch Fermentationsprozesse eine Vielzahl von spezifischen Proteinen sowie vergleichsweise hohe Konzentrationen von relativ wenigen Substraten erfordern. Da aus bislang unbekanntem Gründen keine extrem thermophilen phototrophen Organismen gefunden wurden und außerdem die Temperatur des Ozeans im Archaikum nicht wesentlich von der des heutigen verschieden war (198), müßte man somit einen mesophilen Ursprung des Lebens im lichtdurchfluteten Oberflächenwasser von flachen marinen Becken annehmen. Eine solche Umgebung war vermutlich der Entstehungsort der präkambrischen Stromatolithen. Der bedeutendste Unterschied der archaischen Biosphäre zu unserer heutigen war das Fehlen von molekularem O_2 und damit auch eines vor der UV-Strahlung schützenden Ozonschildes. Fe(III), wie es unter neutralen Bedingungen auftritt, absorbiert stark UV-Licht und stellt somit einen effektiven UV-Schutz dar. Es ist also nicht unbedingt erforderlich, den Ort frühen Lebens weit unterhalb der Oberfläche der Ozeane anzunehmen, da nur dort ausreichend Schutz vor der intensiven UV-Strahlung bestanden hat. Organismen, die im Zuge einer primitiven Photosynthese Fe(III) produzierten, hätten sich ihren UV-Schutz sozusagen selbst hergestellt (71, 157, 162).

Diesem Modell über den Ursprung des frühen Lebens widersprechen scheinbar Sequenzdaten von 16S rRNA Genen, aus denen eher ein thermophiler, chemolithotropher Ursprung des Lebens gefolgert wird (66). Dies wird nämlich aus der Tatsache geschlossen, daß diejenigen Archae- und Eubakterien mit der tiefsten Abzweigung im aus 16S rRNA Daten erstellten Stammbaum der Organismen allesamt thermophil sind (195, 207, 208). Man könnte darauf entgegen, daß Verwandte von hypothetischen, noch primitiveren, mesophilen Organismen,

von welchen alle anderen Lebensformen abstammen, aufgrund der unter mesophilen Bedingungen stattfindenden raschen Evolution keine Chance hatten, bis heute gegen die Konkurrenz der moderneren Organismen zu bestehen. Lediglich in der speziellen ökologischen Nische der extremen Thermophilie konnten sich Organismen halten, die ihren Vorfahren aus dem Archaikum relativ nahe stehen. Ein analoger Ablauf der biologischen Evolution ist aus den verschiedensten Organismengruppen bekannt. Beispielsweise sind die rezenten Lissamphibia gegenüber ihren Verwandten aus dem Palaeozoikum sekundär sehr stark veränderte Amphibien, die sich in spezielle ökologische Nischen zurückgezogen haben. Verwandte der primitiven Amphibiengruppe der Ichtyostegialier haben dagegen nicht lange überlebt und wurden noch im Devon durch die moderneren Temnospondyli und Anthracosauria ersetzt (1), von denen ihrerseits keine rezenten Nachkommen erhalten blieben. Über die letztere Gruppe der Anthracosauria schritt die Evolution dann zu den Reptilien weiter. Lissamphibia sind somit die einzige überlebende Amphibiengruppe; aus ihrer Morphologie kann allerdings nicht auf die Morphologie der für die weitere Evolution relevanten, ausgestorbenen Amphibiengruppen geschlossen werden (27). Um noch ein weiteres Beispiel nennen: Durch die Kenntnis der Physiologie der rezenten Brückenechse *Sphenodon punctatus* (Rhynchocephalier) als nächsten überlebenden Verwandten der als "Dinosaurier" zusammengefaßten Ordnungen Saurischier und Ornithischier (27) ist es nicht möglich zu entscheiden, ob diese homöotherm oder poikilotherm waren.

Somit könnte es ein Fehler sein, aus den heute beobachteten Eigenschaften von früh abgezweigten Archaebakterien- und Eubakterien-Gattungen auf die Eigenschaften der Organismen im frühen Archaikum oder gar die Bedingungen zu schließen, unter denen sich das Leben entwickelt hat.

D.4. Globaler Redoxzyklus des Eisens im Archaikum

Mit der Annahme, daß die Entstehung der BIFs allein mit der Akkumulation des bei der Eisenphotosynthese gebildeten Fe(III) zu erklären ist, vereinfacht man das Bild allerdings auf unzulässige Weise.

Die Rate, mit der Fe(III) im Hamersley Basin abgelagert wurde, ist auf $20 \text{ mg Fe}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ geschätzt worden. Die BIFs der Hamersley Gruppe enthalten nur maximal ca. 0,3 % [w/w], meistens aber deutlich weniger Schwefel. Daher sollte der weitaus größte Teil der Elektronen für die CO_2 -Fixierung aus Fe(II) stammen. Dies würde bei einem molaren Verhältnis von 4:1 von oxidiertem Eisen zu fixiertem CO_2 bedeuten, daß in der Hamersley See etwa $1 \text{ mg C}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$ abgelagert wurde (116). Produktive Zonen der Weltmeere produzieren heutzutage allerdings $20\text{-}50 \text{ mg C}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{a}^{-1}$. Man sollte also annehmen, daß die archaische Hamersley See im Vergleich zu rezenten Ökosystemen nur mäßig produktiv war. Doch selbst dann müßten sich durch CO_2 -Fixierung große Mengen organischen Kohlenstoffs gebildet haben. BIFs enthalten aber generell nur wenig organischen Kohlenstoff, was als Argument gegen biologische Ursachen ihrer Entstehung angeführt wurde (116). An diesem Punkt stellt sich also die berechtigte Frage nach dem Verbleib des durch die CO_2 -Fixierung entstandenen organischen Kohlenstoffs.

Ein weiteres Phänomen, das im Zusammenhang mit den BIFs einer Erklärung bedarf, ist die Tatsache, daß die in ihnen enthaltenen Carbonate generell stark mit dem ^{12}C -Isotop angereichert sind. So haben zum Beispiel die BIFs der Hamersley Gruppe einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -10‰ (158, 197). Dieser Wert gilt mit einer gewissen Unsicherheit aufgrund des stark metamorphen Charakters sogar für die BIFs der Isua-Formation (176). Im Gegensatz dazu haben andere marine Carbonate bis zu einem Alter von mindestens 3,5 Milliarden Jahren unverändert einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $\approx 0\text{‰}$, was zeigt, daß sich der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Meerwasser nicht wesentlich verändert hat. ^{12}C -reiches Carbonat in Sedimentgesteinen aus dem Phanerozoikum wird generell auf eine Oxidation von reduziertem, organischem Kohlenstoff während der Diagenese zurückgeführt (197). Reduzierter organischer Kohlenstoff ist stark mit dem leichten Isotop ^{12}C angereichert, mit $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von -25‰ oder tiefer. Die diagenetische Oxidation von organischem Kohlenstoff in jungen Sedimenten kann das im Porenwasser gelöste Carbonat verdünnen. Carbonate, die sich mit dem Porenwasser äquilibrieren, werden auf diese Weise ebenfalls mit dem Isotop ^{12}C angereichert. Eine mögliche Erklärung für den geringen Gehalt der BIFs an organischem Kohlenstoff sowie die auffällige Anreicherung mit dem leichten ^{12}C -Isotop wäre also die Remineralisierung des durch CO_2 -Fixierung entstandenen organischen Kohlenstoffs durch Atmungsprozesse. Da der Schwefelgehalt der Hamersley BIFs niedriger als

0,3 % ist, scheidet die heute in marinen Bereichen vorherrschende Sulfatreduktion als Oxidationsprozeß für den organischen Kohlenstoff aus. Daher kann man annehmen, daß hier Fe(III) als Elektronenakzeptor bei der Oxidation der organischen Verbindungen diente. Eine chemische Reaktion zwischen organischem Kohlenstoff und Fe(III) wurde in der Literatur als abiotischer, metamorpher Prozeß vorgeschlagen (197). Da aber experimentell weder der Metabolismus von fermentativ Fe(III)-reduzierenden Mikroorganismen noch abiotische Mechanismen eine vollständige Oxidation der großen Mengen organischer Verbindungen erklären, muß eine dissimilatorische Fe(III)-Reduktion als Atmungsprozeß mit terminaler Oxidation von organischen Verbindungen stattgefunden haben (32, 125).

Eisen ist in der Erdkruste wesentlich häufiger als Schwefel. Nahezu aller Schwefel in Primärgesteinen liegt zudem in der Form von Pyrit vor. Verwittert dieser Pyrit unter den rezenten, oxidierenden Bedingungen, so geht der Schwefel als Sulfat in Lösung. Das unlösliche Eisen(III)-oxid bleibt zurück. Deshalb ist Schwefel in der heutigen Biosphäre häufiger als Eisen. Unter anaeroben Bedingungen kann Pyrit allerdings nicht oxidiert und gelöst werden. Eisen kann jedoch als Fe(II) aus den häufigen Eisensilikat-Mineralien in Lösung gehen. Daher war Fe(II) in der archaischen Hydrosphäre wesentlich häufiger als Schwefel (197). Das im Ozean in riesigen Mengen glöste Fe(II) könnte durch phototrophe Organismen somit zu Fe(III) oxidiert worden sein. Dieses Fe(III) könnte dann der Elektronenakzeptor bei der Oxidation von reduziertem Kohlenstoff gewesen sein. Dies hätte produktive, biogeochemische Zyklen ohne die Beteiligung von freiem Sauerstoff erlaubt. Diese geochemischen Evidenzen lassen auch die Vermutung zu, daß sich die dissimilatorische Fe(III)-Reduktion noch vor anderen respiratorischen Prozessen wie Sulfatreduktion, Nitratreduktion oder aerober Respiration entwickelt hat (125, 177).

Sauerstoff, der heute wichtigste Elektronenakzeptor der heterotrophen Respiration, ist ein flüchtiges Photosyntheseprodukt. In der rezenten Hydrosphäre entweicht photosynthetisch gebildeter O_2 wegen seiner geringen Löslichkeit in Wasser größtenteils in die Atmosphäre, während partikulärer organischer Kohlenstoff absinkt und sich auf der Sedimentoberfläche von Ozeanen und Flüssen akkumuliert. Daher kann sich überschüssige organische Substanz in Sedimenten ansammeln und lokale anaerobe Bereiche bilden. Da im geochemischen Zyklus oxidierte und reduzierte Komponenten in stöchiometrischer Menge gebildet werden und bei gleichmäßiger Durchmischung wieder verbraucht würden, beruht die Bildung von lokalen oxidierenden und reduzierenden Bereichen einzig auf den Unterschieden im Transport- und Akkumulationsverhalten der Photosyntheseprodukte. Die moderne Biosphäre ist in oberen Bereichen oxidierend und in unteren Bereichen reduzierend (197). Man muß sich allerdings darüber im klaren sein, daß diese Aufteilung der Biosphäre eine Konsequenz der

physikalischen Eigenschaften von O_2 und organischer Materie darstellt und keineswegs eine allgemeine Eigenschaft von oxidierenden und reduzierenden Komponenten ist.

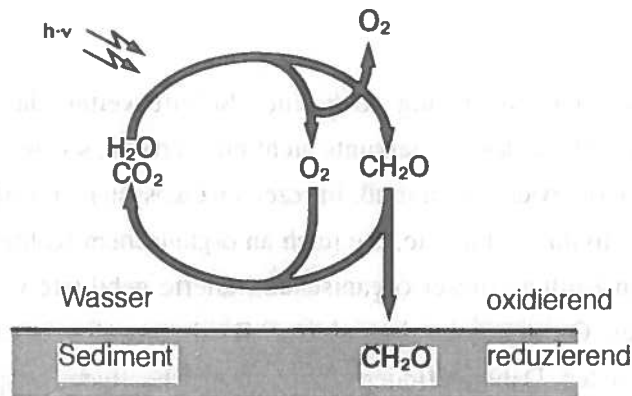
Im Gegensatz zu O_2 ist Fe(III) dichter als Zellmaterial und sedimentiert darum schneller. Die Biosphäre des Archaikums war wahrscheinlich umgekehrt geschichtet wie die rezente. Auf dem Boden eines reduzierenden Wasserkörpers in einer generell anaeroben Welt befanden sich oxidierende, Fe(III)-haltige Sedimente. Die Biosphäre des Archaikums war somit in den oberen Bereichen reduzierend und in den unteren Bereichen oxidierend (197). Der grundsätzliche Unterschied im Aufbau der anaeroben und der aeroben Biosphäre soll in Abbildung 41 verdeutlicht werden.

Geht man in diesem Gedankengang noch einen Schritt weiter, dann kommt man zu dem Schluß, daß die Biosphäre des Archaikums nicht nur vertikal, sondern auch horizontal genau umgekehrt organisiert gewesen sein muß. In rezenten Ökosystemen findet man unter Regionen einer hohen Produktivität Sedimente, die reich an organischem Kohlenstoff sind. Der bei der photosynthetischen Bildung dieser organischen Materie gebildete O_2 ist in die Atmosphäre entwichen. Dieses O_2 dient zur kompletten Oxidation des organischen Materials in unproduktiven Gebieten. Daher befinden sich in unserer heutigen Biosphäre unter produktiven Gebieten reduzierende Sedimente. Dagegen sollten sich in der anaeroben Welt des Archaikums unter Gebieten hoher biologischer Produktivität Sedimente der schneller sedimentierenden Eisen(III)-Verbindungen befunden haben, die relativ arm an der mobileren, organischen Materie waren. Diese lagerte sich nicht nur in produktiven, sondern zum Teil auch in unproduktiven Gebieten ab. In der Welt des Archaikums haben sich in diesem Bild daher unter produktiven Gebieten oxidierende Sedimente befunden, wohingegen unproduktive Gebiete reduzierende Sedimente hatten (197). In den produktiven Gebieten kam es somit zu einem stöchiometrischen Unterschuß an Reduktionsäquivalenten für eine vollständige Reduktion der abgelagerten Eisen(III)-Mineralien. Dies sollte der Grund dafür sein, warum BIFs als produktive Gebiete des Archaikums so arm an organischem Kohlenstoff sind. Es sind auch Sedimentgesteine aus dem Archaikum und frühen Proterozoikum des umgekehrten Typs bekannt. Diese enthalten organische Verbindungen, aber nahezu kein Fe(III). Alles Eisen liegt als Fe(II) vor. Folgt man dem hier geschilderten Modell, sollte es sich dabei um Sedimente handeln, die unter unproduktiven Gebieten entstanden sind, d.h. in solchen, in denen der sedimentierte Elektronenakzeptor Fe(III) für eine Reoxidation organischer Verbindungen begrenzend war.

In dieser Arbeit wurde nun experimentell gezeigt, daß eine Photosynthese mit Fe(II) als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen stattfindet. Die isolierten Organismen können somit als Modellorganismen für die Primärproduzenten aus dem Archaikum angesehen werden.

Ferner wurde gezeigt, daß durch photosynthetische Organismen produziertes Fe(III) *Geobacter metallireducens*, der als Modellorganismus für die archaischen Konsumenten gesehen werden kann, wieder als Elektronenakzeptor dienen kann. Die vorgestellte Kokultur mit Eisen als Überträger von Reduktionsäquivalenten kann man als ein Miniaturmodell des archaischen Ozeans betrachten.

a. Aerobe Biosphäre



b. Anaerobe Biosphäre

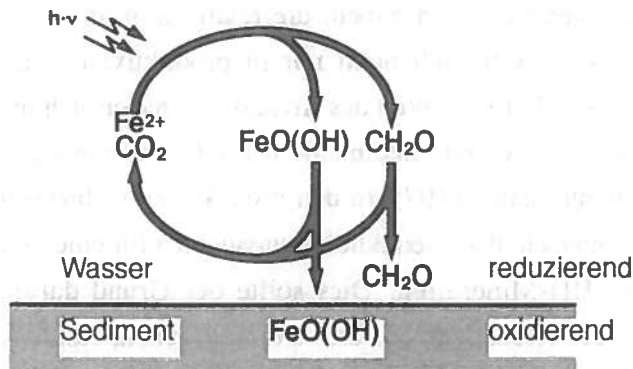


Abbildung 41: Vergleich einer (a) rezenten aeroben und (b) archaischen anaeroben Biosphäre.

Aus den physikalischen Eigenschaften der mikrobiellen Elektronenakzeptoren O_2 und Fe(III) ergeben sich Unterschiede in den oxidierenden und reduzierenden Eigenschaften der Biosphäre. Die Flüchtigkeit von O_2 bedingt, daß in einer aeroben Biosphäre die Sedimente unter produktiven Gebieten reduzierend sind. In der anaeroben Biosphäre führten die im Vergleich zur organischen Substanz spezifisch schwereren Eisen(III)-Hydroxide zu oxidierenden Sedimenten unterhalb von produktiven Regionen.

D.5. Ausblick

Zukünftige mikrobiologische Arbeiten zum anaeroben Eisenzyklus sollten in erster Linie auf die beteiligten Organismen abzielen. Zunächst wäre hier die Isolierung mariner phototropher Fe(II)-Oxidierer zu nennen, um das Vorhandensein dieses Stoffwechselltyps auch im marinen Milieu zu demonstrieren. Vor kurzem gelang es Frau Kristina Straub in unserem Labor, solche Organismen zu isolieren. Ferner wäre es interessant, anaerobe, phototrophe Fe(II)-Oxidierer aus verschiedenen Verwandtschaftsbereichen zu isolieren. Käme dieser Stoffwechselltyp etwa auch unter den Chlorobien oder Chloroflexaceae vor, dann würde das bedeuten, daß er weit im Stammbaum verbreitet und damit recht ursprünglich sein könnte. Hier sollte erwähnt werden, daß Frau Silke Heising aus dem Labor von Prof. Schink bereits ein grünes, Fe(II)-oxidierendes Bakterium anreichern konnte. Es dürfte von allergrößtem Interesse sein festzustellen, ob es sich dabei tatsächlich um ein Chlorobium handelt. Dies wäre eine für die genannten Theorien zur Entstehung des Lebens wichtige Einsicht. Von besonderer Bedeutung wäre auch die Frage, ob alle anaerob Fe(III)-oxidierenden Organismen ein hoch amorphes Eisenoxid produzieren, das leicht durch *Geobacter* oder andere dissimilatorische Fe(III)-Reduzierer reduzierbar ist.

Die zweite Zielrichtung wären die dissimilatorisch Fe(III)-reduzierenden Organismen. Mit der Gattung *Geobacter* stehen erst wenige, gut charakterisierte Organismen dieses Stoffwechselltyps zur Verfügung, die zur vollständigen Oxidation von organischer Substanz fähig sind. Die derzeitig noch geringe Zahl an Reinkulturen Fe(III)-reduzierender Bakterien steht im krassen Gegensatz zu ihrer geochemisch-beobachteten Bedeutung. Insbesondere wäre es interessant, mehrere Reinkulturen auf die Fähigkeit zu testen, verschiedene, chemisch-definierte oder an natürlichen Standorten in der Natur gesammelte Eisenoxidspezies zu reduzieren. Dabei könnte die Frage geklärt werden, ob allgemein amorphe Eisenoxide bevorzugt werden, oder ob es Spezialisten für die verschiedenen Hydroxide, Oxyhydroxide oder Oxide des Eisens gibt. Man müßte auch versuchen, diese Frage mit Hilfe von Anreicherungen auf verschiedenen definierten Eisenoxiden zu beantworten.

Eine weitere Fragestellung von Interesse wäre, von welcher ökologischen Bedeutung der anaerobe Eisenzyklus noch heute ist und ob sich die vermuteten mikrobiellen Matten auf der Basis dieses Redoxkreislaufs tatsächlich finden lassen. Könnte man diese tatsächlich finden, so wäre ihr Studium von großer Bedeutung für Einsichten in die Vorgänge im Archaikum und die ersten Lebensprozesse auf unserem Planeten.

E. Zusammenfassung

1. Es wurde erstmals eine anaerobe Photosynthese mit Fe(II) als Elektronendonator als neue Form einer Photosynthese und als neuer autotropher Stoffwechselltyp beschrieben. Zwei neue Arten von Organismen, die zu diesem Energiestoffwechsel fähig sind, wurden angereichert, isoliert, stoffwechselphysiologisch charakterisiert und durch Sequenzierung ihrer 16S rRNA-Gene innerhalb der Proteobakterien klassifiziert.
2. Methoden für die Kultivierung von *Thiodictyon sideroxidans* in Volumina bis zu 10 l für biochemische Untersuchungen wurden ausgearbeitet.
3. Die Fähigkeit zur Oxidation von Fe(II) war induzierbar. Bei *Thiodictyon sideroxidans* wurde mit einer biochemischen Charakterisierung der an der Fe(II)-Oxidation beteiligten Proteine durch 2D-Gelelektrophorese und Reinigung begonnen.
4. Es wurde gezeigt, daß die durch die phototrophen Organismen produzierten Eisen(III)-Spezies wiederum als Elektronenakzeptoren für dissimilatorische Fe(III)-Reduzierer dienen können. Diese Beobachtung wurde in einen geochemischen Kontext gestellt.
5. Eine neue Kokultur zwischen *Rhodobacter ferrooxidans* und *Geobacter metallireducens* mit Eisen als Überträger von Elektronen wurde etabliert.

F. Anhang

F.1. Description of *Thiodictyon siderooxidans* sp. nov.

si.de.ro.o'xi.dans. Gr. n. *sideros* iron; M.L. v. *oxido* oxidize, make acid; M.L. part. adj. *siderooxidans* oxidizing iron.

Cells are oval rods, about 2 - 3 μm in length and 1.2 μm in width. Multiplication occurs by binary fission. Cells are nonmotile under all conditions. May grow as compact clumps, in chains or as individual cells. Contain towards the end of growth, large, irregularly shaped gas vacuoles in the central part of the cell. Color of cell suspensions is purple-violet. Photosynthetic pigments are bacteriochlorophyll *a* and carotenoids of the rhodopinal series.

Obligately phototrophic and strictly anaerobic. Grows photolithoautotrophically by using ferrous iron or H_2 as electron donor. Ferrous sulfide is oxidized to ferric iron and sulfate ions. Free sulfide is not oxidized. During oxidation of ferrous iron sulfide globules of elemental sulfur are transiently stored in the gas vacuole-free peripheral part of the cell. Photoheterotrophic growth is possible in reduced media on acetate, pyruvate or glucose. No growth factors are required. Sulfate is assimilated as sulfur source. pH range, 6.5 - 7.0. Optimum growth temperature, 18°C.

Habitat: Stagnant fresh and brakish water, especially if rich in iron oxides. Type strain was isolated from a ditch near Lübeck.

F.2. Description of *Rhodobacter ferrooxidans* sp. nov.

fer.ro.o'xi.dans. L. n. *ferrum* iron; M.L. v. *oxido* oxidize, make acid; M.L. part. adj. *ferrooxidans* oxidizing iron.

Cells are tiny to elongated rods, about 1.5 to 3 μm in length, dependent on the growth conditions, and 0.5 μm in width. Multiplication occurs by binary fission. Cells are nonmotile under all conditions. Color of cell suspensions grown anaerobically in the light is yellowish-brown to deep brown. When cultures are grown in the presence of oxygen, they turn red to purple-red. Photosynthetic pigments are bacteriochlorophyll *a* and carotenoids of the spheroidene series.

Photoautotrophic growth is possible with ferrous iron or hydrogen as the electron source. Several organic compounds are used as carbon and electron sources for photoheterotrophic growth. Thiamine, biotin and niacin are required as growth factors. Optimum pH, 6.5. Optimum growth temperature, 18°C.

Habitate: Stagnant water, especially ditches with high iron content.

F.3. 16S rRNA Sequenz von *Thiodictyon siderooxidans*

```
1   UCGAACGCGA AAGCUUUCGG GCUGAGUAGA GUGGCGGACG GGUGAGUAAU
51  GCGUGGGAAU CUGCCUGGCA GUGGGGGACA ACCCGGGGAA ACUCGGGCUA
101 AUACCGCAUA CGACCUACGG GGGAAAGGGG GCCGCAAGGC UCUCGCUGCU
151 AGAUGAGCCC ACGUCCGAUU AGCUAGUUGG CAGGGUAAAG GCCUACCAAG
201 GCGACGAUCG GUAGCUGGUC UGAGAGGAUG ACCAGCCACA CUGGGACUGA
251 GACACGGCCC AGACUCCUAC GGGAGGCAGC AGUGGGGAAU AUUGGACAAU
301 GGGCGAAAGC CUGAUCCAGC AAUGCCGCGU GUGUGAAGAA GGCCUGCGGG
351 UUGUAAAGCA CUUUCAGUGG GGAAGAAAAG CAUGUGGUUA AUACCCGUGU
401 GUUUUGACGU UACCCACAAA AGAAGCACCG GCUAACUCCG UGCCAGCAGC
451 CGCGGUAAUA CGGAGGGUGC AAGCGUUAU CGGAAUUACU GGGCGUAAAG
501 CGCGCGUAGG CGGCCUUGAU AAGUCAGCUG UGAAAGCCCC GGGCUCAACC
551 UGGGAACUGC AGUUGAUACU GUCUGGCUCG AGUCUGAGAG AGGGAGGUGG
601 AAUUCAGGU GUAGCGGUGA AAUGCGUAGA UAUCUGGAGG AACACCAGUG
651 GCGAAGGCGG CCUCCUGGCU UAAGACUGAC GCUGAGGUGC GAAAGCGUGG
701 GGAGCAAACA GGAUUAGAU CCCUGGUAGU CCACGCGGUA AACGAUGUCA
751 ACUAGCCGUU GGGUCCAUUU ACGGGCUUAG UGGCGCAGCU AACGCGAUAA
801 GUUGACCGCC UGGGGAGUAC GGCCGCAAGG UUAAAACUCA AAGGAAUUGA
851 CGGGGGCCCG CACAAGCGGU GGAGCAUGUG GUUUAUUUCG AUGCAACGCG
901 AAGAACCUUA CCAGCCCUUG ACAUCCUGGG AAUCCUGCAG AGAUGCGGGA
951 GUGCCUUCGG GAGCCUGGAG ACAGGUGCUG CAUGGCUGUC GUCAGCUCGU
1001 GUCGUGAGAU GUUGGGUUA GUGCCGUAAC GAGCGCAACC CUUGUCCUUA
1051 GUUGCCAGCG AGUCAUGUCG GGAACUCUAA GGAGACUGCC GGUGAUAAAC
1101 CGGAGGAAGG UGGGGACGAC GUCAAGUCAU CAUGGCCUUU AUGGGCUGGG
1151 CUACACACGU GCUACAAUGG UCGGUACAGA GGGUCGCAA CCCGCGAGGG
1201 GGAGCCAAUC UCACAAAACC GGUCGUAGUC CGGAUCGCAG UCUGCAACUC
1251 GACUGCGUGA AGUCGGAAUC GCUAGUAAUC GCGAAUCAGC AUGUCGCGGU
1301 GAAUACGUUC CCGGGCCUUG UACACACCGC CCGUCACACC AUGGGAGUUG
1351 GUUGCACCAG AAGUAGGUAG CUUAACCUUC GGGAGGGCGC UUACCACGGU
1401 GUGGUCAAUG ACUGGGGUGA AGUCGUAACA AGGUAG
```

F.4. 16S rRNA Sequenz von *Rhodobacter ferrooxidans*

```
1   CCUAACACAU CGAAGUCGAA CGGGUCUUCG GACUAGUGGC GGACGGGUGA
51  GUAACGCGUG GGAACAUACC CUUUGGUACG GAAUAGCCUC GGGAAACUGG
101 GUGUAAUACC GUAUGUGCUU CGGGGGAAAG AUUUAUCGCC AAAGGAUUGG
151 CCCGCGUUGG AUUAGGUAGU UGGUGGGGUA AUGGCCUACC AAGCCGACGA
201 UCCAUAGCUG GUUUGAGAGG AUGAUCAGCC ACACUGGGAC UGAGACACGG
251 CCCAGACUCC UACGGGAGGC AGCAGUGGGG AAUCUAGAC AAUGGGGGAA
301 ACCCUGAUCU AGCCAUGCCG CGUGAGUGAU GAAGGCCUUA GGGUUGUAAA
351 GCUCUUUCAG UGGGGAAGAU AAUGACGGUA CCCACAGAAG AAGCCCCGGC
401 UAACUCCGUG CCAGCAGCCG CGGUAAUACG GAGGGGCUAG CGUUAUUCGG
451 AAUACUGGG CGUAAAGCGC ACGUAGGCGG AUUGGAAAGU UGGAGGUGAA
501 AUCCAGGGC UCAACCUUGG AACUGCCUUC AAAACUCCA GUCUUGAGGU
551 CGAGAGAGGU GAGUGGAAU CCGAGUGUAG AGGUGAAAUU CGUAGAUAAU
601 CGGAGGAACA CCAGUGGCGA AGGCGGCUCA CUGGCUCGAU ACUGACGCUG
651 AGGUGCGAAA GCGUGGGGAG CAAACAGGAU UAGAUACCCU GGUAGUCCAC
701 GCCGUAAACG AUGAAUGCCA GUCGUCGGGU AGCAUGCUAU UCGGUGACAC
751 ACUAACGGAU UAAGCAUUCG GCCUGGGGAG UACGGCCGCA AGGUUAAAAC
801 UCAAAGGAAU UGACGGGGGC CCGCACAAGC GGUGGAGCAU GUGGUUUAAU
851 UCGAAGCAAC GCGCAGAACC UUACCAACC UUGACAUGGC AGUGACCGUU
901 CCAGAGAUGG UCCUUUCUCG UAAGAGACAC UGCACACAGG UGCUGCAUGG
951 CUGUCGUCAG CUCGUGUCGU GAGAUGUUCG GUUAAGUCCG GCAACGAGCG
1001 CAACCCACGU CUUAGUUGC CAGCAUUCAG UUGGGCACUC UAAAGAAACU
1051 GCCGGUGAUA AGCCGGAGGA AGGUGUGGAU GACGUCAAGU CCUCAUGGCC
1101 CUUACGGGUU GGGCUACACA CGUGCUACAA UGGUGGUGAC AAUGGGUUA
1151 UCCCAAAAAG GCCAUCUCAG UUCGGAUUGG GGUCUGCAAC UCGACCCCAU
1201 GAAGUCGGAA UCGCUAGUAA UCGCGUAACA GCAUGACGCG GUGAAUACGU
1251 UCCCGGGCCU UGUACACACC GCCCGUCACA CCAUGGGAAU UGGUUCUACC
1301 CGAAGUGGUG CGCCAACCUC GCAAGAGAGG CAGCCAACCA CGGUAGGAUC
1351 AGUGACUGGG GUGAAGUCGU AACAAGGUAC UCGA
```

G. Literatur

1. **Ahlberg, P. E. and A. R. Milner.** 1994. The origin and early diversification of tetrapods. *Nature* **368**:507-514
2. **Alexandrov, E. A.** 1973. The precambrian banded iron formations of the soviet union. *Economic Geology* **68**:1035-1062
3. **Arnold, R. G., M. R. Hoffmann, T. J. Dichristina and F. W. Picardal.** 1990. Regulation of dissimilatory Fe(III) reduction activity in *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:2811-2817
4. **Assmus, B.** 1991. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians Universität München.
5. **Bak, F., G. Scheff and K.-H. Jansen.** 1991. A rapid and sensitive ion chromatographic technique for the determination of sulfate and sulfate reduction rates in freshwater lake sediments. *FEMS Microbiology* **85**:23-30
6. **Bauer, C., J. Buggy and C. Mosley.** 1993. Control of photosystem genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Trends in Genetics* **9**:56-60
7. **Baur, M. E., J. M. Hayes, S. A. Studey and M. R. Walter.** 1985. Millimeter-scale variations of stable isotope abundances in carbonates from banded iron formations in the hamersley group of western australia. *Economic Geology* **80**:270-282
8. **Bavendamm, W.** 1924. Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß- und Salzwassers, p. 1-157. *In* R. Kolkowitz (ed.), *Pflanzenforschung*, vol. Heft 2. Fischer Verlag, Jena.
9. **Beffa, T., C. Fischer and M. Aragno.** 1993. Growth and respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus novellus* (type strain) grown on thiosulfate. *Current Microbiology* **26**:323-326
10. **Bell, P. E., A. L. Mills and J. S. Herman.** 1987. Biogeochemical conditions favouring magnetite formation during anaerobic iron reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:2610-2616
11. **Benning, M. M., T. E. Meyer, I. Rayment and H. M. H. M. Holden.** 1994. Molecular structure of the oxidized high-potential iron-sulfur protein isolated from *Ectothiorhodospira vacuolata*. *Biochemistry* **33**:2476-2483
12. **Berthelot, D., L. G. Leduc and G. D. Ferroni.** 1993. Temperature studies of iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs isolated from uranium mines. *Canadian Journal of Microbiology* **39**:384-388
13. **Beukes, N. J.** 1973. Precambrian iron-formations of southern africa. *Economic Geology* **68**:960-1004
14. **Blake II, C. B., G. T. Howard and S. McGinness.** 1994. Enhanced yields of iron-oxidizing bacteria by in situ electrochemical reduction of soluble iron in the growth medium. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:2704-2710

15. **Blake II, R. C., E. A. Shute, M. M. Greenwood, G. H. Spencer and W. J. Ingledew.** 1993. Enzymes of aerobic respiration on iron. *FEMS Microbiology Reviews* **11**:9-18
16. **Blum, H., H. Beier and H. J. Gross.** 1987. *Elektrophoresis* **8**:93-99
17. **Borowska, Z. and D. Mauzerall.** 1988. Photoreduction of carbon dioxide by aqueous ferrous ion: An alternative to the strongly reductive atmosphere for the chemical origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**:6577-6580
18. **Böttger, E. C.** 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters* **65**:171-176
19. **Braterman, P. S., A. G. Cairns Smith and R. W. Sloper.** 1983. Photo-oxidation of hydrated Fe²⁺-significance for banded iron formations. *Nature* **303**:163-164
20. **Brischwein, M., B. Scharf, M. Engelhard and W. Mantele.** 1993. Analysis of the redox reaction of an archaeobacterial copper protein, halocyanin, by electrochemistry and FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* **32**:13710-13717
21. **Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter and H. F. Noller.** 1981. Gene organisation and primary structure of a ribosomal RNA operon from *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* **148**:107-127
22. **Brune, D. C.** 1989. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**:189-221
23. **Bruschi, M., M. Woudstra, D. Campese and J. Bonicel.** 1993. Amino-acid sequence of cytochrome c-553 from *Desulfovibrio desulfuricans* Norway. *Biochimica Biophysica Acta* **1162**:89-92
24. **Buonfiglio, V., M. Poidoro, L. Flora, G. Cirto, P. Valenti and N. Orsi.** 1993. Identification of two outer membrane proteins involved in the oxidation of sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* **11**:43-50
25. **Caccavo, F., D. J. Lonergan, D. R. Lovley, M. Davis, J. F. Stolz and M. J. McInerney.** 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:3752-3759
26. **Cairns Smith, A. G.** 1978. Precambrian solution photochemistry, inverse segregation, and banded iron formations. *Nature* **276**:807-808
27. **Carroll, R. L.** 1988. *Vertebrate Paleontology and Evolution*. Freeman, New York.
28. **Castenholz, R. W.** 1994. Microbial mat research: The recent past and new perspectives, p. 3-18. *In* L. Stal and P. Caumette (ed.), *Microbial Mats*, vol. G 35. Springer Verlag, Heidelberg.

29. **Caumette, P.** 1989. Ecology and general physiology of anoxygenic phototrophic bacteria in benthic environments, p. 283-304. *In* Y. C. a. E. Rosenberg (ed.), Microbial mats: physiological ecology of Benthic microbial communities, American Society for Microbiology, Washington.
30. **Champine, J. E. and S. Goodwin.** 1991. Acetate catabolism in the dissimilatory iron-reducing isolate GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* **173**:2704-2706
31. **Cloud, P.** 1973. Paleocological significance of the banded iron-formations. *Economic Geology* **68**:1135-1143
32. **Cloud, P. E. and G. R. Licari.** 1968. Microbiotas of the banded iron formations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **61**:779-786
33. **Cohen, Y.** 1983. Oxygenic photosynthesis, anoxygenic photosynthesis and sulfate reduction in cyanobacterial mats, *In* M. J. Klug and C. A. Reddy (ed.), Current perspectives in microbial ecology, American Society for Microbiology, Washington D.C.
34. **Coleman, M. L., D. B. Hedrick, D. R. Lovley, D. C. White and K. Pye.** 1993. Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* **361**:436-438
35. **Corstjens, P. and G. Muyzer.** 1993. Phylogenetic analysis of the metal-oxidizing bacteria *Leptothrix discophora* and *Sphaerotilus natans* using 16S rDNA sequencing data. *Systematic and Applied Microbiology* **16**:219-223
36. **Corstjens, P. L. A. M., J. P. M. De Vrind, P. Westbroek and E. W. De Vrind-De Jong.** 1992. Enzymatic iron oxidation by *Leptothrix discophora*: Identification of an iron-oxidizing protein. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:450-454
37. **Cataloge of Strains.** 1993. DSM-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig.
38. **De Sioniz, M. I., P. Lorenzo, M. Murua and J. Perera.** 1993. Characterization of a new metal-mobilizing *Thiobacillus* isolate. *Archives of Microbiology* **159**:237-243
39. **De Vrind, J. P. M., E. W. De Vrind-De Jong, J.-W. H. De Voogt, P. Westbroek, F. C. Boogerd and R. A. Rosson.** 1986. Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **52**:1096-1100
40. **De Vrind-De Jong, E. W., P. L. A. M. Corstjens, E. S. Kempers, P. Westbroek and J. P. M. De Vrind.** 1990. Use of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine as an indicator of metal oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:3458-3462
41. **De Vrind-De Jong, E. W., J. P. M. De Vrind, F. C. Boogerd, P. Westbroek and R. A. Rosson.** 1986. Manganese transformations by marine *Bacillus* species, p. 489-495. *In* R. E. Crick (ed.), Origin, evolution, and modern aspects of biomineralisation in plants and animals, Plenum Press, New York.

42. **Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel.** 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature* **318**:618-623
43. **Deisenhofer, J. and H. Michel.** 1989. The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* **245**:1463-1473
44. **Dichristina, T. J. and E. F. Delong.** 1993. Design and application of rRNA-targeted oligonucleotide probes for the dissimilatory iron-reducing and manganese-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:4152-4160
45. **Dolata, M. M., J. J. Vanbeeumen, R. P. Ambler, T. E. Meyer and M. A. Cusanovich.** 1993. Nucleotide sequence of the heme subunit of flavocytochrome *c* from the purple phototrophic bacterium, *Chromatium vinosum* - A 2.6 kilobase pair DNA fragment contains 2 multiheme cytochromes, a flavoprotein, and a homolog of human ankyrin. *Journal of Biological Chemistry* **268**:14426-14431
46. **Dorff, P.** 1934. Die Eisenorganismen. Gustav Fischer Verlag, Jena.
47. **Dorn, M., J. R. Andresen and G. Gottschalk.** 1978. Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of Bacteriology* **133**:26-32
48. **Dorr, J. V. N.** 1973. Iron-formation in south america. *Economic Geology* **68**:1005-1022
49. **Drews, G. and J. F. Imhoff.** 1991. Phototrophic purple bacteria, p. 51-97. *In* J. M. Shively and L. L. Barton (ed.), *Variations in Autotrophic Life*, Academic Press, London.
50. **Dutton, P. L. and W. C. Evans.** 1978. Metabolism of aromatic compounds by Rhodospirillaceae, p. 719-726. *In* R. K. Clayton and W. R. Sistrom (ed.), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York.
51. **Dutton, P. L. and R. C. Prince.** 1978. Reaction centre driven cytochrome interaction in electron and proton translocation and energy coupling, *In* R. K. Clayton and W. R. Sistrom (ed.), *The photosynthetic bacteria*, Plenum Press, New York.
- 52.a **Ehrenreich, A. and F. Widdel.** 1994. Phototrophic oxidation of ferrous minerals - a new aspect in the redox microbiology of iron, *In* L. J. Stal and P. Caumette (ed.), *Microbial mats*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 52.b **Ehrenreich, A. and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* **60**:4517-4526
53. **Ehrlich, H. L.** 1990. Geomicrobiology. Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
54. **Ehrlich, H. L., W. J. Ingledew and J. C. Salerno.** 1991. Iron- and manganese-oxidizing bacteria, p. 51-97. *In* J. M. Shively and L. L. Barton (ed.), *Variations in Autotrophic Life*, Academic Press, London.
55. **Eichler, B. and N. Pfennig.** 1986. Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pedioformis* sp. nov. *Archives of Microbiology* **146**:295-300

56. **Eichler, B. and N. Pfennig.** 1988. A new purple sulfur bacterium from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. Archives of Microbiology **149**:395-400
57. **Eisenreich, W., G. Strauss, U. Werz, G. Fuchs and A. Bacher.** 1993. Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. European Journal of Biochemistry **215**:619-632
58. **Emerson, D. and W. C. Ghiorse.** 1993. Role of disulfide bonds in maintaining the structural integrity of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. Journal of Bacteriology **175**:7819-7827
59. **Emerson, D. and N. P. Revsbech.** 1994. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near aarhus, denmark: field studies. Applied and Environmental Microbiology **60**:4022-4031
60. **Eugster, H. P. and I. Ming-Chou.** 1973. The depositional environments of precambrian banded iron-formations. Economic Geology **68**:1144-1168
61. **Evans, W. R., D. E. Fleischman, H. E. Calvert, P. V. Pyati, G. M. Alter and N. S. S. Rao.** 1990. Bacteriochlorophyll and photosynthetic reaction centers in *Rhizobium* strain BTAi. Applied and Environmental Microbiology **56**:3445-3449
62. **Evers, D., J. Weckesser and G. Drews.** 1984. Protein on the cell surface of the moderately halophilic phototrophic bacterium *Rhodospirillum salexigens*. Journal of Bacteriology **160**:107-111
63. **Fachgruppe Wasserchemie, G. D. C.** 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung, vol. II, E1. VCH, Weinheim, New York.
64. **Felsenstein, J.** 1982. Numerical methods for inferring phylogenetic trees. Quaterly Review of Biology **57**:379-404
65. **Fischer, U.** 1989. Characterization of two soluble basic cytochromes isolated from the anoxygenic phototrophic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides*. Zeitschrift für Naturforschung **44c**:71-76
66. **Forterre, P., N. Benachenhouhfa, F. Confalonieri, M. Duguet, C. Elie and B. Labedan.** 1992. The Nature of the last universal ancestor and the root of the tree of life, still open questions. Biosystems **28**:15-32
67. **Fowler, V. J., N. Pfennig, W. Schubert and E. Stackebrandt.** 1984. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria-16S rRNA oligonucleotide cataloguing of 11 species of Chromatiaceae. Archives of Microbiology **139**:382-387
68. **Francois, L. M.** 1986. Extensive deposition of banded iron formations was possible without photosynthesis. Nature **320**:352-354
69. **French, B. M.** 1973. Mineral assemblages in diagenetic and low-grade metamorphic iron-formation. Economic Geology **68**:1063-1074
70. **Fukumori, Y., T. Yano, A. Sato and T. Yamanaka.** 1988. Fe(II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiology Letters **50**:169-172

71. **Garcia-Pichel, F. and R. W. Castenholz.** 1994. On the significance of solar ultraviolet radiation for the ecology of microbial mats, p. 79-84. *In* L. Stal and P. Caumette (ed.), *Microbial Mats*, vol. G 35. Springer Verlag, Heidelberg.
72. **Garrels, R. M. and C. L. Christ.** 1965. *Solutions, minerals and equilibria*. Harper & Row, New York.
73. **Garrels, R. M., E. A. J. Perry and F. T. Mackenzie.** 1973. Genesis of precambrian iron formations and the development of atmospheric oxygen. *Economic Geology* **68**:1173-1179
74. **Gaul, D. F. and D. B. Knaff.** 1983. The presence of cytochrome *c*1 in the purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *FEBS Letters* **162**:69-75
75. **Gest, H.** 1993. Photosynthetic and quasi-photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **112**:1-6
76. **Gest, H. and J. L. Favinger.** 1989. Genus *Heliobacterium*, p. 1707-1708. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
77. **Ghiorse, W. C.** 1984. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* **38**:515-550
78. **Ghiorse, W. C.** 1989. Manganese and iron as physiological electron donors and acceptors in aerobic-anoerobic transition zones, p. 163-169. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (ed.), *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities*, American Society for Microbiology, Washington.
79. **Goldich, S. S.** 1973. Ages of precambrian banded iron-formations. *Economic Geology* **68**:1126-1134
80. **Goodwin, A. M.** 1973. Archean iron-formations and tectonic basins of the canadian shield. *Economic Geology* **68**:915-933
81. **Gorby, Y. A. and D. R. Lovley.** 1991. Electron transport in the dissimilatory iron reducer, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:867-870
82. **Görg, A.** 1991. Two-dimensional electrophoresis. *Nature* **349**:545-546
83. **Görg, A., W. Postel and S. Günther.** 1988. Two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9**:531-546
84. **Gounot, A. M.** 1994. Microbial oxidation and reduction of manganese: Consequences in groundwater and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **14**:339-350
85. **Gray, G. O., D. F. Gaul and D. B. Knaff.** 1983. Partial purification and characterization of two soluble c-type cytochromes from *Chromatium vinosum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **222**:78-86
86. **Greenwood, N. N. and A. Earnshaw.** 1984. *Chemistry of the elements*. Pergamon Press, Oxford, New York.

87. **Gutell, R. R., N. Larsen and C. C. Woese.** 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* **58**:10-26
88. **Halbeck, L. and K. Pederson.** 1991. Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*. *Journal of General Microbiology* **137**:2657-2661
89. **Hanert, H. H.** 1989. Genus *Gallionella*, p. 1974-1979. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
90. **Hartman, H.** 1984. The evolution of photosynthesis and microbial mats: A speculation on the banded iron formations, p. 451-453. *In* *Microbial mats: stromatolites*, Alan R. Liss Inc., New York.
91. **Henseler, A., H. G. Trüper and U. Fischer.** 1986. Soluble cytochromes of *Rhodospseudomonas marina*. *FEMS Microbiology Letters* **33**:1-8
92. **Holland, H. D.** 1973. The oceans: A possible source of iron in iron-formations. *Economic Geology* **68**:1169-1172
93. **Hooper, A. B. and A. A. DiSpirito.** 1985. In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmatic oxidation of substrate. *Microbiological Reviews* **49**:140-157
94. **Imhoff, J. F.** 1989. Family Ectothiorhodospiraceae, p. 1654-1658. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
95. **Imhoff, J. F.** 1989. Genus *Rhodobacter*, p. 1668-1672. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
96. **Imhoff, J. F.** 1992. The Family Ectothiorhodospiraceae, p. 3222-3229. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes* 2nd edn., vol. IV. Springer-Verlag, New York, Berlin.
97. **Imhoff, J. F.** 1992. Taxonomy, Phylogeny, and General Ecology of Anoxygenic Phototrophic Bacteria, p. 53-92. *In* N. H. Mann and N. G. Carr (ed.), *Photosynthetic Prokaryotes*, vol. 6. Plenum Press, New York.
98. **Imhoff, J. F. and H. G. Trüper.** 1992. The Genus *Rhodospirillum* and Related Genera, p. 2141-2155. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes* 2nd edn., vol. III. Springer-Verlag, New York.
99. **Ingledeu, W. J., J. C. Cox and P. J. Halling.** 1977. A proposed mechanism for energy conservation during Fe(II) oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Chemiosmotic coupling to net H⁺ influx. *FEMS Microbiology Letters* **2**:193-197
100. **Jackson, J. B.** 1988. Bacterial Photosynthesis, p. 317-375. *In* C. Anthony (ed.), *Bacterial Energy Transduction*, Academic Press, London.
101. **Jaenicke, L.** 1984. Einführung in die Biochemie. Photostelle der Universitätsbibliothek Köln, Köln.

102. **James, H. L.** 1983. Distribution of banded iron-formations in space and time, p. 471-490. *In* A. F. Trendall and R. C. Morris (ed.), Iron-formations: facts and problems, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
103. **James, H. L. and P. K. Sims.** 1973. Precambrian iron-formations of the world. *Economic Geology* **68**:913-915
104. **Jenney, F. E., R. C. Prince and F. Daldal.** 1994. Roles of the soluble cytochrome *c*₂ and membrane-associated cytochrome *c* *Rhodobacter capsulatus* in photosynthetic electron transfer. *Biochemistry* **33**:2496-2502
105. **Johnson, D. B., M. A. Ghauri and S. McGinness.** 1993. Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiology Reviews* **11**:63-70
106. **Kai, M., T. Yano, H. Tamegai, Y. Fukumori and T. Yamanaka.** 1992. *Thiobacillus ferrooxidans* cytochrome-c oxidase - purification, and molecular and enzymatic features. *Journal of Biochemistry* **112**:816-821
107. **Kasting, J. F., H. D. Holland and L. R. Kump.** 1992. Atmospheric evolution: the rise of oxygen, p. 159-163. *In* J. W. Schopf and C. Klein (ed.), The proterozoic biosphere: a multidisciplinary study, University Press, Cambridge.
108. **Kawasaki, H., Y. Hoshino, H. Kuraiishi and K. Yamasato.** 1992. *Rhodocista centenaria* gen. nov, sp. nov, a cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the proteobacteria alpha-group. *Journal of General and Applied Microbiology* **38**:541-551
109. **Kawasaki, H., Y. Hoshino and K. Yamasato.** 1993. Phylogenetic diversity of phototrophic purple non-sulfur bacteria in the proteobacteria alpha group. *FEMS Microbiology Letters* **112**:61-66
110. **Khalid, A. M., T. M. Bhatti and M. Umar.** 1993. An improved solid medium for isolation, enumeration and genetic investigations of autotrophic iron-oxidizing and sulphur-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**:259-263
111. **Klein, C., Jr.** 1973. Changes in mineral assemblages with metamorphism of some banded precambrian iron-formations. *Economic Geology* **68**:1075-1088
112. **Klein, C. and N. J. Beukes.** 1992. Models for iron-formation deposition, p. 147-151. *In* J. W. Schopf and C. Klein (ed.), The proterozoic biosphere: a multidisciplinary study, University Press, Cambridge.
113. **Klein, C. and N. J. Beukes.** 1992. Time distribution, stratigraphy, and sedimentologic setting, and geochemistry of precambrian iron formations, p. 139-146. *In* J. W. Schopf and C. Klein (ed.), The proterozoic biosphere: a multidisciplinary study, University Press, Cambridge.
114. **Klug, G.** 1993. Regulation of expression of photosynthesis genes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Archives of Microbiology* **159**:397-404
115. **Knoll, A. H.** 1989. The Paleomicrobiological Information in Proterozoic Rocks, p. 469-484. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (ed.), Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities, American Society for Microbiology, Washington.

116. **Kump, L.** 1993. Bacteria forge a new link. *Nature* **362**:790-791
117. **Kunst, A., B. Draeger and J. Ziegenhorn.** 1988. Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase, p. 178-185. *In* H. U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. VI. VCH, Weinheim.
118. **Kusano, T., T. Takeshima, K. Sugawara, C. Inoue, T. Shiratori, T. Yano, Y. Fukumori and T. Yamanaka.** 1992. Molecular cloning of the gene encoding *Thiobacillus ferrooxidans* Fe(II) oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:11242-11247
119. **LaBerge, G. L.** 1973. Possible Biological Origin of Precambrian Iron-Formations. *Economic Geology* **68**:1098-1109
120. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:6680-6685
121. **Lane, D. J., A. P. Harrison, D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovanni, G. Olsen and N. R. Pace.** 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron oxidising eubacteria. *Journal of Bacteriology* **174**:269-278
122. **Larsen, N., G. J. Olsen, B. L. Maidak, M. J. McCaughey, R. Overbeck, T. J. Macke, T. L. Marsh and C. R. Woese.** 1993. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* **21**:3021-3023
123. **Leduc, L. G. and G. D. Ferroni.** 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* **14**:103-120
124. **Loehr, T. M.** 1989. Iron carriers and iron proteins. VCH, New York, Weinheim.
125. **Lovley, D. R.** 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* **55**:259-287
126. **Lovley, D. R.** 1993. Anaerobes into heavy metal: dissimilatory metal reduction in anoxic environments. *Trends in Ecology and Evolution* **8**:213-217
127. **Lovley, D. R.** 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology* **47**:263-290
128. **Lovley, D. R., M. J. Baedecker, D. J. Lonergan, I. M. Cozzarelli, E. J. P. Phillips and D. I. Siegelt.** 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* **339**:297-299
129. **Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby and S. Goodwin.** 1993. *Geobacter metallireducens* gen nov sp nov, a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* **159**:336-344
130. **Lovley, D. R. and D. J. Lonergan.** 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1858-1864

131. **Lovley, D. R. and E. J. P. Phillips.** 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **51**:683-689
132. **Lovley, D. R., J. F. Stolz, G. L. Nord and E. J. P. Phillips.** 1987. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature* **330**:252-254
133. **Lovley, J. P., J. P. Elizabeth and E. J. P. Phillips.** 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology* **54**:1472-1480
134. **Lowe, D. R.** 1980. Stromatolites 3.400 myr old from the archean of western australia. *Nature* **284**:441-443
135. **Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall.** 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275
136. **Luther, G. W., J. E. Kostka, T. M. Church, B. Sulzberger and W. Stumm.** 1992. Seasonal iron cycling in the salt marsh sedimentary environment: The importance of ligand complexes with Fe(II) and Fe(III) in the dissolution of Fe(III) minerals and pyrite, respectively. *Marine Chemistry* **40**:81-103
137. **Madigan, M. T.** 1992. The Family *Heliobacteriaceae*, p. 1981-1992. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes* 2nd edn., vol. II. Springer-Verlag, New York, Berlin.
138. **Mann, S., N. H. C. Sparks, G. H. E. Scott and E. W. De Vrind-De Jong.** 1988. Oxidation of manganese and formation of Mn₃O₄ (hausmannite) by spore coats of a marine *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **54**:2140-2143
139. **Mauzerall, D., Z. Borowska and I. Zielinski.** 1993. Photo and thermal reactions of ferrous hydroxide. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **23**:105-114
140. **Meijer, W. M., W. Hazeu, J. P. Van Dijken, P. Bos and J. G. Kuenen.** 1991. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:2057-2062
141. **Miyajima, T.** 1992. Production of Metallogenium-like particles by heterotrophic manganese-oxidizing bacteria collected from a lake. *Archives of Microbiology* **158**:100-106
142. **Mizunashi, T. S. W., K. Inakaki and T. Tano.** 1987. Purification and some properties of sulfur:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* **169**:4916-4922
143. **Mulder, E. G. and P. Hirsch.** 1989. Sheathed Bacteria, p. 1994-2009. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
144. **Myers, C. R. and J. M. Myers.** 1992. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* **174**:3429-3438

145. **Myers, C. R. and J. M. Myers.** 1993. Ferric reductase is associated with the membranes of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. FEMS Microbiology Letters **108**:15-22
146. **Myers, C. R. and K. H. Nealson.** 1990. Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. Journal of Bacteriology **172**:6232-6238
147. **Naik, R. R., F. M. Murillo and J. F. Stolz.** 1993. Evidence for a novel nitrate reductase in the dissimilatory iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. FEMS Microbiology Letters **106**:53-58
148. **Nealson, K. H. and D. Saffarini.** 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology and regulation. Annual Reviews of Microbiology **48**:311-343
149. **Neidhardt, F.** 1987. Chemical composition of *E. coli*, p. 3-6. In F. Neidhart (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, vol. 1. ASM, Washington, D.C.
150. **Nielson, K. H. and C. R. Myers.** 1992. Microbial reduction of manganese and iron: New approaches to C carbon cycling. Applied and Environmental Microbiology **58**:439-443
151. **Nunzi, F., M. Woudstra, D. Campese, J. Bonicel, D. Morin and M. Bruschi.** 1993. Amino-acid sequence of rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans* and its comparison with other blue copper proteins. Biochimica Biophysica Acta **1162**:28-34
152. **Ohmura, N., K. Kitamura and H. Saiki.** 1993. Mechanism of microbial flotation using *Thiobacillus ferrooxidans* for pyrite suppression. Biotechnology and Bioengineering **41**:671-676
153. **Ormerod, J. G.** 1992. Physiology of the photosynthetic prokaryotes, p. 93-120. In N. H. Mann and N. G. Carr (ed.), Photosynthetic prokaryotes, vol. 6. Plenum Press, New York.
154. **Orpen, J. L. and J. F. Wilson.** 1981. Stromatolites at 3.500 Myr and a greenstone-granite unconformity in the zimbabwean archaean. Nature **291**:213-220
155. **Overmann, J., U. Fischer and N. Pfennig.** 1992. A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. Archives of Microbiology **157**:329-335
156. **Overmann, J. and N. Pfennig.** 1992. Continuous chemotrophic growth and respiration of Chromatiaceae species at low oxygen concentrations. Archives of Microbiology **1992**:59-67
157. **Pace, N. R.** 1991. Origin of life-facing up to the physical setting. Cell **65**:531-533
158. **Perry, E. C. J., F. C. Tan and G. B. Morey.** 1973. Geology and stable isotope geochemistry of the biwabik iron formation, northern minnesota. Economic Geology **68**:1110-1125

159. **Pfennig, N. and H. G. Trüper.** 1989. Anoxygenic phototrophic bacteria, p. 1635-1709. *In* J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
160. **Pfennig, N. and H. G. Trüper.** 1992. The Family Chromatiaceae, p. 3200-3221. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes* 2 nd. edn., vol. IV. Springer-Verlag, New York, Berlin.
161. **Phillips, E. J. P., D. R. Lovley and E. E. Roden.** 1993. Composition of non-microbially reducible Fe(III) in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:2727-2729
162. **Pierson, B. K. and J. M. Olson.** 1989. Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthetic prokaryotes, p. 402-427. *In* Y. Cohen and E. Rosenberg (ed.), *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities*, American Society for Microbiology, Washington.
163. **Postma, D.** 1993. The reactivity of iron oxides in sediments: A kinetic approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**:5027-5034
164. **Pringsheim, E. G.** 1932. Neues über Purpurbakterien. *Naturwissenschaften* **20**:479-483
165. **Pringsheim, E. G.** 1949. Iron bacteria. *Biological Reviews* **24**:200-225
166. **Pronk, J. T., J. C. De Bruyn, P. Bos and J. G. Kuenen.** 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:2227-2230
167. **Pronk, J. T., K. Liem, P. Bos and J. G. Kuenen.** 1991. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:2063-2068
168. **R.W.** 1993. Photosynthese mit Eisen. *Frankfurter Allgemeine Zeitung*.
169. **Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1444-1451
170. **Rawlings, D. E. and T. Kusano.** 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Reviews* **58**:39-55
171. **Roden, E. E. and D. R. Lovley.** 1993. Dissimilatory Fe(III) reduction by the marine microorganism *Desulfuromonas acetoxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:734-742
172. **Sanger, F. and A. R. Coulson.** 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters* **87**:107-110
173. **Sanger, F., C. Nicklen and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**:5463-5467
174. **Schauder, R. and A. Kröger.** 1993. Bacterial sulphur respiration. *Archives of Microbiology* **159**:491-497

175. **Schidlowski, M.** 1988. A 3800-million-year isotopic record of life from carbon sedimentary rocks. *Nature* **333**:313-318
176. **Schidlowski, M., J. M. Hayes and I. R. Kaplan.** 1983. Isotopic inferences of ancient biochemistries: Carbon, sulfur, hydrogen, and nitrogen, p. 149-186. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey.
177. **Schopf, J. W., J. M. Hayes and M. R. Walter.** 1983. Evolution of earth's earliest ecosystems: Recent progress and unsolved problems, p. 361-384. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey.
178. **Schopf, J. W. and B. M. Packer.** 1987. Early archean (3.3-billion to 3.5 billion-year-old) microfossils from Warrawoona group, Australia. *Science* **237**:70-72
179. **Schopf, J. W. and M. R. Walter.** 1983. Archean Microfossils: New evidence of ancient microbes, p. 214-239. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey.
180. **Schwertmann, U. and R. M. Cornell.** 1991. *Iron oxides in the laboratory*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
181. **Short, K. A. and R. P. Blakemore.** 1986. Iron respiration-driven proton translocation in aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology* **167**:729-731
182. **Shrihari, S. R. Bhavaraju, J. M. Modak, R. Kumar and K. S. Gandhi.** 1993. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans* - substrate for unattached cells. *Biotechnology and Bioengineering* **41**:612-616
183. **Smith, D. W. and W. R. Strohl.** 1991. Sulfur-oxidizing bacteria, *In* J. M. Shively and L. L. Barton (ed.), *Variations in autotrophic life*, Academic Press, London.
184. **Stanley, S. M.** 1994. *Historische Geologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
185. **Stearn, C. W. and R. L. Carroll.** 1989. *Paleontology*. John Wiley & Sons, New York.
186. **Steinmetz, M. A. and U. Fischer.** 1981. Cytochromes of the non-thiosulfate-utilizing green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Archives of Microbiology* **130**:31-37
187. **Steinmetz, M. A. and U. Fischer.** 1982. Cytochromes of the green sulfur bacterium *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*. Purification, characterization and sulfur metabolism. *Archives of Microbiology* **131**:19-26
188. **Steinmetz, M. A. and U. Fischer.** 1982. Cytochromes, rubredoxin, and sulfur metabolism of the non-thiosulfate-utilizing green sulfur bacterium *Pelodictyon luteolum*. *Archives of Microbiology* **132**:204-210
189. **Steinmetz, M. A., H. G. Trüper and U. Fischer.** 1983. Cytochrome c-555 and iron-sulfur-proteins of the non-thiosulfate-utilizing green sulfur bacterium *Chlorobium vibrioforme*. *Archives of Microbiology* **135**:186-190

190. **Strauss, G. and G. Fuchs.** 1993. Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionat cycle. *European Journal of Biochemistry* **215**:633-643
191. **Stumm, W. and J. J. Morgan.** 1981. *Aquatic Chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
192. **Then, J. and H. G. Trüper.** 1983. Sulfide oxidation in *Ectothiorhodospira abdelmalekii*. Evidence for the catalytic role of cytochrome c-551. *Archives of Microbiology* **135**:254-258
193. **Tindall, B. J. and W. D. Grant.** 1986. The Anoxygenic phototrophic bacteria, p. 115-155. *In* E. M. Barnes and G. C. Mead (ed.), *Anaerobic bacteria in habitats other than man*, vol. 13. Blackwell Scientific Publications, London.
194. **Trendall, A. F.** 1973. Precambrian iron-formations of australia. *Economic Geology* **68**:1023-1034
195. **Wächtershäuser, G.** 1988. Before enzymes and templates: Theory of surface metabolism. *Microbiological Reviews* **52**:452-484
196. **Walker, J. C. G.** 1984. Suboxic diagenesis in banded iron formations. *Nature* **309**:340-341
197. **Walker, J. C. G.** 1987. Was the Archean biosphere upside down ? *Nature* **329**:710-712
198. **Walker, J. C. G., C. Klein, M. Schidlowski, J. W. Schopf, D. J. Stevenson and M. R. Walter.** 1983. Environmental evolution of the archean-early proterozoic earth, p. 260-290. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey.
199. **Walter, M. R.** 1983. Archean stromatolites: Evidence of the earth's earliest benthos, p. 187-213. *In* J. W. Schopf (ed.), *Earth's earliest biosphere*, Princeton University Press, New Jersey.
200. **Walter, M. R., R. Buick and J. S. R. Dunlop.** 1980. Stromatolites 3.400-3.500 myr old from the north pole area, western australia. *Nature* **284**:443-445
201. **Wermter, U.** 1983. Molecular properties of high potential iron sulfur protein of *Chromatium warmingii*. *Zeitschrift für Naturforschung* **38c**:968-971
202. **Wermter, U. and U. Fischer.** 1983. Cytochromes and anaerobic sulfide oxidation in the purple sulfur bacterium *Chromatium warmingii*. *Zeitschrift für Naturforschung* **38c**:960-967
203. **Wettlaufer, S. H. and R. W. F. Hardy.** 1992. Effect of light and organic acids on oxygen uptake by BTAi, a photosynthetic *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3830-3833
204. **Widdel, A., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus and B. Schink.** 1993. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature* **362**:834-835

205. **Widdel, F.** 1993. Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie Bremen, p. 241-245. *In* G. d. Max-Planck-Gesellschaft (ed.), Max-Planck-Gesellschaft Jahrbuch 1993, Verlag Vandenhoeck & Rupprecht, München.
206. **Widdel, F. and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria, p. 3352-3378. *In* A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (ed.), The Prokaryotes 2nd ed., vol. IV. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
207. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **52**:221-271
208. **Woese, C. R.** 1994. There must be a prokaryote somewhere: Microbiology's search for itself. *Microbiological Reviews* **58**:1-9
209. **Woese, C. R., B. A. Debrunner-Vossbrink, H. Oyaizu, E. Stackebrandt and W. Ludwig.** 1985. Gram-positive bacteria: Possible photosynthetic ancestry. *Science* **229**:762-765
210. **Yamanaka, T.** 1992. The biochemistry of bacterial cytochromes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
211. **Yildiz, F. H., H. Gest and C. E. Bauer.** 1992. Conservation of the photosynthesis gene cluster in *Rhodospirillum centenum*. *Molecular Microbiology* **6**:2683-2691
212. **Zavarzin, G. A.** 1989. Genus *Metallogenium*, p. 1986-1989. *In* J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore.
213. **Zeyer, J., P. Eicher, S. G. Wakeham and R. P. Schwarzenbach.** 1977. Oxidation of dimethylsulfide to dimethylsulfoxide by phototrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:2026-2032

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. F. Widdel für die Überlassung eines Themas, von dem die meisten Doktoranden wohl nur zu träumen wagen würden, für die praktische Hilfestellung bei der Isolierung der Stämme und sein großes Verständnis gegenüber "meiner Sicht der Dinge".

Meinen Eltern, besonders meiner Mutter, gebührt an dieser Stelle auch großer Dank, da sie mein Tun und Treiben stets akzeptiert haben und mir meine persönliche Chance gaben. Besonders mein "ich muß jedes Buch selber haben"-Fimmel wurde immer finanzkräftig unterstützt.

Meiner Freundin Petra Rueter danke ich außer für das "Händchenhalten" in den dunklen Zeiten noch für's Korrekturlesen, die Diskussionen und ihr riesengroßes Verständnis gegenüber meinen diversen Verzweiflungsausbrüchen.

Cathrin Wawer und Heide Schulz danke ich für all die Zigaretten, die wir zusammen geraucht haben und die netten Plauderpausen. Ich schulde den beiden neben Dank noch eine Unmenge Zigaretten.

Christina Probian möchte ich für ihr nettes Wesen und die Ordnung im Labor danken, in dem es sich so gut arbeiten ließ. Viel, viel Glück auch noch an Ingrid Kunze.

Niels Ramsing sei für die freundschaftlichen Diskussionen und Erläuterungen zu unseren Macs und deren Funktion und Programmierung gedankt. Er ist sicherlich der netteste "Macianer", den ich bisher getroffen habe. Dank ihm konnte das Max-Planck-Institut von Anfang an vor Microsoft bewahrt werden.

Frau Marianne Hanzlig vom Institut für Geophysik der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die physikochemische Charakterisierung der Eisen(III)-Verbindungen ebenso wie Herrn Dr. W. Ludwig vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München und Dr. Fred A. Rainey von der DSM für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume aus den rDNA Sequenzen.

Silke Heising, die an der Universität Konstanz an der gleichen Thematik forscht, danke ich für ihre Gastfreundschaft bei meinem Besuch in Konstanz und die netten Diskussionen über Eisenphotosynthese und so. Ich wünsche ihr noch ganz viel Glück mit ihren "Viechern".

Mein Dank gilt nicht zuletzt den Kollegen in den Instituten in München und Bremen, besonders vielen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Widdel, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders Dr. Jan Kuever und Andreas Teske seien an dieser Stelle speziell hervorgehoben. Möge das Forscherglück ihnen stets gewogen sein.