

**ANAEROBER ABBAU VON
FETTSÄUREN UND BENZOESÄURE
DURCH NEU ISOLIERTE ARTEN
SULFAT-REDUZIERENDER BAKTERIEN**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

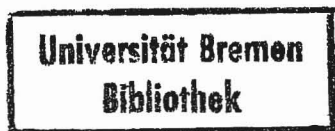
vorgelegt von
Friedrich Widdel
aus Lindhorst / Schaumburg-Lippe

Göttingen 1980

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden durch Sachbeihilfen der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), München, der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig-Stöckheim, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

DH 8324



D 7

DH 8324

Referent: Prof. Dr. N. Pfennig

Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 1980

ABSTRACT

Widdel
Friedrich

Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien

Aus anaeroben Schlämmen wurden mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoat insgesamt 22 Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien isoliert. Morphologisch waren stäbchenförmige, ovale, zitronenförmige, vibrioide, coccoide, Sarcinenbildende und Filamentbildende, gleitend bewegliche Arten vertreten. Stöchiometrische Messungen zeigten, daß die mit Acetat, Stearat und Benzoat isolierten Stämme ihre verschiedenen organischen Substrate vollständig zu CO₂ oxidierten, während die mit Propionat, Butyrat und Palmitat isolierten Stämme Acetat als Endprodukt bildeten. Einige Stämme wurden aufgrund der Morphologie, der Gram-Färbung, des GC-Gehalts der DNS und wichtiger Pigmente (Cytochrome, Desulfovirdin, P 582) eingehender charakterisiert. Sechs Sulfatreduzierer wurden als neue Arten neuer Gattungen beschrieben: Desulfobacter postgatei, Desulfobulbus propionicus, Desulfococcus multivorans, Desulfonema limicola, Desulfonema magnum, Desulfosarcina variabilis. Drei Sulfatreduzierer wurden als neue Arten bekannten Gattungen zugeordnet: Desulfotomaculum acetoxidans, Desulfovibrio sapovorans, Desulfovibrio baarsii. Einige der zur vollständigen Oxidation fähigen Sulfatreduzierer vermochten mit H₂ + CO₂ bzw. mit Formiat autotroph zu wachsen; eine CO₂-Fixierung über den Calvin-Cyclus war dabei nicht nachweisbar. Für den Abbau von Benzoat und verwandten Verbindungen wurde eine physiologische Rolle der Spurenelemente Selen und Molybdän nachgewiesen. Den neu isolierten Arten, insbesondere jenen, die organische Verbindungen vollständig oxidieren, könnte eine größere Bedeutung für die anaerobe Mineralisierung biologischer Substanzen in Sulfathaltigen (z. B. marinen) Sedimenten zukommen.

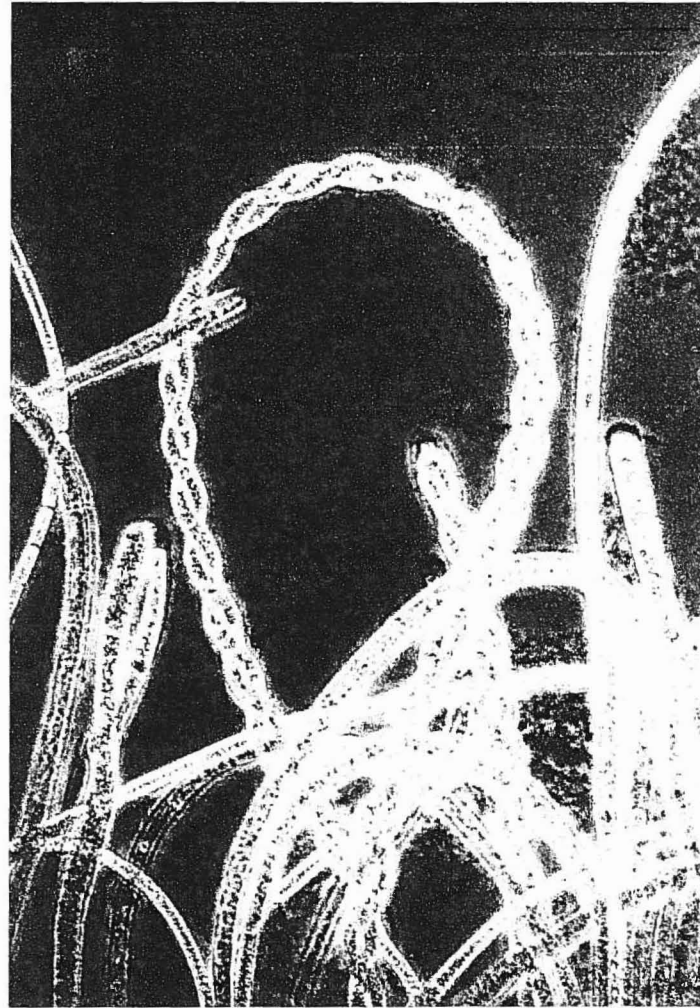
LEBENS LAUF

Am 12. August 1950 wurde ich als Sohn des Bundesbahnbeamten Friedrich Widdel und seiner Ehefrau, der Hausfrau Karoline Widdel, geb. Heine, in Lindhorst, Kreis Schaumburg-Lippe, geboren. Von April 1957 bis April 1961 besuchte ich die Volksschule in Lindhorst und im Anschluß daran das Gymnasium der Kreisstadt Stadthagen. Im Juni 1969 legte ich die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig ab.

Vom 1. Juli 1969 bis Ende Dezember 1970 war ich Wehrpflichtiger der Bundeswehr, wurde aber zwecks Aufnahme des Studiums zum Wintersemester 1970/71 beurlaubt.

Am 15. Oktober 1970 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Technischen Universität und der Tierärztlichen Hochschule in Hannover und bestand dort im Februar 1973 das Vordiplom. Vom Sommersemester 1973 an setzte ich mein Studium mit dem Schwerpunkt Mikrobiologie an der Universität Göttingen fort. Hier legte ich im Februar 1975 die mündliche Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Physikalische Chemie ab. Das Thema der anschließenden Diplomarbeit lautete: "Die Verwertung anaerober Schlämme durch phototrophe Purpurbakterien".

Im März 1976 begann ich mit einer Untersuchung zur Produktion von molekularem Wasserstoff durch phototrophe Bakterien. Aus diesem Forschungsvorhaben ergab sich gegen Ende des Jahres das Thema der vorliegenden Dissertation.



Das Sulfat-reduzierende Bakterium *Desulfonema magnum* besteht aus Zellfilamenten, die sich in Sedimenten gleitend fortbewegen. Bisweilen winden sich die Zellfäden in regelmäßigen Schraubenwindungen seilartig umeinander. Die Flocken bestehen aus voluminösem Aluminiumphosphat, welches dem Medium der Reinkultur als ein synthetisches Sediment zugesetzt wurde. *Desulfonema magnum* oxidiert unter streng anaeroben Bedingungen Acetat, höhere Fettsäuren und sogar Benzoat mit Sulfat als Elektronenakzeptor vollständig zu Kohlendioxid. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 0,1 mm

Abkürzungen, Symbole und Einheiten

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
atm	Atmosphäre
°C	Grad Celsius
dest.	destilliert (-es, -em)
E_h	Redoxpotential
E'_0	praktisches Standard-Redoxpotential bei pH = 7.0
g	Gramm
$\Delta G'$	Änderung der freien Enthalpie bei pH = 7.0
$\Delta G^{\circ'}$	Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen, jedoch bei pH = 7.0
GC	Guanin + Cytosin
h	Stunde
J	Joule
°K	Grad Kelvin
l	Liter
-lsg.	-lösung
m	Meter
min	Minute
[$\mu\text{mol/l}$]	angegebene Zahlenwerte gelten in $\mu\text{mol/l}$
N	Normal = Grammäquivalente (Val) pro Liter
p	Druck im Sinne von Gesamtdruck im System
P_i	(anorganisches) Orthophosphat

PP _i	(anorganisches) Pyrophosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PHB	Poly-β-hydroxybuttersäure
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante einer Säure
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
T	absolute Temperatur
Tab.	Tabelle
V	Volt
vgl.	vergleiche
Y	Symbol für Ertragskoeffizienten
Y ^{max}	maximaler Ertragskoeffizient (korrigiert gegen Erhaltungsstoffwechsel)
Y _{Ac.} (Sulfat)	Ertrag [g] pro mol oxidierten Acetats mit Sulfat als Elektronenakzeptor
	Ac. Acetat Pa. Palmitat
	Be. Benzoat Pr. Propionat
	Fo. Formiat Thios. Thiosulfat
Y _{ATP}	Ertrag [g] pro mol ATP
Y _{ΔG}	Ertrag [g], bezogen auf den Betrag der Änderung an freier Enthalpie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Wie es zur Arbeit mit Sulfat-reduzierenden Bakterien kam	1
2. Die Entwicklung unseres Wissens und der heutige Kenntnisstand über Sulfat-reduzierende Bakterien und deren Biochemie	3
2.1. Herkunft des Schwefelwasserstoffs in der Natur und seine verschiedenen Bildungsweisen	4
2.2. Mikrobiologie der Sulfat-reduzierenden Bakterien	7
2.3. Biochemie der Sulfat-reduzierenden Bakterien	13
2.4. Energiekonservierung bei Sulfat-reduzierenden Bakterien	18
2.5. Die dissimilatorische Sulfatreduktion an natürlichen Standorten	22
3. Ziel der vorliegenden Untersuchungen	26
B. MATERIAL UND METHODEN	29
1. Herkunft des Probenmaterials	29
2. Häufig angewandte Verfahrensweisen beim anaeroben Arbeiten	30
2.1. Aufbewahrung von Kulturen und Lösungen unter einer anaeroben Gasatmosphäre	30
2.2. Druckentlastung von Kulturgefäßen	34
2.3. Anaerobes Autoklavieren von Lösungen	35
2.4. Anaerobe Aufbewahrung von Lösungen für den ständigen Gebrauch	35
2.5. Aufbewahrung kleiner Kulturvolumina in verschraubbaren Flaschen und Röhrchen	36
3. Nährmedien	37
3.1. Technik der anaeroben Zubereitung von Grundmedien	38
3.1.1. Zubereitung von Grundmedien für kleine Kulturvolumina	38

	Seite
3.1.2. Zubereitung von Grundmedien für größere Kulturvolumina	41
3.2. Einzellösungen für die Herstellung von Grundmedien	41
3.3. Zusammensetzung verschiedener Grundmedien	43
3.3.1. Normale synthetische Grundmedien	43
3.3.2. Synthetisches Grundmedium für Kulturen mit langkettigen Fettsäuren	45
3.3.3. Agarmedium	46
3.3.4. Natürliches Meerwassermedium	47
3.3.5. Grundmedien für Agar-Schüttelkulturen	47
3.3.6. Medien zum Suspendieren isolierter Bakterien	47
3.3.7. Grundmedium für Versuche mit Methanbakterien	48
3.3.8. Grundmedien für Rollröhrchen	48
3.4. Die im Einzelfall benötigten Zusätze für Grundmedien	48
3.4.1. Elektronendonatoren	49
3.4.2. Elektronenakzeptoren	56
3.4.3. Kohlenstoffquellen	57
3.4.4. Vitamine und Vitamin-ähnliche Stoffe	58
3.4.5. Dithionit	61
3.4.6. Zusätzliche Spurenelemente	62
3.4.7. Suppline	67
3.4.8. Synthetisches Sediment	72
3.5. Fertigstellung von Nährmedien für die verschiedenen Kulturverfahren	73
3.5.1. Kleine Kulturvolumina ohne Verbrauch oder Bildung von Gasen	73
3.5.2. Größere Kulturvolumina ohne Verbrauch oder Bildung von Gasen	74
3.5.3. Kulturen mit Verbrauch oder Bildung von Gasen	74

	Seite
3.5.4. Kulturen mit flüssigen Alkanen	75
3.5.5. Prüfung auf ein Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen	76
4. Verfahren zur Isolierung anaerober Bakterien	77
4.1. Agar-Schüttelkulturen	77
4.1.1. Herstellung der Verdünnungsreihen	77
4.1.2. Isolierung von Kolonien	81
4.2. Pasteurisation	85
4.3. Reinigung durch anaerobes Waschen	85
4.3.1. Anaerobes Waschen auf einem Grid	86
4.3.2. Anaerobes Waschen in kleinen Röhrchen	88
4.4. Rollröhrchen	89
4.4.1. Herstellung der Verdünnungsreihen	89
4.4.2. Isolierung von Kolonien	91
5. Reinheitskontrolle	92
6. Wachstumsparameter	93
6.1. Trübungsmessungen	93
6.2. Abschätzung der Verdopplungszeit inhomogener Bakterienkulturen	94
6.3. Bestimmung der Trockenmasse	95
7. Optimierung von Wachstumsbedingungen	96
7.1. pH-Optima	97
7.2. Temperatur-Optima	98
8. Lichtmikroskopische Untersuchungen	98
8.1. Nachweis von Poly- β -hydroxybuttersäure	98
8.2. Gram-Färbung	99
9. Anfertigung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie	101

	Seite		Seite
10. Bestimmung von Pigmenten	103	1.2.1. Weitere Anreicherungen und Isolierungen mit Acetat	128
10.1. Gewinnung der Zellfraktionen	103	1.2.2. Anreicherungen und Isolierungen mit Propionat	137
10.2. Bestimmung von Cytochromen	104	1.2.3. Anreicherungen und Isolierungen mit Butyrat	139
10.3. Nachweis von Desulfovirdin	106	1.2.4. Anreicherungen und Isolierungen mit Palmitat und Stearat	140
10.4. Kohlenmonoxid-Differenzspektren	107	1.2.5. Anreicherungen und Isolierungen mit Benzoat	144
11. Bestimmung des GC-Gehalts der DNS	107	2. Anreicherungsversuche mit Alkanen	149
12. Chemische Analysen	108	3. Charakterisierung der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien	151
12.1. Bestimmung von Schwefelwasserstoff nach PACHMAYR	108	3.1. Ermittlung der Wachstumsansprüche	151
12.2. Schnellnachweis für Schwefelwasserstoff	111	3.1.1. Ermittlung geeigneter Salzkonzentrationen	152
12.3. Nachweis von Sulfat	112	3.1.2. pH- und Temperatur-Optima	156
12.4. Bestimmung von Ammonium	112	3.1.3. Lichtempfindlichkeit	157
12.5. Prüfung auf Nitrit	113	3.1.4. Stimulation des Wachstums durch Suppline	160
12.6. Bestimmung von Acetat, Propionat und Butyrat	113	3.1.5. Vitaminbedürfnis	168
12.7. Nachweis von Benzoat	115	3.1.6. Wirkung zusätzlicher Spurenelemente	170
12.8. Nachweis von Formiat	115	3.1.7. Aufbewahrung und Haltbarkeit der Kulturen	171
12.9. Bestimmung von Succinat und Fumarat	116	3.2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen	174
12.10. Bestimmung von Methan	118	3.2.1. Zellform, Beweglichkeit	174
13. Stöchiometrie von Substratumsetzungen	118	3.2.2. Zelleinschlüsse	176
14. Prüfung auf Vorhandensein des Calvin-Cyclus	120	3.2.3. Elektronenmikroskopie	177
15. Chemikalien	120	3.2.4. Gram-Färbung	182
C. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	122	3.3. Verwertung verschiedener organischer und anorganischer Substrate	195
1. Anreicherung und Isolierung Sulfat-reduzierender Bakterien mit Fettsäuren und Benzoat	122	3.3.1. Elektronendonatoren	197
1.1. Anreicherung und Isolierung eines ersten Sulfat-reduzierenden Bakteriums mit Acetat: <u>Desulfo-tomaculum acetoxidans</u>	122	3.3.2. Elektronenakzeptoren	205
1.2. Anreicherung und Isolierung weiterer Sulfat-reduzierender Bakterien	125		

	Seite
3.3.3. Wachstum mit organischen Substraten in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors	208
3.4. Nachweis wichtiger Pigmente	210
3.4.1. Cytochrome	211
3.4.2. Desulfovirdin	214
3.4.3. Kohlenmonoxid-Differenzspektren und Nachweis von P-582	215
3.5. GC-Gehalt der DNS	220
4. Quantitative Messungen zum Umsatz organischer Substrate durch die isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien	221
4.1. Oxidation von Acetat	224
4.2. Oxidation von Propionat	235
4.3. Oxidation von Butyrat und höheren Fettsäuren	239
4.4. Oxidation von Benzoat	245
4.5. Umsetzung organischer Substrate in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors	247
5. Einige Untersuchungen zum autotrophen Wachstum	249
6. Versuche zur Wirkung von Spurenelementen	252
6.1. Bedeutung spezieller Spurenelemente für die Verwertung von Benzoat und weiteren Verbindungen	253
6.2. Wirkung von Selen, Molybdän und chemisch ähnlichen Elementen in verschiedenen Konzentrationsbereichen	257
7. Versuche zur Syntrophie von Sulfatreduzierern mit Methanbakterien	261
7.1. Anreicherung und Isolierung von Methanbakterien	262
7.2. Beobachtungen an Mischkulturen	264

	Seite
D. DISKUSSION	268
1. Substratumsetzungen der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien	269
1.1. Oxidation organischer Elektronendonatoren durch Sulfat-reduzierende Bakterien	270
1.1.1. Unvollständige Oxidation der organischen Elektronendonatoren	271
1.1.2. Vollständige Oxidation der organischen Elektronendonatoren	273
1.1.3. Die zwei physiologischen Untergruppen der Sulfat-reduzierenden Bakterien	275
1.2. Verwertung alternativer Elektronenakzeptoren anstelle von Sulfat	277
1.2.1. Verwertung von Sulfit oder Thiosulfat	277
1.2.2. Verhalten gegenüber Schwefel, Fumarat und Malat	278
1.2.3. Dissimilatorische Reduktion von Nitrat zu Ammonium	280
1.2.4. Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff	281
1.3. Vergärung organischer Substrate in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors	284
2. Taxonomische Einordnung der neu isolierten Sulfat-reduzierer	286
3. Die dissimilatorische Sulfatreduktion mit Acetat als Elektronendonator - Versuch einer Deutung aus bioenergetischer Sicht	296
3.1. Irreversible und reversible Stoffwechselschritte	298
3.2. Annahmen und Voraussetzungen für die thermodynamischen Betrachtungen	301
3.3. Wie energieaufwendig ist die Sulfataktivierung?	303
3.4. Die Aktivierung von Acetat	309
3.5. Ertragsvergleiche	310

	Seite
3.6. Fragestellungen für künftige biochemische Untersuchungen an Acetat-verwertenden Sulfatreduzierern	314
4. Das Wachstum Sulfat-reduzierender Bakterien mit Kohlendioxid oder Formiat als einziger Kohlenstoffquelle	316
4.1. Bekannte Assimilationswege für CO ₂ und reduziertere C ₁ -Verbindungen	317
4.2. Einige Betrachtungen über mögliche Assimilationswege in den autotrophen Sulfatreduzierern	322
5. Die Verwertung aromatischer Verbindungen durch Sulfat-reduzierende Bakterien und die Bedeutung besonderer Spurenelemente	326
5.1. Vermutungen über den Abbaueg von Benzoat unter Beteiligung der Spurenelemente Selen und Molybdän	327
5.2. Wirkung von Molybdän, Selen und chemisch ähnlichen Elementen in verschiedenen Konzentrationsbereichen	331
5.3. Verbliebene Fragen zur Bedeutung von Selen, Molybdän und Wolfram für weitere Stoffwechsellleistungen der Sulfatreduzierer	333
6. Ökologische Bedeutung der neu isolierten Sulfatreduzierer	334
6.1. Möglichkeiten für eine anaerobe Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat	335
6.2. Endabbau von Biomasse an natürlichen Standorten unter verschiedenen Bedingungen	341
6.3. Energetische Betrachtungen zu den Abbauegen organischer Verbindungen	344
6.4. Die dissimilatorische Sulfatreduktion und der natürliche Stoffkreislauf	352
6.4.1. Abbaustufen und Synthesewege in der anaeroben Lebewelt	353
6.4.2. Wechselbeziehungen zwischen aerober und anaerober Lebewelt	358
6.5. Schlußbetrachtung	361

E. ZUSAMMENFASSUNG

Seite
367

F. DESCRIPTION OF SPECIES

373

1. Genus Desulfobacter

373

2. Genus Desulfobulbus

374

3. Genus Desulfococcus

376

4. Genus Desulfonema

378

5. Genus Desulfosarcina

382

6. Genus Desulfotomaculum

384

7. Genus Desulfovibrio

386

G. ANHANG

391

1. Bestandteile des natürlichen Meerwassers

391

2. Physikalisch-chemische Daten und Formeln

393

2.1. Löslichkeit von Gasen

393

2.2. Dissoziation von Säuren

395

2.3. Zusammenhang zwischen NaHCO₃-Konzentration, pH-Wert und CO₂-Partialdruck

398

2.4. Freie Reaktionsenthalpie

400

2.5. Redoxpotential

403

3. Zentrifugieren: Radialbeschleunigung

407

H. LITERATUR

408

A. EINLEITUNG

1. Wie es zur Arbeit mit Sulfat-reduzierenden Bakterien kam

Für die Anreicherung und Isolierung phototropher Purpurbakterien wurde nach einer organischen Verbindung gesucht, die auch an den natürlichen Standorten ein wichtiges Substrat dieser Bakterien sein könnte. Purpurbakterien synthetisieren ihre Zellsubstanz mit Hilfe von Lichtenergie und können dafür nur einfache, niedermolekulare organische Verbindungen, Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff oder Wasserstoff verwerten (PFENNIG, 1967). Als organische Substrate für Purpurbakterien kommen daher in der Natur vor allem Gärungsprodukte in Frage; diese werden beim Abbau von Biomasse unter anaeroben Bedingungen, d. h. unter Luftausschluß, durch andere Bakterien gebildet. Ein wichtiges natürliches Substrat für Purpurbakterien müßte somit auch gleichzeitig ein verbreitetes Gärungsprodukt sein. Welche Gärungsprodukte am häufigsten vorkommen, wurde aus Analysen von Systemen geschlossen, in denen Biomasse in großem Umfange durch reichhaltige Bakterienpopulationen anaerob abgebaut wird: Im Pansen von Wiederkäuern ist Acetat (Essigsäure) das vorherrschende Endprodukt (HUNGATE, 1966, S. 245 - 280). Ferner ist Acetat eine bedeutende Zwischenstufe beim vollständigen anaeroben Abbau zersetzlicher biologischer Substanzen zu Methan und Kohlendioxid. JERIS und McCARTY (1965) sowie SMITH und MAH (1966) zeigten, daß in Klärschlämmen etwa 70 % des Methans aus Acetat gebildet werden. Somit erschien Acetat als das Substrat der Wahl für die geplanten Anreicherungen von Purpurbakterien; es wurde einem Mineralmedium zugesetzt, das Bicarbonat und einige wichtige Vitamine, jedoch keine weitere organische Kohlenstoffquelle enthielt. Sauerstoff wurde entfernt, indem das Medium im Vakuum gerührt und anschließend mit einem Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid begast wurde. Das Medium wurde mit verschiedenen Schlammproben beimpft und in vollständig gefüllten Flaschen mit Schraubverschlüssen im Licht bei 29 °C bebrütet.

Nach zwei bis drei Wochen hatten phototrophe Purpurbakterien das Medium über den Schlammssedimenten in den meisten Ansätzen kräftig braunrot gefärbt. Mikroskopisch wurde Rhodospseudomonas palustris in diesen Flaschen als vorherrschendes Purpurbakterium identifiziert. Einige Ansätze zeigten jedoch eine weniger intensive, mehr hellrote Färbung. An den Glaswandungen, insbesondere im Schlammssediment, hatten sich stellenweise rosa gefärbte, lichtbrechende Beläge gebildet. Beim Öffnen fielen diese Flaschen, anders als die kräftig braunrot gefärbten, durch einen intensiven Geruch nach Schwefelwasserstoff auf. Unter dem Mikroskop waren Schwefel-Purpurbakterien mit Schwefeleinschlüssen zu erkennen.

Offensichtlich hatte hier eine bakterielle Reduktion des im Medium enthaltenen Sulfats zu Schwefelwasserstoff stattgefunden. Als organisches Substrat dafür hatten entweder die mit dem Schlamm eingebrachten Verbindungen oder das dem Medium zugesetzte Acetat gedient. Besonders der Gedanke an eine bakterielle anaerobe Oxidation von Acetat mit Sulfat erschien interessant, denn keines der bis dahin bekannten Sulfat-reduzierenden Bakterien konnte Acetat verwerten. Daher wurde der beobachteten Bildung von Schwefelwasserstoff weiter nachgegangen. Mit den Anreicherungen, die Schwefelwasserstoff enthielten, wurden weitere Passagen beimpft und nunmehr im Dunkeln inkubiert. Dazu diente wiederum das gleiche Medium wie anfangs, allerdings jetzt mit erhöhtem Sulfatgehalt. Auch in weiteren Passagen wurde Schwefelwasserstoff gebildet, obwohl die anfangs zugesetzte Menge Schlamm mehr und mehr ausverdünnung worden war. In Kontrollansätzen ohne Acetat oder ohne Sulfat war dagegen keine Entwicklung von Schwefelwasserstoff zu beobachten. Es waren hier eindeutig Mikroorganismen angereichert worden, die Sulfat mit Acetat zu Schwefelwasserstoff reduzierten. Im Mikroskop fielen vor allem große bewegliche, stäbchenförmige Bakterien mit zugespitzten Enden auf. In alternden Kulturen wurden etliche dieser Bakterien spindelförmig und bildeten Einschlüsse, die wie Sporen mit angrenzenden Gasvakuolen aussahen. Sollte es sich bei diesen Bakterien tatsächlich um Sulfatreduzierer handeln, die

anaerob mit Acetat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen vermochten?

Weshalb gerade ein Sulfat-reduzierendes Bakterium, das Acetat verwertet, von besonderem wissenschaftlichem Interesse ist, soll im folgenden anhand älterer und jüngerer Literatur verdeutlicht werden.

2. Die Entwicklung unseres Wissens und der heutige Kenntnisstand über Sulfat-reduzierende Bakterien und deren Biochemie

In der Geschichte der Naturwissenschaften begann die Entdeckung eines Vorganges oft damit, daß ein eindrucksvolles Phänomen das Interesse des Beobachters erweckt hatte. Die Erscheinung, die einst die Aufmerksamkeit auf die biologische Sulfatreduktion gelenkt hat, ist daher wohl weniger im Verschwinden von Sulfat zu sehen als in der Bildung eines markanten Produkts, des Schwefelwasserstoffs. Sulfat, SO_4^{2-} , ist farblos, als Ion aus wäßrigen Lösungen nicht flüchtig, also auch geruchlos, und zeigt keinerlei Giftwirkung; eine der wenigen chemischen Reaktionen von Sulfat bei Raumtemperatur ist die mit Bariumionen zu schwer löslichem, weißem BaSO_4 . Schwefelwasserstoff, H_2S , hat dagegen weit auffallendere physiologische und chemische Eigenschaften; die am unmittelbarsten wahrnehmbare ist sicherlich der Geruch. Dieser Geruch ist schwerlich mit dem anderer Substanzen zu verwechseln; er wird bereits bei Konzentrationen von 0,2 ppm H_2S wahrgenommen, das sind nur 0,2 cm³ Schwefelwasserstoffgas pro m³ Luft. Stets wird der Geruch als unangenehm empfunden. Die Abneigung ist berechtigt, denn H_2S ist ein schweres Atemgift und in seiner Wirkung der von Blausäure vergleichbar. Die Gefährlichkeit wird noch dadurch erhöht, daß Schwefelwasserstoff ebenso wie Blausäure in höheren Konzentrationen den Geruchssinn betäubt und dann alsbald nicht mehr wahrgenommen wird. Von den chemischen Reaktionen des Schwefelwasserstoffs ist die mit zahlreichen Schwermetallverbindungen zu tief schwarzen unlöslichen Sulfiden sehr charakteristisch; wegen der weiten Verbreitung von Eisenverbindungen ist in der Natur die Bildung von

Eisensulfid am häufigsten. Als Reduktionsmittel reagiert H_2S bereits bei Raumtemperatur mit etlichen Oxidationsmitteln, wie zum Beispiel auch mit Sauerstoff, zu höher oxidierten Stufen des Schwefels. Daher wird in der Lufthülle kein Schwefelwasserstoff angereichert, obwohl dieser durch natürliche Prozesse häufig freigesetzt wird und auch bei industriellen Verfahren entstehen kann. Somit ist auch die Konzentration von Schwefelwasserstoff in der Atmosphäre normalerweise bei weitem zu gering, als daß sie mit dem Geruchssinn wahrgenommen werden könnte. Erst über längere Zeiträume können die Spuren von atmosphärischem Schwefelwasserstoff eine chemische Wirkung zeigen und zum Beispiel Silber oder Bleiweiß durch Bildung von Sulfid schwarz färben.

2.1. Herkunft des Schwefelwasserstoffs in der Natur und seine verschiedenen Bildungsweisen

Wenn Schwefelwasserstoff in der Natur auftritt, stammt dieser entweder aus physikalisch-chemischen Vorgängen in tieferen Erdschichten (geochemische Vorgänge) oder ist biologischer Herkunft. Während nun der Schwefelwasserstoff geochemischen Ursprungs nur an wenigen Orten an die Erdoberfläche gelangt, wie zum Beispiel in Schwefelquellen, ist seine biologische Bildung allerorts möglich. Seit jeher gilt das Auftreten von Schwefelwasserstoff in biologischen Systemen als ein Symptom für Fäulnis. Wissenschaftlich versteht man derartige Prozesse längst als die abbauende Tätigkeit von Mikroorganismen und unterscheidet heute zwei Bildungsweisen von Schwefelwasserstoff:

Einmal kann Schwefelwasserstoff aus dem biologischen Material direkt stammen. Als Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin sowie der Coenzyme Biotin, Coenzym A, Liponsäure und Thiaminpyrophosphat ist Schwefel ein unentbehrliches Element aller Lebewesen. In der Zelle liegt Schwefel also in den reduzierten Zuständen vor, nämlich den Oxidationsstufen -2 oder, wie in Disulfidbrücken, -1. Die häufigste freie Schwefelverbindung, die Lebewesen zur Verfügung steht, ist jedoch das Sulfat;

darin hat Schwefel den höchstmöglichen Oxidationszustand, nämlich +6. Grüne Pflanzen und nahezu alle Bakterien haben nun die Fähigkeit, Sulfat zum Aufbau der Zellbestandteile zu reduzieren. Weil diese Reduktion ausschließlich Syntheszwecken dient, nennt man den Vorgang assimilatorische Sulfatreduktion. Alle zu dieser Reaktion nicht fähigen Organismen haben dann über die Nahrungskette Zugang zum reduzierten Schwefel. Erst beim Abbau der biologischen Substanzen wird das Produkt der assimilatorischen Sulfatreduktion, der Schwefelwasserstoff, freigesetzt.

Die andere biologische Bildungsweise von Schwefelwasserstoff ist eine Stoffwechselleistung spezialisierter, unter Luftaustausch lebender Bakterien. Bei anaerober Lebensweise können nämlich die Reduktionsäquivalente, die durch Dehydrogenierungen aus den organischen Substraten freigesetzt werden (Wasserstoff bzw. H^+ -Ionen plus Elektronen), nicht auf Sauerstoff übertragen werden. Es sind daher andere Akzeptoren (sogenannte Elektronenakzeptoren) notwendig. Die Art der Stoffumsetzung durch ein anaerobes Bakterium wird somit entscheidend dadurch bestimmt, welche Verbindung als Elektronenakzeptor dient. Die Mehrzahl anaerober Organismen verwendet als Elektronenakzeptoren Abbauprodukte, die aus dem Substrat selbst stammen. Als Bilanz derartiger Umsetzungen ergibt sich daher nicht selten eine Disproportionierung der organischen Substrate in höher oxidierte und stärker reduzierte Verbindungen. Man nennt diese Art des Stoffwechsels Gärung. Nun hat eine Gruppe bestimmter anaerober Bakterien aber auch die Fähigkeit, im Medium gelöste höhere Oxidationsstufen von Schwefel als externe Elektronenakzeptoren zu verwerten und zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Die Reduktion von Sulfat als der verbreitetsten Schwefelverbindung spielt dabei zweifellos die größte Rolle. Diese Art der Bildung von Schwefelwasserstoff ist stöchiometrisch mit dem Substratumsatz des Energiestoffwechsels gekoppelt; daher werden durch diese Reaktion auch weit größere Mengen Sulfat reduziert, als jemals für die Synthese bakterieller Zellbestandteile benötigt werden. Man grenzt diese Stoffwechselleistung als dissimilato-

rische Sulfatreduktion gegen die vorher dargestellte assimilatorische ab. Die zur dissimilatorischen Sulfatreduktion fähigen Bakterien nennt man der Einfachheit halber fast immer nur Sulfat-reduzierende Bakterien oder Sulfatreduzierer; diese Bezeichnungen sind insofern ungenau, als Sulfat für Syntheszwecke von einem noch weit größeren Kreis von Organismen reduziert wird.

Die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien, eine anorganische Verbindung als externen Elektronenakzeptor zu verwerten, hat seit BEIJERINCKs (1895) Untersuchungen die Mikrobiologen immer wieder veranlaßt, diese besondere Bakteriengruppe hinsichtlich ihrer Physiologie, Biochemie und Ökologie zu studieren. Die Ergebnisse ernährungsphysiologischer Untersuchungen bildeten dabei die Grundlage für das Verständnis der Sulfat-reduzierenden Bakterien. In diesem Zusammenhang wurde häufig die Frage gestellt, ob die von Sulfatreduzierern verwerteten organischen Substrate vollständig zu Kohlendioxid oxidiert werden können. Dieses Problem hat nicht selten zu kontroversen Auffassungen geführt, ist jedoch bis heute nicht befriedigend geklärt worden. Eine eindeutige Antwort ist deshalb von Interesse, weil eine vollständige Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat ein der Atmung mit Sauerstoff analoger Vorgang im streng anaeroben Bereich wäre.

Bei chemischen Untersuchungen der Wässer warmer Quellen stellte MEYER (1864) die Bildung auffallender Mengen freien Schwefelwasserstoffs fest und erkannte bereits, daß es sich dabei um eine biologische Reduktion von gelöstem Sulfat handelte. Weniger klare Vorstellungen herrschten jedoch anfangs über die Art der Lebewesen, die diese Reaktion durchführten. MEYER sah in der Sulfatreduktion eine Tätigkeit von Algen unter Luftausschluß im Dunkeln; über deren Substrate stellte er keine Vermutungen an. COHN (1867) machte für die Produktion von H_2S fähige, gleitend bewegliche Mikroorganismen verantwortlich, die er als "Beggiatoen" bezeichnete; diese wiederum wurden zu der

Gruppe der "Oscillarineen" gezählt. COHN berichtete:

"Es ist daher die Entwicklung der Beggiatoen, die bei reichlicherer Gegenwart organischer Reste sehr rasch vor sich geht, dem übrigen Leben im Aquarium höchst verderblich".

Im Jahre 1886 beobachtete HOPPE-SEYLER, daß Cellulose durch eine mit Schlamm beimpfte Kultur unter Luftausschluß vollständig zu gleichen Volumina Kohlendioxid und Methan vergoren wurde. Wenn dagegen der Anreicherung Calciumsulfat ("Gyps") zugesetzt wurde, entstand mehr Kohlendioxid und kaum noch Methan. Das Calciumsulfat wurde dabei zu Schwefelwasserstoff reduziert, der mit Eisenoxid gebunden wurde. Anhand quantitativer Messungen wurde gezeigt, daß Cellulose mit Sulfat vollständig zu Kohlendioxid oxidiert werden kann. Auch von einer Sulfatreduktion mit Lactat ("milchsaurer Kalk"), Formiat ("ameisensäurer Kalk") und Protein ("Eiweißstoffe") berichtete HOPPE-SEYLER.

2.2. Mikrobiologie der Sulfat-reduzierenden Bakterien

Der erste, der die Sulfatreduktion mikrobiologisch genauer untersuchte, war BEIJERINCK (1895). In der Einführung zu seiner Arbeit grenzte er die Bildung von Schwefelwasserstoff durch Sulfatreduktion gegen die durch Zersetzung "schwefelhaltiger Proteinkörper" ab. Somit unterschied BEIJERINCK bereits die dissimilatorische Sulfatreduktion von der Freisetzung des assimilatorisch reduzierten Schwefels. BEIJERINCK beschrieb die Isolierung eines streng anaeroben Bakteriums, Spirillum desulfuricans, das Sulfat mit Malat oder Asparagin zu Schwefelwasserstoff reduzierte. VAN DELDEN (1903) verwendete zusätzlich Lactat als Substrat für Sulfat-reduzierende Bakterien. Anhand zweier isolierter Stämme wurde ermittelt, wieviel Schwefelwasserstoff beim Umsatz bestimmter Mengen organischer Verbindungen gebildet wurde; die Ergebnisse sprachen für eine vollständige Oxidation von Lactat und Malat zu Kohlendioxid. Die Sulfatreduktion wurde von VAN DELDEN als ein der Denitrifikation (dissimilatorische Nitratreduktion) analoger Prozeß dargestellt. Die Denitrifikation galt als eine mikrobielle vollständige Oxida-

tion organischer Verbindungen, bei welcher in Abwesenheit von Sauerstoff an dessen Stelle der im Nitrat gebundene tritt (VAN ITERSON, 1904; RITTER, 1908; BEIJERINCK und MINKMANN, 1910; QUASTEL et al., 1925). Auch ELION (1925) beschrieb die Sulfat-reduktion als eine vollständige Oxidation des organischen Kohlenstoffs zu Kohlendioxid. RUBENTSCHIK (1928) berichtete von Sulfatreduzierern, die Acetat und Butyrat verwerteten; dabei dürfte man zumindest die Verwertung von Acetat als eine vollständige Oxidation verstehen. Zwei Jahre später zeigte BAARS (1930) anhand verschiedener Kulturen Sulfat-reduzierender Bakterien, daß die Oxidation organischer Verbindungen nicht immer vollständig war. Eines der Isolate, Vibrio desulfuricans (vormals als Spirillum desulfuricans bezeichnet) setzte Lactat und Äthanol nur bis zum Acetat um; dieses wurde als Endprodukt ausgeschieden und konnte nicht weiterverwertet werden. Ebensoviele wurden Propionat und Butyrat von diesem Stamm verwertet. Auch noch zwei weitere Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien vermochten weder Acetat noch die höheren Fettsäuren zu oxidieren. Ein vierter Stamm dagegen konnte Acetat, Propionat und Butyrat verwerten, ebenso Formiat, Lactat, Äthanol und weitere Verbindungen; all diese Substrate wurden vollständig zu Kohlendioxid oxidiert. Das betreffende Bakterium war zwar morphologisch nicht von Vibrio desulfuricans zu unterscheiden; aufgrund der Fähigkeit, Fettsäuren zu verwerten, wurde es jedoch als neue Art mit dem Namen Vibrio rubentschikii beschrieben. Zu jener Zeit konnte jedoch in der Stoffwechsellistung von Vibrio rubentschikii kaum eine Besonderheit gesehen werden; hatte man doch bis dahin den Substratumsatz Sulfat-reduzierender Bakterien stets als vollständige Oxidation verstanden. Neu war vielmehr der Nachweis einer nur unvollständigen Oxidation bei diesen Bakterien. Vibrio rubentschikii fand wenig Beachtung.

Als SENEZ (1954) sowie auch GROSSMAN und POSTGATE (1955) die Umsetzung von Lactat, Pyruvat, Succinat, Fumarat und Malat durch Desulphovibrio desulphuricans untersuchten, wurden diese Substrate nur unvollständig zu Acetat als Endprodukt oxidiert (Desulphovibrio desulphuricans bzw. Desulfovibrio desulfuricans

waren nunmehr die neuen Namen für den früher als Spirillum desulfuricans oder Vibrio desulfuricans bezeichneten Sulfat-reduzierer). Aufgrund solcher Meßergebnisse wurde allmählich wieder die Frage nach Sulfat-reduzierenden Bakterien interessant, die ihre Substrate vollständig zu oxidieren vermochten. So versuchten SELWYN und POSTGATE (1959), Vibrio rubentschikii mit Acetat zu reisolieren. In den ersten Anreicherungsphasen wurde Acetat bei gleichzeitiger Reduktion von Sulfat zu Schwefelwasserstoff verbraucht. Folgephasen verloren jedoch diese Fähigkeit. Ein Acetat-verwertender Sulfatreduzierer konnte daher weder angereichert noch isoliert werden. Auch die Suche nach einem Butyrat-verwertenden Sulfat-reduzierenden Bakterium blieb erfolglos. Ein Sulfatreduzierer, der außer Formiat auch Propionat oxidierte, war acht Jahre vorher von HVID-HANSEN (1951) beschrieben worden; doch der Stamm war nicht erhalten geblieben. So wurde dann die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur Verwertung von Acetat, Propionat oder Butyrat als bald wieder angezweifelt (POSTGATE, 1959 a). 1965 klassifizierten CAMPBELL und POSTGATE die Sporenbildenden Sulfatreduzierer als Gattung Desulfotomaculum. Die gekrümmten vibrioiden Sulfat-reduzierenden Bakterien wurden ein Jahr später in der Gattung Desulfovibrio zusammengefaßt (POSTGATE und CAMPBELL, 1966). Alle mit diesen zwei Gattungen beschriebenen Arten oxidieren ihre Substrate unvollständig zu Acetat, das als ein Endprodukt nicht verwertet werden kann. Als ein bevorzugtes und stets verwertetes Substrat Sulfat-reduzierender Bakterien erwies sich Lactat; daher wurde für Anreicherungen auch stets Lactat empfohlen (BUTLIN et al., 1949 a; POSTGATE, 1965 a; PANKHURST, 1971) und häufig eingesetzt. Nicht minder beliebt waren das dem Lactat nahestehende Pyruvat sowie Äthanol.

Weitere Typen Sulfat-reduzierender Bakterien wurden in den neuen Arten Desulfovibrio thermophilus (ROZANOVA und KHUDYAKOVA, 1974), Desulfovibrio baculatus (ROZANOVA und NAZINA, 1976) und der neuen Gattung Desulfomonas mit der Art Desulfomonas pigra (MOORE et al., 1976) beschrieben; es handelt sich um kleine, stäbchenförmige Bakterien, die keine Sporen bilden. Auch diese

neueren Arten Sulfat-reduzierender Bakterien oxidieren organische Substrate nur unvollständig zu Acetat als Endprodukt.

Außer Lactat, Pyruvat, Äthanol und Dicarbonsäuren wurden aber auch noch andere Substrate als Elektronendonatoren für Sulfat-reduzierer gefunden. WIGHT und STARKEY (1945) reicherten Sulfat-reduzierende Bakterien mit Wasserstoff und Kohlendioxid an. BUTLIN und ADAMS (1947) sowie SISLER und ZOBELL (1950; 1951) berichteten dann, daß Reinkulturen von Desulfovibrio auf Wasserstoff mit Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen vermochten, also autotroph seien. Später wurde diese Fähigkeit zu autotrophem Wachstum wieder in Frage gestellt: Es konnte gezeigt werden, daß zum Wachstum Sulfat-reduzierender Bakterien mit Wasserstoff (POSTGATE, 1960; MECHALAS und RITTENBERG, 1960; SOROKIN, 1966 a,b,c; BADZIONG et al., 1978) oder auch Formiat (SOROKIN, 1966 a,b,c) als Elektronendonatoren stets eine zusätzliche organische Kohlenstoffquelle vorhanden sein mußte. Auch Propanol, Butanol und iso-Butanol konnten von Desulfovibrio-Stämmen nur als Elektronendonatoren, nicht aber als Kohlenstoffquellen verwertet werden; die Alkohole wurden dabei zu Propionat, Butyrat bzw. iso-Butyrat oxidiert. Eine geeignete Kohlenstoffquelle war immer Acetat; es diente jedoch in solchen Fällen ausschließlich für die Synthese von Zellmaterial und wurde nicht etwa wie ein Elektronendonator oxidiert. POSTGATE (1963 a) beschrieb eine Art von Desulfovibrio, die Oxamat wie auch Formiat verwertete. Oxamat war ebenfalls nur Elektronendonator, sodaß zum Wachstum wiederum eine weitere Kohlenstoffquelle benötigt wurde. Wie Formiat wurde auch Oxamat ganz zu Kohlendioxid oxidiert. Nun darf aber diese Stoffwechselleistung nicht allgemein als Fähigkeit zur vollständigen Oxidation organischer Substrate verstanden werden; denn Oxamat (das Salz von Oxalsäuremonoamid) und Formiat stellen bereits weitgehend oxidierte organische Verbindungen dar, und Kohlendioxid ist hier das einzig mögliche Produkt einer weiteren Oxidation. Eine Umsetzung von Cystein durch Sulfatreduzierer zu CO_2 , NH_3 , H_2S und Acetat wiesen SENEZ und LEROUX-GILLERON (1954) nach. Über die Verwertung von Cholin durch Desulfovibrio desulfuricans

berichteten SENEZ und PASCAL (1961) sowie BAKER et al. (1962). Ein Beispiel für die unter Sulfatreduzierern seltene Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenhydraten ist Desulfotomaculum nigrificans: Glucose wird zu Acetat, Äthanol und Kohlendioxid umgesetzt (AKAGI und JACKSON, 1967). Zu den am kuriosesten anmutenden physiologischen Fähigkeiten Sulfat-reduzierender Bakterien zählen sicherlich Berichte über das Wachstum mit Kohlenwasserstoffen. So beobachteten NOVELLI und ZOBELL (1944) sowie ROSENFELD (1947), daß Stämme von Desulfovibrio langkettige Kohlenwasserstoffe (Paraffine) oxidierten; leider blieben diese Stämme nicht erhalten. Erst kürzlich beschrieben PANGANIBAN et al. (1979) Sulfatreduzierer, die Methan zu oxidieren vermochten. Für den Mechanismus derartiger Umsetzungen gibt es noch keinerlei Erklärung, denn bislang galten Kohlenwasserstoffe als unter anaeroben Bedingungen nicht abbaubar; so war in Experimenten von SOROKIN (1957), MARTENS und BERNER (1974) und WINFREY und ZEIKUS (1977) Methan als Substrat für eine Sulfatreduktion ausgeschlossen worden. Ergebnisse von GUYNES und BENNETT (1959), ISENBERG und BENNETT (1959) sowie KUZNETSOVA und GORLENKO (1965) sind dagegen verständlich: Hier wurde gezeigt, daß Kohlenwasserstoffe zuerst von aeroben Bakterien zu Verbindungen oxidiert werden können, die dann von Sulfatreduzierern verwertet werden.

Auch andere Elektronenakzeptoren als Sulfat werden von Sulfatreduzierenden Bakterien verwertet. So vermag z. B. Desulfovibrio desulfuricans Sulfit (SO_3^{2-}), Thiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), Tetrathionat ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), Dithionit ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) und kolloidalen Schwefel zu H_2S zu reduzieren (POSTGATE, 1951; ISHIMOTO et al., 1954 a). BIEBL und PFENNIG (1977) wiesen bei mehreren Isolaten Sulfatreduzierender Bakterien ein Wachstum mit rhombischem Schwefel (Schwefelblüte) als Elektronenakzeptor nach. Auch zwei organische Verbindungen, nämlich Fumarat und Malat, können als Elektronenakzeptoren fungieren; diese biochemisch miteinander verwandten Dicarbonsäuren werden dabei zu Succinat reduziert (MILLER und WAKERLEY, 1966; MILLER et al., 1970).

Beim Fehlen eines Elektronenakzeptors vermögen Sulfatreduzierer durch Vergärung bestimmter organischer Verbindungen zu wachsen: Pyruvat wird von Desulfovibrio- oder Desulfotomaculum-Stämmen in Sulfat-freiem Medium zu Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff vergoren (POSTGATE, 1952; ISHIMOTO et al.; 1954 a; SENEZ, 1954; POSTGATE, 1963 b). MILLER und WAKERLEY (1966) sowie MILLER et al. (1970) zeigten, daß Stämme von Desulfovibrio auch mit Fumarat oder Malat allein zu wachsen vermögen und diese Verbindungen zu Succinat, Acetat und Kohlendioxid vergären. Eine Vergärung von Cholin zu Trimethylamin, Äthanol und Acetat wiesen SENEZ und PASCAL (1961) nach.

Auch nach den ausführlichen Experimenten von BAARS (1930) wurde also durchaus versucht, noch weitere von Sulfatreduzierern verwertbare Substrate zu finden; dennoch blieb deren Anzahl verhältnismäßig begrenzt. Aufgrund der älteren Arbeiten hatte man in den Sulfat-reduzierenden Bakterien eine bedeutende physiologische Gruppe sehen können: Zu der vollständigen Oxidation von organischem Material mit Sauerstoff war das Analogon im streng anaeroben Bereich gefunden worden. Neuere Arbeiten stellten diese Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien jedoch wieder in Frage. Übersichtsartikel jüngeren Datums (POSTGATE, 1965 b; LEGALL und POSTGATE, 1973; PECK, 1974; SIEGEL, 1975) beschrieben die Sulfatreduzierer stets als eine Bakteriengruppe, die ihre organischen Substrate unvollständig oxidiert und kein Acetat verwertet; auch die ebenfalls sehr verbreiteten Gärungsprodukte Propionat und Butyrat fehlen unter den Verbindungen, die von den bekannten Sulfatreduzierern verwertet werden. Der Widerspruch zwischen den älteren und jüngeren Arbeiten wurde jedoch nicht geklärt. So vermutete man zwar, daß die von VAN DELDEN (1903) und BAARS (1930) beschriebenen, aber nicht mehr existierenden Kulturen verunreinigt waren; von der Stoffwechsellleistung der möglichen Kontaminanten gab es jedoch keine genaueren Vorstellungen. Die einst beobachtete stöchiometrische vollständige Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat unter anaeroben Bedingungen erschien weiterhin rätselhaft. Ebenso

unverständlich blieben auch die Beobachtungen von HOPPE-SEYLER (1886), RUBENTSCHIK (1928) und SELWYN und POSTGATE (1959) an anaeroben Anreicherungen, in denen organische Verbindungen bzw. speziell Acetat mit Sulfat vollständig oxidiert wurden.

2.3. Biochemie der Sulfat-reduzierenden Bakterien

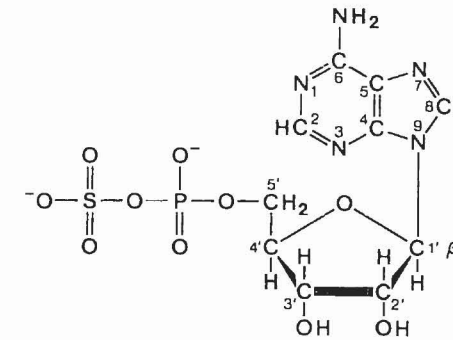
Große Fortschritte wurden im Verständnis der Biochemie der Sulfat-reduzierenden Bakterien erzielt. Die Experimente auf diesem Gebiet wurden vor allem bestimmt durch Fragen zur Energieumwandlung und zum Schwefelstoffwechsel dieser besonderen Bakteriengruppe.

Daß Sulfatreduzierer wie viele andere Anaerobier ihr ATP durch Substratphosphorylierung gewinnen können, hatte das Wachstum durch Vergärung von Pyruvat oder Fumarat gezeigt. Der ATP-liefernde Schritt beim Umsatz von Pyruvat ist die phosphoroklastische Spaltung zu Acetat und Kohlendioxid. Das sehr negative Redoxpotential des Systems Acetat + CO₂/Pyruvat ($E'_0 = - 0,70$ V, MAHLER und CORDES, 1971) erlaubt eine Freisetzung von molekularem Wasserstoff ($2 H^+/H_2$: $E'_0 = - 0,42$ V, DECKER et al., 1970).

Mit der Mehrzahl der verwertbaren Verbindungen können Sulfatreduzierer jedoch nur dann ATP gewinnen, wenn die beim Substratumsatz abgespaltenen Reduktionsäquivalente auf einen externen Elektronenakzeptor übertragen werden. Aufgrund des Wachstums mit Wasserstoff konnte man bereits vermuten, daß die Reduktion von Sulfat auch mit einer Energiekonservierung durch Elektronentransport verbunden ist. Für einen Elektronentransport sprach dann ferner, daß in Sulfat-reduzierenden Bakterien Cytochrome nachgewiesen wurden; diese Pigmente waren zuvor nur in aeroben, also atmenden Organismen gefunden worden. Zuerst wiesen POSTGATE (1954) und ISHIMOTO et al. (1954 b) in Desulfovibrio desulfuricans ein c-Typ-Cytochrom nach; es wurde später als c₃ bekannt (POSTGATE, 1956) und hat ein ungewöhnlich nied-

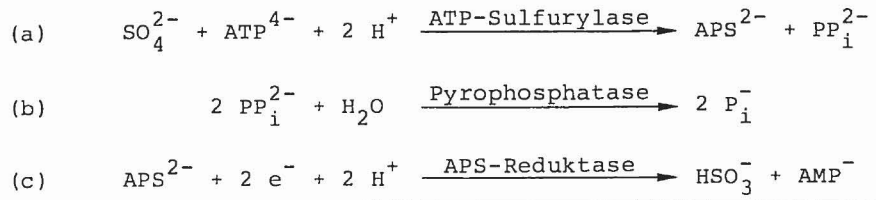
riges Redoxpotential (unterhalb - 0,2 V). Das Vorhandensein von Cytochrom c_3 erwies sich als ein spezifisches Merkmal für Arten der Gattung Desulfovibrio (POSTGATE und CAMPBELL, 1966; LeGALL und POSTGATE, 1973). Von weiteren c-Typ-Cytochromen berichteten LeGALL und BRUSCHI-HERIAUD (1968) sowie YAGI (1969). Cytochrome vom b-Typ wurden zuerst nur in solchen Sulfatreduzierern gefunden, die später als Gattung Desulfotomaculum eingeordnet wurden (ADAMS und POSTGATE, 1959; POSTGATE und CAMPBELL, 1963; CAMPBELL und POSTGATE, 1965; POSTGATE und CAMPBELL, 1966). HATCHIKIAN et al. (1972 b) fanden dann aber auch in Desulfovibrio gigas ein b-Typ-Cytochrom. Schließlich zeigte JONES (1972) in systematischen Untersuchungen, daß b- und c-Typ-Cytochrome zusammen sowohl in der Gattung Desulfovibrio als auch der Gattung Desulfotomaculum vorkommen. Aus Versuchen zur chemischen Hemmung erhielt PECK (1960 a) Hinweise für eine Energiekonservierung durch Elektronentransport-Phosphorylierung. 1966 erbrachte PECK dann einen direkten Beweis für diese Art der Phosphorylierung: In Extrakten von Desulfovibrio gigas wurde bei der Oxidation von Wasserstoff mit Sulfit oder Thiosulfat ATP gebildet. An der Reaktion war eine Partikelfraktion beteiligt, die viel Ferredoxin enthielt. Ein Mitwirken von Ferredoxin bei der Reduktion von Sulfit wurde auch von AKAGI (1965) an Desulfotomaculum nigrificans und von LeGALL und DRAGONI (1966) an Desulfovibrio gigas nachgewiesen. AKAGI und ADAMS (1967) sowie DerVARTANIAN und LeGALL (1974) schlugen Schemata für den Elektronentransport in Desulfovibrio vor, an dem Cytochrom c_3 und Ferredoxin beteiligt sind. Als Komponenten in den Elektronentransport miteinbezogen sind wahrscheinlich auch Flavodoxin (HATCHIKIAN et al., 1972 a; IRIE et al., 1973) und das Menachinon MK-6 (MAROC et al., 1970; WEBER et al., 1970; WAGNER et al., 1974). Aus Sulfatreduzierern wurden ferner Rubredoxin (NEWMANN und POSTGATE, 1968; BRUSCHI und LeGALL, 1971) sowie Desulforedoxin (MOURA et al., 1977) isoliert; die Funktion dieser Komponenten ist jedoch noch unklar. Die Bedeutung der Reduktion von Fumarat in Desulfovibrio gigas für die Energiekonservierung durch Elektronentransport diskutierten BARTON et al. (1970).

Die sicherlich interessantesten Fragen und Hypothesen zur Energiekonservierung in Sulfat-reduzierenden Bakterien erwachsen aus der Aufklärung des Mechanismus der Sulfatreduktion. Das als terminaler Elektronenakzeptor von der Zelle aufgenommene Sulfat kann mit keinem der physiologischen Elektronendonatoren direkt reduziert werden, sondern muß vorher in eine reaktionsfähige, energiereichere Verbindung überführt werden. PECK (1959; 1962 a) erkannte Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) als die aktivierte Form des Sulfats für dessen dissimilatorische Reduktion:

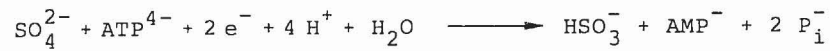


Adenosin-5'-phosphosulfat (APS)

Sulfat wird durch ATP-Sulfurylase mit ATP in APS überführt, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird (a). Das Pyrophosphat wird durch Pyrophosphatase zu Orthophosphat hydrolysiert (b). Erst APS wird dann unter Aufnahme von 2 Elektronen durch APS-Reduktase zu Sulfit bzw. Bisulfit (Hydrogensulfit) reduziert; dabei entsteht ferner AMP (c):



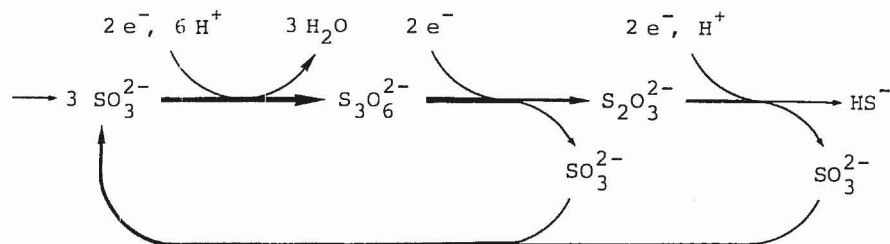
Summe:



Die ATP-Sulfurylase wurde von AKAGI und CAMPBELL (1962) in Desulfotomaculum und Desulfovibrio untersucht. WARE und POSTGATE (1971) berichteten über Eigenschaften der Pyrophosphatase; eine Hemmung der Pyrophosphatase verhinderte auch die Sulfatreduktion. Der Hydrolyseschritt schien notwendig zu sein, um die Reaktion zugunsten der Produkte zu beeinflussen. PECK (1960 b), PECK et al. (1965) sowie BOWEN et al. (1966) untersuchten die APS-Reduktase; dieses Enzym wurde ebenso in dem aeroben Bakterium Thiobacillus thioparus nachgewiesen und vermag auch die umgekehrte Reaktion zu katalysieren. Nimmt man nun an, daß Pyrophosphat tatsächlich vollständig hydrolysiert wird, so verbraucht die Aktivierung von Sulfat für die Reduktion zu Sulfit zwei energiereiche Phosphatbindungen; dieser Schritt kostet die Zelle somit letztlich 2 mol ATP pro mol aktivierten Sulfats. Bei der assimilatorischen Sulfatreduktion wird APS mit ATP in 3'-Stellung noch weiter zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat, abgekürzt PAPS, phosphoryliert (ROBBINS und LIPMANN, 1958 a,b; FUJIMOTO und ISHIMOTO, 1961; TSANG und SCHIFF, 1976).

Die weitere Reduktion von Sulfit bedarf keiner Aktivierung mehr. In Desulfovibrio desulfuricans fungiert das von POSTGATE (1956) gefundene grüne Pigment Desulfovirdin als Sulfit-Reduktase. Für Desulfovirdin gibt es eine einfache diagnostische Reaktion: Wird Desulfovirdin mit Alkali behandelt und unmittelbar darauf UV-Licht (365 nm) ausgesetzt, so beobachtet man eine leuchtend rote Fluoreszenz (POSTGATE, 1959 b). Zunächst wurde Desulfovirdin auch in allen weiteren Desulfovibrio-Arten gefunden. MILLER und SALEH (1964) beschrieben dann jedoch einen

Stamm von Desulfovibrio desulfuricans, dem das grüne Pigment fehlte. Aus diesem Stamm isolierten LEE et al. (1973 a) das Pigment Desulforubidin und erkannten es ebenfalls als eine Sulfit-Reduktase. Die Sulfitreduktion in Desulfotomaculum nigrificans wird durch das Pigment P-582 katalysiert, das ein charakteristisches Kohlenmonoxid-Differenzspektrum hat (TRUDINGER, 1970; AKAGI und ADAMS, 1973). Alle drei Sulfit-Reduktasen, Desulfovirdin, Desulforubidin und P-582, enthalten als prosthetische Gruppe Sirohäm, ein hochgradig carboxyliertes Tetrahydrophorphyrin mit Eisen als Zentralatom (MURPHY et al., 1973; MURPHY und SIEGEL, 1973; MURPHY et al., 1974). Aus Desulfovibrio vulgaris wurden noch weitere Sulfit-Reduktasen isoliert (LEE et al., 1973 b; KOBAYASHI et al., 1974; DRAKE und AKAGI, 1976). Weil die Enzyme häufig pH-Optima haben, bei denen Sulfit als HSO_3^- -Ion vorliegt, spricht man anstelle von Sulfit-Reduktasen auch von Bisulfit-Reduktasen. Über den Weg der Reduktion vom Sulfit (bzw. Bisulfit) bis zum Sulfid (bzw. Hydrogensulfid oder Schwefelwasserstoff) herrschen unterschiedliche Auffassungen. Als Produkte einer Sulfitreduktion durch Zellextrakte oder gereinigte Enzyme wurden nämlich nicht nur Sulfid, sondern auch Trithionat ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$) und Thiosulfat gefunden (KOBAYASHI et al., 1969; FINDLEY und AKAGI, 1969; SUH und AKAGI, 1969; LEE und PECK, 1971; AKAGI und ADAMS, 1973; KOBAYASHI et al., 1974; DRAKE und AKAGI, 1976). Aus Desulfotomaculum nigrificans (NAKATSUKASA und AKAGI, 1969), Desulfovibrio vulgaris (HASCHKE und CAMPBELL, 1971) und Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN, 1975) konnten ferner Thiosulfat-Reduktasen isoliert werden. Daher wurde von vielen Autoren angenommen, daß Sulfit in den Zellen über Trithionat und Thiosulfat zu Sulfid reduziert wird. Bei diesem Reaktionsweg, der von KOBAYASHI et al. (1969) vorgeschlagen wurde, wird bei zwei Reduktionsschritten auch die Ausgangssubstanz Sulfit erneut gebildet:



SIEGEL (1975) sowie CHAMBERS und TRUDINGER (1975) jedoch hielten es aufgrund eigener Beobachtungen für wahrscheinlicher, daß Sulfit ohne Zwischenstufen bis zum Sulfid reduziert wird.

2.4. Energiekonservierung bei Sulfat-reduzierenden Bakterien

Die biochemischen Erkenntnisse konnten leicht zu Begründungen verleiten, weshalb man bei Sulfat-reduzierenden Bakterien weder eine Verwertung von Acetat noch eine vollständige Oxidation anderer Substrate fand. Wo immer in Lebewesen organische Substrate vollständig zu Kohlendioxid oxidiert werden, erfolgt die Endoxidation über aktiviertes Acetat im Tricarbonsäure-Cyclus. Ein in dieser Weise funktionierender Tricarbonsäure-Cyclus war jedoch in Anaerobiern noch nie nachgewiesen worden und wurde auch aus thermodynamischen Gründen bezweifelt (DECKER et al., 1970). Im Falle von Sulfat als Elektronenakzeptor käme noch hinzu, daß bereits allein für dessen Aktivierung 2 ATP verbraucht werden. Für ein Wachstum, also eine positive Energiebilanz, müssen daher bei der Oxidation eines Substrats mit 1 mol Sulfat mehr als 2 mol ATP gewonnen werden. Von dem bewährten Substrat Lactat werden 2 mol benötigt, um 1 mol Sulfat stöchiometrisch zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Die Substratphosphorylierung während der Oxidation der aus 2 mol Lactat gebildeten 2 mol Pyruvat zu Acetat und CO_2 (phosphoroklastische Spaltung) liefert aber maximal 2 mol ATP. Aufgrund derartiger Überlegungen zeigte PECK (1960 a; 1962 b), daß es beim Wachstum auf Lactat noch eine zusätzliche Energiekonservierung durch Elektronentransport geben muß. Daß aber auch der Elektro-

nenstransport allein kein Wachstum auf Lactat ermöglicht, geht aus Untersuchungen von VOSJAHN (1970) hervor: Aus der dort bestimmten Phosphorylierungsrate in Desulfovibrio desulfuricans berechnet man, daß der Transport von 8 Elektronen aus 2 Molekülen Lactat ebenfalls nicht mehr als 2 Moleküle ATP liefern kann. Für ein Wachstum mit Lactat ist demnach eine Energiekonservierung sowohl durch Substrat- als auch durch Elektronentransport-Phosphorylierung notwendig. Bei einer angenommenen Verwertung von Acetat durch Sulfatreduzierer käme für die Energiekonservierung nur der Elektronentransport in Frage, denn die Oxidation von Acetat zu Kohlendioxid erlaubt nach biochemischen Erkenntnissen keinen Nettogewinn von ATP durch Substratphosphorylierung. Da aus einer Sulfatreduktion mit Acetat aber insgesamt weit weniger Energie zu erhalten wäre als aus der mit Lactat, mußte ein Wachstum Sulfat-reduzierender Bakterien mit Acetat als sehr unwahrscheinlich gelten: Während nämlich für die Reduktion von 1 mol Sulfat mit 2 mol Lactat eine Änderung der freien Enthalpie von $\Delta G^{\circ'} = -170 \text{ kJ}$ ($-40,6 \text{ kcal}$) angegeben wird (DECKER et al., 1970), berechnet man für die Reduktion von 1 mol Sulfat mit 1 mol Acetat nur $\Delta G^{\circ'} = -72 \text{ kJ}$. Bei der Verwertung von Wasserstoff durch Sulfat-reduzierende Bakterien kommt für die Energiekonservierung ebenfalls nur ein Elektronentransport in Frage; dennoch war der Nettogewinn von ATP beim Wachstum mit Wasserstoff stets plausibel, denn das Paar $2 \text{H}^+/\text{H}_2$ hat ein Redoxpotential von $E_0' = -0,42 \text{ V}$ (DECKER et al., 1970); dieses sehr negative Redoxpotential ermöglicht durch Elektronentransport einen so hohen ATP-Gewinn, daß auch nach der Aktivierung von Sulfat immer noch genügend Energie zum Wachstum zur Verfügung steht. Die aus einer Redoxreaktion pro übertragenes Elektron konservierbare freie Enthalpie ist nämlich proportional zu der Differenz des Redoxpotentials von Elektronendonator und Elektronenakzeptor. Die freie Reaktionsenthalpie der Reduktion von 1 mol Sulfat mit 4 mol H_2 (1 atm) beträgt nach DECKER et al. (1970) $\Delta G^{\circ'} = -154 \text{ kJ}$ ($-36,8 \text{ kcal}$). Mit Lactat als Elektronendonator ist der Energiebetrag zwar noch etwas höher (s. o.); die einzelnen Oxidationsschritte bei der Verwertung von Lactat tragen jedoch nicht in gleichem Maße zur Ener-

giekonservierung bei (vgl. VOSJAHN, 1970). Der hauptsächliche, wenn nicht gar eigentliche ATP-liefernde Schritt mußte in der Oxidation von Pyruvat gesehen werden, denn für das Redoxpotential des Systems Acetat + CO₂/Pyruvat wird E'° = - 0,70 V angegeben (MAHLER und CORDES, 1971). Bevor diese Reaktion stattfinden kann, ist jedoch die Dehydrogenierung von Lactat und die Übertragung der dabei anfallenden Reduktionsäquivalente auf den externen Elektronenakzeptor erforderlich. Das Redoxpotential des Systems Pyruvat/Lactat beträgt aber nur E'° = - 0,19 V (DECKER et al., 1970). Soweit mit den Reduktionsäquivalenten aus der Dehydrogenierung von Lactat überhaupt eine Gewinnung von ATP durch Elektronentransport möglich schien, mußte diese viel geringer sein als bei einer Verwertung von H₂ als Elektronendonator.

WAKE et al. (1977) versuchten, aufgrund thermodynamischer Berechnungen ein Kriterium dafür zu finden, wann die Verwertung einer Verbindung als Elektronendonator für die Reduktion von Sulfat prinzipiell möglich ist und wann nicht. Weil die einzelnen Reaktionsschritte bei der Oxidation eines Substrats in unterschiedlichem Maße zur Energiekonservierung beitragen können (s. o.), wurde in den Untersuchungen eine mittlere (durchschnittliche) freie Enthalpie pro Elektronenpaar eingeführt: Die berechnete gesamte freie Reaktionsenthalpie wurde durch die Anzahl der dabei übertragenen Elektronenpaare dividiert. WAKE et al. gelangten zu dem Schluß, daß ein Wachstum Sulfatreduzierender Bakterien grundsätzlich nur auf solchen Verbindungen möglich ist, die mindestens 35 kJ pro Elektronenpaar bereitstellen. Mit dieser Bedingung steht im Einklang, daß Lactat, Pyruvat, Äthanol, Fumarat, Malat und Glucose durch Sulfatreduzierer unvollständig zu Acetat oxidiert werden. Dagegen würde eine vollständige Oxidation der genannten Verbindungen weniger als 35 kJ pro Elektronenpaar liefern und daher auch kein Wachstum der Bakterien erlauben; aus dem gleichen Grunde können Sulfatreduzierer nach Ansicht der Autoren auch kein Acetat verwerten:

"... using our method of assessment, where a certain minimum free energy release must be attained before any oxidoreduction is considered able to support growth, the acetate-sulphate combination is excluded since it fails to meet this criterion."

In der Arbeit wurden ferner Energiebilanzen für eine angenommene Oxidation von Propionat und Butyrat mit Sulfat berechnet. Schon zuvor hatten DECKER et al. (1970) gezeigt, daß unter anaeroben Bedingungen eine Energiekonservierung mit gesättigten Carbonsäuren als Elektronendonatoren kaum möglich ist. Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis gelangten nun auch WAKE et al. bezüglich der Verwertbarkeit von Propionat und Butyrat durch Sulfatreduzierer:

"Neither total nor partial oxidation of butyrate or propionate will yield sufficient energy to meet the criterion for ATP production."

Erst unlängst brachten Untersuchungen von THAUER und seinen Mitarbeitern neue Aspekte für das Verständnis der Energieumwandlung in Sulfatreduzierenden Bakterien. THAUER et al. (1977) sowie BADZIONG und THAUER (1978) halten es für möglich, daß ein Teil des bei der Sulfataktivierung gebildeten Pyrophosphats energetisch wieder genutzt werden kann. Ferner wird gezeigt, daß bereits die Reduktion von 1 mol APS zu Sulfit und AMP (s. 2.3., Gleichung c) mit verschiedenen Elektronendonatoren prinzipiell eine Bildung von 1 mol ATP erlaubt. Ein Nachweis dieser Energie-liefernden Reaktionen in Sulfatreduzierern steht zur Zeit noch aus. BADZIONG und THAUER (1978) untersuchten dann das Wachstum eines Stammes von Desulfovibrio vulgaris mit Wasserstoff als Elektronendonator und Sulfat und Thiosulfat als Elektronenakzeptoren. Aus den erhaltenen Zellerträgen wurde berechnet, daß bei der Reduktion von 1 mol Sulfit zu Sulfid 3 mol ATP synthetisiert wurden. Bei der Reduktion von 1 mol Sulfat zu Sulfid ergab sich nur ein Nettogewinn von 1 mol ATP; zwei von den während der Sulfitreduktion gebildeten energiereichen Phosphate wurden demnach für die Sulfataktivierung benötigt. Weil in diesen Versuchen jedoch stets Wasserstoff der Elektronendonator war, erlauben die Ergebnisse nicht ohne weiteres Aussagen über eine eventuelle Sulfatreduktion mit Acetat.

2.5. Die dissimilatorische Sulfatreduktion an natürlichen Standorten

Die Frage nach der Existenz Acetat-oxidierender Sulfatreduzierer stellte sich erneut aus ökologischer Sicht, unabhängig von den physiologischen und biochemischen Erfahrungen mit Reinkulturen. Denn etliche der in natürlichen Systemen beobachteten Umsetzungen durch Sulfat-reduzierende Bakterien bleiben aufgrund der Stoffwechsellleistung der bekannten Arten unverständlich.

Das bisweilen große Ausmaß einer dissimilatorischen Reduktion von Sulfat in Gewässern könnte schwer erklärt werden, wenn dabei nur die wenigen als verwertbar bekannten Verbindungen als Substrate dienen. So werden hin und wieder sogenannte eutrophierte Gewässer von einer starken Produktion von Schwefelwasserstoff betroffen. In solchen Gewässern bewirken ein hohes Nährstoffangebot sowie mangelnde Verdünnung mit Frischwasser zunächst einen starken Pflanzenbewuchs und eine demzufolge oft üppige Fauna von Wassertieren. Abgestorbene Biomasse und die hohen Populationsdichten können dann eine so starke Sauerstoffzehrung hervorrufen, daß sich der anaerobe Abbau organischen Materials ausweitet. Ist Sulfat zugegen, wie vor allem an marinen Standorten, geht mit dem anaeroben Abbau eine intensive Produktion von Schwefelwasserstoff einher. Durch die Anaerobiose und vor allem die Giftigkeit des Schwefelwasserstoffs werden höhere Lebensformen getötet, wie zum Beispiel auch Fische. Dadurch erhält aber der anaerobe Abbau weitere Nahrung, sodaß sich der mit Schwefelwasserstoff vergiftete Bereich schließlich im gesamten Wasser ausbreitet. Der vormals reichliche Bestand an höheren Lebewesen wird zu einem Massengrab. Nicht selten ruft dann der gebildete Schwefelwasserstoff auch eine stärkere Entwicklung farbloser Schwefelbakterien und phototropher Schwefel-Purpurbakterien hervor, die das Wasser milchig trüben bzw. rot färben (CAUMETTE, 1978). Daß katastrophenartige Entwicklungen dieser Art auch in erdgeschichtlicher Zeit stattgefunden haben, darf man aufgrund des Reichtums

bestimmter Fundorte an Fossilien vermuten.

Ebenfalls recht stark muß die Produktivität der Sulfat-reduzierenden Bakterien gewesen sein, die einst zur Bildung sedimentärer Lagerstätten von Schwefel und sulfidischen Erzen geführt haben soll (KUZNETSOV et al., 1963; TEMPLE, 1964; LYALIKOVA und SOKOLOVA, 1965; IVANOV, 1968; ZAJIC, 1969; TRUDINGER, 1976; ORR, 1978). AULT und KULP (1959) hatten gezeigt, daß die Fraktionierung der Schwefelisotope ^{32}S und ^{34}S in der Natur vor allem durch bakterielle Sulfatreduktion zustande kommt. Sulfatreduzierer bevorzugen nämlich das leichtere Isotop; dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Isotopenzusammensetzung zwischen unverbrauchtem Sulfat und gebildetem Schwefelwasserstoff. Aufgrund eines ermittelten $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ -Verhältnisses kann dann vermutet werden, inwieweit ein Schwefelvorkommen auf mikrobielle Prozesse zurückzuführen ist. Eine Oxidation von Schwefelwasserstoff zu Schwefel ist einerseits mit Sauerstoff möglich, entweder rein chemisch oder durch farblose Schwefelbakterien; andererseits kann Schwefelwasserstoff anaerob durch grüne oder rote Schwefelbakterien im Licht zu Schwefel oxidiert werden. Sulfat-reduzierende Bakterien könnten somit entscheidend zur Bildung von sedimentärem Schwefel beigetragen haben. Sedimentär, also nicht vulkanogen, sind immerhin etwa 90 % der heute erschlossenen Schwefelvorkommen. Die Bildung von Ablagerungen sulfidischer Erze wird so erklärt, daß biologisch gebildeter Schwefelwasserstoff mit leichter löslichen Verbindungen von Schwermetallen (Fe, Cu, Zn, Pb) der damaligen Ozeane zu den sehr schwer löslichen Sulfiden reagiert hat.

Im Normalfalle häufen sich jedoch in Gewässern keine größeren Mengen freien Schwefelwasserstoffs an. Ausreichende Sauerstoffzufuhr und ein begrenztes Nährstoffangebot schränken den anaeroben Abbau ein. Die Grenzschicht zwischen anaerober und aerober Zone, die sogenannte Chemokline, liegt häufiger unterhalb der Sedimentoberfläche als oberhalb. Gebildeter Schwefelwasserstoff wird an der Chemokline mit Sauerstoff biologisch oder

chemisch oxidiert; wenn Tageslicht in den Bereich unterhalb der Chemokline gelangen kann, oxidieren auch rote und grüne Schwefelbakterien den Schwefelwasserstoff. Die oxidierten Schwefelverbindungen, wie Thiosulfat oder Sulfat, werden dann weiter unterhalb wieder mit organischen Verbindungen reduziert. Es resultiert ein Kreislauf der verschiedenen Oxidationszustände des Schwefels. An Standorten, die reich an Sulfat sind, kann dieser Schwefelkreislauf erheblich an der Oxidation des abgesunkenen organischen Materials (Detritus) beteiligt sein: JØRGENSEN und FENCHEL (1974) sowie JØRGENSEN (1977 a) bestimmten Umsatzraten im Schwefelkreislauf eines marinen Sediments. Dabei zeigte sich, daß über die Hälfte der anfallenden Biomasse durch die dissimilatorische Sulfatreduktion mineralisiert, also zu Kohlendioxid oxidiert wurde; mit dem Substratumsatz der bekannten Sulfatreduzierer könnte jedoch maximal ein Drittel der Biomasse mineralisiert werden (FENCHEL und JØRGENSEN, 1977).

CAHET (1975) konnte zeigen, daß als Substrate für eine Sulfatreduktion in Sedimenten dennoch solche Verbindungen in Frage kommen, die von den bekannten Reinkulturen Sulfat-reduzierender Bakterien nicht verwertet werden: In natürlichen anaeroben Bakterienpopulationen wurden biologisch so bedeutende Abbauprodukte wie Acetat und höhere Fettsäuren unter Bildung von Schwefelwasserstoff schnell verbraucht. In der Arbeit wurde jedoch versucht, die Umsetzung mit den bekannten Sulfatreduzierern zu erklären; so postulierte CAHET eine Bakterienflora, die Acetat und andere Fettsäuren zunächst zu Lactat und H_2 umsetzt.

Zu neuen Vermutungen über den Substratumsatz Sulfat-reduzierender Bakterien gelangte man auch aufgrund eines Phänomens, das erst durch die neueren Untersuchungen an Methanbakterien wieder an Bedeutung gewonnen hat: Gemeint ist die bereits von HOPPE-SEYLER (1886) beschriebene Hemmung der Methanbildung in Schlämmen durch Sulfat. BUTLIN et al. (1956) führten die Hemmung der Methanbildung durch Sulfat auf die Giftigkeit des gebildeten Schwefelwasserstoffs zurück. In Untersuchungen an Schlamm-sedimenten eines Süßwassersees beobachteten

CAPPENBERG (1974 a,b) sowie CAPPENBERG und PRINS (1974) ebenfalls, daß bei Gegenwart von Sulfat kein Methan entstand. Als wichtigstes Substrat für die Methanbildung wurde Acetat nachgewiesen. Auch schon frühere Untersuchungen anderer Autoren hatten gezeigt, daß bis zu 73 % des in Schlämmen gebildeten Methans aus Acetat als Zwischenstufe entstehen können (JERIS und McCARTY, 1965; SMITH und MAH, 1966). Um das Ausbleiben der Methanproduktion in Gegenwart von Sulfat zu erklären, diskutierten CAPPENBERG und PRINS eine Verwertung von Methan durch Sulfatreduzierer sowie die Giftwirkung des gebildeten Schwefelwasserstoffs auf Methanbakterien. Dagegen wurden keinerlei Hinweise für die naheliegende Vermutung gegeben, daß die Sulfatreduzierer das sonst von den Methanbakterien verwertete Acetat ebenfalls umsetzen könnten. Nach Ansicht der Autoren ist nämlich Lactat das hauptsächliche Substrat für die in dem See lebenden Sulfat-reduzierenden Bakterien. Im selben Jahre wiesen MARTENS und BERNER (1974) nach, daß auch in marinen Sedimenten erst dann Methan gebildet wurde, als der Vorrat an Sulfat infolge einer dissimilatorischen Sulfatreduktion nahezu erschöpft war. Hier wurde vermutet, daß Methanbakterien und Sulfatreduzierer um ein gemeinsames Substrat konkurrieren: In Gegenwart von Sulfat ist die Reduktion zu Schwefelwasserstoff die begünstigte Reaktion. Eine Oxidation von Methan durch Sulfatreduzierer konnte in den Experimenten nicht nachgewiesen werden. WINFREY und ZEIKUS (1977) zeigten, daß bereits bei Zusatz geringer Mengen Sulfat zu Sedimenten eines Süßwassersees die Methanbildung ausblieb. Eine Hemmung durch die Giftigkeit von gebildetem Schwefelwasserstoff und auch eine Oxidation von Methan durch Sulfatreduzierer konnten ausgeschlossen werden. Auch hier wurden die Ergebnisse durch Konkurrenz zwischen Methanbakterien und Sulfatreduzierern um gemeinsame Substrate erklärt. Als ein wichtiges Substrat für die Methanbakterien in dem See war außer Wasserstoff auch Acetat nachgewiesen worden. Die Autoren zeigten, welche Bedeutung möglicherweise existierende Acetat-oxidierende Sulfatreduzierer für den Endabbau organischer Substanzen unter anaeroben Bedingungen hätten.

Den ersten Beweis für eine vollständige Oxidation organischer Verbindungen durch ein anaerobes Bakterium erbrachten PFENNIG und BIEBL (1976) mit der Isolation von Desulfuromonas acetoxidans. Dieses Bakterium oxidiert Acetat oder Äthanol zu Kohlendioxid, wobei elementarer Schwefel als Elektronenakzeptor dient und zu Schwefelwasserstoff reduziert wird. Sulfat, Sulfit oder Thiosulfat werden jedoch nicht verwertet. Eine vollständige Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat unter anaeroben Bedingungen kann daher mit der Stoffwechsellleistung von Desulfuromonas acetoxidans nicht erklärt werden.

3. Ziel der vorliegenden Untersuchungen

Die Literaturübersicht hat gezeigt, daß der Nachweis eines Acetat-verwertenden Sulfat-reduzierenden Bakteriums in mehrfacher Hinsicht von wissenschaftlicher Bedeutung sein könnte: Die Sulfat-reduzierenden Bakterien wären fortan als eine physiologische Gruppe zu betrachten, in der auch die Fähigkeit zur Endoxidation organischer Verbindungen vertreten ist. Biochemisch wären der Mechanismus der anaeroben Oxidation von Acetat sowie die Energiebilanzen der damit verbundenen Reaktionsschritte von Interesse; die älteren Hypothesen gälte es neu zu prüfen. Schließlich wäre auch für die aufgezeigten ökologischen Aktivitäten Sulfat-reduzierender Bakterien im anaeroben Abbaugeschehen eine plausible Erklärung aus mikrobiologischer Sicht gefunden.

Daher galt es zunächst, den endgültigen Nachweis für die Existenz eines Acetat-verwertenden Sulfatreduzierers zu erbringen: Aus der anfangs beschriebenen Anreicherung (s. 1.), in der Sulfat mit Acetat zu Schwefelwasserstoff reduziert wurde, sollte das für diese Reaktion verantwortliche Bakterium isoliert werden. Darüberhinaus sollte auch an anderen Standorten nach Acetat-verwertenden Sulfatreduzierern gesucht werden; wegen des hohen Sulfat-Gehalts erschienen besonders Versuche mit marinen Schlämmen erfolgversprechend. Weil nach Acetat die nächst

häufigeren Gärungsprodukte natürlicher anaerober Mischpopulationen Propionat und Butyrat sind (HUNGATE, 1966, S. 245 - 280; TOERIEN und HATTINGH, 1969), sollten auch diese Fettsäuren für Anreicherungen eingesetzt werden. Ferner war von Interesse, ob von Sulfatreduzierern auch langkettige Fettsäuren verwertet werden können. Diese Verbindungen werden in Schlämmen beim Abbau der weit verbreiteten Lipide frei. CHYNOWETH und MAH (1971) zeigten, daß langkettige Fettsäuren wesentlich zur Methanbildung im Klärschlamm beitragen. CAHET (1975) wies eine Verwertung langkettiger Fettsäuren auch in Sulfat-reduzierenden Bakterienpopulationen nach. Daher bestanden hier ebenfalls Aussichten, mit derartigen Substanzen zumindest Anreicherungen zu erhalten. Als Vertreter für die Vielzahl der biologischen Fettsäuren höheren Molekulargewichts wurden zwei wichtige gesättigte gewählt, nämlich Palmitat und Stearat. Schließlich sollte auch noch eine aromatische Verbindung auf Verwertbarkeit durch Sulfatreduzierer geprüft werden. Als eine einfache und verhältnismäßig ungiftige Substanz dieser Art bot sich Benzoesäure (Benzoat) an, die in der Natur im Benzoeharz, in Beeren und in Gräsern verbreitet ist. Die mit der Nahrung aufgenommene Benzoesäure wird zum Beispiel von Pferden als Hippursäure (Benzoylglycin) gebunden ausgeschieden. Benzoat wurde bereits mit Erfolg als Substrat für Methan-bildende Mischpopulationen eingesetzt (TARVIN und BUSWELL, 1934; FINA und FISKIN, 1960; NOTTINGHAM und HUNGATE, 1969; FERRY und WOLFE, 1976; FINA et al., 1978; HEALY und YOUNG, 1979). Dagegen fehlen bisher Berichte über eine Sulfatreduktion mit Benzoat.

Durch Anreicherungsversuche sollte schließlich noch auf die Frage eingegangen werden, ob Methan und auch höhere Alkane von Sulfat-reduzierenden Bakterien verwertet werden können.

In Reinkultur isolierte Sulfatreduzierer galt es dann aufgrund morphologischer, wachstumsphysiologischer und auch einiger biochemischer Merkmale zu charakterisieren und taxonomisch einzuordnen. Dafür waren Zellform, Begeißelung, pH- und Temperatur-

Optima, verwertbare und nicht verwertbare Substrate, benötigte Wachstumsfaktoren, Pigmentgehalt sowie das Basenverhältnis der DNS die wichtigsten Eigenschaften. Die Stöchiometrie von Substratumsetzungen sollte in Wachstumsexperimenten ermittelt werden. Die dabei bestimmten Zellerträge konnten energetischen Betrachtungen dienen und Grundlage für spätere biochemische Untersuchungen werden. Die physiologischen Beobachtungen sollten schließlich auch dazu beitragen, die ökologische Bedeutung Sulfat-reduzierender Bakterien innerhalb des natürlichen Stoffkreislaufs zu verstehen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Herkunft des Probenmaterials

Anaerobe Schlämme für die Anreicherung Sulfat-reduzierender Bakterien wurden den folgenden Standorten entnommen:

- 1) Faulschlamm aus der Kläranlage Göttingen. Schlammproben aus dem Haupt- und Nachfaulbehälter wurden zu gleichen Teilen miteinander vermischt.
- 2) Gülle aus einer Schweinehaltung, Göttingen.
- 3) Schlamm aus einem Dorfgraben, Lindhorst, Kreis Schaumburg.
- 4) Schlamm aus einem Waldteich bei Sachsenhagen, Kreis Schaumburg.
- 5) Schlamm aus einem Moorteich bei Rehburg Stadt, Kreis Nienburg.
- 6) Anreicherungskultur für Schwefel-Purpurbakterien (Prof. Dr. N. Pfennig). Das verwendete Ausgangsmaterial war dunkles Sediment aus einem Waldteich mit Zufluß aus einer Quelle, der Ducksteinquelle bei Mohringen, Solling. Der Schlamm war mit Cellulose-Pulver und Calciumsulfat versetzt und in einem Standzylinder an einem Nordfenster aufbewahrt worden.
- 7) Panseninhalt einer Kuh, Institut für Tierphysiologie der Universität Göttingen. Der fließbare Anteil wurde aus dem ventralen Bereich des Pansens durch eine Fistel mit einem Schlauch abgesaugt und über ein Sieb von groben Bestandteilen befreit.
- 8) Schlamm aus einem Bewässerungsgraben, Jork, Kreis Stade.

- 9) Schlamm aus dem Graben einer Viehweide in der Nähe des Deiches bei Dangast, Jadebusen.
- 10) Schlamm (Schlick) aus dem Watt des Jadebusen bei Dangast. Nur die schwarze Schicht unterhalb der helleren aeroben wurde verwendet.
- 11) Anreicherungskultur für Schwefel-Purpurbakterien mit Acetat und Sulfid in marinem Medium (Prof. Dr. N. Pfennig). Das Ausgangsmaterial war einer faulenden Anschwemmung von Algen auf Helgoland entnommen worden.
- 12) Sedimentsäule aus dem Limfjord, Dänemark, entnommen an einer Meßstation des Meereslaboratoriums der Universität Århus in Rønbjerg (Dr. B. B. Jørgensen). Nur Schlamm aus dem schwarzen Bereich der Sedimentsäule wurde verwendet.
- 13) Schlamm aus einer Lagune am Mittelmeer, Etang du Prévost, bei Montpellier, Frankreich. Zwei Tage nach Beginn der massiven Entwicklung von Schwefelwasserstoff im Juli 1977 wurden an mehreren Stellen Sedimentproben entnommen und vereinigt.

Das Probenmaterial wurde in dicht verschlossenen Gefäßen unter einer Stickstoffatmosphäre (s. 2.1.) im Dunkeln aufbewahrt. Proben, die innerhalb einer Woche nicht für Anreicherungen verwendet werden konnten, wurden bei 4 °C gelagert.

2. Häufig angewandte Verfahrensweisen beim anaeroben Arbeiten

2.1. Aufbewahrung von Kulturen und Lösungen unter einer anaeroben Gasatmosphäre

In den verwendeten Kultur- und Vorratsgefäßen war häufig ein Gasraum über der Flüssigkeit vorhanden oder erforderlich. Um die streng anaeroben Bakterien ebenso wie Sauerstoff-empfind-

liche Lösungen vor dem Zutritt von Luft zu schützen, wurde der freie Raum über den Flüssigkeiten nach der von BRYANT (1972) beschriebenen sogenannten Hungate-Technik begast.

Zunächst wurde eine Glasspritze mit einer spitzwinklig gebogenen Kanüle mit Watte gestopft, autoklaviert und anschließend über einen Schlauch und Glashahn mit einer Begasungsapparatur verbunden. Mit Hilfe dieser Apparatur konnten Gase aus Stahlflaschen (MESSER GRIESHEIM, Düsseldorf) über Stömungsmeßrohre mit Regulierventilen (FISCHER & PORTER, Gr. Ellershausen/Göttingen) in beliebigen Verhältnissen miteinander vermischt werden. Der Gasdruck in der Apparatur betrug 0,5 atm. Zur Entfernung letzter Reste von Sauerstoff wurden die Gase durch eine Glassäule geleitet, die einen Kupfer-Katalysator, Actimet 13 (DODUCO, DÜRRWÄCHTER, Sinsheim/Els.), enthielt. Die Glassäule wurde über eine Heizspirale auf etwa 200 °C erhitzt. War der Kupfer-Katalysator dunkelbraun, so war er oxidiert und mußte mit Wasserstoff zu der reduzierten braunroten Form regeneriert werden. Alle Schlauchverbindungen der Begasungsapparatur waren aus Isoversinic (VERNERT, Freimersdorf/Köln), das eine sehr geringe Durchlässigkeit für O₂ und H₂ besitzt. Zur sterilen Begasung von Gefäßen wurde die gebogene Kanüle in der Bunsen-Flamme kurzzeitig auf schwache Rotglut erhitzt, ohne die Spritze dabei zu erwärmen. Nach dem Öffnen des Glashahns wurde dann die weitgehend abgekühlte Kanüle in die Gefäßöffnung eingeführt. Gleichzeitig wurde ein steriler Stopfen so in die Gefäßöffnung gesteckt, daß das ausströmende Gas seitlich entweichen konnte. Der Stopfen wurde nur am oberen Rande, der nicht mit dem Kulturgefäß in Berührung kam, gehalten. Nach einer Begasungsdauer zwischen etwa 5 und 30 s wurde die Kanüle - bei noch strömendem Gas - herausgezogen und der Stopfen gleichzeitig so stark hineingedrückt, daß er sofort hinter der Kanüle abschloß. Anschließend wurde der Stopfen noch etwas tiefer hineingedreht. Der Begasungsvorgang ist in Abb. 1 dargestellt. Es wurden hauptsächlich Stopfen aus Butyl-Gummi (THOMAS, Philadelphia, Pa., USA; oder Viton (VERNERT) verwendet, denn diese Materialien haben ebenfalls eine nur sehr geringe Durchlässigkeit.

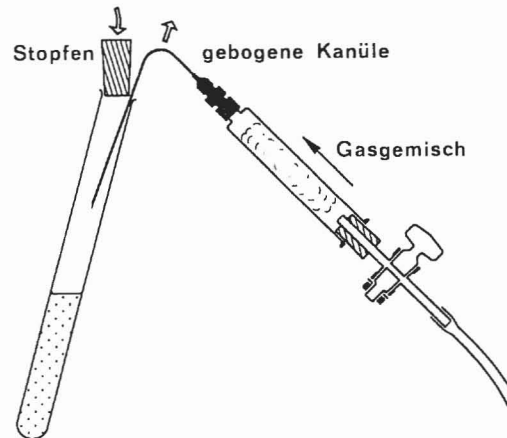


Abb. 1: Begasen eines Gefäßes nach der Hungate-Technik

keit für O_2 und H_2 . Nur für Massenzuchten in größeren Kulturgefäßen waren auch gängige (blaue) Gummistopfen ausreichend. Die verschlossenen Hälse der Gefäße wurden dann zur Herabsetzung der Kontaminationsgefahr mit einer vorher in der Flamme erhitzten Metallkappe bedeckt.

Beim Begasen von Kulturgefäßen, insbesondere bei einem verhältnismäßig großen Gasraum über dem Medium, mußte dem einzuleitenden Gas ein bestimmter Anteil an CO_2 beigemischt werden. Die Nährmedien enthielten nämlich stets Bicarbonat (s. 3.) als Puffer und anorganische Kohlenstoffquelle, sodaß CO_2 aus der Flüssigkeit in die Gasphase diffundierte. Ein Verlust des Mediums an CO_2 hätte aber einen Anstieg des pH-Wertes zur Folge. Daher wurde dem einzuleitenden Gas soviel CO_2 beigemischt, daß ein Diffusionsgleichgewicht zwischen gelöstem und gasförmigem CO_2 bestand. Der für ein Gleichgewicht erforderliche Partialdruck von CO_2 ist von der Konzentration an Bicarbonat im Medium, dem gewünschten pH-Wert und der Temperatur abhängig. Als Temperatur der Medien kann man annäherungsweise $30^\circ C$ annehmen. Die Konzentration an Bicarbonat wurde bei der Herstellung der

Medien vorgegeben (s. Tab. 2). Der erforderliche Partialdruck von CO_2 in der Gasphase wurde nach der im Anhang gegebenen Formel berechnet. Ist der Gesamtdruck der Gasatmosphäre im Kulturgefäß gleich dem Außendruck, also 1 atm, so ist der einzustellende prozentuale Anteil von CO_2 im Gasgemisch gleich dem Zahlenwert des Partialdrucks, multipliziert mit dem Faktor 100. In Tab. 1 sind einige Werte für den CO_2 -Gehalt im Gasgemisch angegeben, um bei einem Gesamtdruck von 1 atm einen bestimmten pH-Wert in den Medien aufrechtzuerhalten.

Tab. 1: Erforderlicher CO_2 -Gehalt in der Gasphase über den verwendeten Kulturmedien, um einen gegebenen pH-Wert aufrechtzuerhalten

Gesamtdruck: 1 atm; Temperatur: $30^\circ C$; $[NaHCO_3] = 30 \text{ mmol/l}$	
pH-Wert des Kulturmediums	CO_2 -Gehalt der Gasphase [%]
6.6	37
6.8	26
7.0	18
7.2	12
7.4	8,2
7.6	5,3
7.8	3,4

Ferner war beim Begasen von Kulturgefäßen zu beachten, daß das Medium noch eine weitere flüchtige Verbindung enthielt, nämlich das als Reduktionsmittel stets benutzte Sulfid; dieses liegt bei den verwendeten pH-Werten bereits zu einem erheblichen Teil als freies H_2S vor und tritt daher aus den Medien merklich in die Gasphase über. Beim Begasen mußte daher vermieden werden,

das Nährmedium stark zu bewegen oder unnötig lange dem Gasstrom auszusetzen.

2.2. Druckentlastung von Kulturgefäßen

Wenn in Nährmedien gelöste Substrate zu Methan umgesetzt wurden, konnte infolge eines zu hohen Gasdrucks der Stopfen herausfliegen oder das Gefäß zerplatzen. Um einen derartigen Druckanstieg zu vermeiden, wurden die Stopfen der betreffenden Kulturgefäße von Zeit zu Zeit soweit herausgedreht, daß das überschüssige Gas entweichen, aber keine Luft eindringen konnte. Die gelockerten Stopfen in den Gefäßöffnungen wurden dann abgeflammt und wieder tiefer hineingedreht.

Kulturgefäße, in denen eine starke Bildung von Methan erwartet wurde, konnten auch schon von vornherein mit einem Aufsatz für einen kontinuierlichen Druckausgleich verschlossen werden. Zur Herstellung eines solchen Aufsatzes wurde ein durchbohrter Stopfen mit einem Gärröhrchen versehen. Um eine Konvektion in diesem Gärröhrchen zu vermeiden, hatte das Verbindungsstück zwischen den kugelförmigen Erweiterungen, welche die Sperrflüssigkeit aufnehmen, einen möglichst geringen Innendurchmesser. Das Gärröhrchen wurde nahe dem unteren Ende mit Watte gestopft. Vor dem Autoklavieren wurde der Stopfen am Gärröhrchen mit Aluminiumfolie umwickelt. Nach dem Abkühlen wurde mit einer Spritze Glycerin aufgenommen und über einen dünnen Schlauch in das Gärröhrchen gegeben. Das Glycerin verhinderte als viskose Sperrflüssigkeit ein Eindringen von Sauerstoff durch Konvektionsströmungen. Dieser Aufsatz wurde nach Entfernung der Aluminiumfolie bei der Begasung eines Gefäßes nach der beschriebenen Hungate-Technik als Verschuß verwendet; während das Gasgemisch eingeleitet wurde, entwich ein Teil auch durch das Gärröhrchen. Der Rand des so verschlossenen Gefäßes wurde zur Herabsetzung der Kontaminationsgefahr mit erhitzter Aluminiumfolie umwickelt.

2.3. Anaerobes Autoklavieren von Lösungen

Hitzebeständige Lösungen wurden ohne Luftzutritt in verschlossenen Gefäßen unter einer Gasatmosphäre autoklaviert. Flaschen oder Röhrchen wurden bis zu 80 % ihres Volumens mit den betreffenden Lösungen gefüllt und nach der Hungate-Technik begast. Die mit den Stopfen verschlossenen Gefäßöffnungen wurden mit Metallkappen bedeckt. Dann wurden die Flaschen senkrecht zwischen zwei rechteckige parallele Metallplatten eingespannt, die an den jeweils entsprechenden vier Ecken über vier lange Schrauben mit Flügelmutter verbunden waren; Röhrchen wurden dabei in einem Ständer gehalten. Die Flügelmutter wurden dann so stark angezogen, daß der durch die Platten ausgeübte Druck ein Herausfliegen der Stopfen im Autoklaven verhinderte. Erst nach dem Erkalten wurden die Klemmplatten wieder entfernt.

2.4. Anaerobe Aufbewahrung von Lösungen für den ständigen Gebrauch

Zur Aufbewahrung Sauerstoff-empfindlicher Stammlösungen, aus denen häufig etwas entnommen wurde, dienten spezielle Gefäße mit zwei Öffnungen (Abb. 2). Durch die eine der Öffnungen wurde Stickstoff über einen Wattefilter steril eingeleitet. Über die zweite Öffnung, die mit einem Schraubdeckel zu verschließen war, konnte vom Inhalt entnommen werden, ohne anschließend nach der Hungate-Technik begasen zu müssen. Vor der Benutzung wurde das Gefäß zusammen mit dem Wattefilter autoklaviert. Danach wurde über den Wattefilter Stickstoff von 0,5 atm Druck angelegt. Nach dem Aufdrehen des Schraubverschlusses strömte der Stickstoff durch das Gefäß. Sterile Stammlösungen konnten dann eingefüllt und mit einer Pipette bei Bedarf wieder entnommen werden. Die Lösungen konnten in derartigen Gefäßen auch über längere Zeit aufbewahrt werden; bevor das Gefäß von der Gasleitung getrennt wurde, mußte der Hahn geschlossen werden.

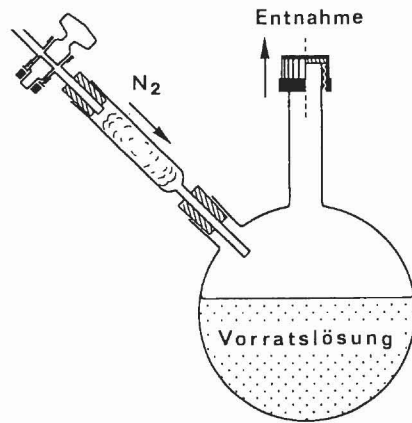


Abb. 2: Anaerobe Aufbewahrung einer Vorratslösung (Stammlösung) bei häufiger Entnahme

2.5. Aufbewahrung kleiner Kulturvolumina in verschraubbaren Flaschen und Röhrchen

Für Kulturen bis zu 100 ml, die weder aus der Gasphase zu ernähren waren noch Gas produzierten, bot sich eine einfache Methode für die anaerobe Aufbewahrung an: Flaschen und Röhrchen mit Schraubdeckeln und Gummidichtung wurden vollständig mit dem betreffenden Medium gefüllt und fest verschlossen. Die Schraubdeckel waren aus Aluminium und konnten deshalb vor jedem Öffnen wirksam abgeflammt werden. Bei einer Erwärmung vollständig gefüllter Flaschen und Röhrchen in einem Wasserbade oder Inkubationsraum mußte die Wärmeausdehnung der Flüssigkeit berücksichtigt werden; die Gefäße wurden dann mit den Schraubdeckeln bis zum Erreichen der Temperatur zunächst weniger fest verschlossen.

3. Nährmedien

Für die Kultur Sulfat-reduzierender Bakterien wurden nach Möglichkeit chemisch definierte Medien verwendet, die als organische Verbindungen nur das jeweilige Substrat und eventuell benötigte Vitamine enthielten.

Um bei der Verwendung hoher Konzentrationen von Magnesium- und Calcium-Ionen in Medien für marine Bakterien Ausfällungen von schwerlöslichen Phosphaten zu vermeiden, wurde Phosphat stets in niedriger Konzentration verwendet. Da somit nur noch eine geringe puffernde Wirkung vom Phosphat ausging, wurde den Medien reichlich Bicarbonat zugesetzt. Dadurch stand den Bakterien gleichzeitig genügend CO₂ für Synthesereaktionen zur Verfügung. Bei 30 °C beträgt der pK_a-Wert des Systems HCO₃⁻/CO₂(gelöst) etwa 6.3. Da der pH-Wert der Medien fast immer etwas höher als 7.0 lag, waren die Kulturen somit gegen eine Ansäuerung stärker gepuffert als gegen eine Alkalisierung.

Eine weitere Voraussetzung zur Anzucht Sulfat-reduzierender Bakterien sind streng anaerobe Verhältnisse. Das Fehlen von Sauerstoff ist jedoch allein noch keine hinreichende Bedingung für das Wachstum vieler streng anaerober Bakterien; darüberhinaus ist ein bestimmtes negatives Redoxpotential erforderlich, das allein durch physikalisches Austreiben von Sauerstoff aus der Lösung nicht erreicht werden kann. Daher wurde den Kulturmedien ferner ein Reduktionsmittel zugesetzt; dieses sollte aber nicht nur für ein genügend negatives Redoxpotential sorgen, sondern auch kleine Mengen von unvermeidbar eindringendem Sauerstoff binden. Das Reduktionsmittel mußte deshalb bezüglich dieser Reaktion eine gewisse Kapazität haben und damit eine nicht zu geringe Konzentration im Medium. Ascorbat (Vitamin C) sowie Cystein erschienen weniger geeignet, da diese als biologische organische Verbindungen in Anreicherungen Substrate für Bakterien sind. Bei der Verwendung von Thioglycolat mußte eine Giftwirkung auf empfindliche Bakterienarten befürchtet werden. Da nun in Kulturen von Sulfat-reduzierenden Bakterien

ohnehin Schwefelwasserstoff gebildet wird, wurde den Nährmedien von vornherein eine bestimmte Menge an Natriumsulfid zugesetzt. Somit enthielten diese ein natürliches und unter den anaeroben Bedingungen nicht weiter abbaubares Reduktionsmittel.

Für die geplanten Versuche wurde eine große Zahl von Nährmedien sehr unterschiedlicher Zusammensetzung benötigt. Diese wurden jedoch nicht für jeden Fall einzeln zubereitet; vielmehr wurden wenige bestimmte Grundmedien hergestellt, denen dann die für den speziellen Zweck noch erforderlichen Komponenten aus separaten Stammlösungen zugesetzt wurden.

3.1. Technik der anaeroben Zubereitung von Grundmedien

Bereits die Grundmedien mußten unter Ausschluß von Luftsauerstoff hergestellt werden. Welches Verfahren dabei angewandt wurde, hing davon ab, ob das Medium in einer größeren Zahl kleinerer oder in wenigen großen Gefäßen verwendet wurde.

Einige Bestandteile des Grundmediums konnten nicht mit diesem zusammen autoklaviert werden. Bicarbonat und Sulfid entweichen aus heißen Lösungen schnell als CO_2 bzw. H_2S ; Sulfid wird außerdem in der Hitze besonders schnell oxidiert. Schwermetalle aus Spurenelement-Lösungen (hauptsächlich Fe) werden in heißen Medien oft in Form flockiger, schwerlöslicher Verbindungen ausgefällt. Daher wurde zunächst ein Medium ohne die betreffenden Komponenten hergestellt, das sogenannte Teilmedium, und autoklaviert. Die noch fehlenden Bestandteile wurden erst nach dem Erkalten des Teilmediums aus separat sterilisierten Lösungen zugesetzt.

3.1.1. Zubereitung von Grundmedien für kleine Kulturvolumina

Für Stammkulturen, die Optimierung von Wachstumsbedingungen und für Substrattests wurde Grundmedium in einer größeren

Anzahl verschraubbarer Flaschen und Rührchen vorrätig gehalten (s. 2.5.). Das für einen solchen Zweck bestimmte Medium wurde in dem in Abb. 3 dargestellten trichterförmigen Kolben zubereitet. Kolben dieser Art standen mit Volumina von 2 oder 5 l zur Verfügung. Das hitzebeständige Teilmedium wurde in dem Kolben direkt zubereitet, der dann mit dem abgebildeten Aufsatz mit Wattefilter und Abfüllvorrichtung autoklaviert wurde; dabei blieben die Schraubverschlüsse halb geöffnet. Nach dem Autoklavieren wurde über den Hahn und den Wattefilter ein Gemisch aus 90 % N_2 und 10 % CO_2 von 0,07 atm Druck durch den Kolben geleitet, das durch die halboffenen Schraubverschlüsse wieder entwich; diese wurden nach etwa 1 min verschlossen. Der Kolben wurde dann unter Rührung in einem Durchfluß-Wasserbad abgekühlt. Der Schlauch (Silicon) am unteren Ende des Steigrohres endete wenige mm über dem Boden des Gefäßes; somit konnte der Rührmagnet den Schlauch erfassen und in kreisende Bewegung versetzen, sodaß ein verstärkter Rühreffekt zustande kam. Nach dem Erkalten konnten die noch fehlenden Komponenten durch die links in der Abbildung dargestellte Öffnung steril zugesetzt werden; dabei verhinderte das beim Öffnen des Schraubverschlusses stets ausströmende Gasgemisch ein Eindringen von Luft. Zum Einstellen des pH-Werts wurde durch die linke Öffnung sterile Salzsäure (bzw. Natriumcarbonat-Lösung) zugegeben und unter Rührung mit dem Medium vermischt. Über die rechte Öffnung wurden mit einer sterilen Pipette kleine Proben entnommen und mit einem pH-Meter geprüft. War der gewünschte pH-Wert eingestellt, so wurde die Rührung endgültig ausgeschaltet. Mit Hilfe der gläsernen Abfüllglocke wurde das Medium unter Betätigung des Quetschhahns in sterile verschraubbare Flaschen (50 - 100 ml) oder Rührchen (20 ml) gefüllt. Die Abfüllglocke schützte die Austrittsöffnung gegen Luftkontaminationen. Die ersten 100 ml des entnommenen Mediums wurden in den Kolben zurückgegeben. Während der Gasdruck das Medium aus dem Kolben trieb, verhinderte die besondere Form dieses Gefäßes eine zu starke Abgabe von H_2S in den Gasraum: Infolge der Trichterform wurde die Oberfläche des ständig abnehmenden Flüssigkeitsvolumens ebenfalls immer kleiner, sodaß der Gasaustausch in Grenzen gehalten wurde. Bei

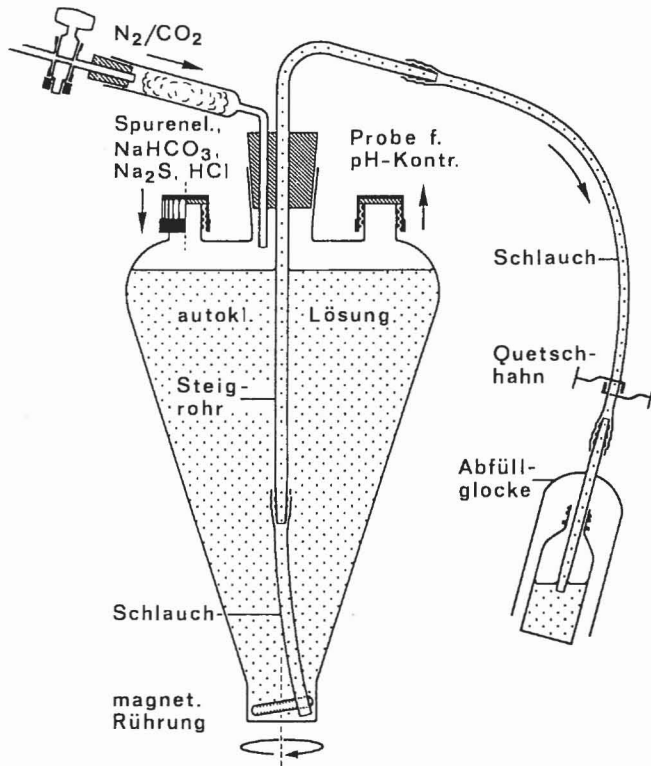


Abb. 3: Zubereitung von Grundmedium für kleine Flaschen und Röhrchen

der Entnahme von Proben und beim Abfüllen wurden das Entweichen von CO_2 und H_2S sowie der Kontakt des auslaufenden Mediums mit der Luft soweit wie möglich eingeschränkt: Die Austrittsöffnung der Pipette bzw. die unter der Abfüllglocke wurde stets in das bereits ausgelaufene Medium eingetaucht (Abb. 3).

3.1.2. Zubereitung von Grundmedien für größere Kulturvolumina

Medium für Kulturvolumina von 0,25 bis 10 l wurde in den jeweiligen Anzuchtgefäßen direkt zubereitet. Glasflaschen mit Schraubverschlüssen bzw. Steilbrustflaschen wurden bis zu 70 % ihres Volumens mit dem autoklavierbaren Teilmedium gefüllt und mit Rührmagneten versehen. Neben den Anzuchtgefäßen wurden noch zusätzlich kleinere Gefäße mit Teilmedium gefüllt. Zum Autoklavieren wurden die Schraubverschlüsse nur locker zuge dreht; Steilbrustflaschen wurden mit Wattestopfen verschlossen und mit umgestülpten Bechergläsern bedeckt. Nach dem Autoklavieren wurden die noch heißen Anzuchtgefäße aus den kleineren Flaschen auf 90 bis 95 % ihres Volumens aufgefüllt, nach 2.1. mit einem Gemisch aus 90 % N_2 und 10 % CO_2 begast und mit sterilen Cummi stopfen verschlossen. Nach dem Abkühlen unter Rührung in einem Durchfluß-Wasserbad wurden die für das Grundmedium noch erforderlichen Komponenten zugesetzt sowie der pH-Wert eingestellt (s. 3.1.1.). Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Flaschen wieder nach der Hungate-Technik verschlossen.

3.2. Einzellösungen für die Herstellung von Grundmedien

a) Spurenelement-Gemisch I

Stammlösung:	HCl	50	mmol/l
	H_3BO_3	1,0	mmol/l
	MnCl_2	0,5	mmol/l
	FeCl_2	7,5	mmol/l
	CoCl_2	0,5	mmol/l
	NiCl_2	0,1	mmol/l
	CuCl_2	0,1	mmol/l
	ZnCl_2	0,5	mmol/l

Anwendung: 1,0 ml Spurenelement-Gemisch I pro 1 Kulturmedium (Verdünnung 1/1000)

Zunächst wurde FeCl_2 in der benötigten Menge halbkonzentrierter Salzsäure, 5 mol/l, gelöst; dann wurden die übrigen Verbindungen zugesetzt. Nach dem Auffüllen mit destilliertem Wasser wurden Flaschen (50 bzw. 100 ml Inhalt) bis zu 80 % ihres Volumens gefüllt, mit Schraubdeckeln dicht verschlossen und autoklaviert (s. auch 3.4.).

b) Molybdat

Stammlösung: NaOH 10 mmol/l
 Na_2MoO_4 0,1 mmol/l

Anwendung: 1,0 ml Molybdat-Lösung pro 1 Kulturmedium (Verdünnung 1/1000)

Die Molybdat-Lösung wurde wie das Spurenelement-Gemisch I autoklaviert.

c) Bicarbonat

Stammlösung: NaHCO_3 1,0 mol/l
 CO_2 bis zur Sättigung

Anwendung: 30 ml Bicarbonat-Lösung pro 1 Nährmedium; das entspricht einer Endkonzentration von mindestens 30 mmol/l.

Die Lösung von Natriumbicarbonat in destilliertem Wasser wurde in einem Kolben mit Kohlendioxid überschichtet und unter Verschluss kräftig geschüttelt. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis beim Öffnen des Kolbens kein Unterdruck mehr bemerkt wurde. Die mit CO_2 gesättigte Lösung wurde bereits genau in den

Mengen auf Flaschen verteilt, die jeweils für die Herstellung eines bestimmten Volumens an Medium benötigt wurden. Die Flaschen wurden bis zu 80 % ihres Volumens gefüllt, nach 2.1. mit CO_2 begast und nach 2.3. unter Verschluss autoklaviert.

d) Sulfid

Stammlösung: Na_2S 0,50 mol/l

Anwendung: 3,0 ml Sulfid-Lösung pro 1 Kulturmedium; das entspricht einer Endkonzentration von 1,5 mmol/l. Für spezielle Medien wurden höhere Konzentrationen verwendet.

Die Sulfid-Lösung wurde nach 2.3. unter einer Stickstoffatmosphäre autoklaviert. Wurde eine Sulfid-Lösung häufiger benötigt, so wurde der Inhalt der autoklavierten, abgekühlten Flaschen in das in Abb. 2 dargestellte Gefäß gegeben.

e) Salzsäure, Natriumcarbonat

Zum Einstellen des jeweils benötigten pH-Werts dienten Lösungen von HCl, 2,0 mol/l, bzw. Na_2CO_3 , 1,0 mol/l. Kleine Flaschen (50 bzw. 100 ml Inhalt) wurden bis zu 60 % ihres Volumens gefüllt, mit Schraubdeckeln mit Gummidichtung fest verschlossen und autoklaviert (s. auch 3.4.).

3.3. Zusammensetzung verschiedener Grundmedien

3.3.1. Normale synthetische Grundmedien

Tab. 2 gibt die Zusammensetzung fünf verschiedener synthetischer Grundmedien an, die sich in den Konzentrationen der wichtigsten Ionen (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^-) unterscheiden. Die

Tab. 2: Zusammensetzung der normalen synthetischen Grundmedien. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Endvolumen der fertigen Medien. Die ersten sieben Komponenten wurden als Lösung zusammen autoklaviert (als sogenanntes Teilmedium). Die letzten vier Komponenten wurden dem autoklavierten Teilmedium erst nach dem Abkühlen aus sterilen konzentrierten Stammlösungen zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit steriler HCl- oder Na₂CO₃-Lösung eingestellt. Nährmedien für spezielle Zwecke enthielten kein Sulfat bzw. kein Molybdat.

Bestandteil	Süßwasser- medium	Brackwasser- medium I	Brackwasser- medium II	Meerwasser- medium I	Meerwasser- medium II
NaCl	20	120	225	340	340
MgCl ₂	2,0	6,0	10,0	15,0	27,0
KCl	4,0	4,0	4,0	4,0	7,0
CaCl ₂	1,0	1,0	1,0	1,0	9,0
NH ₄ Cl	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
KH ₂ PO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Na ₂ SO ₄	(20,0)	(20,0)	(20,0)	(20,0)	(20,0)
Spurenelement- Gemisch I	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Molybdat-Lösung	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)	(1,0)
NaHCO ₃	≥30	≥30	≥30	≥30	≥30
Na ₂ S	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
pH-Wert	7.2	7.2	7.2	7.2	6.9

ersten sieben Komponenten (NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂, NH₄Cl, KH₂PO₄, Na₂SO₄) wurden nacheinander unter Rühren in destilliertem Wasser gelöst und als sogenanntes Teilmedium (s. 3.1.) autoklaviert. Sollte das Medium für die Prüfung auf alternative Elektronenakzeptoren, für stöchiometrische Versuche mit begrenztem Sulfat-Gehalt oder zur Anzucht von Methanbakterien verwendet werden, so wurde kein Sulfat zugesetzt. Die vier letztgenannten Komponenten (Spurenelemente I, Molybdat, NaHCO₃, Na₂S) wurden dem abgekühlten Teilmedium aus sterilen Stammlösungen (s. 3.2.) zugesetzt, so wie es unter 3.1. beschrieben ist; ebenso wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt. Für Versuche zur Wirkung von Spurenelementen wurde kein Molybdat zugesetzt. Die Medien waren in verschraubbaren Flaschen (50 bzw. 100 ml) etwa vier Monate lang, in Röhrchen (20 ml) etwa zwei Monate lang haltbar. Für eine längere Aufbewahrung wurde der Gehalt an Na₂S bei der Herstellung auf 3 mmol/l erhöht.

3.3.2. Synthetisches Grundmedium für Kulturen mit langkettigen Fettsäuren

Die langkettigen Fettsäuren wurden den Nährmedien vor dem Beimpfen aus geschmolzenen Lösungen ihrer Natriumsalze zugesetzt (s. 3.4.1.). Enthält nun ein Medium höhere Konzentrationen an NaCl, MgCl₂ und CaCl₂, so werden die langkettigen Fettsäuren an der Zugabestelle sofort in Form dicker Flocken der Erdalkalisalze ("Kalkseifen") ausgefällt; derartige Flocken bleiben zum Teil unter der Flüssigkeitsoberfläche hängen. In dieser Form jedoch wären die Fettsäuren den Bakterien schwer zugänglich. Daher wurden alle Grundmedien für Kulturen mit höheren Fettsäuren zunächst ohne Zusatz von NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ hergestellt. Von den fehlenden Mineralsalzen wurden einzelne konzentrierte Lösungen hergestellt:

Stammlösungen:

a) NaCl	5,0 mol/l
b) MgCl ₂	2,0 mol/l
c) CaCl ₂	1,0 mol/l

Diese Stammlösungen wurden separat in Flaschen unter Verschluss autoklaviert und erst nach Zusatz der höheren Fettsäuren vor dem Beimpfen dem betreffenden Kulturmedium in der benötigten Konzentration (s. Tab. 2) zugesetzt. Beim Vorgehen in dieser Reihenfolge bildeten die ausfallenden Erdalkalisalze der langkettigen Fettsäuren sehr viel feinere Flocken, die gut verwertet wurden.

3.3.3. Agarmedium

Für Reinkulturen fädiger, gleitend beweglicher Bakterien wurde häufig ein Medium mit Agar als einer gelartigen, inerten Gerüstsubstanz verwendet. Es wurde soviel Agar zugesetzt, daß das Medium noch gut in Flaschen gefüllt und pipettiert werden konnte. Eine Konzentration von 2 g Agar pro 1 Medium hatte sich als optimal erwiesen. Die für das Volumen des herzustellenden Mediums benötigte Menge Agar wurde gewaschen, indem sie in destilliertem Wasser, etwa 100 ml pro g Agar, suspendiert wurde. Nach dem Absetzen des Agars wurde der Überstand vorsichtig abgossen und durch neues Wasser ersetzt. Dieser Waschvorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach dem Abgießen des letzten Waschwassers wurde soweit mit destilliertem Wasser aufgefüllt, daß eine Suspension von 50 ml Flüssigkeitsvolumen pro g Agar (20 g Agar/l) erhalten wurde. Die Wassermenge zum Lösen der Salze des Teilmediums (s. 3.3.1.) wurde so bemessen, daß das endgültige Volumen erst beim Zusatz der Agarlösung nach dem Autoklavieren erreicht wurde. Die Agarsuspension und das Teilmedium wurden getrennt autoklaviert. Nachdem das in dem Kolben (Abb. 3) enthaltene Teilmedium auf etwa 80 °C abgekühlt war, wurde die ebenfalls bei 80 °C flüssig gehaltene Agarlösung zugegeben. Der Kolbeninhalt wurde unter Rühren weiter abgekühlt und dann ebenso zubereitet, wie es unter 3.1.1. beschrieben ist.

3.3.4. Natürliches Meerwassermedium

Vorräte von Meerwasser aus der Nordsee wurden unter Verschluss im Dunkeln aufbewahrt. Die molaren Konzentrationen der häufigsten Bestandteile des natürlichen Meerwassers sind im Anhang aufgeführt. In den abgebildeten Kolben (Abb. 3) wurden pro 1 Endvolumen herzustellenden Meerwassermediums 900 ml Nordseewasser gefüllt und autoklaviert. Weil Meerwassermedium wenig Ammonium und noch weniger Phosphat enthält, wurde eine Lösung mit 70 mmol NH_4Cl und 21 mmol KH_2PO_4 pro 1 getrennt autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Meerwassers wurden pro 1 Endvolumen 70 ml dieser sterilen Ammonium-Phosphat-Lösung zugesetzt. Dann wurden Spurenelemente, NaHCO_3 und Na_2S zugesetzt (s. 3.2.); der pH-Wert wurde auf 6.9 eingestellt.

3.3.5. Grundmedien für Agar-Schüttelkulturen

Für Agar-Schüttelkulturen mit Agar in der üblichen Endkonzentration von 10 g/l (s. 4.1.1.) wurde der Gehalt an NaCl , MgCl_2 , Spurenelementen, NaHCO_3 und Na_2S in dem jeweils benötigten Grundmedium (Tab. 2) auf das 1,5fache erhöht. Für die Versuche mit Weichagar (s. 3.5.5.; 4.1.1.) wurde der Gehalt an den genannten Bestandteilen auf das 1,3fache erhöht.

3.3.6. Medien zum Suspendieren isolierter Bakterien

Zum Suspendieren abgeimpfter Kolonien aus Agar-Schüttelkulturen sowie zum Reinigen einzelner Zellfilamente großer fädiger Bakterien wurden sehr geringe Volumina, 0,5 bzw. 1 ml, in kleine Glasröhrchen gefüllt. Weil so geringe Mengen verhältnismäßig schnell durch Luftsauerstoff oxidiert werden können, wurde der Gehalt an Na_2S auf 10 mmol/l erhöht: Einer Flasche mit 50 ml Inhalt, die das betreffende Grundmedium enthielt, wurden 0,9 ml sterile Na_2S -Lösung, 0,50 mol/l, und zum Wiedereinstellen des ursprünglichen pH-Werts noch 0,3 ml sterile Salzsäure, 2,0 mol/l, zugesetzt (s. 3.2.).

3.3.7. Grundmedium für Versuche mit Methanbakterien

Zur Anreicherung von Methanbakterien und für Mischkulturen von Methanbakterien mit Sulfatreduzierern wurde Süßwassermedium (Tab. 2) ohne Sulfat verwendet. Für die Reinkulturen der in dieser Arbeit isolierten Methanbakterien wurde der Gehalt an Na₂S des Süßwassermediums auf 2,5 mmol/l erhöht.

3.3.8. Grundmedien für Rollröhrchen

Für die Isolation der in dieser Arbeit benötigten Methanbakterien mit Hilfe von Rollröhrchen wurde ein spezielles, Sulfat-freies Süßwassermedium mit einem auf 10 mmol/l erhöhten Gehalt an Na₂S verwendet. Der Gehalt dieses Mediums an NaCl, MgCl₂, Spurenelementen und NaHCO₃ war doppelt so hoch, der an den übrigen Bestandteilen genauso hoch wie in dem Süßwassermedium (s. Tab. 2). Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt.

3.4. Die im Einzelfall benötigten Zusätze für Grundmedien

Die im einzelnen Falle benötigten Substrate, Wachstumsfaktoren und besonderen Spurenelemente wurden den Grundmedien erst unmittelbar vor dem Beimpfen aus konzentrierten sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Hitzebeständige Stammlösungen wurden autoklaviert; dazu wurden Flaschen mit 50 bzw. 100 ml Inhalt bis zu 80 % ihres Volumens mit der betreffenden Lösung gefüllt und mit Schraubdeckeln dicht verschlossen. Gewichtskontrolle der Flaschen vor und nach dem Autoklavieren hatte bewiesen, daß dabei keine Flüssigkeit bzw. kein Dampf entweichen konnte.

Gegen Hitze empfindliche Stammlösungen wurden mit Stickstoff von 1 atm Druck über Membranfilter aus Celluloseacetat (SARTORIUS, Göttingen), Porendurchmesser 0,20 µm, sterilfil-

triert; die Membranfilter waren vorher zusammen mit dem Filtergerät autoklaviert worden.

Im folgenden ist die Herstellung und Anwendung all der Zusätze beschrieben, die für die verschiedenen Versuche in den Nährmedien benötigt wurden.

3.4.1. Elektronendonatoren

a) Wasserstoff

Wasserstoff wurde im Gemisch mit einem bestimmten Anteil an CO₂ als Gasphase über der betreffenden Kultur eingesetzt, so wie es unter 2.1. und 3.5.3. eingehender beschrieben ist.

b) Alkohole

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Methanol	5,0	5,0	25,0
Äthanol	1,0	10,0	10,0
Propanol-(1)	1,0	5,0	5,0
n-Butanol-(1)	0,5	10,0	5,0

Die wasserfreien Alkohole wurden in etwas destilliertes Wasser eingewogen; nach dem Auffüllen auf das betreffende Volumen und gründlichem Umschwenken wurden die Lösungen bei 120 °C in verschlossenen Flaschen autoklaviert.

c) Alkansäuren, C₁ bis C₉

		Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Formiat	(C ₁)	1,0	5,0 - 12,0	5,0 - 12,0
Acetat	(C ₂)	2,0	5,0 - 10,0	10,0 - 20,0
Propionat	(C ₃)	2,0	4,0 - 8,0	8,0 - 16,0
n-Butyrat	(C ₄)	1,0	5,0 - 10,0	5,0 - 10,0
iso-Butyrat	(C ₄)	1,0	5,0	5,0
n-Valerianat	(C ₅)	1,0	5,0	5,0
2-Methyl- butyrat	(C ₅)	1,0	5,0	5,0
3-Methyl- ¹⁾ butyrat	(C ₅)	1,0	5,0	5,0
n-Capronat	(C ₆)	1,0	3,0	3,0
n-Heptanat ²⁾	(C ₇)	1,0	1,5	1,5
n-Caprylat	(C ₈)	1,0	0,8	0,8
n-Pelargonat	(C ₉)	0,5	1,0	0,5

Die Stammlösungen von Formiat und Acetat wurden jeweils aus den käuflichen, verhältnismäßig reinen Natriumsalzen angesetzt. Zur Herstellung der Lösungen von Propionat und höheren Alkansäuren dienten die freien Säuren; diese wurden in etwas destilliertes Wasser eingewogen und unter Rührung und Kühlung langsam mit etwas weniger als der äquimolaren Menge konzentrierter Natronlauge, 4,0 mol/l, versetzt. Mit verdünnterer Natronlauge, 1,0 mol/l, wurde dann der pH-Wert auf 9,0 eingestellt. In den nunmehr schwach alkalischen Lösungen machte sich bisweilen ein fruchtartiger Geruch bemerkbar, der durch Ester verursacht wurde, die in den käuflichen Säuren als Verunreinigungen vor-

1) 3-Methylbutyrat wird in der Mikrobiologie häufig iso-Valerianat genannt

2) Die Bezeichnung von Heptanat mit dem Trivialnamen "Önanthat" ist wenig gebräuchlich

kommen. In solchen Fällen wurden die Lösungen solange gekocht, bis sich der Geruch verflüchtigt hatte. Eventuell vorhandene Trübungen wurden über ein Membranfilter aus Celluloseacetat entfernt. Nach dem Auffüllen aufs Endvolumen wurden die Lösungen in verschlossenen Flaschen bei 120 °C autoklaviert.

Ameisensäure-Formiat-Gemisch:

Außer einer Lösung von reinem Natriumformiat wurde noch eine weitere hergestellt, die ein Gemisch aus Ameisensäure, 0,50 mol/l, und Natriumformiat, 0,50 mol/l, enthielt. Die Lösung wurde wiederum in verschlossenen Flaschen autoklaviert. Das Ameisensäure-Formiat-Gemisch wurde verwendet, wenn bestimmten Kulturen noch während des Wachstums weiteres Formiat zugesetzt werden sollte.

d) Alkansäuren, C₁₀ bis C₁₈

		Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
n-Caprinat	(C ₁₀)	0,50	1,0	0,50
n-Laurinat	(C ₁₂)	0,20	2,5	0,50
n-Myristinat	(C ₁₄)	0,20	5,0	1,0
n-Palmitat	(C ₁₆)	0,10	15,0	1,5
n-Stearat	(C ₁₈)	0,10	15,0	1,5

Die längerkettigen Alkansäuren, die Fettsäuren im engeren Sinne, sind bei Raumtemperatur fest. Zur Herstellung der Na-Salze wurden diese Fettsäuren daher in Wasser mit der äquimolaren Menge an NaOH in einem siedenden Wasserbad erhitzt; die Säuren schmolzen dabei und lösten sich beim Rühren langsam. Nach dem Auffüllen mit heißem destilliertem Wasser auf das jeweilige Volumen wurden die Lösungen nochmals vermischt, im heißen Zustande auf Flaschen verteilt und unter Verschluss bei 120 °C

autoklaviert. Beim Erkalten erstarrten die Lösungen der langkettigen Fettsäuren zu halbfesten, seifigen Massen. Vor der Verwendung als Substrat wurden daher die Stammlösungen in einem siedenden Wasserbad wieder geschmolzen und im flüssigen Zustande den Medien zugesetzt. Pipetten für die Entnahme wurden vorher in der Bunsen-Flamme erwärmt. Die besondere Zubereitung der Kulturmedien mit langkettigen Fettsäuren als Substraten wurde unter 3.3.2. beschrieben.

e) Lactat, Pyruvat

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Lactat	1,0	10,0	10,0
Pyruvat	1,0	10,0	10,0

Zur Herstellung der Lactat-Lösung wurde Milchsäure, 85 %, in etwas destilliertem Wasser gelöst und mit Natronlauge genau bekannter Konzentration bis zu einem pH-Wert von 8.5 titriert. Aus der verbrauchten Menge an Natronlauge wurde die genau vorhandene Menge an Milchsäure berechnet. Dementsprechend wurde dann die Lactat-Lösung mit destilliertem Wasser auf die Endkonzentration aufgefüllt und sterilfiltriert.

Die Pyruvat-Lösung wurde aus dem Natriumsalz hergestellt und sterilfiltriert. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt und jeweils nach fünf Monaten erneuert.

f) Dicarbonsäuren

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Succinat	1,0	5,0	5,0
Fumarat	1,0	5,0	5,0
DL-Malat	1,0	5,0	5,0
Adipat	1,0	3,0	3,0
Pimelat	1,0	2,0	2,0

Die festen, freien Dicarbonsäuren wurden in wenig destilliertes Wasser eingewogen und unter Rührung langsam mit etwas weniger als der zweifachen äquimolaren Menge konzentrierter Natronlauge, 4,0 mol/l, versetzt. Mit verdünnterer Natronlauge wurde dann ein pH-Wert von etwa 8 eingestellt. Die Lösungen wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt und unter Verschluss autoklaviert

g) Carbonsäuren mit cyclischen Substituenten

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Cyclohexan-carboxylat	1,0	2,0 - 4,0	2,0 - 4,0
Benzoat	1,0	2,0 - 5,0	2,0 - 5,0
Hippurat	1,0	2,0	2,0
Phenylacetat	1,0	1,5 - 3,0	1,5 - 3,0
3-Phenylpropionat	0,5	3,0 - 6,0	1,5 - 3,0
2-Hydroxybenzoat	1,0	1,0 - 2,0	1,0 - 2,0
3-Hydroxybenzoat	1,0	1,0	1,0
4-Hydroxybenzoat	1,0	1,0	1,0
Nicotinat	0,5	3,0	1,5

Die Lösung von 2-Hydroxybenzoat (Salicylat) wurde aus dem Natriumsalz hergestellt, das in hoher Reinheit erhältlich ist. Die Stammlösungen der übrigen Carbonsäuren mit cyclischen Substituenten wurden aus den freien Säuren hergestellt. Diese wurden dazu in etwas destilliertem Wasser suspendiert und unter Rührung langsam mit etwas weniger als der äquimolaren Menge an konzentrierter Natronlauge, 4,0 mol/l, versetzt. Der pH-Wert wurde dann mit verdünnter Natronlauge, 1,0 mol/l, auf 8 bis 9 eingestellt. Die Säuren gingen bei der Neutralisation in Lösung. Mit destilliertem Wasser wurde auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Alle Lösungen der hier genannten Carbonsäuren mit cyclischen Substituenten wurden in verschlossenen Flaschen bei 120 °C autoklaviert. Die Hydroxybenzoate wurden anschließend im Dunkeln aufbewahrt.

h) Harnsäure

Das Natriumsalz der Harnsäure ist zwar etwas leichter löslich als die freie Säure; dennoch ist die Konzentration selbst einer gesättigten Lösung des Natriumsalzes für eine Stammlösung bei weitem zu niedrig. Daher wurde eine konzentrierte Suspension hergestellt: Harnsäure wurde in destilliertem Wasser mit der äquimolaren Menge an NaOH versetzt und im siedenden Wasserbad 10 min lang unter Rühren erhitzt. Dann wurde soviel destilliertes Wasser hinzugegeben, daß eine Suspension von 0,20 mol/l erhalten wurde. Diese wurde nach gutem Durchmischen in Flaschen unter Verschluss bei 120 °C autoklaviert. Vor der Zugabe zum Medium wurde die breiige Suspension geschüttelt. Zur Entnahme diente eine Pipette mit einer nicht zu engen Öffnung. Pro l Kulturmedium wurden 25 ml der Suspension zugesetzt; das entsprach einem Gehalt an Harnsäure im Medium von 5 mmol/l. Auch im Medium lag die Harnsäure größtenteils als unlöslicher Bodensatz vor.

i) Kohlenhydrate

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
D(+)-Glucose	0,50	10,0	5,0
D(-)-Fructose	0,50	10,0	5,0
Maltose	0,25	10,0	2,5
Cellobiose	0,25	10,0	2,5

Die jeweiligen Lösungen der Kohlenhydrate in destilliertem Wasser wurden sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

k) Alkane

Methan
n-Hexan
n-Heptan
n-Octan
n-Tetradecan
n-Hexadecan

Methan mit einem bestimmten Gehalt an CO₂ wurde als Gasphase über dem jeweiligen Kulturmedium eingesetzt, so wie es unter 2.1. und 3.5.3. beschrieben ist.

Die flüssigen Kohlenwasserstoffe wurden durch Schütteln in Anwesenheit von Sedimentpartikeln im Medium emulgiert; die Methode ist unter 3.5.4. beschrieben. Eine Sterilisation der Alkane war für die anaeroben Versuche im Rahmen dieser Arbeit nicht erforderlich.

3.4.2. Elektronenakzeptoren

a) Lösliche anorganische Elektronenakzeptoren

	Stammlösung [mol/l]	Anwendung [ml/l]	Endkonzentration [mmol/l]
Sulfit	1,0	2,0	2,0
Thiosulfat	1,0	5,0 - 12,0	5,0 - 12,0
Nitrat	1,0	4,0 - 15,0	4,0 - 15,0

Die Lösungen von Na_2SO_3 und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wurden über Membranfilter aus Celluloseacetat sterilfiltriert. Die Sulfit-Lösung wurde anschließend in Flaschen unter Stickstoffatmosphäre oder - bei häufigerem Gebrauch - in dem in Abb. 2 dargestellten Gefäß aufbewahrt. Die NaNO_3 -Lösung wurde in verschlossenen Flaschen bei 120°C autoklaviert.

b) Schwefel

Schwefelblüte wurde in einem Mörser fein zerrieben und zusammen mit einem Rührmagneten in einen evakuierbaren Kolben gegeben. Nach Zusatz von destilliertem Wasser wurde unter ständiger magnetischer Rührung abwechselnd evakuiert und begast. Auf diese Weise wurde der zunächst auf der Wasseroberfläche schwimmende Schwefel befeuchtet, sodaß er schließlich absank. Das überstehende Wasser wurde dann abgegossen. Der wäßrige Schwefelbrei wurde in verschlossenen Flaschen bei nur 104°C autoklaviert.

c) Fumarat, Malat

Zur Prüfung von Fumarat und Malat auf Verwertbarkeit als Elektronenakzeptoren dienten die unter 3.4.1. beschriebenen Lösungen, von denen nunmehr dem Medium jeweils die doppelte Menge zugesetzt wurde (Endkonzentration: 10 mmol/l).

d) Sauerstoff

Zur Prüfung des Wachstums unter mikroaeroben Bedingungen diente eine Gasphase mit 10 % Sauerstoff über Kulturen in Weichagar. Die Methode wird unter 3.5.5. beschrieben.

3.4.3. Kohlenstoffquellen

a) Elektronendonatoren als gleichzeitige Kohlenstoffquellen

Bei der Verwendung aller organischen Verbindungen außer Formiat als Elektronendonatoren in Minimalmedien wurden keine weiteren Kohlenstoffquellen zugesetzt. Lediglich solche Medien, denen die unter 3.4.7. aufgeführten Suppline zugesetzt wurden, erhielten dadurch weitere mögliche Kohlenstoffquellen.

b) Acetat

Sofern nicht auf autotrophes Wachstum zu prüfen war, wurde bei der Verwendung von Wasserstoff, C_1 -Verbindungen oder höheren Alkoholen als Elektronendonatoren Acetat in geringer Konzentration als organische Kohlenstoffquelle zugesetzt. Aus einer sterilen Stammlösung mit 0,70 mol Acetat pro l wurde 1,0 ml pro l Kulturmedium zugesetzt, was einer Endkonzentration von 0,70 mmol/l entspricht. Als Elektronendonator für die Sulfatreduktion würde diese Menge Acetat maximal nur 0,70 mmol H_2S pro l Medium liefern.

c) Kohlendioxid

Allen Medien wurde bei der Herstellung eine mit Kohlendioxid gesättigte Lösung von NaHCO_3 zugesetzt (s. 3.2.). Daher standen den Bakterien mindestens 30 mmol CO_2 pro l als anorganische Kohlenstoffquelle zur Verfügung.

3.4.4. Vitamine und Vitamin-ähnliche Stoffe

Die Wahl der Vitamin-Konzentrationen für die Medien erfolgte in Anlehnung an PFENNIG (1965), KOSER (1968) sowie BOK und CASIDA (1977). Bei der Herstellung der Stammlösungen wurde die Empfindlichkeit einiger Vitamine gegenüber bestimmten pH-Bereichen und höheren Temperaturen berücksichtigt (MERCK Index, 1960; KOSER, 1968); im Zweifelsfalle wurden die Lösungen stets in reinem destilliertem Wasser angesetzt und über Membranfilter sterilfiltriert.

Einzellösungen verwendeter Vitamine

Kurz- bezeichnung:	Stammlsg.: [mmol/l]	Herstellung:	Sterili- sation:
4-Amino- benzoat	0,29	4 mg 4-Aminobenzoesäure 100 ml dest. Wasser	Autokl.
Biotin	0,041	1 mg D(+)-Biotin 100 ml dest. Wasser, heiß	Autokl.
B ₁₂	0,037	5 mg Cyanocobalamin 100 ml dest. Wasser	Autokl.
Cholin	14,3	200 mg Cholinchlorid 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Folat	0,068	3 mg Folsäure 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Hämin	1,53	100 mg Hämin 100 ml Natronlauge, 50 mmol/l	Filtr.
Inosit	8,3	150 mg myo-Inosit 100 ml dest. Wasser	Filtr.

Kurz- bezeichnung:	Stammlsg.: [mmol/l]	Herstellung:	Sterili- sation:
Liponat	0,048	1 mg DL- α -Liponsäure 100 ml Na-phosphat-Puffer, 50 mmol/l, pH = 7.0	Autokl.
Menadion	0,36	10 mg Menadion-Na-bisulfit 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Nicotinat	0,81	10 mg Nicotinsäure 100 ml dest. Wasser	Autokl.
Pantothenat	0,21	5 mg Ca-D(+)-pantothenat 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Pyridoxal	0,15	3 mg Pyridoxal- hydrochlorid 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Pyridoxamin	0,58	15 mg Pyridoxamin- dihydrochlorid 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Pyridoxol	0,24	5 mg Pyridoxol- hydrochlorid 100 ml dest. Wasser	Filtr.
Riboflavin	0,13	5 mg Riboflavin 100 ml Essigsäure-Lsg., 20 mmol/l	Autokl.
Thiamin	0,30	10 mg Thiaminiumdichlorid 100 ml Na-phosphat-Puffer, 200 mmol/l, pH = 3.4	Autokl.
Anwendung:		1,0 ml einer Vitamin-Lösung pro 1 Medium; für die jeweilige Endkonzentration gilt dann der für die Stammlösung angegebene Wert in μ mol/l.	

Alle Vitamin-Lösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösungen von B₁₂, Folat, Hämin, Pyridoxal, Pyridoxamin, Pyridoxol und Riboflavin wurden zusätzlich durch Umwickeln mit schwarzem Papier vor Licht geschützt.

Vitamin-Gemische

Außer den Einzellösungen wurde noch ein Gemisch der sechs wichtigsten Vitamine (PFENNIG, 1965) hergestellt, in welchem diese in der 5fachen Verdünnung der Einzellösungen vorlagen:

Stammlösung:	4-Aminobenzoesäure	8 mg/l
	D(+)-Biotin	2 mg/l
	Nicotinsäure	20 mg/l
	Ca-D(+)-pantothenat	10 mg/l
	Pyridoxamindihydrochlorid	30 mg/l
	Thiaminiumdichlorid	20 mg/l

Anwendung: 5,0 ml Vitamin-Gemisch pro 1 Kulturmedium; die Konzentrationen der mit dem Gemisch zugesetzten Vitamine im Medium waren somit die gleichen wie bei Verwendung der Einzellösungen.

Zur Herstellung des Vitamin-Gemisches wurde zunächst das Biotin in etwas heißem destilliertem Wasser gelöst. Der abgekühlten Lösung wurden die übrigen Vitamine zugesetzt. Nach dem Auffüllen mit destilliertem Wasser wurde das Vitamin-Gemisch über ein Membranfilter in Flaschen sterilfiltriert. Die Flaschen wurden mit schwarzem Papier umwickelt und bei 4 °C aufbewahrt. Nach sechs Monaten wurde das Gemisch erneuert.

Für Versuche zur Ermittlung des Vitaminbedürfnisses isolierter Bakterien wurden Vitamin-Gemische hergestellt, in denen jeweils eines der sechs genannten Vitamine fehlte.

3.4.5. Dithionit

In vielen Fällen war zur Initiation des Wachstums der Sulfat-reduzierenden Bakterien ein noch negativeres Redoxpotential erforderlich als das durch Zusatz von Natriumsulfid gegebene. In diesen Fällen wurde zusätzlich Dithionit als ein starkes Reduktionsmittel verwendet.

Stammlösung: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0,30 mol/l

Anwendung: 0,5 ml Stammlösung pro 1 Kulturmedium; das entspricht einer Endkonzentration von 0,15 mmol/l. Für bestimmte Kulturen wurden etwas höhere oder auch geringere Konzentrationen eingesetzt.

Die Lösung wurde unter Stickstoffatmosphäre (s. 2.1.) in vorher ausgekochtem und abgekühltem Wasser zubereitet. In wässriger Lösung wird Dithionit durch Sauerstoff augenblicklich zu Bisulfid oxidiert. Die Lösung wurde mit einer Spritze aufgenommen, deren Hubraum mit Stickstoff begast worden war; mit der Spritze wurde dann die Dithionit-Lösung über einen autoklavierten Vorsatz mit einem Membranfilter aus Celluloseacetat in das in Abb. 2 dargestellte Gefäß gegeben. Aus diesem Gefäß wurde die Dithionit-Lösung bei Bedarf mit einer Pipette entnommen und den Medien immer erst nach dem Beimpfen vor dem Verschließen der Kulturgefäße zugesetzt; die Pipettenspitze wurde dabei in das Nährmedium eingetaucht. In der Pipette war die Dithionit-Lösung vor dem Zutritt von Luft weitgehend geschützt.

Dithionit wurde auch ferner in Form des festen kristallinen Salzes zugesetzt. Vorversuche hatten gezeigt, daß das feste käufliche Natriumdithionit steril ist: Wurde nämlich sterilen komplexen Nährmedien, die Glucose, Pepton und Hefeextrakt enthielten, pulverförmiges Dithionit zugesetzt, so kam es nie zu einer Entwicklung von Bakterien. Natriumdithionit wurde in trocken sterilisierten Röhrchen mit dicht schließenden Schraub-

verschlüssen aufbewahrt. Bei Bedarf wurde mit einem kleinen, vorher ausgeglühten Platinspatel etwas Dithionit entnommen und direkt in die beimpfte Kultur gegeben. Um die benötigte Menge von etwa 20 bis 30 mg pro l Medium bemessen zu können, waren zuvor mit Hilfe einer Analysenwaage Erfahrungswerte darüber gesammelt worden, wieviel Dithionit mit der Spatelfläche erfaßt werden konnte.

3.4.6. Zusätzliche Spurenelemente

Außer den unter 3.2. aufgeführten immer verwendeten Spurenelementen (B, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn und normalerweise auch Mo) wurden für spezielle Versuche noch weitere eingesetzt.

Einzellösungen weiterer Spurenelemente

Für Experimente zur Förderung und auch zur Hemmung des Wachstums durch Spurenelemente wurden Stammlösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Lösungen von Spurenelementen, in denen eine Ausfällung von unlöslichen Verbindungen in der Hitze zu erwarten war, wurden über Membranfilter aus Celluloseacetat sterilfiltriert.

Symbol:	Stammlsg.: [mol/l]	Herstellung:	Sterilisation:
F	$5 \cdot 10^{-4}$	2 mg NaF 100 ml dest. Wasser	Autokl.
Ti	$2 \cdot 10^{-4}$	20 µl $TiCl_3$ -Lsg., 15 % 100 ml Citronensäure-Lsg., 50 mmol/l	Filtr.
V	1) $1 \cdot 10^{-3}$	8 mg V_2O_5 100 ml Natronlauge, 100 mmol/l	Autokl.

Symbol:	Stammlsg.: [mol/l]	Herstellung:	Sterilisation:
V	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	1) $1 \cdot 10^{-3}$	27 mg $CrCl_3 \cdot 6 H_2O$ 100 ml Citronensäure-Lsg., 20 mmol/l	Filtr.
Cr (III)	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Citronensäure-Lsg., 20 mmol/l	Filtr.
	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Citronensäure-Lsg., 20 mmol/l	Filtr.
	1) $1 \cdot 10^{-3}$	15 mg $K_2Cr_2O_7$ 100 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
Cr (VI)	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	1) $1 \cdot 10^{-3}$	26 mg $Na_2SeO_3 \cdot 5 H_2O$ 100 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
Se	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.

Symbol:	Stammlsg.: [mol/l]	Herstellung:	Sterili- sation	Symbol:	Stammlsg.: [mol/l]	Herstellung:	Sterili- sation
Se	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.	J	$2 \cdot 10^{-4}$	3 mg KJ 100 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
Mo	1) $1 \cdot 10^{-2}$	24 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.	W	1) $1 \cdot 10^{-2}$	33 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	2) $1 \cdot 10^{-4}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.		2) $1 \cdot 10^{-4}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	3) $1 \cdot 10^{-6}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.		3) $1 \cdot 10^{-6}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	4) $1 \cdot 10^{-8}$	1 ml von 3) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.		4) $1 \cdot 10^{-8}$	1 ml von 3) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
Sn	1) $1 \cdot 10^{-3}$	30 mg $\text{Na}_2\text{SnO}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 100 ml Natronlauge, 100 mmol/l	Filtr.	Re	1) $1 \cdot 10^{-3}$	24 mg Re_2O_7 100 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 100 mmol/l	Filtr.		2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
Te	1) $1 \cdot 10^{-3}$	25 mg K_2TeO_3 100 ml Natronlauge, 100 mmol/l	Autokl.	U	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.
	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.		1) $1 \cdot 10^{-3}$	42 mg $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 100 ml Na-carbonat-Lsg. 100 mmol/l	Autokl.
	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Natronlauge, 10 mmol/l	Autokl.				

Symbol:	Stammlsg.: [mol/l]	Herstellung:	Sterili- sation:
U	2) $1 \cdot 10^{-5}$	1 ml von 1) 99 ml Na-carbonat-Lsg., 10 mmol/l	Autokl.
	3) $1 \cdot 10^{-7}$	1 ml von 2) 99 ml Na-carbonat-Lsg., 10 mmol/l	Autokl.

Anwendung: Von den Stammlösungen der Elemente F, Ti, Sn Nr. 2) und J wurde 1 ml pro 1 Kulturmedium zugesetzt (Verdünnung 1/1000); von den Stammlösungen der übrigen Elemente wurden, je nach Ansatz, 1 bzw. 10 ml pro 1 Kulturmedium zugesetzt (Verdünnung 1/1000 bzw. 1/100).

Spurenelement-Gemisch II

Stammlösung:	NaOH	100	mmol/l
	NaF	0,50	mmol/l
	$\text{NaOH} \cdot \frac{1}{2} \text{V}_2\text{O}_5$	0,01	mmol/l
	Na_2SeO_3	0,01	mmol/l
	Na_2SnO_3	0,01	mmol/l
	KJ	0,20	mmol/l
	Na_2WO_4	0,01	mmol/l

Anwendung: 1 ml Spurenelement-Gemisch II pro 1 Kulturmedium (Verdünnung 1/1000)

Die hier nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhandenen Elemente V, Se, Sn und W wurden den konzentrierteren Einzelösungen entnommen. Das Spurenelement-Gemisch II wurde sterilfiltriert.

3.4.7. Suppline

Für Versuche, das Bakterienwachstum durch Suppline zu stimulieren, wurden sowohl definierte organische Verbindungen als auch komplexe Extrakte aus natürlichem biologischen Material verwendet.

Die Suppline durften jedoch nur in solchen Konzentrationen zugesetzt werden, daß bei einer möglichen Verwertung als Elektronendonatoren die reduzierte Menge Sulfat gering blieb gegenüber der, die mit dem eigentlichen Elektronendonator reduziert werden sollte. Im Falle definierter organischer Verbindungen wurde berechnet, wieviel H_2S bei vollständiger Oxidation maximal gebildet werden kann. Wieviel Sulfat durch die natürlichen Extrakte reduziert werden konnte, wurde experimentell bestimmt. Eine bekannte Menge des jeweiligen komplexen Extraktes wurde als Substrat in begrenzter Menge natürlichem Meerwassermedium zugesetzt. Dieses Kulturmedium und auch ein Kontrollansatz ohne Extrakt wurden mit gleichen Mengen mariner Schlammproben beimpft; anaerobe Schlämme aus Meeressedimenten haben nämlich bezüglich der Sulfatreduktion eine besonders hohe Aktivität. Nach drei Wochen Inkubation bei 29°C wurden die Differenzen zwischen den gebildeten H_2S -Konzentrationen der Ansätze mit Extrakt und dem Kontrollansatz nach 12.1. bestimmt. Diese Werte wurden dann auf die vorher jeweils eingesetzten Volumina der Extrakte bezogen.

a) Succinat

Aus einer sterilen Stammlösung von Succinat, 0,40 mol/l, wurde dem Medium 1,0 ml zugesetzt (Verdünnung 1/1000). Als Elektrodendonator für die Sulfatreduktion vermochte diese Menge Succinat maximal 0,70 mmol H₂S pro 1 Kulturmedium zu liefern.

b) Carbonsäure-Gemisch I

Ein von BRYANT (1973) angegebenes Gemisch von Fettsäuren, die von bestimmten Pansenbakterien als Wachstoffsstoffe benötigt werden, wurde modifiziert und um einige Bestandteile erweitert. Die in den Kulturmedien dieser Arbeit für die Sulfatreduzierer verwendete Menge des Gemisches wurde so gewählt, daß bei einer vollständigen Oxidation der mit dem Gemisch eingebrachten Fettsäuren nicht mehr als 1 mmol H₂S pro 1 Kulturmedium gebildet werden konnte.

Stammlösung:	iso-Butyrat	50 mmol/l
	n-Valerianat	50 mmol/l
	2-Methylbutyrat	50 mmol/l
	3-Methylbutyrat	50 mmol/l
	n-Capronat	20 mmol/l
	n-Heptanat	20 mmol/l
	n-Caprylat	20 mmol/l

Anwendung: 1,0 ml Stammlösung pro 1 Kulturmedium (Verdünnung 1/1000); in der angewandten Konzentration werden bei einer theoretischen vollständigen Oxidation von Carbonsäure-Gemisch I 0,90 mmol H₂S pro 1 Medium gebildet.

Das Carbonsäure-Gemisch I wurde aus den unter 3.4.1. beschriebenen neutralisierten Lösungen der betreffenden Alkansäuren hergestellt und ebenso wie diese autoklaviert.

c) Carbonsäure-Gemisch II

Ein weiteres Gemisch organischer Säuren enthielt drei Carbonsäuren mit cyclischen Substituenten; die Konzentrationen dieser Verbindungen wurden denen in Carbonsäure-Gemisch I angeglichen.

Stammlösung:	Phenylacetat	50 mmol/l
	4-Hydroxyphenylacetat	50 mmol/l
	3-Indolylacetat	50 mmol/l

Anwendung: 1,0 ml Stammlösung pro 1 Kulturmedium (Verdünnung 1/1000)

Zur Herstellung von Carbonsäure-Gemisch II wurden die freien Säuren verwendet; diese wurden in etwas destilliertem Wasser suspendiert und langsam unter Rühren mit soviel verdünnter Natronlauge, 1,0 mol/l, versetzt, bis ein pH-Wert von 8 bis 9 erreicht war. Nach dem Auffüllen mit destilliertem Wasser wurde das Gemisch sterilfiltriert und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

d) Hefeextrakt

Bei Zusatz von Hefeextrakt zu Medien von Sulfatreduzierern wurde die Konzentration etwas niedriger gewählt als in älteren Vorschriften zur Anzucht von Sulfatreduzierern (BUTLIN et al., 1949 a; POSTGATE, 1965 a; PANKHURST, 1971) angegeben wird.

Stammlösung: Hefeextrakt 50 g/l

Anwendung: 10 ml Stammlösung pro 1 Kulturmedium;
das entspricht einer Endkonzentration
von 0,5 g/l.

Die Hefeextrakt-Lösung wurde in dicht verschlossenen Flaschen
autoklaviert.

e) Faulwasser

Faulschlamm (s. 1., Probe Nr. 1) wurde 30 min lang bei
 $4 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert (RC2-B, SORVALL). Der Überstand
wurde unter Stickstoffatmosphäre nach 2.3. autoklaviert.

Anwendung: Von dem somit erhaltenen Faulwasser wurden
25 ml pro 1 Kulturmedium zugesetzt. Durch
Zusatz von Faulwasser zu Sulfat-reduzierenden
Mischpopulationen war gezeigt worden,
daß die hier verwendete Menge für eine meß-
bare Bildung von H_2S keine Elektronendonatoren
mehr enthielt.

f) Gäreextrakt

Aus Süßwassermedium mit wenig Sulfat wurde die folgende, an
komplexen organischen Substraten reiche Nährlösung hergestellt:

Süßwassermedium mit 1,0 mmol Sulfat/l	1,0 l
Hefeextrakt	7,5 g
Glucose	5,0 g
Pepton	2,5 g

Diese Nährlösung wurde mit einigen Tropfen Gülle, Panseninhalt
und Faulschlamm (s. 1.) beimpft und in einer Flasche, die mit
einem Gärröhrchen verschlossen wurde, bei 35°C inkubiert. Be-
reits kurze Zeit nach dem Beimpfen kam es zu einer kräftigen
Entwicklung von Bakterien; diese lysierten nach einigen Tagen
und lieferten auf diese Weise weitere komplexe Verbindungen.
Von Zeit zu Zeit wurde der pH-Wert wieder auf 7.2 eingestellt.
Nach drei Wochen wurde das vergorene Nährmedium 30 min lang
bei $4 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde nach 2.3.
unter Stickstoff autoklaviert. Sulfat-reduzierende Mischpopu-
lationen bildeten mit 1 ml dieses Gäreextraktes 0,15 mmol H_2S .

Anwendung: 15 ml Gäreextrakt pro 1 Kulturmedium; als
Elektronendonator für die Sulfatreduktion
vermag diese Menge somit bis zu 2,3 mmol
 H_2S pro 1 Kulturmedium zu liefern.

g) Gülleextrakt

Schweinegülle (s. 1., Probe Nr. 2) mit einem Feststoffgehalt
von etwa 100 g/l wurde in einer Flasche, die mit einem Gär-
röhrchen verschlossen wurde, bei 35°C anaerob inkubiert. Der
pH-Wert wurde auf 7.2 gehalten. Nach 20 Tagen wurde die Gülle
über ein Sieb von groben Bestandteilen befreit und 30 min lang
bei $4 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde unter
Stickstoffatmosphäre autoklaviert. In Sulfat-reduzierenden
Mischpopulationen wurden mit 1 ml dieses Gülleextraktes
0,4 mmol H_2S gebildet.

Anwendung: 7 ml Gülleextrakt pro 1 Kulturmedium; als
Elektronendonator für die Sulfatreduktion
kann diese Menge somit bis zu 2,8 mmol H_2S
pro 1 Kulturmedium liefern.

h) Extrakt-Gemisch

Aus drei verschiedenen Extrakten wurde ein Gemisch hergestellt:

Faulwasser	(e)	55 ml
Gärextrakt	(f)	30 ml
Gülleextrakt	(g)	15 ml

Anwendung: Von dem hier erhaltenen Extrakt-Gemisch wurden 20 ml pro 1 Kulturmedium zugesetzt. Als Elektronendonator für die Sulfatreduktion vermag diese Menge bis zu 2,1 mmol H₂S pro 1 Kulturmedium zu liefern.

i) Pansenflüssigkeit

Panseninhalt (s. 1., Probe Nr. 7) wurde unter Stickstoffatmosphäre autoklaviert und anschließend bei $4 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals unter einer Stickstoffatmosphäre autoklaviert. Bei der Verwendung als Substrat für die natürlichen Sulfat-reduzierenden Mischpopulationen wurden mit 1 ml Pansenflüssigkeit 0,18 mmol H₂S gebildet.

Anwendung: 15 ml pro 1 Kulturmedium; als Elektronendonator für die Sulfatreduktion vermag diese Menge bis zu 2,7 mmol H₂S pro 1 Kulturmedium zu liefern.

3.4.8. Synthetisches Sediment

Den Kulturen fädiger, gleitend beweglicher Bakterien wurde anstelle von Agar (s. 3.3.3.) auch häufig eine unlösliche Phase anorganischer Natur zugesetzt. Als geeignet erwies sich das voluminöse und amorphe basische Aluminiumphosphat, das beim Zusatz von Aluminiumsalzen zu den gepufferten Nährmedien als

ein wasserunlösliches Sediment ausfällt. Da Aluminiumsalze stark sauer reagieren, sank der pH-Wert und mußte daher wieder auf den ursprünglichen Wert eingestellt werden.

Stammlösungen: a) AlCl₃ · 6 H₂O 48,3 g/l (= 0,20 mol/l)
b) Na₂CO₃ 106 g/l (= 1,00 mol/l)

Anwendung: 5,0 ml AlCl₃-Lösung und 0,80 ml Na₂CO₃-Lösung pro 1 Kulturmedium

Beide Stammlösungen konnten in verschlossenen Flaschen autoklaviert werden.

3.5. Fertigstellung von Nährmedien für die verschiedenen Kulturverfahren

Zur Herstellung der fertigen Nährmedien wurden den Grundmedien vor dem Beimpfen die für den Einzelfall noch erforderlichen Komponenten aus den Stammlösungen zugesetzt. Das Impfvolumen, welches dann in die Nährlösung gegeben wurde, betrug, je nach Bakteriedichte, 2 bis 5 % vom Volumen der anzuziehenden Kultur. Nach dem Beimpfen wurde gegebenenfalls nur noch Dithionit (s. 3.4.5.) zugesetzt, bevor dann die Kulturgefäße verschlossen wurden.

3.5.1. Kleine Kulturvolumina ohne Verbrauch oder Bildung von Gasen

Kulturen bis zu 100 ml, die weder Gas produzierten noch aus der Gasphase zu ernähren waren, konnten auf eine einfache Weise ohne Anwendung einer Begasungstechnik anaerob angezogen werden. Den Grundmedien in den verschraubbaren Röhrchen und Flaschen (s. 2.5. und 3.1.1.) wurde mit sterilen Pipetten soviel entnommen, daß die Gefäße nach Zusatz der jeweiligen Stammlösungen und des Impfvolumens wieder vollständig gefüllt

waren. Wegen der Wärmeausdehnung der Flüssigkeit wurden zu bebrütende Gefäße zunächst weniger fest verschraubt. Die Gummidichtung wirkte dann wie ein Ventil, durch das sich die Flüssigkeit hindurchzuzwängen vermochte; diese Flüssigkeitsmenge war jedoch so gering, daß sie unter dem Schraubdeckel alsbald verdunstete. Nach dem Erreichen der Inkubationstemperatur wurden dann die Schraubdeckel kräftiger zuge dreht. Die Schraubdeckel waren aus Metall (Al) und konnten deshalb immer vor dem Öffnen der Flaschen wirksam abgeflammt werden.

3.5.2. Größere Kulturvolumina ohne Verbrauch oder Bildung von Gasen

Größere Kulturen als 100 ml, die kein Gas bildeten und auch nicht aus der Gasphase ernährt werden sollten, benötigten wegen der Wärmeausdehnung zu Beginn der Inkubation dennoch einen gewissen Gasraum über dem Medium. Dieser Gasraum hatte jedoch nicht mehr als 5 % des Kulturvolumens. Die Menge der Grundmedien in den großen Kulturgefäßen war bereits bei der Herstellung so bemessen worden (s. 3.1.2.), daß nach Zusatz aller Stammlösungen und des Impfvolumens der noch notwendige Gasraum erhalten blieb. Wenn die Kulturgefäße bereits vor dem endgültigen Verschließen in einem Wasserbad auf die Inkubationstemperatur gebracht wurden, konnte der Gasraum sehr klein gehalten werden. Die Kulturgefäße wurden dann nach 2.1. steril begast und anaerob verschlossen. Für größere Kulturvolumina waren gängige (blaue) Gummistopfen ausreichend.

3.5.3. Kulturen mit Verbrauch oder Bildung von Gasen

Kulturen, die mit Wasserstoff oder Methan inkubiert werden sollten oder die Methan produzierten, benötigten eine verhältnismäßig große Gasphase über dem Medium. Das Grundmedium für diese Zwecke wurde in verschraubbaren Röhrchen (20 ml) sowie Flaschen bis zu 500 ml Inhalt nach 3.1.1. bzw. 3.1.2. aufbewahrt. Für größere Kulturvolumina, die aus der Gasphase er-

nährt werden sollten, wurden flache Flaschen (Meplats-Flaschen) mit jeweils einem Rührmagneten verwendet. Zunächst wurde den Grundmedien in den Röhrchen oder Flaschen soviel vom Inhalt entnommen, daß die für das jeweilige Nährmedium noch erforderlichen Stammlösungen zugesetzt werden konnten. Die Gefäße wurden dann wieder verschlossen und umgeschwenkt. Nunmehr wurde mit sterilen, möglichst großen Pipetten soviel Medium entnommen, daß der gewünschte Gasraum entstand. Die entnommenen Volumina wurden ebenfalls verwendet und in leer autoklavierte Röhrchen bzw. Flaschen gegeben; dabei wurde die Pipettenspitze stets in das bereits ausgelaufene Medium gehalten. Das Verhältnis vom Flüssigkeitsvolumen zum Gasraum sollte nach dem Beimpfen 1:2 bis 1:1 betragen. Die Kulturgefäße wurden möglichst schnell beimpft, mit dem betreffenden Gasgemisch begast und mit Stopfen aus Butyl-Gummi oder Viton verschlossen (s. 2.1.). Weil bei diesen Ansätzen der Gasraum verhältnismäßig groß war, mußte der CO₂-Gehalt des eingeleiteten Gasgemischs genau berücksichtigt werden. All diejenigen Gefäße, in denen ein gasförmiges Substrat verwertet werden sollte, wurden während der Inkubation flach gelegt, sodaß eine große Flüssigkeitsoberfläche vorhanden war: der Inhalt dieser flach liegenden Gefäße wurde bei kleineren Volumina gelegentlich geschüttelt, bei größeren Volumina auch in einigen Fällen kontinuierlich gerührt.

Bei Kulturen, in denen Methan aus gelösten Substraten gebildet wurde, mußte ein zu starker Druckanstieg vermieden werden. Die betreffenden Gefäße wurden von Zeit zu Zeit durch vorsichtiges Lockern der Stopfen entgast oder von vornherein mit Stopfen mit Gärröhrchen versehen (s. 2.2.).

3.5.4. Kulturen mit flüssigen Alkanen

Flüssige Alkane sind mit Wasser und somit auch mit Kulturmedium so gut wie nicht mischbar. Enthielten die Kulturmedien jedoch ein natürliches Schlamm sediment, so vermochte dieses bei längerem Schütteln mit den Kohlenwasserstoffen eine Emulsion zu bilden. Für Anreicherungsversuche mit Alkanen wurde daher

genügend Schlamm zugesetzt. Für die Inkubation von Reinkulturen mit Alkanen wurde anaerob autoklaviertes (s. 2.3.) Schlammssediment vom betreffenden Standort verwendet. Alle Ansätze wurden in flachen Flaschen (Meplats-Flaschen, 100 ml Inhalt) zubereitet; Sediment, Medium und Kohlenwasserstoffe durften zusammen nicht mehr als 90 % vom Flaschenvolumen einnehmen, sodaß die Ansätze noch wirksam geschüttelt werden konnten. Die Flaschen wurden nach der Hungate-Technik begast und in waagerechter Lage einen Tag lang auf einem Rotationsschüttler bei 150 bis 200 Umdrehungen pro min inkubiert. Danach wurden die Flaschen, wiederum waagrecht, ruhig gelagert und nur noch einmal täglich kurz und kräftig geschüttelt. Vor der Bestimmung des eventuell gebildeten Schwefelwasserstoffs wurden die Flaschen senkrecht gestellt. Dabei stieg eine an emulgierten Alkanen reiche, leichtere Phase nach oben, während die schwereren Schlammstoffe nach unten sanken. Im mittleren Bereich des Kulturvolumens entstand somit eine Zone, die verhältnismäßig wenige Partikel enthielt; in diese Zone wurde die Pipette zur Entnahme der Probe geführt. Vor der Zugabe der Probe zum Meßansatz wurde die ausen an der Pipette anhaftende Schlammsschicht mit Zellstoff entfernt.

3.5.5. Prüfung auf ein Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen

Reagenzgläser mit jeweils 3 ml gewaschenem, sterilem Agar, 30 g/l, die mit Wattestopfen verschlossen waren, wurden in ein siedendes Wasserbad gestellt; die Zubereitung des Agars ist unter 4.1.1. beschrieben. Der geschmolzene Agar wurde dann bei etwa 55 °C flüssig gehalten. Ein Sulfat-freies Medium für Weichagar (s. 3.3.5.) mit dem betreffenden organischen Substrat und möglichen weiteren Zusätzen wurde in einem anderen Wasserbad auf etwa 42 °C erwärmt. Mit einer Pipette wurden jeweils 9 ml von diesem Medium in die Reagenzgläser mit Agar gegeben, die dann bei 42 °C gehalten wurden. Zum Beimpfen wurde eine Kultur verwendet, deren Wachstum infolge einer begrenzten Menge an Sulfat gerade zum Stillstand gekommen war. Von einer solchen Kultur wurden, entsprechend der Zelldichte, jeweils

0,1 bis 1,0 ml mit Hilfe einer Pipette mit dem noch flüssigen Inhalt der Reagenzgläser vermischt. Die Reagenzgläser wurden wieder mit Watte verschlossen, in kaltem Wasser abgekühlt und nach dem Erstarren des Agars in einen großen evakuierbaren Glastopf gestellt; dieser wurde dann bis zu 50 % (0,5 atm) evakuiert, mit einer bestimmten Menge CO₂ (s. Tab. 1) und N₂ wiederaufgefüllt und inkubiert. Die Gasphase enthielt somit 10 % O₂. Kontrollansätze wurden ohne Sauerstoff inkubiert; dazu wurde der betreffende Glastopf fünfmal hintereinander möglichst weitgehend evakuiert und wieder mit einem Gemisch aus N₂ und CO₂ begast.

4. Verfahren zur Isolierung anaerober Bakterien

4.1. Agar-Schüttelkulturen

Für die Isolation Sulfat-reduzierender Bakterien stellen Agar-Schüttelkulturen ein sehr geeignetes Verfahren dar. Ein durch Agar als kompakte Säule verfestigtes Nährmedium, das alle für ein Wachstum erforderlichen Bestandteile enthält und gegen Luftzutritt abgeschlossen ist, gewährleistet optimale Bedingungen für die Entwicklung dieser streng anaeroben Bakterien.

4.1.1. Herstellung der Verdünnungsreihen

- Zusätze:
- a) Agar, gewaschen, 30 - 33 g/l
 - b) Medium, speziell für Agar-Schüttelkulturen (s. 3.3.5.), mit Substraten, Vitaminen und eventuell mit Supplinen und zusätzlichen Spurenelementen; die Konzentrationen der Zusätze waren etwas höher als in Flüssigkeitskulturen
 - c) Dithionit-Lösung (s. 3.4.5.), 0,30 mol/l
 - d) Thiosulfat-Lösung (s. 3.4.2.), 1,0 mol/l

- e) Gemisch aus 1 Teil Paraffin und 3 Teilen Paraffinöl (Gewichtsverhältnis)
- f) Pyrogallol, pulverisiert
- g) Na_2CO_3 -Lösung, 210 g/l (2 mol/l)

Der Agar wurde nach dem bereits unter 3.3.3. beschriebenen Verfahren gewaschen. Die Agar-Suspension wurde auf einen Gehalt von 30 bis 33 g/l eingestellt und in einem siedenden Wasserbad unter Rühren solange erhitzt, bis eine völlig durchsichtige, homogene Lösung vorlag. Diese wurde dann in Portionen von 3,0 ml auf Reagenzgläser, Innendurchmesser 14 bis 15 mm, Länge 150 bis 160 mm, verteilt. Die mit Agar beschickten Reagenzgläser wurden mit Wattestopfen verschlossen, 10 min lang bei 120 °C autoklaviert und zur Vermeidung der Austrocknung in dicht verschlossenen Behältern kühl aufbewahrt. Das Gemisch aus Paraffin und Paraffinöl wurde ebenfalls autoklaviert. Die Dithionit-Lösung wurde in dem in Abb. 2 dargestellten Gefäß unter Stickstoffatmosphäre frisch zubereitet.

Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe wurden 6 bis 7 der mit Agar beschickten Reagenzgläser benötigt; diese wurden dann solange in ein siedendes Wasserbad gestellt, bis der erstarrte Agar wieder zu einer klaren Flüssigkeit geschmolzen war. Dann wurden die Reagenzgläser in einem zweiten Wasserbad bei 55 °C bereitgehalten. Auch das sterile Gemisch aus Paraffin und Paraffinöl wurde flüssig gehalten. Das Nährmedium wurde in Flaschen mit 50 ml Inhalt zubereitet. Sofern keine langkettigen Fettsäuren als Substrate eingesetzt werden sollten (s. folgenden Abschnitt), wurden dem speziellen Grundmedium alle für ein komplettes Nährmedium erforderlichen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt; auch die Konzentrationen dieser Zusätze wurden auf das 1,5fache erhöht, sodaß nach dem Vermischen mit dem Agar wieder ein Gehalt wie in den betreffenden Anreicherungskulturen vorlag. Die Flaschen wurden bis auf eine kleine Luftblase gefüllt. Nach dem Umschwenken wurde das Nährmedium in einem weiteren Wasserbad auf 42 °C erwärmt; die Schraubdeckel wurden dabei nicht ganz fest verschlossen. Mit einer

sterilen Pipette wurden dann von dem erwärmten Medium jeweils 6,0 ml den Reagenzgläsern mit dem verflüssigten Agar zugegeben; dabei wurde die Austrittsöffnung der Pipette in die Flüssigkeit gehalten. Das Medium wurde auf diese Weise mit dem Agar vermischt und auf die Konzentration der Anreicherungskultur verdünnt. Die Reagenzgläser wurden sofort nach dem Zusatz des Mediums in das auf 42 °C gehaltene Wasserbad gestellt. Dem ersten Reagenzglas wurden dann etwa 0,1 bis 0,5 ml der betreffenden Anreicherungskultur zugesetzt. Das mit dem Wattestopfen wieder verschlossene Röhrchen wurde einmal vorsichtig umgedreht, wodurch der Inhalt vermischt wurde. Aus diesem ersten Röhrchen wurde dann maximal etwa 1 ml aseptisch in das zweite gegossen und mit dessen Inhalt wiederum durchmischt. Durch Fortsetzung dieses Verfahrens wurden etwa 6 bis 7 Verdünnungsstufen hergestellt, die stets sofort in das Wasserbad zurückgestellt wurden. In die immer noch flüssigen Verdünnungsstufen wurden mit einer sehr fein graduierten sterilen Pipette jeweils 4 bis 7 µl Dithionit-Lösung gegeben, wobei diese gleichzeitig durch kurzes Rühren mit der Pipette verteilt wurde. Um nur eine Pipette pro Reihe verwenden zu können, wurde mit dem Zusatz von Dithionit in der höchsten Verdünnungsstufe begonnen. Sofort nach der Zugabe der Dithionit-Lösung wurden die Röhrchen in ein kaltes Wasserbad gestellt. Nach dem Erstarren wurde der Agar mit einer 1 bis 1,5 cm hohen Schicht aus dem geschmolzenen sterilen Paraffingemisch überschichtet. Nachdem auch dieses erstarrt war, wurde aus dem Wattestopfen ein Wright-Burphy-Verschluß hergestellt; dabei wurden auf die obere Hälfte des durchgeschnittenen Wattestopfens eine Spatelspitze (ca. 0,3 g) Pyrogallol und 1 ml der konzentrierten Na_2CO_3 -Lösung gegeben. Das Reagenzglas wurde sofort mit einem Gummistopfen verschlossen. Die somit fertiggestellten Schüttelkulturen wurden bei der für die betreffende Anreicherung optimalen Temperatur im Dunkeln inkubiert. Gelegentlich wurden die Reagenzgläser in Höhe der Paraffinschicht über einer kleinen Flamme vorsichtig erwärmt, sodaß nur das Paraffin am Rande wieder etwas schmolz. Dadurch konnten sich aufgetretene Hohlräume zwischen Paraffin und Glaswandung wieder verschließen.

Sollten Agar-Schüttelkulturen mit langkettigen Fettsäuren (Palmitat bzw. Stearat) hergestellt werden, so mußte jegliche Bildung von Flocken, auch die sehr feiner, verhindert werden. Daher wurden die geschmolzenen Lösungen der Natriumsalze dieser Fettsäuren (s. 3.4.1.) nicht dem Medium zugesetzt, sondern dem geschmolzenen Agar, und durch eine kurze, kräftige Schüttelbewegung mit diesem vermischt. Die zugesetzte Menge an langkettiger Fettsäure wurde so bemessen, daß die gewünschte Endkonzentration bei Zugabe des Mediums erreicht wurde; dieses enthielt alle weiteren notwendigen Bestandteile (Sulfat, Vitamine, Suppline). Bei der hier beschriebenen Verfahrensweise blieben die Erdalkalisalze der langkettigen Fettsäuren als milchige Suspension im Agar verteilt, dessen Viskosität eine Flockenbildung verhinderte. Der weitere Arbeitsgang entsprach dann dem oben beschriebenen mit löslichen Substraten.

Um fädigen, gleitenden Bakterien in Schüttelkulturen eine Vermehrung und Ausbreitung zu Kolonien zu ermöglichen, wurde die Konzentration an Agar herabgesetzt. Wie im folgenden Kapitel beschrieben wird, war für die Isolation fädiger Bakterien aus Weichagar eine chemische Sterilisation der Agaroberfläche durch ein reaktives Oxidationsmittel (Brom) erforderlich; als Schutzmittel gegenüber einer tiefergreifenden Oxidation wurden daher 6 mmol Thiosulfat pro l des hier verwendeten Mediums aus einer sterilen Stammlösung zugesetzt. Ferner enthielt das Medium wichtige Mineralsalze und Substrate in etwas erhöhten Konzentrationen (s. 3.3.5.), welche dann beim Zusatz zum Agar wieder die Werte wie in den Anreicherungskulturen erreichten. Das Verfahren unterschied sich nun von dem vorher beschriebenen darin, daß anstelle von 6,0 ml nunmehr 9,0 ml komplettes Medium mit 3,0 ml geschmolzenem Agar pro Reagenzglas vereinigt wurden. Mit den so vorbereiteten Röhrrchen wurde dann weiter genauso verfahren, wie es für die Schüttelkulturen mit üblichem Agar-Gehalt beschrieben wurde.

4.1.2. Isolierung von Kolonien

- Zusätze:
- a) Medium zum Suspendieren von Bakterien (s. 3.3.6.)
 - b) Komplettes Nährmedium für die betreffenden Sulfatreduzierer
 - c) Brom

Die inkubierten Agar-Schüttelkulturen wurden von Zeit zu Zeit unter einer Stereolupe auf das Vorhandensein von Bakterienkolonien durchmustert. Die Lage von Kolonien, die für eine Isolation geeignet erschienen, wurde an der Glaswandung markiert; dabei wurden nach Möglichkeit solche Kolonien ausgewählt, die einzeln, also von anderen weiter entfernt lagen.

Das spezielle Medium zum Suspendieren von Kolonien, welches einen erhöhten Gehalt an Sulfid aufwies, wurde in Portionen von 0,5 ml auf kleine sterile Röhrrchen, Innendurchmesser 6 mm, Länge 50 mm, verteilt. Wenn diese Röhrrchen sofort weiterverwendet wurden, so genügte es, die Öffnungen mit passenden sterilen Kappen zu bedecken. Für eine etwas längere Aufbewahrung wurden die Röhrrchen mit kleinen sterilen Stopfen nach 2.1. anaerob verschlossen.

Zur Isolation von Kolonien aus Agar-Schüttelkulturen wurde der Wright-Burry-Verschluß entfernt und das Glas in Höhe der Paraffinschicht über einer kleinen Flamme vorsichtig erwärmt; dabei schmolz das Paraffingemisch zum Teil, sodaß es beim Umdrehen des Reagenzglases als Stück herausfiel. Der freie Abschnitt des Reagenzglases wurde nochmals in der Bunsen-Flamme sterilisiert, ohne dabei die Agarsäule zu erwärmen.

Kolonien, die nicht weit von der Oberfläche entfernt lagen, konnten direkt aus dem Reagenzglas isoliert werden. Eine mit Watte gestopfte, trocken sterilisierte Pasteur-Pipette wurde an ihrem unteren Ende mit Hilfe einer erhitzten Pinzette in der Flamme zu einer feinen Spitze ausgezogen und durch Abbrechen

der Kapillare auf eine geeignete Länge gebracht. Die Pasteur-Pipette wurde mit einem Schlauch zum Ansaugen verbunden und mit etwas sterilem Medium gefüllt. Mit der Spitze wurde dann unter Beobachtung mit der Stereolupe eine Kolonie angestochen und langsam aufgesaugt, ohne daß Luft mitaufgenommen wurde. Die isolierte Kolonie wurde in einem der vorbereiteten kleinen Röhrchen mit Medium suspendiert. Ein mit der Pasteur-Pipette wiederaufgenommener Teil der Suspension diente zur mikroskopischen Kontrolle.

Kolonien, die in der Agarsäule im Reagenzglas weit von der Oberfläche entfernt lagen, konnten mit der Pasteur-Pipette häufig nicht erreicht werden, ohne andere, zum Beispiel auch fremdartige Kolonien zu streifen. Handelte es sich um Schüttelkulturen mit Agar üblicher Konzentration (10 g/l), so konnte die Agarsäule als Ganzes aus dem Reagenzglas ausgetrieben werden. Dazu wurde wieder eine sterile Pasteur-Pipette in der Flamme lang ausgezogen und so abgebrochen, daß eine lange Kapillare blieb. Die Pasteur-Pipette wurde mit einem Schlauch verbunden, durch den ein Gas von 0,7 atm Druck geleitet wurde. Die Kapillare wurde zwischen Glaswandung und Agar bis an das untere Ende des Reagenzglases geführt, sodaß der Gasdruck die Agarsäule herausschob. Das Reagenzglas wurde dabei waagrecht mit der Öffnung über eine sterile Petrischale gehalten, in der die ausgetriebene Agarsäule aufgefangen wurde. Nunmehr waren die Kolonien von der Seite her zugänglich und wurden möglichst bald isoliert, so wie es oben beschrieben ist.

Lagen Kolonien jedoch in Schüttelkulturen mit Weichagar weit von der Oberfläche entfernt, so konnte die Agarsäule infolge der geringen Festigkeit nicht auf die beschriebene Art ausgetrieben werden. Hinzu kam noch, daß Weichagar in dieser Arbeit nur für die Isolation fädiger, gleitender Bakterien verwendet wurde. Nun war aber die Anzahl dieser relativ großen Zellfäden pro Kolonie sehr niedrig. Daher bedeutete eine neue Kontamination mit nur wenigen anderen Bakterien bereits wieder eine starke Verunreinigung, sodaß eine endgültige Isolation aus-

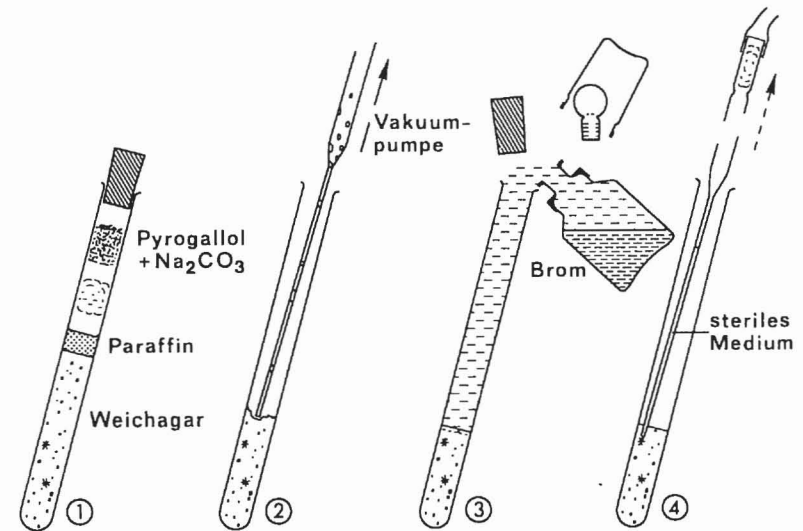


Abb. 4: Isolierung fädiger, gleitender Bakterien aus Weichagar, in welchem Kolonien von Kontaminanten weit in Überzahl waren. (Erläuterungen s. Text)

sichtslos erschien. Daher wurde hier ein anderes Verfahren entwickelt, das in Abb. 4 dargestellt ist. Eine Verdünnungsstufe einer Schüttelkultur-Reihe mit Kolonien, die für eine Isolation geeignet erschienen (1), wurde vom Wright-Burry-Verschluß und dem Paraffingemisch befreit (s. o.). Mit einer Pasteur-Pipette, die mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war, wurde der Weichagar unter Beobachtung mit einer Stereolupe vorsichtig Stück um Stück abgesaugt (2). Die Agarsäule wurde soweit abgetragen, bis die zu isolierende Kolonie von oben her mit einer Pasteur-Pipette erreicht werden konnte, ohne andere Kolonien zu streifen. Die betreffende Kolonie mußte dennoch mindestens 6 mm von der Oberfläche entfernt bleiben. Die Agaroberfläche war jedoch nun stark mit Bakterien kontaminiert, die aus den zerstörten Kolonien der Begleiter stammten. Um die Kontaminanten abzutöten, wurde eine Flasche mit Brom in der Weise über die Öffnung des Reagenzglases gehalten, daß nur die schweren rotbraunen Bromdämpfe hineinfließen (3). Das Reagenzglas wurde 1 min lang

verschlossen. Während dieser Zeit drang das Brom als gut sichtbare, braungelbe Zone nur wenig tief in den Agar ein. Das bei der Herstellung des Weichagars zugesetzte Thiosulfat sowie auch das stets vorhandene Sulfid wirkten hier als Reduktionsmittel und schützten dadurch tieferliegende Bereiche vor dem Angriff des Broms. Anschließend wurden die Bromdämpfe mit sterilem Stickstoff ausgetrieben. Nach dieser chemischen Sterilisation der oberen Agarschicht wurde die Kolonie in der beschriebenen Weise mit einer ausgezogenen Pasteur-Pipette mit etwas Medium aufgenommen (4) und in ein Kulturröhrchen mit flüssigem Nährmedium gegeben.

Suspendierte Kolonien aus ersten Schüttelkulturen wurden direkt in zweite überführt, sofern es sich nicht um die fädigen Bakterien handelte. Mit den zweiten Schüttelkulturen wurde ebenso verfahren, wie es unter 4.1.1. beschrieben ist. Fädige Bakterien wurden vor den zweiten Schüttelkulturen zunächst wieder in Flüssigkeitskultur überimpft und nach der Vermehrung darin noch nach einem anderen Verfahren weiter gereinigt (s. 4.3.1.).

Aus zweiten Agar-Schüttelkulturen konnten die Bakterien bereits häufig als Reinkulturen isoliert werden. Für die Anzucht isolierter Kolonien in Flüssigkeitskultur dienten zunächst Reagenzgläser, die nach der Hungate-Technik (s. 2.1.) anaerob verschlossen wurden; das untere Ende der hier verwendeten Reagenzgläser lief spitz zu, ähnlich wie bei manchen Zentrifugenröhrchen. Die anfangs noch geringe Zellmasse aus der Kolonie sammelte sich zunächst in der Spitze an. Der dort recht begrenzte Raum erlaubte es den Bakterien, eine günstige Umgebung für den Wachstumsbeginn zu schaffen. Hatte ein sichtbares Wachstum begonnen, so wurden die Röhrchen von Zeit zu Zeit umgeschwenkt. Mit dem Inhalt konnten dann größere Kulturvolumina (Flaschen) beimpft werden.

4.2. Pasteurisation

Sporen-bildende Bakterien wurden zunächst ebenso wie andere in Agar-Schüttelkulturen nach 4.1.1. gereinigt. Die Röhrchen wurden solange inkubiert, bis keine merkliche Größenzunahme der Kolonien mehr zu beobachten war. Aus einer möglichst hohen Verdünnungsstufe wurde die Agarsäule nach 4.1.2. ausgetrieben; aus dieser wurde eine einzelne Kolonie als Ganzes mit einem feinen ausgeglühten Platinspatel zusammen mit etwas Agar als kleiner Block herausgeschnitten und in ein steriles Reagenzglas mit 1 ml Medium gegeben. Das Reagenzglas wurde mit einem sterilen Wattestopfen verschlossen und 10 min lang in einem Wasserbad auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde der obere, nicht mit dem Wasserbad erwärmte Abschnitt des Reagenzglases in der Flamme erhitzt. Dann wurde die Kolonie mit einer sterilen Pasteur-Pipette zerquetscht, aufgenommen und in Nährmedium übertragen. Als Kulturgefäß diente wieder ein Reagenzglas mit spitz zulau fendem Ende, das nach der Hungate-Technik verschlossen wurde (s. 4.1.2.).

4.3. Reinigung durch anaerobes Waschen

Filament-bildende Bakterien konnten mit Hilfe von Agar-Schüttelkulturen allein nicht in Reinkultur isoliert werden, wenn auch die Zellfäden oft erheblich zur Gesamtmasse der Bakterien in einer Anreicherung beitragen konnten. Die Filamente waren nämlich im Vergleich zu den übrigen Bakterien recht groß und daher stets bei weitem in der Minderzahl. Weil somit ein Zellfaden in Anreicherungen immer von einer großen Zahl wesentlich kleinerer, anderer Bakterien umgeben war, konnte eine Isolierung allein aufgrund der statistischen Verteilung in einer Agar-Schüttelkultur ausgeschlossen werden. Daher wurden zwei Verfahren entwickelt, die eine Reinigung der Filamente von ihren Begleitern aufgrund des Größenunterschiedes ermöglichten.

4.3.1. Anaerobes Waschen auf einem Grid

- Zusätze:
- a) Grundmedium
 - b) Äthanol, 70 Vol.-% (70 ml Äthanol, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt)

Zunächst wurde die in Abb. 5 gezeigte Apparatur hergestellt, deren wichtigster Bestandteil ein zu einem Sieb umfunktioniertes Kupfer-Grid war, welches normalerweise für die Elektronenmikroskopie verwandt wird. Ein Glasröhrchen von 4 mm Innendurchmesser wurde in der Flamme etwas ausgezogen und an der Verjüngung abgeschnitten. In dieses Glasröhrchen wurde nun ein Kupfer-Grid (VECO, Solingen), Durchmesser 3 mm, mit 256 Maschen pro mm² gegeben, welches an einer bestimmten Stelle der Verjüngung hängen blieb; diese Stelle wurde außen markiert. Das Grid wurde dann zunächst wieder herausgenommen. In eine Pasteur-Pipette wurde etwas Zweikomponenten-Klebstoff (UHU plus) aufgesaugt und in dem Glasröhrchen in Höhe der markierten Stelle entlang der Wandung verteilt. Eine weitere Pasteur-Pipette wurde über einen Schlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Mit dem Ende der Pipette wurde das Grid aufgenommen, sodaß es infolge des Sogs quer vor der Pipettenöffnung gehalten wurde. Das Grid konnte nunmehr in das Glasröhrchen langsam bis an die klebende Stelle geführt werden. Durch Abdrücken des Schlauchs wurde der Sog unterbrochen, und das Grid wurde nunmehr an seinem Außenrand durch den Klebstoff festgehalten. Nach dem Erhärten des Klebstoffs wurde das verjüngte Ende des Röhrchens über einen dünnwandigen Siliconschlauch mit einem Überlauf verbunden, der aus einem gebogenen Glasrohr bestand.

Vor dem Waschen der fädigen Bakterien wurde die hergestellte Apparatur zur Sterilisation mit 70%igem Äthanol durchspült und anschließend mit einem sterilen Luftstrom wieder vollständig getrocknet. Dann wurde das Röhrchen mit dem Grid und dem angeschlossenen Überlauf so installiert, daß die Austrittsöffnung des Überlaufs höher lag als das Grid. Das Ende des Überlaufs wurde in ein Röhrchen getaucht, das bis zum Rande mit dem

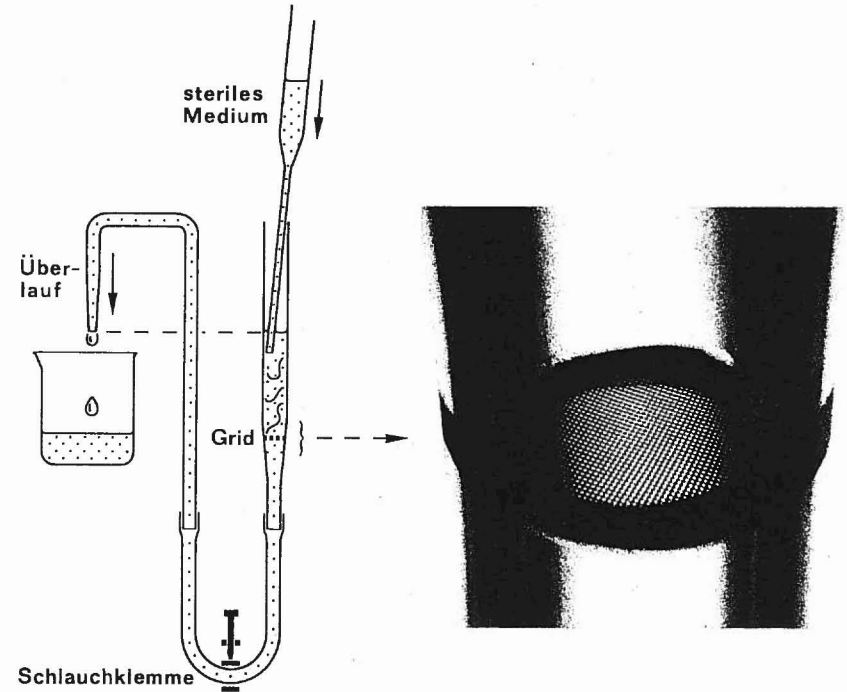


Abb. 5: Reinigung Filament-bildender Bakterien durch anaerobes Waschen auf einem elektronenmikroskopischen Grid. (Erläuterungen s. Text)

betreffenden sterilen Grundmedium gefüllt war. Das Medium wanderte dabei vom Überlauf durch den Schlauch bis über das Grid hinaus, ohne daß eine Luftblase in der Apparatur blieb. Aus der zu reinigenden Kultur wurden nun, je nach Gehalt an Zellfäden, 0,5 bis 2 ml mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in das Medium oberhalb vom Grid gegeben. Auf die gleiche Weise wurden anschließend 10 bis 20 ml steriles Medium in die Apparatur gegeben (s. Abb. 5). Die fädigen Bakterien blieben dabei größtenteils in dem Grid hängen, während die Mehrzahl der Begleiter mit der Waschflüssigkeit durch die Maschen mitgerissen wurde. Da die Austrittsöffnung des Überlaufs oberhalb vom Grid lag, war über diesem stets eine höhere Schicht des reduzierenden

Mediums vorhanden. Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde der Verbindungsschlauch etwa in der Mitte mit einer Klemme verschlossen. Der mit dem verjüngten Röhrchen in Verbindung stehende Abschnitt des Schlauchs wurde dann mit einer ruckartigen Bewegung zusammengedrückt, sodaß ein Flüssigkeitsstoß über das Grid zurückdrang und die darin hängenden Zellfäden größtenteils wieder herauslöste. Das Medium mit den Filamenten oberhalb vom Grid wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette aufgenommen. Durch dieses Waschverfahren konnten zwar die fädigen Bakterien nicht vollständig von den anderen befreit werden; die Zahl der Begleiter war jedoch im Vergleich zur Anreicherung stark vermindert worden. Die gewaschene Suspension der Zellfilamente konnte nunmehr in Agar-Schüttelkulturen mit Weichagar (s. 4.1.1.) weiter gereinigt werden. Waren die Filamente sehr lang, so wurde die Suspension vor den Agar-Schüttelkulturen noch in einen kleinen, vorher sterilisierten Kolbenhomogenisator mit 4,5 mm Innendurchmesser gegeben. Der Kolben wurde langsam auf- und abbewegt, wobei eine Bildung von Blasen vermieden wurde. Durch diese Behandlung zerbrachen längere Filamente in kürzere, sodaß deren Anzahl für die Agar-Schüttelkultur noch erhöht wurde.

Handelte es sich um sehr große fädige Bakterien, so war die endgültige Isolierung in Reinkultur auch nach der im folgenden Kapitel erläuterten Methode möglich.

4.3.2. Anaerobes Waschen in kleinen Röhrchen

- Zusätze:
- a) Medium zum Suspendieren von Bakterien (s. 3.3.6.)
 - b) Komplettes Nährmedium

Einzelne Filamente großer fädiger Bakterien waren mit bloßem Auge zu erkennen, wenn die Kulturgefäße gegen eine Lichtquelle betrachtet wurden. Daher konnten solche Filamente in sterilem Medium unter direkter Beobachtung gewaschen und isoliert

werden. Das betreffende Grundmedium mit hohem Sulfid-Gehalt zum Suspendieren von Bakterien wurde in Portionen von 1 ml auf kleine sterile Röhrchen von 6 mm Innendurchmesser und 50 mm Länge verteilt, die mit passenden sterilen Kappen bedeckt wurden. Für einen Waschgang wurden etwa 5 bis 6 dieser Röhrchen benötigt. Aus einer bereits auf einem Grid gewaschenen Suspension fädiger Bakterien (s. 4.3.1.) wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette ein einzelnes Filament mit etwas Medium aufgenommen und in das erste der vorbereiteten Röhrchen gegeben. Der Zellfaden wurde in der Waschflüssigkeit mit einer weiteren sterilen Pasteur-Pipette umhergewirbelt, aufgenommen und in das nächste Röhrchen überführt. Nachdem das Filament alle Röhrchen passiert hatte, wurde es in Nährmedium gegeben und inkubiert. Das Nährmedium befand sich wiederum in einem Reagenzglas mit spitz zulaufendem Ende (s. 4.1.2.), das nach der Hungate-Technik verschlossen wurde.

4.4. Rollröhrchen

Methanbakterien wurden nach der von HUNGATE (1969) beschriebenen Methode mit Hilfe von Rollröhrchen isoliert. Das Verfahren wurde ein wenig modifiziert, sodaß die Lösungen und Gefäße für den Umgang mit Sulfat-reduzierenden Bakterien auch hier verwendet werden konnten.

4.4.1. Herstellung der Verdünnungsreihen

- Zusätze:
- a) Agar, gewaschen, 30 - 33 g/l
 - b) Medium, speziell für Rollröhrchen (s. 3.3.8.), mit 10 mmol Formiat und 2 mmol Acetat pro l, ferner mit Vitaminen, den Spurenelementen Se, Mo und W sowie Faulwasser und Gülleextrakt (s. 3.4.4., 3.4.6.; 3.4.7.); Sulfat-frei
 - c) Grundmedium für Methanbakterien (Süßwassermedium, s. Tab. 2), Sulfat-frei

d) Dithionit-Lösung (s. 3.4.5.), 0,30 mol/l

e) Gase: H₂, CO₂

Der Agar wurde ebenso wie auch der für Schüttelkulturen (s. 4.1.1.) gewaschen, geschmolzen und in Portionen von 3 ml in Reagenzgläsern mit Wattestopfen autoklaviert; allerdings wurden hier Reagenzgläser mit dicken Wandungen (ca. 1,5 mm) verwendet. Die Dithionit-Lösung wurde wiederum frisch zubereitet und unter Stickstoff aufbewahrt (s. Abb. 2).

Zur Herstellung einer Schüttelkultur-Reihe wurden 6 der mit Agar beschickten Reagenzgläser in ein siedendes Wasserbad gestellt; nachdem der Agar geschmolzen war, wurde dieser in einem weiteren Wasserbad bei 55 °C flüssig gehalten. Verwendet wurde das spezielle, Sulfat-freie Medium für Rollröhrchen, das 10 mmol Sulfid pro l und wichtige Mineralsalze in der zweifachen Konzentration des Süßwassermediums enthielt; auch Formiat als eine mögliche Energiequelle, Vitamine, Spurenelemente sowie Faulwasser und Gülleextrakt waren in diesem Medium ebenfalls in der zweifachen Konzentration gegenüber Flüssigkeitskulturen vorhanden. Das somit bis auf die weitere Energiequelle H₂ fertiggestellte Nährmedium wurde auf 42 °C erwärmt. Von der betreffenden Anreicherung wurde dann mit einfachem sterilen Grundmedium für Methanbakterien (Süßwassermedium) ohne Sulfat eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde das Grundmedium in Portionen von 9 ml auf sterile Reagenzgläser verteilt, die mit Wattestopfen verschlossen wurden. Die Ansätze wurden sofort verwendet. In das erste Röhrchen wurde etwa 1 ml der Anreicherungskultur gegeben und unter schwachem Rühren mit der Pipette vermischt. Aus diesem Röhrchen wurde dann mit einer sterilen Pipette etwa 1 ml entnommen und mit dem Inhalt des zweiten Röhrchens vermischt. Auf diese Weise wurden 6 Verdünnungsstufen hergestellt. Von dem erwärmten Medium für Rollröhrchen wurden nunmehr jeweils 3 ml in die Reagenzgläser mit dem verflüssigten Agar gegeben, wobei die Öffnung der Pipette stets in die Flüssigkeit gehalten wurde. In diese Röhrchen wurde mit einer sterilen Pipette jeweils 1 ml aus jeder Stufe der herge-

gestellten Verdünnungsreihe gegeben, beginnend bei der höchsten Verdünnung. Mit einer sehr fein graduierten Pipette wurden dann jedem Röhrchen 1 bis 2 µl Dithionit-Lösung zugesetzt, wobei wiederum mit der höchsten Verdünnungsstufe begonnen wurde; die Konzentration an Dithionit war hier etwas niedriger als in Schüttelkulturen für Sulfatreduzierer. Anschließend wurden die Röhrchen mit einem Gasgemisch aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ steril begast, so wie es in Abb. 1 dargestellt ist, und mit Stopfen aus Butyl-Gummi oder Viton gut verschlossen. Während des Begasens durfte kein zu kräftiger Gasstrom auf das Agar-haltige Medium gerichtet werden, da dessen Oberfläche sonst vorzeitig erstarrte. Immer sofort nach der Begasung eines Reagenzglases wurde dieses einmal umgeschwenkt und in waagerechter Lage unter kaltem, fließendem Wasser gleichmäßig schnell und stets in einer Richtung gedreht, ohne daß Blasen auftraten. Dabei erstarrte der Agar als ein gleichdicker Belag an der gesamten Innenwandung. Die somit fertigen Rollröhrchen wurden in senkrechter Stellung inkubiert.

4.4.2. Isolierung von Kolonien

- Zusätze:
- a) Medium zum Suspendieren von Bakterien (s. 3.3.6.)
 - b) Medium für Methanbakterien (s. 3.3.7.) zur Anzucht mit Wasserstoff; dieses enthielt 1 mmol Acetat pro l, Vitamine und die Spurenelemente Se, Mo und W
 - c) Gase: H₂, CO₂

Beim Durchmustern von Rollröhrchen auf Kolonien durfte das Schwitzwasser, das sich im unteren Teil angesammelt hatte, nicht die übrige Agaroberfläche benetzen. Daher wurde die zum Betrachten der Rollröhrchen verwendete Stereolupe auf einer geneigten Ebene installiert; somit lagen auch die Rollröhrchen auf dem Objektisch stets schräg, und das Schwitzwasser blieb im unteren Teil des Reagenzglases.

Das Medium zum Suspendieren von Bakterien wurde ebenso auf kleine sterile Röhrchen verteilt, wie es bereits unter 4.1.2. beschrieben wurde. Zur Isolierung wurde das untere Ende einer sterilen Pasteur-Pipette mit einer erhitzten Pinzette in der Flamme zu einer Spitze ausgezogen und hakenförmig im nahezu rechten Winkel umgebogen; die Glaskapillare wurde so abgebrochen, daß der Haken 3 bis 4 mm lang war. Ein Rollröhrchen, in welchem isoliert liegende Kolonien sichtbar waren, wurde am oberen Rande abgeflammt und durch sehr langsames Herausdrehen des Stopfens geöffnet. Der im oberen Teil des Röhrchens sitzende Agarpfropf wurde mit einem ausgeglühten Platinspatel entfernt. Die hakenförmig umgebogene Pasteur-Pipette wurde mit einem Schlauch zum Ansaugen verbunden und mit etwas Medium gefüllt. Dann wurde die Pasteur-Pipette in das Rollröhrchen geführt, ohne dabei die Agarschicht zu streifen. Mit der Spitze wurde unter Beobachtung durch die Stereolupe eine Kolonie langsam aufgesaugt, ohne daß Luft mitaufgenommen wurde. Die Bakterien wurden dann in einem der vorbereiteten kleinen Röhrchen mit Medium suspendiert. Kolonien aus ersten Rollröhrchen wurden nochmals in zweite überführt, aus denen dann die Methanbakterien in Reagenzgläser mit flüssigem Medium isoliert wurden; diese wurden unter einer Atmosphäre aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ in waagerechter Lage inkubiert.

5. Reinheitskontrolle

Isolierte Bakterienstämme wurden während der Versuche ständig mikroskopisch auf Reinheit geprüft. Mikroskopiert wurden vor allem Kulturen aus solchen Versuchen, in denen Pyruvat und Kohlenhydrate als Elektronendonatoren oder zusätzlich Hefeextrakt eingesetzt worden waren; diese Substanzen können nämlich von einer Vielzahl anderer, gärender Bakterien verwertet werden, sodaß auch eventuell vorhandene Kontaminanten durch eine mikroskopisch sichtbare Entwicklung auffallen dürften.

6. Wachstumsparameter

6.1. Trübungsmessungen

Für vergleichende Wachstumsmessungen an freischwebenden Bakterien war die Trübung ein leicht zu bestimmendes relatives Maß für die Bakteriendichte. Die Trübung einer Bakterienkultur wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen das jeweilige unbeeimpfte Medium als Leerwert gemessen.

Zur Bestimmung der Bakterientrübung in Flaschen wurde nach dem Umschwenken ein Teil entnommen und in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gegeben. Zur Messung diente das Photometer PM 4 (ZEISS). Um aus einer gemessenen Trübung die wirkliche zu ermitteln, die zur Bakteriendichte genau proportional war, wurden von der jeweiligen Bakteriensuspension mit unbeeimpftem Medium definierte Verdünnungsstufen hergestellt. Die unterschiedlichen Trübungen dieser Verdünnungsstufen wurden gemessen. Im Bereich höherer Verdünnung waren die gemessenen Werte proportional zur Verdünnung. Wurden Meßwerte aus diesem Bereich durch die jeweilige Verdünnung dividiert, so wurden Werte für die wahre Trübung der unverdünnten Suspension erhalten, aus denen dann das arithmetische Mittel gebildet wurde. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit den jeweils vorgenommenen Verdünnungen wurden die wahren Trübungen aller Verdünnungsstufen berechnet und graphisch gegen die entsprechenden gemessenen Trübungen aufgetragen. Auf diese Weise wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe aus einer beliebigen gemessenen Trübung der Kultur des betreffenden Bakterienstammes die wahre Trübung ermittelt werden konnte.

Die Trübung von Bakterienpopulationen in verschlossenen Kulturröhrchen (20 ml Inhalt) konnte ohne Probeentnahme direkt bestimmt werden. Die Röhrchen wurden kräftig umgeschwenkt und in das Photometer Spectronic 88 (BAUSCH & LOMB) gesteckt. Für Experimente mit Trübungsmessungen dieser Art wurden nur solche Röhrchen verwendet, die mit Wasser wenig voneinander abweichen-

de Leerwerte geliefert hatten. Jedes Röhrchen war so markiert worden, daß es stets in derselben Stellung ins Photometer gesteckt werden konnte. Aus gemessenen Trübungen oberhalb etwa 0.3 wurden die wirklichen wiederum mit Hilfe einer Korrekturkurve ermittelt.

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurde die Trübung der Bakterienkulturen in regelmäßigen Zeitabständen gemessen. Die erhaltenen Werte wurden, wenn nötig, korrigiert und auf halblogarithmischem Papier gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Auftragung wurde diejenige Zeit abgelesen, nach welcher für eine geeignete, auf der Ausgleichsgeraden angenommene beliebige Trübung der zahlenmäßig doppelt so hohe Wert erreicht war.

6.2. Abschätzung der Verdopplungszeit inhomogener Bakterienkulturen

Die Dichte von Bakterien, die mit unlöslichen Fettsäuren wuchsen, konnte nicht durch Trübungsmessung bestimmt werden; das gleiche galt für solche Bakterien, die in Form großer Zellpakete wuchsen oder lange Filamente bildeten. Daher mußte das Wachstum in diesen Fällen aufgrund qualitativer Beobachtungen bewertet werden. Auf die Wachstumsgeschwindigkeit in Medien mit unlöslichen Fettsäuren konnte daraus geschlossen werden, wie schnell die als Flocken ausgefallenen weißen Erdalkalisalze verbraucht wurden. Eine Bewertung des Wachstums von Zellpaketen oder Filamenten war am besten möglich, wenn die Kulturgefäße gegen eine möglichst punktförmige Lichtquelle in einem abgedunkelten Raum unter leichtem Umschwenken betrachtet wurden.

Die Verdopplungszeit von Kulturen mit unlöslichen Fettsäuren bzw. die Verdopplungszeit von Zellpaketen oder Filamenten konnte aus den Beobachtungen nur ungefähr berechnet werden: Es wurde die Zeit bestimmt, in welcher eine beimpfte Kultur wieder den Wachstumszustand der Vorkultur erreicht hatte; als zusätzliche Kontrolle diente die H_2S -Konzentration (s. 12.1.), die

nach dieser Zeit ebenfalls wieder den Wert wie in der Vorkultur erreicht haben sollte. Das Volumen der neu beimpften Kultur sei V ; beimpft wurde mit dem Volumen v aus einer gut gewachsenen, ganz frischen Vorkultur. Nach der seit dem Beimpfen verstrichenen Zeit t haben die Bakterien wieder die Populationsdichte wie in der Vorkultur erreicht. Zur Berechnung der Verdopplungszeit t'_d wird nach der Zahl der Verdopplungen, x , gefragt, welche das Impfvolumen v durchführen mußte, um das Kulturvolumen V auszufüllen; das lautet formal:

$$v \cdot 2^x = V$$
$$x = \frac{\log \frac{V}{v}}{\log 2}$$

Dividiert man die für das Wachstum benötigte Zeit durch die Zahl der Verdopplungen, x , so erhält man die Verdopplungszeit t'_d :

$$t'_d = 0,301 \cdot \frac{t}{\log \frac{V}{v}}$$

Weil innerhalb der beobachteten Wachstumszeit auch häufig eine Anlaufphase liegt, wird die wahre Verdopplungszeit t_d während der exponentiellen Wachstumsphase in vielen Fällen kürzer sein als t'_d .

6.3. Bestimmung der Trockenmasse

In Versuchen zur Ermittlung der Stöchiometrie von Substratumsetzungen wurde die Bakterienmasse als Trockenmasse direkt durch Wägung ermittelt.

- Zusätze:
- a) HCl-Lösung, 2,0 mol/l
 - b) NaH_2PO_4 -Lösung, 0,01 mol/l

1,0 l der betreffenden Kultur wurde mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 6.4 gebracht und gelegentlich umgeschwenkt. Ausfällungen von Erdalkaliverbindungen, die sich durch eine Erhöhung des pH-Wertes während des Wachstums gebildet haben konnten, wurden dadurch wieder gelöst. Um eine Ausfällung von Schwefel durch Oxidation des Schwefelwasserstoffs mit Luftsauerstoff zu vermeiden, wurde das angesäuerte Medium unter CO_2 aufbewahrt. Nach etwa 30 min wurde die Kultur in verschraubbare Zentrifugenbecher gegeben, mit Kohlendioxid überschichtet und 15 min lang bei $1 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ unter Kühlung zentrifugiert (RC2-B, SORVALL). Der Überstand wurde soweit wie möglich abgegossen und das Pellet vollständig in ca. 100 ml NaH_2PO_4 -Lösung (0,01 mol/l) überführt und gut suspendiert. Für Versuche dieser Art wurden in der Arbeit nur Stämme aus Medien mit niedrigen Salzkonzentrationen durchgeführt; daher war eine Lyse infolge der osmotischen Wirkung der verdünnten NaH_2PO_4 -Lösung nicht zu befürchten. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder abgegossen; verbliebene Reste des klaren Überstandes wurden mit einer Pipette mit Gummiball vorsichtig abgesaugt. Dann wurde das Zellpellet in kleine Glasbecher überführt, die ein geringes, genau bekanntes Eigengewicht zwischen etwa 2 und 3 g hatten. Für die Hauptmasse des Pellets wurde zunächst ein kleiner, schlanker Spatel verwendet. Alle noch hängengebliebenen Reste der Bakterienmasse wurden dann sehr sorgfältig mit wenig destilliertem Wasser in die Glasbecher gespült, wozu wieder eine Pipette mit Gummiball diente. Die Zellmasse in den Bechern wurde bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Differenz zum Leergewicht eines Glasbechers war die aus 1,0 l erhaltene Trockenmasse.

7. Optimierung von Wachstumsbedingungen

Für die Bestimmung der pH- und Temperatur-Optima wurde das Bakterienwachstum in Röhrchen bei verschiedenen vorgegebenen pH-Werten und Temperaturen zeitlich verfolgt. Bei den Messungen wurde nach Möglichkeit dasjenige Substrat im Medium verwendet,

das auch für die Anreicherung und Isolierung der betreffenden Bakterienstämme gedient hatte. Lediglich anstelle der langkettigen, flockig ausfallenden Fettsäuren wurden bei der Bestimmung der pH-Optima kürzerkettige, lösliche Homologe verwendet. Im Falle freischwimmender Bakterien wurde die Trübungszunahme direkt in den Kulturröhrchen nach 6.1. gemessen. Die Verdopplungszeiten von Bakterien, die Zellpakete oder Filamente bildeten, konnte nur aufgrund qualitativer Beobachtungen nach 6.2. annähernd ermittelt werden; das gleiche galt für die Ansätze mit langkettigen Fettsäuren zur Bestimmung des Temperaturoptimums. Die Messungen wurden durch mikroskopische Beobachtungen ergänzt: Lange, in der Teilung gehemmte oder andersartig deformierte Zellen wurden als Anzeichen für ungünstige, extreme Bedingungen aufgefaßt, ebenso schwerfällig gewordene Bewegungen.

7.1. pH-Optima

Zur Bestimmung der pH-Optima wurden Nährmedien in Flaschen mit 50 ml Inhalt mit verschiedenen Mengen an HCl oder Na_2CO_3 (s. 3.2.) versetzt, mit frischen Kulturen beimpft, umgeschwenkt und durch Pipettieren auf jeweils zwei Kulturröhrchen verteilt; die Pipettenspitze wurde dabei stets in das ausgelaufene Medium gehalten. Die verbliebenen Reste der Ansätze dienten zur Messung der verschiedenen vorgegebenen pH-Werte. Das Wachstum in den anaerob verschlossenen Röhrchen wurde dann zeitlich verfolgt. Weil sich der pH-Wert während des Umsatzes eines Substrats häufig ändert, dienten zur Auswertung nur die Anfangssteigungen der halblogarithmischen Auftragungen. Daher mußte das pH-Optimum von Bakterien, die mit unlöslichen Fettsäuren isoliert worden waren, mit löslichen bestimmt werden. Bei sehr hohen pH-Werten wurden, insbesondere in marinen Medien, Erdalkalisalze ausgefällt, sodaß hier das Wachstum nur mikroskopisch kontrolliert werden konnte; die Optima der in dieser Arbeit isolierten Bakterien lagen jedoch stets in einem pH-Bereich, in welchem aus den betreffenden Medien noch keine schwerlöslichen Verbindungen als sichtbare Trübungen ausfielen.

7.2. Temperatur-Optima

Die Temperatur-Optima wurden bei optimalen pH-Werten ermittelt. Die beimpften Kulturröhrchen wurden in Wasserbädern inkubiert, die durch Thermostaten auf verschiedenen Temperaturen gehalten wurden. Wegen der Wärmeausdehnung der Medien wurden alle Kulturröhrchen für höhere Inkubationstemperaturen mit einem kleinen Gasraum versehen und nach 2.1. mit Stopfen anaerob verschlossen.

8. Lichtmikroskopische Untersuchungen

8.1. Nachweis von Poly- β -hydroxybuttersäure

- Reagenzien: a) Eau de Javelle (Natriumhypochlorit-Lösung),
13 % aktives Chlor
- b) Methanol
- c) Chloroform

Ein erster Hinweis auf den Speicherstoff Poly- β -hydroxybuttersäure, kurz PHB genannt, wurde bereits beim Mikrokopieren lebender Zellen erhalten: PHB bildete tröpfchenförmige oder granuläre Einschlüsse, die im Gegensatz zu Schwefeltröpfchen in Schwefelwasserstoff-oxidierenden Bakterien nur eine schwache Lichtbrechung hervorriefen; im Phasenkontrast erschienen die Einschlüsse, je nach Größe und mikroskopischer Vergrößerung, heller oder dunkler als die übrige Zelle. Wurde dann an den Rand des Deckglases ein kleiner Tropfen Eau de Javelle gesetzt, so drang dieser alsbald unter das Deckglas; dabei konnte beobachtet werden, daß die Zellen aufgelöst und die Einschlüsse freigesetzt wurden; bestanden diese aus PHB, so wurden sie von Eau de Javelle nicht angegriffen.

Ein weiterer Nachweis für PHB beruht auf der Löslichkeit dieses Polymers in Chloroform. Die durch Zentrifugieren eingeeengte Zellsuspension wurde auf einem Objektträger ausgestrichen. Nach

dem Trocknen an der Luft wurden die Bakterien mit Methanol fixiert. Der Objektträger wurde schräg gehalten, mit 2 ml Methanol beträufelt und an der Luft getrocknet. Dann wurde der Objektträger 1 min lang senkrecht in der Weise in ein offenes Bad aus Chloroform gestellt, daß er nur bis zur Hälfte mit dem Lösungsmittel in Berührung kam. Nachdem das Chloroform auf dem Objektträger verdunstet war, wurde dieser mit Wasser befeuchtet, mit einem Deckglas versehen und im Phasenkontrast mikroskopiert. Bestanden die Einschlüsse aus PHB, so waren diese in den Zellen verschwunden, die auf der mit Chloroform behandelten Seite des Objektträgers lagen.

8.2. Gram-Färbung

Die von MAGEE (1975) angegebene Methode zur Gram-Färbung wurde etwas modifiziert; eine Gegenfärbung mit Safranin hatte sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Bakterien als störend erwiesen und wurde daher nicht angewandt.

- Reagenzien: a) Methanol

b) Kristallviolett-Lösung:

Lösung I : Kristallviolett	1,7 g
Äthanol, 95 Vol.%	10 ml
dest. Wasser	ad 100 ml

Lösung II: Ammoniumoxalat, (NH ₄) ₂ (COO) ₂ ·H ₂ O	10 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

100 ml Lösung I und 400 ml Lösung II wurden miteinander vermischt

c) Jod-Lösung:

KJ	6,6 g
J ₂	3,3 g
NaHCO ₃	10 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

d) Propanol-(1)

Kulturen freischwimmender Bakterien wurden 10 min lang bei $2 \cdot 10^4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Dann wurde soviel vom Überstand abgegossen, daß die Bakterien im Restüberstand zu der 10 bis 20fachen Dichte der Kultur resuspendiert werden konnten. Diese Suspension wurde auf einem sauberen Objektträger ausgestrichen. Fädige, gleitende Bakterien wurden zusammen mit dem synthetischen Sediment mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen und auf den Objektträger gebracht; dieser wurde dann etwas schräg gehalten, sodaß überschüssiges Medium abfloß, die Filamente aber auf dem Objektträger blieben. Zum Vergleich wurden Escherichia coli (Gram-negativ) und Bacillus cereus (Gram-positiv) mituntersucht; die Stämme wurden von Herrn Dr. Claus, Göttingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Frische Zellen dieser Bakterien aus Schrägagar-Röhrchen wurden in wenig Wasser suspendiert und neben den zu prüfenden Sulfatreduzierern auf dem Objektträger ausgestrichen.

Nachdem die Objektträger an der Luft völlig getrocknet waren, wurden die Bakterien mit Methanol fixiert, so wie es unter 8.1. beschrieben ist. Die fixierten Bakterien wurden 1 min lang mit der Kristallviolett-Lösung bedeckt und anschließend unter kaltem, fließendem Wasser 5 s lang vorsichtig gespült. Das Wasser wurde durch Beträufeln mit der Jod-Lösung vom Objektträger entfernt. Die Zellen blieben dann 1 min lang mit der Jod-Lösung bedeckt. Danach wurden die Präparate wieder 5 s lang in fließendem Wasser abgespült und dreimal jeweils 1 min lang hintereinander in drei Bädern mit Propanol-(1) entfärbt. Die Objektträger wurden nochmals unter fließendem Wasser 5 s lang gespült

und an der nicht beschichteten Seite abgetrocknet. Die noch feuchte, beschichtete Seite wurde mit Deckgläsern versehen und mikroskopiert. Im Hellfeld erschienen Bacillus cereus und andere Gram-positive Bakterien blauviolett. Escherichia coli sowie andere Gram-negative Bakterien waren im Hellfeld farblos und nur schwach zu erkennen; diese wurden daher im Phasenkontrast identifiziert. War Bacillus cereus bereits entfärbt oder, im entgegengesetzten Falle, Escherichia coli noch gefärbt, so wurde ein neues Präparat hergestellt; dieses zweite Präparat wurde dann für kürzere bzw. längere Zeit als beim ersten Mal in Propanol-(1) entfärbt.

9. Anfertigung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Art der Begeißelung wurden die Zellen der Sulfat-reduzierenden Bakterien negativ kontrastiert.

Reagenzien: a) Neopren-Lösung:

Neopren	0,5 g
Toluol	ad 100 ml

b) Uranylacetat-Lösung:

UO ₂ (CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	2 g
dest. Wasser	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH vorsichtig auf 4.8 eingestellt.

c) Wolframato-phosphorsäure-Lösung:

Wolframato-phosphorsäure	3 g
dest. Wasser	ad 100 ml

pH = 6.8

Zunächst wurden Kupfer-Grids mit der matten Seite nach oben auf Filterpapier ausgebreitet, mit der Neopren-Lösung beträufelt und mit einem anderen Stück Filterpapier abgetrocknet. Eine noch nicht ausgewachsene Kultur der zu mikroskopierenden Bakterien wurde bei schwacher Beschleunigung, $8000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$, abzentrifugiert; vom Überstand wurde soviel abgegossen, daß nach dem Resuspendieren eine 10 bis 20fach dichtere Bakteriensuspension erhalten wurde. Von dieser wurde soviel in eine kleine Kunststoffkapsel gegeben, daß die Oberfläche konvex war. Aus einer mit Kohle bedampften Glimmerfolie wurde ein kleines Plättchen herausgeschnitten, von welchem der Kohlefilm auf die Oberfläche der Bakteriensuspension abflottiert wurde; das Glimmerplättchen wurde dabei mit einer Nadelpinzette festgehalten. Nach 30 bis 60 s wurde der Kohlefilm mit dem Glimmerplättchen wiederaufgenommen und auf die Uranylacetat-Lösung abflottiert, die sich in einer zweiten Kunststoffkapsel befand. Anstelle von Uranylacetat wurde bisweilen auch Wolframato-phosphorsäure verwendet. Die Kohlefolie wurde dann von oben her mit einem mit Neopren beschichteten Grid aufgenommen; die noch anhaftende Flüssigkeit wurde sogleich seitlich mit einem spitz zugeschnittenen Stück Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Das Präparat konnte dann sofort im Elektronenmikroskop betrachtet werden. Blieben bei der beschriebenen Vorgehensweise keine Bakterien an dem Kohlefilm haften, so wurde das Verfahren wenig modifiziert. Der Kohlefilm wurde vom Glimmerplättchen zunächst auf Wasser abflottiert und mit dem mit Neopren beschichteten Grid aufgenommen. Der Kohlefilm auf dem umgedrehten Grid wurde einige min lang mit einem Tropfen der dichten Bakteriensuspension bedeckt. Nach dem Absaugen dieser Suspension mit Filterpapier wurde ein Tropfen Uranylacetat-Lösung aufgebracht und ebenfalls abgesaugt.

Das verwendete Elektronenmikroskop war ein EM 301 der Firma PHILIPS.

10. Bestimmung von Pigmenten

Zur Bestimmung von Zellpigmenten wurden die betreffenden Bakterienstämme in Kulturvolumina von 5 bis 10 l angezogen. Fädigen gleitenden Bakterien wurde Aluminiumphosphat als synthetisches Sediment zugesetzt (s. 3.4.8.). Die ausgewachsenen Kulturen wurden abgeerntet und zur Herstellung einer Cytoplasma- und einer Membranfraktion verwendet.

10.1. Gewinnung der Zellfraktionen

- Reagenzien:
- a) K-phosphat-Puffer, Phosphat-Konzentration $0,50 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 7.0$
 - b) K-phosphat-Puffer, Phosphat-Konzentration $0,50 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 7.0$, zusätzlich mit $0,1$ bis $0,4 \text{ mol NaCl pro l}$, entsprechend dem Kulturmedium des jeweiligen Bakterienstammes
 - c) $\text{Na}_3\text{-citrat-Lösung}$, $0,12 \text{ mol/l}$; der pH-Wert wurde mit Citronensäure auf 6.5 eingestellt

Jeweils 5 bis 10 l einer Bakterienkultur wurden in verschraubbaren Zentrifugenbechern unter Stickstoffatmosphäre 15 min lang bei $100\,000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ unter Kühlung zentrifugiert (RC2-B, SORVALL); fädige Bakterien wurden nur bei $8000 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Bakterien ohne zugesetztes synthetisches Sediment wurden dann einmal in 400 ml K-phosphat-Puffer gewaschen; für Zellen aus Medien mit höherem Salzgehalt wurde dem Puffer vorher eine entsprechende Menge an NaCl zugesetzt. Fädige Bakterien wurden zur weitgehenden Entfernung des voluminösen Sediments (Aluminiumphosphat) zweimal in je 400 ml der genannten Natriumcitratlösung gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden dann in 10 bis 12 ml K-phosphat-Puffer der erwähnten Konzentration, jedoch nunmehr stets ohne Zusatz von NaCl, resuspendiert und unter Kühlung und mikroskopischer Kontrolle mit Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden in 15 min bei $4 \cdot 10^5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ unter Kühlung abzentrifugiert (RC2-B, SORVALL); der Aufschluß von Bakterien, die viel Schleim bildeten, wurde

bei nur $3 \cdot 10^4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Der erhaltene Überstand war der sogenannte zellfreie Extrakt.

Ein Teil des zellfreien Extrakts wurde dann in eine lösliche, die sogenannte Cytoplasmafraktion, und eine partikuläre, die Membranfraktion aufgetrennt. 7 bis 8 ml zellfreier Extrakt wurden 120 min lang bei $1,5 \cdot 10^6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ unter Kühlung zentrifugiert (Vacufuge, HERAEUS CHRIST). Der Überstand wurde in einem Eisbad aufbewahrt. Das Membranpellet wurde mit Hilfe eines Kolbenhomogenisators in 7 ml K-phosphat-Puffer der genannten Konzentration sorgfältig resuspendiert und nochmals 120 min lang bei $1,5 \cdot 10^6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Der nun erhaltene Überstand wurde mit dem ersteren vereinigt, wodurch die Cytoplasmafraktion erhalten wurde. Das gewaschene Membranpellet wurde erneut in 7 bis 8 ml K-phosphat-Puffer gründlich suspendiert und ergab so die Membranfraktion.

10.2. Bestimmung von Cytochromen

Die Cytoplasma- und die Membranfraktion wurden auf das Vorhandensein von Cytochromen geprüft. Zwei Küvetten, Schichtdicke 1,0 cm, Inhalt 1,0 ml, wurden mit der betreffenden Zellfraktion gefüllt. Bei stark absorbierenden Fraktionen wurde vorher mit K-phosphat-Puffer (s. 10.1.) verdünnt. Vorhandene Cytochrome lagen infolge der Aufarbeitung an der Luft bereits im oxidierten Zustand vor. Daher bedurfte es lediglich der Reduktion des Inhalts einer der Küvetten; dazu wurden mit einem dünnen Glasstab wenige Körnchen festes Natriumdithionit aufgenommen und mit dem betreffenden Küvetteninhalt kurz verrührt. Mit dem Photometer DMR 21 (ZEISS) wurde ein Differenzspektrum zwischen 400 und 600 nm aufgezeichnet: Die Anwesenheit von Cytochromen wurde anhand der α - und γ -Banden erkannt (BARTSCH, 1968); die β -Bande war häufig nur schwach ausgeprägt. Zum eindeutigen Nachweis von b- bzw. c-Typ-Cytochromen wurden die Cytoplasma- und die Membranfraktion nach der von WESTON und KNOWLES (1973) beschriebenen Methode durch Extraktion differenziert. Das Verfahren beruht darauf, daß b-Typ-Cytochrome das nicht-kovalent

gebundene Protohäm enthalten, welches mit einem Aceton-HCl-Gemisch extrahiert werden kann. c-Typ-Cytochrome enthalten dagegen Häm-Gruppen, welche über Schwefel-Brücken von Cystein kovalent gebunden und daher nicht extrahierbar sind (BARTSCH, 1968; KAMEN und HORIO, 1970).

Reagenzien: a) Aceton

b) Aceton-HCl:

HCl, 2,4 mol/l 20 ml

Aceton ad 1000 ml

Das Gemisch wurde vor Versuchsbeginn stets frisch angesetzt

c) Diäthyläther, Peroxid-frei

d) Pyridin-NaOH:

NaOH, 1,0 mol/l 100 ml

Pyridin 500 ml

dest. Wasser ad 1000 ml

Von der Cytoplasma- und der Membranfraktion wurden jeweils 5 ml in einem Erlenmeyer-Kolben (100 ml) bei -20°C eingefroren und lyophilisiert (GT 2, LEYBOLD-HERAEUS). Die völlig trockenen Rückstände wurden jeweils in Zentrifugenbechern aus Glas oder Polypropylen zweimal mit 30 ml Aceton übergossen, 1 min lang gerührt und 10 min lang bei $2 \cdot 10^5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ zentrifugiert. Die hier erhaltenen Überstände wurden verworfen. Die somit gewaschenen Pellets wurden viermal hintereinander mit jeweils 30 ml des Aceton-HCl-Gemischs unter Rühren extrahiert. Nach jedem Extraktionsgang, der etwa 2 min dauerte, wurden die Partikel abzentrifugiert. Der Rückstand wurde an der Luft getrocknet. Die aus je einer Fraktion erhaltenen Extrakte wurden vereinigt, mit einem Rotationsverdampfer (BÜCHI) auf etwa 8 ml eingedunstet und danach zweimal mit jeweils 20 ml Diäthyläther in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die jeweiligen zwei Ätherextrakte

wurden vereinigt, einmal mit 20 ml destilliertem Wasser im Scheidetrichter gewaschen und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Die aus den Ätherphasen erhaltenen Rückstände wurden dann ebenso wie die trockenen Pellets der Aceton-HCl-Extraktion in je 5 ml Pyridin-NaOH aufgenommen; die Pellets konnten nur langsam und unter gründlichem Rühren gelöst werden. Von den erhaltenen Lösungen in Pyridin-NaOH wurden Redox-Differenzspektren aufgenommen, so wie es oben beschrieben ist. Bei hohem Gehalt an Cytochromen wurde mit Pyridin-NaOH noch weiter verdünnt.

Hatten Cytoplasma- bzw. Membranfraktion b-Typ-Cytochrome enthalten, so lagen deren Protohäm-Gruppen nunmehr in denjenigen Pyridin-NaOH-Lösungen vor, mit welchen die Aceton-HCl-Extrakte aufgenommen worden waren. Angaben über Absorptionsbanden des Redox-Differenzspektrums von Protohäm in Pyridin-NaOH finden sich bei FALK (1964, S. 241). Die c-Typ-Cytochrome waren, soweit vorhanden, im Rückstand der Aceton-HCl-Extraktion verblieben und wurden somit in der daraus erhaltenen Pyridin-NaOH-Lösung nachgewiesen.

10.3. Nachweis von Desulfovirdin

Vom zellfreien Extrakt wurde ohne weitere Vorbehandlung das Absorptionsspektrum gegenüber Wasser mit dem Photometer DMR 21 (ZEISS) aufgenommen. War Desulfovirdin vorhanden, so war ein deutlich ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei etwa 630 nm zu erkennen (POSTGATE, 1956).

Ferner wurde Desulfovirdin nach dem von POSTGATE (1959 b) beschriebenen Fluoreszenz-Test nachgewiesen. Dafür wurden etwa 0,5 ml zellfreier Extrakt in einem dunklen Raum unter einer UV-Lampe einer Wellenlänge von 365 nm ausgesetzt und mit einem kleinen Tropfen Natronlauge, ca. 2 mol/l, vermischt. Bei Anwesenheit von Desulfovirdin fluoreszierte der zellfreie Extrakt dann sofort leuchtend hellrot.

Um über die Löslichkeit von Desulfovirdin Auskunft zu erhalten, wurde auch jeweils die aus dem zellfreien Extrakt hergestellte Cytoplasma- bzw. Membranfraktion (s. 10.1.) auf Desulfovirdin geprüft.

10.4. Kohlenmonoxid-Differenzspektren

Zum Nachweis der Sulfit-Reduktase P-582 wurden Kohlenmonoxid-Differenzspektren aufgenommen (TRUDINGER, 1970). Sowohl Cytoplasma- als auch Membranfraktion wurden geprüft. Zwei Küvetten, Schichtdicke 1,0 cm, Inhalt 1,0 ml, wurden mit der betreffenden Zellfraktion beschickt. Der Inhalt beider Küvetten wurde mit Dithionit reduziert (s. 10.2.). In eine der Küvetten wurde über eine feine Kanüle 1 min lang Kohlenmonoxid in Form sehr feiner Gasblasen eingeleitet; die Küvette wurde dabei und auch hernach mit schwarzem Papier vor Licht geschützt. Mit dem Photometer DMR 21 (ZEISS) wurde dann das Differenzspektrum gegenüber der nicht mit Kohlenmonoxid begasten, aber ebenfalls reduzierten Fraktion aufgenommen. Waren gleichzeitig Cytochrome vorhanden, die ebenfalls mit Kohlenmonoxid reagierten, so überlagerte deren Spektrum das von eventuell vorhandenem P-582. In solchen Fällen wäre zum eindeutigen Nachweis von P-582 eine chromatographische Auftrennung der Pigmente erforderlich, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

11. Bestimmung des GC-Gehalts der DNS

Der GC-Gehalt der DNS (Gehalt an Guanin + Cytosin in mol%) wurde von Herrn Dr. H. Hippe, Göttingen, durch thermische Denaturierung ermittelt. Eine Beschreibung der Methode findet sich bei HUNGER (1978).

Das benötigte Zellmaterial wurde in Kulturvolumina von 5 bis 10 l angezogen. Den Kulturen fädiger Bakterien wurde als synthetisches Sediment wiederum Aluminiumphosphat zugesetzt. Sobald keine nennenswerte Zunahme der Bakteriendichte mehr zu

beobachten war, wurden die Zellen bei $100\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ unter Kühlung abzentrifugiert; fädige Bakterien wurden bei nur $8000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ abzentrifugiert. Die fädigen Bakterien wurden, wie bereits unter 10.1. beschrieben, durch zweimaliges Waschen in jeweils 400 ml Natriumcitrat-Lösung, 120 mmol/l, pH = 6.5, weitgehend vom zugesetzten Sediment befreit. Die Zellpellets wurden stets in einem Eisbad gehandhabt und möglichst bald zur Bestimmung des GC-Gehalts verwendet. Zum Vergleich diente Escherichia coli K 12 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, mit einem GC-Gehalt von 51,7 mol%.

12. Chemische Analysen

12.1. Bestimmung von Schwefelwasserstoff nach PACHMAYR

Schwefelwasserstoff wurde quantitativ nach der von PACHMAYR (1960) angegebenen Methode bestimmt. Dabei wird H_2S zunächst als ZnS gebunden, das gegen Luft längere Zeit beständig ist. Durch Zusatz einer stark sauren Lösung eines N,N-Dimethyl-1,4-phenyldiammonium-Salzes wird H_2S wieder freigesetzt, welches mit dem Diamin zu der reduzierten, farblosen Form von Methylenblau reagiert; diese wird mit Fe^{3+} -Ionen zu der blauen Form oxidiert, deren Konzentration man photometrisch bestimmt.

Reagenzien: a) Zinkacetat-Lösung:

$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24 g
Essigsäure, 20 Vol.%	1 ml
dest. Wasser	ad 1000 ml

Das Zinkacetat wurde zunächst mit der verdünnten Essigsäure beträufelt; nach dem Auffüllen mit Wasser wurde die Lösung stets gut verschlossen aufbewahrt.

b) Diamin-Reagenz:

dest. Wasser	600 ml
H_2SO_4 , konzentriert	200 ml
N,N-Dimethyl-1,4-phenyldiammoniumdichlorid	2 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

Nach der Zugabe der Schwefelsäure zum ersten Teil des Wassers wurde die Mischung abgekühlt. Erst dann wurde das Diamin zugesetzt. Die Lösung wurde auf das endgültige Volumen aufgefüllt und stets vor Licht geschützt.

c) Eisen(III)-Lösung:

$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10 g
H_2SO_4 , konzentriert	2 ml
dest. Wasser	ad 100 ml

Das Eisensalz wurde mit der konzentrierten Schwefelsäure beträufelt, mit dem größten Teil des destillierten Wassers versetzt und unter Erhitzen und Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen wurde auf das endgültige Volumen aufgefüllt.

d) $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, frisch

e) HCl, 0,100 mol/l

f) Jod-Lösung (Titrisol, MERCK), 0,100 mol J/l

g) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (Titrisol, MERCK), 0,050 mol/l bzw. 0,100 N

h) Stärke-Lösung:

lösliche Stärke	1 g
dest. Wasser	ad 100 ml

Die Stärke wurde unter Erwärmen gelöst.

beobachten war, wurden die Zellen bei $100\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ unter Kühlung abzentrifugiert; fädige Bakterien wurden bei nur $8000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ abzentrifugiert. Die fädigen Bakterien wurden, wie bereits unter 10.1. beschrieben, durch zweimaliges Waschen in jeweils 400 ml Natriumcitrat-Lösung, 120 mmol/l, pH = 6.5, weitgehend vom zugesetzten Sediment befreit. Die Zellpellets wurden stets in einem Eisbad gehandhabt und möglichst bald zur Bestimmung des GC-Gehalts verwendet. Zum Vergleich diente Escherichia coli K 12 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, mit einem GC-Gehalt von 51,7 mol%.

12. Chemische Analysen

12.1. Bestimmung von Schwefelwasserstoff nach PACHMAYR

Schwefelwasserstoff wurde quantitativ nach der von PACHMAYR (1960) angegebenen Methode bestimmt. Dabei wird H_2S zunächst als ZnS gebunden, das gegen Luft längere Zeit beständig ist. Durch Zusatz einer stark sauren Lösung eines N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammonium-Salzes wird H_2S wieder freigesetzt, welches mit dem Diamin zu der reduzierten, farblosen Form von Methylenblau reagiert; diese wird mit Fe^{3+} -Ionen zu der blauen Form oxidiert, deren Konzentration man photometrisch bestimmt.

Reagenzien: a) Zinkacetat-Lösung:

$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24 g
Essigsäure, 20 Vol.%	1 ml
dest. Wasser	ad 1000 ml

Das Zinkacetat wurde zunächst mit der verdünnten Essigsäure beträufelt; nach dem Auffüllen mit Wasser wurde die Lösung stets gut verschlossen aufbewahrt.

b) Diamin-Reagenz:

dest. Wasser	600 ml
H_2SO_4 , konzentriert	200 ml.
N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid	2 g
dest. Wasser	ad 1000 ml

Nach der Zugabe der Schwefelsäure zum ersten Teil des Wassers wurde die Mischung abgekühlt. Erst dann wurde das Diamin zugesetzt. Die Lösung wurde auf das endgültige Volumen aufgefüllt und stets vor Licht geschützt.

c) Eisen(III)-Lösung:

$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10 g
H_2SO_4 , konzentriert	2 ml
dest. Wasser	ad 100 ml

Das Eisensalz wurde mit der konzentrierten Schwefelsäure beträufelt, mit dem größten Teil des destillierten Wassers versetzt und unter Erhitzen und Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen wurde auf das endgültige Volumen aufgefüllt.

d) $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, frisch

e) HCl, 0,100 mol/l

f) Jod-Lösung (Titrisol, MERCK), 0,100 mol J/l

g) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (Titrisol, MERCK), 0,050 mol/l bzw. 0,100 N

h) Stärke-Lösung:

lösliche Stärke	1 g
dest. Wasser	ad 100 ml

Die Stärke wurde unter Erwärmen gelöst.

In einen Meßzylinder für 100 ml wurden 20 ml Zinkacetat-Lösung gegeben. Mit einer Enzympipette wurde das betreffende Probevolumen in die Zinkacetat-Lösung gegeben, wobei die Pipettenspitze in die Flüssigkeit eingetaucht wurde. Pro Kolben sollten zwischen etwa 0,5 und 2 μmol Sulfid vorhanden sein. Dann wurden 50 ml destilliertes Wasser und 10 ml Diamin-Reagenz zugesetzt. Nach dem Umschwenken des Kolbens wurden sogleich 0,5 ml der Eisen(III)-Lösung zugegeben und wiederum mit dem Inhalt vermischt. Nach 10 min wurde mit destilliertem Wasser genau auf 100 ml aufgefüllt. Mit dem Photometer PM 4 (ZEISS) wurde die Extinktion des Ansatzes bei 670 nm in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Als Referenzwert diente ein parallel hergestellter Ansatz ohne Sulfid.

Zur Aufnahme einer Eichkurve diente eine Na_2S -Lösung bekannter Konzentration. Destilliertes Wasser wurde gekocht und unter Stickstoffatmosphäre in einem Meßzylinder für 1000 ml abgekühlt. Ein frischer, einheitlich durchsichtiger Kristall aus $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ von schätzungsweise 2 g wurde genau gewogen und in dem Kolben unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde dann mit ausgekochtem Wasser bis zur Strichmarke auf 1000 ml aufgefüllt. Die aus der Einwaage berechnete Sulfid-Konzentration wurde titrimetrisch nachgeprüft. In eine Flasche mit 250 ml Inhalt, die einen Rührmagneten enthielt, wurden 75,0 ml HCl , 0,100 mol/l, und 25 ml Jod-Lösung, 0,100 mol/l, gegeben. Dieser Lösung wurden unter Rühren langsam 100 ml der hergestellten Sulfid-Lösung aus einer Meßpipette zugesetzt, wobei die Pipettenspitze in die Flüssigkeit eintauchte. Dabei wurde H_2S zu Schwefel oxidiert. Das durch H_2S nicht reduzierte Jod wurde mit der Thiosulfat-Lösung, 0,100 mol/l, zurücktitriert. War die Lösung durch Jod nur noch schwach gelblich gefärbt, so wurden zum besseren Erkennen des Titrationsendpunktes ein bis zwei Tropfen der Stärke-Lösung zugegeben. Thiosulfat wurde bei dieser Titration stöchiometrisch zu Tetrathionat oxidiert. Die Ansäuerung des Reaktionsansatzes mit Salzsäure war erforderlich, weil sonst sowohl die Oxidation von Sulfid als auch die von Thiosulfat durch Jod nicht zu Schwefel bzw. Tetrathionat

führt, sondern zu höher oxidierten Schwefelverbindungen. Aus der Einwaage eines Natriumsulfid-Kristalls war eine Konzentration von 8,74 mmol S^{2-}/l errechnet worden; durch die Titration wurde ein Gehalt von 8,70 mmol S^{2-}/l ermittelt. Beide Werte stimmten also gut überein. Durch Vorgabe verschiedener Mengen Sulfid-Lösung zu Bestimmungsansätzen wurden Extinktionswerte zur Aufstellung einer Eichkurve erhalten. Bei der Untersuchung einer Probe wurde die Menge Sulfid pro Reaktionsansatz über die Extinktion direkt aus der Kurve abgelesen und auf das Probevolumen bezogen.

12.2. Schnellnachweis für Schwefelwasserstoff

Zur Prüfung auf gebildeten Schwefelwasserstoff in einer größeren Anzahl von Anreicherungen oder Testansätzen zur Substratverwertung genügte häufig eine qualitative Nachweismethode. Für diesen Zweck wurde ein einfacher, schnell durchzuführender Nachweis entwickelt, der auf der Ausfällung von braunem Kupfersulfid beruht, welches zunächst kolloidal entsteht.

Reagenz:	HCl	50	mmol/l
	CuSO_4	5,0	mmol/l

Das Reagenz wurde in Portionen von 2 ml auf Röhrchen verteilt. In diese Ansätze wurden aus den zu prüfenden Kulturen jeweils 0,5 ml pipettiert und sofort durch kurzes Schütteln vermischt. Zum Vergleich von Kulturen mit sehr starker Bildung von H_2S wurden kleinere, aber für eine Meßreihe jeweils gleiche Probevolumina eingesetzt. Während der H_2S -Gehalt nicht beimpfter Kulturmedien nur eine schwache gelbbraune Färbung verursachte, lieferten Medien, in denen eine Sulfatreduktion stattgefunden hatte, eine mehr oder weniger stark braune Färbung. Die Intensitäten dieser Färbung in einer Reihe von Ansätzen wurden miteinander verglichen, bevor das Kupfersulfid in Form dunkler Flocken ausfiel.

12.3. Nachweis von Sulfat

Reagenzien: a) HCl 1,0 mol/l
 b) BaCl₂ 0,2 mol/l

Die Nachweismethode für Sulfat wurde angewandt, um rein qualitativ auf Anwesenheit bzw. vollständigen Verbrauch von Sulfat zu prüfen. 5 ml Kulturüberstand wurden mit 1 ml der verdünnten Salzsäure und dann mit 2 ml BaCl₂-Lösung versetzt. Bei Anwesenheit von Sulfat entstand eine milchige Trübung von BaSO₄, die allmählich als weißer Niederschlag ausfiel.

12.4. Bestimmung von Ammonium

Ammonium in Kulturmedien wurde als Ammoniak destilliert und titrimetrisch bestimmt.

Reagenzien: a) HCl 1,0 mol/l
 b) NaOH 5,0 mol/l
 c) H₃BO₃, 20 g/l (0,3 mol/l)
 d) H₂SO₄ (Titrisol, MERCK),
 0,010 mol/l bzw. 0,020 N

20 ml Kulturmedium wurden in einen Rundkoben (100 ml Inhalt) für eine Wasserdampf-Destillierapparatur (BÜCHI) gegeben und mit 1,0 ml der verdünnten Salzsäure versetzt. Durch Einleiten von CO₂ wurde H₂S ausgetrieben. Der Kolben wurde mit der Destillierapparatur verbunden. Über eine Einfüllvorrichtung wurde 1,0 ml der konzentrierten Natronlauge zugegeben. Der Auslaufstutzen am Ende der Kühltülle der Apparatur wurde in eine Vorlage aus 20 ml Borsäure-Lösung eingetaucht. Sogleich wurden mit Wasserdampf 60 ml überdestilliert. Anschließend wurde das Destillat mit der verdünnten Schwefelsäure titriert, wobei der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters verfolgt wurde. Der

Äquivalenzpunkt war der Wendepunkt in der graphischen Auftragung des pH-Werts gegen die zugegebene Menge an H₂SO₄.

12.5. Prüfung auf Nitrit

Auf eine Bildung von Nitrit im Kulturmedium wurde nur qualitativ geprüft.

Reagenzien: a) Sulfanilsäure-Lösung:

Sulfanilsäure 0,3 g
 dest. Wasser ad 100 ml

Die Sulfanilsäure wurde unter Erwärmen gelöst.

b) α-Naphthylamin-Lösung:

α-Naphthylamin 0,2 g
 dest. Wasser 45 ml
 Essigsäure ad 100 ml

α-Naphthylamin wurde zunächst in siedendem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurde mit Essigsäure aufgefüllt. Die Lösung wurde im Dunkeln gelagert.

2 ml der zu prüfenden Kulturflüssigkeit wurden durch Einleiten von CO₂ von H₂S befreit. Dann wurden 0,5 ml Sulfanilsäure-Lösung und 0,5 ml α-Naphthylamin-Lösung zugesetzt. Bei Anwesenheit von Nitrit färbte sich der Ansatz alsbald rot bis rotviolett.

12.6. Bestimmung von Acetat, Propionat und Butyrat

Die flüchtigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat wurden als freie Säuren mit dem Gaschromatographen F 22 (PERKIN ELMER) bestimmt.

Säule: Porapak QS, 100 - 120 mesh (WATERS, WGA, Düsseldorf);
Länge 2,0 m; Innendurchmesser 2 - 2,5 mm;
Betriebstemperatur 180 °C

Die Säule grenzte direkt an das Septum des Injektors, sodaß die Probe in den vorderen leeren Abschnitt der Säule gespritzt werden konnte. Vor den Analysen wurde die Säule 12 Stunden lang bei 230 °C mit strömendem Trägergas ausgeheizt.

Trägergas: 95 % N₂, 5 % CO₂; Strömungsgeschwindigkeit 70 ml/min

Injektor: Betriebstemperatur 230 °C

Detektor: FID (Flammenionisationsdetektor), betrieben mit H₂ und synthetischer Luft; Betriebstemperatur 200 °C

Die organischen Säuren wurden durch Ansäuern der zu untersuchenden Probe freigesetzt.

Reagenzien: a) HCl, verdünnt 1,0 mol/l
b) HCl, konzentriert 12 mol/l

Zur Analyse von Kulturüberständen wurden in ein kleines Röhrchen 0,10 ml verdünnte Salzsäure und 0,90 ml der betreffenden Probe gegeben. H₂S wurde durch kurzzeitiges Einleiten von CO₂ ausgetrieben. Mit einer Mikroliter-Spritze (HAMILTON) wurden 5,0 µl dieser angesäuerten Probe in den Injektor des Gaschromatographen gespritzt. Die Konzentrationen wurden aus den Peakflächen mit Hilfe eines Computing Integrators, Autolab System II (SPECTRA PHYSICS) ermittelt. Mit Hilfe von Standard-Lösungen verschiedener, genau bekannter Konzentrationen wurde vor jeder Meßreihe eine Eichkurve erstellt.

Zur Reinheitsprüfung von Formiat wurden 0,90 ml der Stammlösung (1,0 mol Formiat pro l, s. 3.4.1.) mit 0,10 ml konzentrierter Salzsäure versetzt; es wurden wiederum 5,0 µl injiziert.

12.7. Nachweis von Benzoat

Benzoat wurde von Herrn Dr. E. Schmidt, Göttingen, mit Hilfe eines Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen direkt im Kulturmedium bestimmt; die Methode wurde von REINECKE (1976) beschrieben. Durch Einleiten von CO₂ wurde die Probe vorher von H₂S befreit. Das Nachweisverfahren wurde angewandt, um auf vollständigen Verbrauch von Benzoat in ausgewachsenen Kulturen zu prüfen. Als Kontrolle diente ein unbeimpftes Medium mit 1 mmol Benzoat pro l.

12.8. Nachweis von Formiat

Formiat wurde nach der Methode von LANG und LANG (1972) colorimetrisch bestimmt. Dem Nachweis liegt eine noch nicht aufgeklärte Reaktion zugrunde, bei welcher eine aus Citronensäure gebildete, grüngelb fluoreszierende Verbindungen spezifisch mit Formiat zu einem roten Farbstoff reagiert.

Reagenzien: a) Citronensäure-Reagenz:

Citronensäure-1-hydrat 0,5 g
Acetamid 10 g
Propanol-(2) ad 100 ml

Die Substanzen lösten sich nur langsam.

b) Acetat-Lösung:

Na(CH₃COO) 30 g
dest. Wasser ad 100 ml

c) Essigsäureanhydrid

0,50 ml Probelösung wurden mit 1,0 ml Citronensäure-Reagenz, 0,04 ml Acetat-Lösung und 3,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt, gut vermischt und in einem Wasserbad 30 min lang bei 50 °C

inkubiert; dabei wurde der Ansatz häufiger mit einem Glasstab umgerührt. Anschließend wurde mit dem Photometer PM 4 (ZEISS) die Extinktion bei 515 nm gegen einen Ansatz ohne Formiat als Leerwert gemessen.

Die Methode wurde in dieser Arbeit benutzt, um auf einen vollständigen Verbrauch von Formiat in Kulturüberständen zu prüfen. 50 ml vom betreffenden Kulturüberstand wurden durch Einleiten von CO_2 von H_2S befreit und mit einem Rotationsverdampfer auf etwa 3 ml eingengt. Die infolge des angestiegenen pH-Werts und der Konzentrierung ausgefallenen Carbonate und Phosphate wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der pH-Wert des Überstands wurde mit HCl auf 7.5 eingestellt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 5,0 ml aufgefüllt. Von der auf diese Weise 10fach konzentrierten Probelösung wurden dann 0,50 ml für den oben beschriebenen Nachweis eingesetzt. Als Leer- bzw. Vergleichswert dienten ein Kulturmedium ohne Formiat und ein Kulturmedium mit frisch zugesetztem Formiat, 1,0 mmol/l; beide Kulturmedien wurden auf die gleiche Art wie die Probe 10fach konzentriert.

12.9. Bestimmung von Succinat und Fumarat

Succinat und Fumarat wurden nach der von LAANBROEK et al. (1977) angewandten Methode als Methylester mit dem Gaschromatographen F 22 (PERKIN ELMER) bestimmt.

Säule: Chromosorb W AW mit 10 % SP 1000 + 3 % H_3PO_4 , 100 - 120 mesh (SUPELCO, ICT, Frankfurt); Länge 2,0 m; Innendurchmesser 2 - 2,5 mm; Betriebstemperatur 120 °C.

Die Säule grenzte direkt an das Septum des Injektors. Vor den Analysen wurde die Säule 12 Stunden lang bei 160 °C mit strömendem Trägergas ausgeheizt.

Trägergas: 95 % N_2 , 5 % CO_2 ; Strömungsgeschwindigkeit 40 ml/min.

Injektor: Betriebstemperatur 180 °C

Detektor: FID, betrieben mit H_2 und synthetischer Luft; Betriebstemperatur 160 °C.

Die Dicarbonsäuren in der zu untersuchenden Probe wurden mit Methanol verestert. Als interner Standard diente Malonsäure.

Reagenzien: a) Malonsäure-Lösung, 5,0 mmol/l
b) H_2SO_4 , 50 Vol.-%
c) Methanol
d) Butylacetat
e) Succinat-Fumarat-Gemisch, jeweils 5,0 mmol/l

Reaktionsansatz: 0,5 ml Probelösung
0,5 ml Malonsäure-Lösung als interner Standard
0,4 ml H_2SO_4 , 50 Vol.-%
2,0 ml Methanol

Der Reaktionsansatz wurde in einem kleinen Röhrchen gut vermischt und 30 min lang in einem Wasserbad bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden noch folgende Zusätze in das Röhrchen gegeben:

1,0 ml dest. Wasser
1,0 ml Butylacetat

Das Röhrchen wurde unter Verschluss 20mal gut geschüttelt. Nachdem sich die Phasen getrennt hatten, wurden 2,0 μl aus der oberen Phase mit einer Mikroliter-Spritze in den Gaschromatographen injiziert. Zur Auswertung dienten die Peakhöhen. Das Succinat-Fumarat-Gemisch wurde als Bezugslösung verwendet und ebenso wie die Probelösung verestert.

12.10. Bestimmung von Methan

Methan in der Gasphase einer Kultur wurde mit dem Gaschromatographen F 22 (PERKIN ELMER) bestimmt.

Säule: Porapak QS, 80 - 100 mesh (WATERS, WGA, Düsseldorf);
Länge 2,0 m; Innendurchmesser 2 - 2,5 mm;
Betriebstemperatur 75 °C.

Trägergas: N₂; Strömungsgeschwindigkeit 25 ml/min

Injektor: Betriebstemperatur 100 °C

Detektor: FID, betrieben mit H₂ und synthetischer Luft;
Betriebstemperatur 100 °C

Aus der Gasphase eines Kulturgefäßes wurden mit einer Mikroliter-Spritze 2,0 µl entnommen, indem die Kanüle vorsichtig zwischen Stopfen und Glaswandung hindurch bis in den Gasraum geschoben wurde. Das entnommene Volumen wurde sofort in den Gaschromatographen injiziert. Zum Vergleich wurden 1 bis 2 µl reines Methan aus einer Gasflasche eingespritzt.

13. Stöchiometrie von Substratumsetzungen

Für Wachstumsversuche zur Ermittlung der Reaktionsgleichungen von Substratumsätzen mit gleichzeitiger Ertragsbestimmung dienten Flaschen, deren Inhalt etwas mehr als 1 l betrug. In die Flaschenhalse wurden Eichmarken in der Weise eingeritzt, daß das spätere Gasvolumen über der Flüssigkeit bis zu diesen Eichmarken nur etwa 5 ml betrug. Das genaue Fassungsvermögen einer Flasche bis zur Eichmarke wurde dann jeweils durch Ausmessen mit Wasser bestimmt. Das Medium wurde in diesen Flaschen direkt zubereitet, so wie es unter 3.1.2. beschrieben ist. Bei der Fertigstellung des Grundmediums nach dem Autoklavieren wurde soviel Na₂S aus der sterilen Stammlösung (s. 3.2.) zugeetzt, daß die Endkonzentration in allen Flaschen genau gleich

war. Das Volumen des Grundmediums in den Flaschen wurde so bemessen, daß die Flüssigkeitsoberfläche auch nach Zusatz der Substrate und des Impfvolumens immer noch etwas unterhalb der Eichmarke lag. Unterschiedliche Mengen der betreffenden Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren, deren Umsatz es zu messen galt, wurden aus Stammlösungen genau bekannter Konzentration in die autoklavierten Flaschen pipettiert; diese Stammlösungen waren in dicht verschlossenen Gefäßen getrennt autoklaviert bzw. sterilfiltriert worden (s. 2.3. bzw. 3.4.), sodaß deren Konzentration unverändert geblieben war. Nach Zusatz der Substrate wurden die Ansätze zu gleichen Anteilen mit der jeweiligen Vorkultur beimpft und aus dem separat autoklavierten Teilmedium (s. 3.1.2.) bis zur Eichmarke aufgefüllt. Verbindungen, die in höheren Konzentrationen giftig wirkten, wurden portionsweise in gewissen Zeitabständen während des Wachstums zugesetzt; für diese Fälle wurden die Flaschen nur soweit aufgefüllt, daß ein vorher berechneter Raum zwischen Flüssigkeitsoberfläche und Eichmarke blieb, der dem Volumen der noch zuzusetzenden Lösung entsprach. Die Flaschen wurden dann in einem Wasserbad auf die Inkubationstemperatur erwärmt und nach der Hungate-Technik anaerob verschlossen. Die ausgewachsenen Kulturen wurden dann wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Zuerst wurde der gebildete Schwefelwasserstoff nach 12.1. gemessen. Für die Bestimmung organischer Verbindungen wurden 3 bis 4 ml entnommen, durch Einleiten eines CO₂-Stroms von H₂S befreit und bis zur Analyse eingefroren. Das übrige Kulturvolumen diente dann zur Ermittlung der jeweils gebildeten Bakterienmasse nach 6.3.; die dabei erhaltenen Überstände wurden eventuell noch auf Sulfat geprüft (s. 12.3.).

Für stöchiometrische Messungen mit Palmitat wurden die Medien in den Flaschen nach 3.3.2. zunächst ohne NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ hergestellt. Die einzusetzenden unterschiedlichen Mengen an Palmitinsäure wurden für jeden Ansatz einzeln abgewogen und in kleinen Kolben mit etwas Wasser und der äquimolaren Menge NaOH in einem siedenden Wasserbad gelöst (s. 3.4.1.). Die Palmitatlösungen wurden heiß in die betreffenden Kulturgefäße gegeben;

die Kolben wurden mit etwas heißem destilliertem Wasser nachgespült, sodaß auch die verbliebenen Reste in die Kulturgefäße überführt wurden. Erst dann wurden NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ aus den konzentrierten Stammlösungen zugesetzt.

Wenn die bei der Umsetzung eines Substrats gebildete Bakterienmasse nicht bestimmt werden sollte, so waren zur Ermittlung der Stöchiometrie auch Flaschen mit 50 ml Inhalt ausreichend (s. 2.5.). Das genaue Volumen dieser Flaschen wurde vorher ausgemessen, um auch hier die Menge der zuzusetzenden Substrate exakt berechnen zu können. Sollte bereits vor der Inkubation eine Probe zur Bestimmung von Schwefelwasserstoff entnommen werden, so wurden anschließend soviele sterile Glasperlen oder Glasstäbchen in die Flasche gegeben, daß diese wieder vollständig gefüllt war; auf diese Weise wurde der entstandene Gasraum über der Flüssigkeit vor dem endgültigen Verschließen wieder aufgefüllt, ohne daß die Konzentrationen von Bestandteilen des Mediums verändert wurden.

14. Prüfung auf Vorhandensein des Calvin-Cyclus

Die Frage, ob autotroph wachsende Sulfatreduzierer CO₂ über den Calvin-Cyclus fixierten, wurde von Herrn Dr. B. Bowien, Göttingen, untersucht. Dabei wurde auf das Vorhandensein des entscheidenden Enzyms, der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, geprüft: In ganzen, permeabilisierten Zellen und auch in Extrakten wurde der Einbau von ¹⁴C-markiertem CO₂ gemessen.

15. Chemikalien

Die Mehrzahl der verwendeten Chemikalien waren die handelsüblichen der Firma MERCK, Darmstadt, in den Reinheitsgraden "zur Analyse", "reinst" und "zur Synthese".

Von anderen Firmen wurden folgende Chemikalien bezogen:

BAKER, Groß-Gerau: Milchsäure; Natriumstannat.

BDH, Poole/England: Laurinsäure; Natriumthiosulfat.

DIFCO, Detroit, Mich./USA: Agar; Hefeextrakt; Pepton.

EGA, Steinheim: Adipinsäure; Hämin; 3-Hydroxybenzoesäure; 4-Hydroxybenzoesäure; 3-Indolylessigsäure; 3-Phenylpropionsäure; Pimelinsäure; 3-Methylbuttersäure.

FLUKA, Neu-Ulm: Capronsäure; Myristinsäure; Uranylacetat.

RIEDEL-DE HAËN, Seelze/Hannover: Propionsäure; Buttersäure; Cyclohexancarbonsäure.

SERVA, Heidelberg: DL- α -Liponsäure.

C. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Anreicherung und Isolierung Sulfat-reduzierender Bakterien mit Fettsäuren und Benzoat

1.1. Anreicherung und Isolierung eines ersten Sulfat-reduzierenden Bakteriums mit Acetat: *Desulfotomaculum acetoxidans*

Anreicherungskulturen für phototrophe Purpurbakterien mit Acetat als einzigem organischen Substrat waren in einigen Fällen durch die Bildung von Schwefelwasserstoff aufgefallen (s. A.1.). Als Nährlösung war ein rein mineralisches Grundmedium für Purpurbakterien ohne Sulfid verwendet worden, dem 20 mmol Bicarbonat und 10 mmol Acetat pro l sowie das Vitamin-Gemisch und Vitamin B₁₂ (s. B.3.4.4.) zugesetzt worden waren. Der Gehalt an Sulfat war durch das üblicherweise verwendete MgSO₄ bedingt und betrug etwa 2 mmol/l. Zur Untersuchung der beobachteten Bildung von H₂S in Folgepassagen im Dunkeln wurde der Sulfat-Gehalt durch Zusatz von Na₂SO₄ auf 20 mmol/l erhöht. Ein Reduktionsmittel wurde den Anreicherungskulturen noch nicht zugesetzt; der gelöste Sauerstoff wurde entfernt, indem das Medium lediglich in einem evakuierten Gefäß magnetisch gerührt und anschließend mit einem Gemisch aus 90 % N₂ und 10 % CO₂ begast wurde. Als Kulturgefäße dienten Flaschen mit 100 ml Inhalt, die vollständig gefüllt und mit Schraubdeckeln verschlossen wurden (s. B.2.5. und B.3.5.1.). In vielen Folgepassagen kam es dann zu einer kräftigen Bildung von H₂S. Anhand von Kontrollansätzen ohne Acetat oder ohne Sulfat konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Schwefelwasserstoff durch eine Reduktion von Sulfat mit Acetat zustande kam. In den Medien, in welchen Schwefelwasserstoff produziert wurde, entwickelten sich gleichzeitig große, stäbchenförmige, bewegliche Bakterien mit zugespitzten Enden. In älteren Kulturen wurden viele dieser Zellen spindelförmig und bildeten lichtbrechende Einschlüsse, die Sporen und Gasvakuolen ähnelten. Diese Sulfat-reduzierenden Anreicherungen wuchsen noch besser, wenn die anfangs gewählte

Inkubationstemperatur von 29 °C noch etwas erhöht wurde; als optimal für die Anzucht erwies sich eine Temperatur von 35 bis 36 °C, die daher für alle weiteren Passagen beibehalten wurde. Es galt nun, zu prüfen, ob die Sulfatreduktion mit Acetat in den Anreicherungen durch die beobachteten großen Bakterien verursacht wurde, oder ob noch andere Mikroorganismen an der Umsetzung beteiligt waren. Daher wurde versucht, aus den Anreicherungen mit Hilfe von Agar-Schüttelkulturen Reinkulturen zu isolieren.

Für die Agar-Schüttelkulturen wurde nunmehr steriles Medium mit zugesetztem Sulfid als Reduktionsmittel verwendet. Die Schüttelkulturen wurden nach B.4.1. hergestellt, allerdings zu diesem Zeitpunkt noch ohne Zusatz von Dithionit. Nach zwei Wochen hatten sich im Agar Kolonien der großen, stäbchenförmigen Bakterien entwickelt, aber stets nur in den unteren drei Verdünnungsstufen; in höheren Verdünnungsstufen waren diese Bakterien nie zu finden, auch nicht nach längerer Wartezeit. Aufgrund der vorgenommenen Verdünnungen hätte man jedoch auch in den höheren Verdünnungsstufen durchaus noch Kolonien erwarten können. Die Kolonien der großen Bakterien waren grauweiß und hatten eine sehr fein und regelmäßig granuliert Oberfläche. Aus den unteren Verdünnungsstufen wurden Kolonien abgeimpft und in zweite Agar-Schüttelkulturen überführt. Auch in zweiten und noch weiteren Agar-Schüttelkulturen endete das Wachstum der Kolonien stets abrupt nach der dritten Verdünnungsstufe. Alle gefundenen Kolonien der großen, stäbchenförmigen Bakterien waren mit Spirochäten oder anderen kleinen, sehr schlanken und biegsamen Bakterien verunreinigt.

Nun war während der Anreicherungen aufgefallen, daß etliche Folgepassagen erst nach einer langen Anlaufphase wuchsen, einige sogar überhaupt nicht. Wenn schließlich Kolonien aus den Agar-Schüttelkulturen in flüssiges Medium überimpft wurden, so vermehrten sich die großen Bakterien nur noch in den wenigsten Fällen und dann stets zusammen mit den kleinen Begleitern. Wurden diese bereits etwas vorgereinigten Bakterienkulturen

weiter in flüssiges Medium übertragen, so kam es ebenfalls nur noch selten zu einem Wachstum. Wenn aber das Wachstum in einem Ansatz nach einer längeren Verzögerung schließlich doch einsetzte, so entwickelten sich die Bakterien ebensogut wie in anderen, sofort gewachsenen Passagen. Den mit Kolonien beimpften Medien wurde dann Hefeextrakt (s. B.3.4.7.) zugesetzt. Die kleinen Begleiter vermehrten sich daraufhin stärker, und stets wuchsen dann auch die großen Bakterien alsbald unter Bildung von H_2S . Daher wurde vermutet, daß das zum Wachstum der großen Bakterien erforderliche Milieu erst durch die kleinen Begleiter geschaffen wurde. Als wichtiger Milieufaktor mußte vor allem das Redoxpotential berücksichtigt werden. In den hier verwendeten Medien war Sulfid das Reduktionsmittel. Es war denkbar, daß die großen Bakterien zum Wachstum oder für den Wachstumsbeginn ein noch niedrigeres Redoxpotential benötigten als das durch die Vorgabe von Natriumsulfid bedingte. Tatsächlich wuchsen die Bakterien stets und ohne Verzögerung, auch in Abwesenheit von Hefeextrakt, wenn den Nährmedien nach dem Beimpfen das starke Reduktionsmittel Dithionit zugesetzt wurde (s. B.3.4.5.). Nach dieser Beobachtung wurde Dithionit nun auch für die Herstellung neuer Agar-Schüttelkulturen eingesetzt; in diesen entwickelten sich dann die großen Bakterien auch noch in höheren Verdünnungsstufen als den dritten zu Kolonien. In zweiten Agar-Schüttelkulturen mit Zusatz von Dithionit waren bereits alle gefundenen Kolonien mikroskopisch rein.

Beim Wachstum in Kolonien im Agar bildeten besonders viele der großen Bakterien die lichtbrechenden Zelleinschlüsse. Deshalb wurde anhand einer Kolonie aus dem Agar geprüft, ob es sich bei den Zelleinschlüssen um Sporen handelte. Die Kolonie wurde nach B.4.2. pasteurisiert und in steriles Medium mit Acetat und Sulfat gegeben, dem auch wieder Dithionit zugesetzt wurde. Nach zweiwöchiger Inkubation hatten sich in dem beimpften Medium die großen, stäbchenförmigen Bakterien entwickelt. Nunmehr lagen diejenigen Bakterien in Reinkultur vor, welche die Sulfatreduktion mit Acetat in den Anreicherungen verursacht hatten. Die hier isolierte Bakterienkultur entstammte einer Anreicherung

mit Gülle als Ausgangsmaterial (s. B.1., Probe Nr. 2) und wurde als Desulfotomaculum acetoxidans beschrieben (WIDDEL und PFENNIG, 1977).

1.2. Anreicherung und Isolierung weiterer Sulfat-reduzierender Bakterien

Nach der Isolierung von Desulfotomaculum acetoxidans erschien es aussichtsvoll, mit Hilfe der erprobten Methoden nach weiteren Sulfat-reduzierenden Bakterien zu suchen, welche Acetat zu verwerten vermochten. Doch nicht nur Acetat, sondern auch Propionat und Butyrat wurden für Anreicherungen eingesetzt; diese Fettsäuren sind nämlich nach Acetat die nächst häufigeren Gärungsprodukte beim Abbau von Biomasse durch natürliche Mischpopulationen (HUNGATE, 1966, S. 245 - 280; TOERIEN und HATTINGH, 1969). Angereichert wurde ferner noch mit Palmitat und Stearat als Vertretern der in Lipiden verbreiteten langkettigen Fettsäuren sowie mit Benzoat als einer häufig vorkommenden aromatischen Verbindung (s. A.3.).

Für die Anreicherung und Isolierung wurden geeignete, möglichst vielseitig verwendbare Medien entwickelt (s. B.3.). Diese Medien waren gekennzeichnet durch einen niedrigen Phosphat-Gehalt, höhere Konzentrationen an Bicarbonat sowie durch Sulfid als Reduktionsmittel. Bei den in Tab. 2 aufgeführten Grundmedien wurden die unterschiedlichen Bedürfnisse von Bakterien für Salzkonzentrationen berücksichtigt.

Ausgangsmaterial für die Anreicherungen waren die unter B.1. genannten Schlammproben verschiedener Herkunft. Für Anreicherungen mit Schlämmen von Standorten mit geringem Salzgehalt wurde das Süßwassermedium (Tab.2) verwendet. Zur Anreicherung Sulfat-reduzierender Bakterien aus den marinen Schlammproben diente zunächst natürliches Meerwassermedium (s. B.3.3.4.). Gesucht wurde vor allem nach solchen Sulfatreduzieren, die in definierten Medien wuchsen und daher für physiologische Untersuchungen besonders geeignet waren. Für diesen Zweck wurden

daher den betreffenden Medien nur das Vitamin-Gemisch und Vitamin B₁₂ (s. B.3.4.4.) als Wachstumsfaktoren zugesetzt; diese gehören nämlich zu den am häufigsten benötigten. Dennoch sollte auch berücksichtigt werden, daß die zum Anreichern verwendeten organischen Säuren in der Natur vielleicht auch von Bakterien mit komplexeren Ernährungsansprüchen umgesetzt werden; um daher auch solchen Mikroorganismen ein Wachstum in den Anreicherungen zu ermöglichen, wurden parallele Anreicherungspassagen unter Zusatz komplexer, natürlicher Wachstumsfaktoren hergestellt. Hefeextrakt und Pansenflüssigkeit, die häufig als Wuchsstoffe für Anaerobier verwendet werden (s. z. B. POSTGATE, 1965 a; HOBSON, 1969), führten zu einer stärkeren Entwicklung gärender Bakterien. Als geeignet erschienen daher Extrakte aus biologischem Material, wie z. B. Faulwasser, Gärextrakt oder Gülleextrakt (s. B.3.4.7.), in welchen leicht abbaubare Verbindungen bereits durch andere Bakterien vergoren waren. Zusätzlich zu den Anreicherungen in den einfachen definierten Medien wurden daher auch solche hergestellt, denen das unter B.3.4.7. beschriebene komplexe Extrakt-Gemisch zugesetzt wurde. Die Medien wurden in Flaschen mit 50 ml Inhalt (s. B.2.5. und B.3.5.) mit jeweils 2 bis 4 ml der Schlammproben versetzt. Ebenso wurden Kontrollansätze ohne Zusatz der organischen Säuren beimpft. Die bei Desulfotomaculum acetoxidans beobachtete wachstumsfördernde Wirkung von Dithionit wurde auch jetzt berücksichtigt. Daher wurden die Anreicherungen in zwei parallelen Reihen hergestellt, von denen die der einen stets mit Dithionit (s. B.3.4.5.) versetzt wurden. Die anaerob verschlossenen Flaschen wurden im Dunkeln bei 29 °C inkubiert und alle 2 bis 4 Tage umgeschüttelt. Berücksichtigt wurde, daß bisweilen Methan und somit ein Überdruck entstehen konnte.

Nach 2 bis 4 Wochen wurden die Überstände in den Anreicherungsgefäßen mit Hilfe des Schnellnachweises (s. B.12.2.) auf Schwefelwasserstoff geprüft. Hatte im Vergleich zum Kontrollansatz eine Produktion von H₂S stattgefunden, so wurde der Bodensatz der betreffenden Anreicherung mit Hilfe eines kleinen elektrischen Mixers (Ultra-Turrax, IKA, Staufen) im Überstand suspen-

diert; dabei durfte keine Luft in das Medium eingerührt werden. Aus der durchmischten Anreicherung wurden dann wieder 3 bis 5 ml in eine Folgepassage übertragen. Die Entwicklung der Anreicherungen wurde auch mikroskopisch verfolgt. Wenn Kulturen schlecht wuchsen, so wurde geprüft, ob durch Inkubation bei 35 °C ein besseres Wachstum zu erzielen war. Wenn in den Medien mit den zusätzlichen natürlichen Wuchsstoffen, dem Extrakt-Gemisch, die gleichen Bakterien angereichert wurden wie in den definierten Medien, so wurden die Folgepassagen zweckmäßigerweise nur noch in letzteren weitergeführt. Die löslichen Substrate Acetat, Propionat, Butyrat und Benzoat wurden anfangs in den niedrigeren der unter B.3.4.1. angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Es zeigte sich dann schließlich, daß alle isolierten Stämme gegen diese Verbindungen verhältnismäßig unempfindlich waren; daher wurden dann auch die höheren Konzentrationen verwendet, um so ein reichlicheres Wachstum zu erzielen. Bei Folgepassagen mariner Anreicherungen wurde ferner versucht, das natürliche Meerwassermedium durch das synthetische Meerwasser-Medium I zu ersetzen (s. Tab. 2).

Nachdem die anfangs eingesetzte Menge an Schlamm in den Sulfat-reduzierenden Anreicherungen nach 4 bis 6 Passagen weitgehend ausverdünnt war, wurde mit der Isolierung begonnen. Viel Sulfatreduzierer vermochten unter den Bedingungen in den Agar-Schüttelkulturen schneller als Kolonien zu wachsen, wenn natürliche Wuchsstoffe zugegen waren, wie z. B. das Extrakt-Gemisch; derartige Wuchsstoffe erleichterten auch den Bakterien aus abgeimpften Kolonien den Wachstumsbeginn in flüssigem Medium. Daher wurde sowohl den Agar-Schüttelkulturen als auch den ersten Nährmedien zur Anzucht isolierter Kolonien das Extraktgemisch zugesetzt.

Im folgenden sind die verschiedenen Anreicherungen und Isolierungen nach dem jeweils verwendeten organischen Substrat in Kapiteln geordnet.

1.2.1. Weitere Anreicherungen und Isolierungen mit Acetat

Der unter 1.1. isolierte Sulfatreduzierer Desulfotomaculum acetoxidans entstammte Anreicherungen mit Gülle als Ausgangsmaterial.

Aus dem Dorfgraben, dem Moorteich, dem Kuhpansen und dem Bewässerungsgraben wurden Bakterien angereichert, die ganz und gar Desulfotomaculum acetoxidans glichen. Aus diesen Anreicherungen wurden jedoch keine weiteren Stämme isoliert.

In den Anreicherungen mit Faulschlamm wurde in den ersten zwei Passagen neben Schwefelwasserstoff auch noch Methan gebildet. In weiteren Passagen blieb jedoch die Produktion von Methan aus, und die von Schwefelwasserstoff wurde intensiver. Es wurden coccoide, zum Teil langsam bewegliche Bakterien angereichert, die aber nach mehreren Überimpfungen von Desulfotomaculum acetoxidans überwachsen wurden. Daher wurden für Agar-Schüttelkulturen solche Anreicherungen verwendet, in denen noch die coccoiden Bakterien vorherrschten. In den unteren Verdünnungsstufen fand auf einmal wieder eine Bildung von Methan statt, die den Agar sprengte. Aus einer höheren Verdünnungsstufe wurde ein coccoides Bakterium abgeimpft und in zweiten Agar-Schüttelkulturen weiter gereinigt. Auch in diesen wurde die Agarsäule der unteren Verdünnungsstufen durch Bildung von Methan gesprengt. Eine Einzelkolonie wurde in Nährmedium mit Acetat übertragen und unter einer N_2 - CO_2 -Atmosphäre (s. B.2.1.) inkubiert. Nach drei Wochen hatten sich die Bakterien entwickelt. H_2S war nicht gebildet worden. In der Gasphase wurde jedoch Methan nachgewiesen (s. B.12.10.). Es handelte sich hier um ein unbewegliches, coccoides, Acetat-verwertendes Methanbakterium, das später zusammen mit anderen Methanbakterien behandelt werden sollte (s. 7.). Die zahlreichen ebenfalls coccoiden Bakterien in den Anreicherungen mußten jedoch anderer Natur sein; hier wurde nämlich seit der zweiten Passage kein Methan mehr gebildet, sondern reichlich H_2S , selbst wenn Desulfotomaculum acetoxidans mikroskopisch noch nicht zu erkennen war.

In Agar-Schüttelkulturen mit Acetat vermochte diese Art coccoider Bakterien nicht zu wachsen; es stellte sich dann heraus, daß diese bedeutend besser mit Benzoat als Substrat wuchsen, mit welchem auch die Isolierung möglich war (s. 1.2.5.).

In Anreicherungen mit Schlamm aus dem Waldteich wurde weder eine Bildung von H_2S noch eine Entwicklung von Bakterien beobachtet (s. B.1., Probe Nr. 4).

Aus dem Graben nahe am Jadebusen wurden unbewegliche Bakterien angereichert, die zunächst schlecht wuchsen und vielfach langgestreckte, deformierte Zellen bildeten. Weil nun das Ausgangsmaterial unweit vom Meer entnommen worden war, wurde das Brackwassermedium I (s. Tab. 2) mit den etwas erhöhten Konzentrationen an $NaCl$ und $MgCl_2$ hergestellt. In diesem wuchsen die Bakterien sofort sehr gut als regelmäßige, ovale Zellen und bildeten hohe Konzentrationen an H_2S . Die Isolation bereitete dann keinerlei Schwierigkeiten mehr (Stamm 2ac9).

Alle Anreicherungen mit marinen Schlämmen hatten bereits nach einer Woche kräftig H_2S produziert. Dennoch blieben die Überstände in den ersten zwei aufeinanderfolgenden Passagen stets klar und enthielten so gut wie keine Bakterien. Wurden daher Folgepassagen nur mit dem Überstand beimpft, so kam es erst nach mehreren Wochen und auch nur in einigen Fällen zu einer nachweisbaren Bildung von H_2S . Die marinen Sulfatreduzierer schienen also typische Sedimentbewohner zu sein. Daher war es auch sinnvoll, das Sediment vor der Übertragung in neues Medium im Überstand mit Hilfe eines Mixers zu suspendieren. Aber auch im Sediment der ersten Anreicherungsstadien waren nur selten Bakterien zu sehen, trotz intensiver Bildung von H_2S . In den Anreicherungen mit Schlamm aus dem Jadebusen sowie aus dem Limfjord wurden erst nach den zweiten Passagen ovale bis stäbchenförmige, zum Teil auch bewegliche Bakterien zwischen den Sedimentpartikeln sichtbar; diese Bakterien zeigten eine ausgesprochene Neigung, in Form klumpiger Zellanhäufungen zusammenzubleiben. Daneben wurden auch einige lange Zellfäden

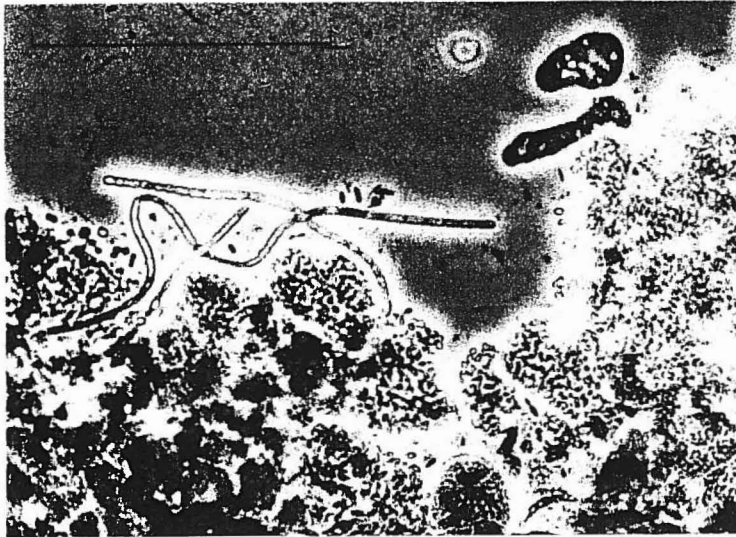


Abb. 6: Bodensatz einer Sulfat-reduzierenden Anreicherungskultur mit Acetat aus Meeresschlamm (Jadebusen). Der Bodensatz besteht in der Hauptsache aus ovalen und stäbchenförmigen Bakterien, die in Form großer Zellhaufen wachsen. Daneben sind gleitende Zellfilamente sowie auch zwei Amöben zu erkennen. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 0,1 mm

(Filamente) beobachtet, die mit gleitender Bewegung im Sediment umherkrochen. Nach weiteren Überimpfungen kam es dann schließlich zu einer deutlichen Trübung, hervorgerufen durch freischwebende Bakterien. Eine große Zahl der Bakterien wuchs jedoch immer noch in Form von Zellanhäufungen im Bodensatz. In älteren Kulturen schloß sich auch die Mehrzahl der freischwebenden Bakterien wieder zu Zellhaufen zusammen, die zu Boden sanken. Nach Ausverdünnung des anfangs zugesetzten Schlammes blieb daher in allen Passagen stets ein Bodensatz, der dann in der Hauptsache aus Bakterien bestand. In diesem Bakteriensediment lebten ebenfalls die gleitenden Zellfäden weiter. Daneben entwickelten sich auch Amöben, die in den Bakterien eine ergiebige Nahrungsquelle fanden. Abb. 6 zeigt einen solchen Bodensatz aus einer höheren Passage. Es ist erstaunlich, welche reichhaltige Population unter anaeroben Bedingungen allein

durch Acetat unterhalten wird, eine Verbindung, die vormals als nicht weiter abbaubares Endprodukt Sulfat-reduzierender Bakterien galt (s. A.2.). Mit dem Schlamm aus der Lagune am Mittelmeer wurden ebenfalls ovale bis stäbchenförmige Bakterien angereichert, die wiederum bevorzugt als Zellhaufen wuchsen. Auch hier fanden sich im Bodensatz der ersten zwei Passagen, insbesondere in denen mit zusätzlichen komplexen Wuchsstoffen, einige gleitende Zellfilamente; diese waren noch bedeutend dicker als die oben erwähnten. In den Folgepassagen wurden dann diese dicken Zellfäden nicht mehr gesehen, denn die übrigen, ovalen bis stäbchenförmigen Bakterien wuchsen von Mal zu Mal üppiger. Erst mit Benzoat (s. 1.2.5.) konnten die dicken Zellfilamente weiter angereichert werden. Eine Übertragung der mit Acetat erhaltenen marinen ovalen bis stäbchenförmigen Bakterien aus dem natürlichen Meerwassermedium in das synthetische Meerwassermedium I hatte keinerlei Auswirkung auf die Qualität des Wachstums. Ein Stamm dieses Bakterientyps wurde aus einer Anreicherung mit Schlamm vom Jadebusen isoliert (Stamm 3ac10).

Als Probenmaterial wurde auch die marine Anreicherung für Chromatien mit Acetat und H_2S verwendet; es handelte sich um eine alte Kultur, die an einem dunklen Platz abgestellt worden war. Der Ansatz war dann durch eine Neubildung von H_2S aufgefallen und wurde deshalb auf Sulfatreduzierer geprüft, die Acetat verwerteten. Die angesetzten Folgepassagen lieferten ovale, verhältnismäßig große, sehr bewegliche Bakterien, die gut in dem synthetischen Meerwassermedium I wuchsen. Auch diese Acetatverwertenden Sulfatreduzierer wurden in Reinkultur isoliert (Stamm 4ac11).

Isolierung fädiger, gleitend beweglicher Bakterien mit Acetat

Die Anreicherungen mit Schlamm vom Jadebusen waren für die Isolation einer der ovalen bis stäbchenförmigen Sulfatreduzierer sechsmal in neues Medium überimpft worden. In all diesen Passagen, auch in denen mit synthetischem Meerwassermedium I,

hatten sich im Bodensatz neben den zahlreichen Zellhaufen auch die beobachteten gleitenden Zellfilamente halten können. Zwar wuchsen die übrigen Bakterien zuerst immer so schnell und so dicht, daß die Zellfäden dann nicht ausfindig gemacht werden konnten; nachdem jedoch reichlich H_2S gebildet worden und der pH-Wert auf 7.8 angestiegen war, schlossen sich die freischwebenden Bakterien in der oben beschriebenen Weise zu Zellhaufen zusammen. Diese bildeten dann gemeinsam mit einigen anorganischen Ausfällungen einen Bodensatz, in welchem die umherkriechenden Zellfäden wieder sichtbar wurden. Durch das Extrakt-Gemisch (s. B.3.4.7.) konnte das Wachstum der Filamente gefördert werden; dennoch blieben diese im Vergleich zu den übrigen Bakterien stets weit in der Minderzahl. Sollte es sich bei den gleitenden Filamenten ebenfalls um Sulfatreduzierer handeln, die Acetat verwerteten, so waren sie unter diesen Kulturbedingungen den anderen, den Konkurrenten, unterlegen. Daher war es aussichtslos, zu versuchen, die Zellfäden aus solchen Anreicherungen mit einer Überzahl anderer Bakterien gleichen Stoffwechseltyps direkt mit Agar-Schüttelkulturen zu isolieren. Darum wurde zunächst versucht, die Zellfäden durch andere Substrate spezifisch zu besserem Wachstum zu veranlassen. Doch weder höhere Fettsäuren noch Lactat oder Dicarbonsäuren vermochten das Wachstum der Filamente spezifisch zu fördern; vielmehr führten diese Verbindungen zur Entwicklung noch weiterer Bakterientypen. Dennoch bot sich eine Möglichkeit, die Zellfäden von ihren Konkurrenten ein wenig abzusondern: Bei hoher H_2S -Konzentration und hohem pH-Wert krochen nämlich die Filamente noch frei umher, während die ovalen bis stäbchenförmigen Bakterien bereits größtenteils in Zellklumpen gebunden waren. Um dieses Verhalten der Filamente von vornherein zu begünstigen, wurden Folgepassagen mit einem erhöhten H_2S -Gehalt von 8 mmol/l und einem ebenfalls erhöhten pH-Wert von 7.8 hergestellt. Als organisches Substrat wurde keine Acetat-Lösung zugesetzt, sondern nur das Extrakt-Gemisch; dieses dürfte eine gewisse Menge an Acetat als Gärungsprodukt enthalten haben. Unter den nun veränderten Bedingungen vermochten die ovalen bis stäbchenförmigen Bakterien nicht mehr das Medium zu übervölkern; sie vermehrten sich zwar

noch ein wenig, doch blieben sie dabei in den Klumpen im Bodensatz aneinander haften. Die Zellfilamente dagegen breiteten sich im Sediment weiter aus, indem sie wuchsen, sich teilten und umherkrochen. Einige der gleitenden Zellfäden kamen zeitweise aus den Sedimentpartikeln sogar ganz heraus, sodaß dieses Verhalten an eine Suche nach geeigneteren Lebensbedingungen erinnerte. Für Agar-Schüttelkulturen aus derartigen Anreicherungen sollte daher eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestehen, daß sich ein Zellfilament in der erstarrten Agar-Säule separat von den Konkurrenten entwickelt. Daher wurden Schüttelkulturen vorbereitet, und zwar mit Weichagar, der Acetat, Sulfat, das Extraktgemisch und Thiosulfat enthielt (s. B.4.1.1.). Mit einer Pasteur-Pipette wurde etwas Medium mit Bodensatz vom Grunde der Anreicherungskultur aufgenommen; damit sich möglichst wenige der ovalen bis stäbchenförmigen Bakterien aus den Zellklumpen herauslösten, wurde sehr langsam pipettiert. Mit der Probe wurden fünf Reihen von Agar-Schüttelkulturen beimpft. Nach zwei bis drei Wochen waren im Weichagar in den unteren drei Verdünnungsstufen einige mycelartige Kolonien neben vielen anderen zu erkennen. Diese mycelartigen Kolonien bestanden aus den Filamenten. Insgesamt drei dieser Kolonien hatten soviel Abstand von anderen, daß eine Isolierung möglich erschien. Die betreffenden Kolonien der Filamente lagen jedoch weit von der Agaroberfläche entfernt. Daher mußten die oberen Agarschichten abgesaugt und die neu entstandene Oberfläche chemisch sterilisiert werden, so wie es in Abb. 4 dargestellt ist. Die abgeimpften Kolonien, die bereits im Agar der ersten Schüttelkulturen ein verhältnismäßig schwaches Wachstum gezeigt hatten, wuchsen überhaupt nicht mehr, wenn sogleich zweite Agar-Schüttelkulturen beimpft wurden. Daher mußten die Filamente aus dem Agar zunächst wieder in flüssiges Medium übertragen werden. Als erste Kulturgefäße dienten die unter B.4.1.2. beschriebenen spitzen Röhrchen, die nach der Hungate-Technik verschlossen wurden. Nach zwei Wochen stellte sich heraus, daß es mit einem von drei Ansätzen gelungen war, die Filamente von ihren Konkurrenten zu befreien. Die Zellfäden überzogen die Glaswände mit seidenglänzenden Belägen. Reinkulturen waren es jedoch noch

nicht; kleine, vibrioide, sehr bewegliche Begleiter, die in den Schüttelkulturen zahlreich gewachsen waren, vermehrten sich auch jetzt in der Flüssigkeitskultur weiter. Die Begleiter waren zwar keine Acetat-verwertenden Konkurrenten, welche die Zellfäden zu überwachsen drohten; doch waren die kleinen Bakterien immer noch so stark in der Überzahl, daß eine weitere Reinigung der Filamente allein durch Agar-Schüttelkulturen nicht möglich war. Selbstverständlich trugen auch die mit dem Extrakt-Gemisch zugesetzten organischen Verbindungen zum Wachstum der Begleitorganismen bei; der Zusatz dieser Wuchsstoffe war jedoch notwendig, da sich die Filamente in rein synthetischem Medium allein mit Acetat zu wenig und zu langsam vermehrten. Wegen des enormen Größenunterschieds der Bakterien in dieser bereits vorgereinigten Kultur schien es erfolgversprechend, die Filamente durch einen anaeroben Waschgang auf einem elektronenmikroskopischen Grid als Sieb von den kleinen Begleitern weitgehend zu befreien. Für diesen Zweck wurde die in Abb. 5 dargestellte Apparatur entwickelt. Eine mikroskopische Kontrolle hatte gezeigt, daß die Filamente in der genannten Vorrichtung größtenteils im Grid hängenblieben, während die Begleiter mit der Waschflüssigkeit durch die Maschen fortgespült wurden. Die auf diese Weise gewaschenen Zellfäden wurden in einem kleinen sterilen Kolbenhomogenisator vorsichtig weiter zerteilt, sodaß die Anzahl einzelner Filamente noch erhöht wurde. Diese Suspension wurde dann wiederum in Schüttelkulturen mit Weichagar (s. o.) überführt. Während der Inkubation entwickelten sich dann weit weniger Kolonien von Begleitorganismen als in den ersten Schüttelkulturen. Die Kolonien wurden nun genau wie beim ersten Mal isoliert, nachdem die oberen Agarschichten abgesaugt und die entstandene Oberfläche sterilisiert worden waren. Die Filamente wurden in Meerwassermedium I mit Acetat, Sulfat und dem Extrakt-Gemisch inkubiert. Von acht der nunmehr erhaltenen Sulfat-reduzierenden Kulturen gleitend beweglicher Zellfäden waren zwei rein. Die Filamente wuchsen wieder als glänzender Belag an den Glaswandungen. In den Anreicherungen hatten die Zellfäden stets im Bodensatz gelebt. Das Fehlen eines Sediments in den jetzigen Reinkulturen war offenbar der Grund für das

Wandwachstum, denn die Filamente vermochten nicht frei zu schwimmen. Um die Kulturbedingungen wieder den natürlichen Verhältnissen anzugleichen, wurde ein synthetisches Sediment aus voluminösem Aluminiumphosphat zugesetzt (s. B.3.4.8.). In diesem amorphen Bodensatz wuchsen die Filamente gut. Eines der zwei erhaltenen Isolate wurde unter der Stammbezeichnung 5ac10 weiterkultiviert.

Fädige, gleitende Bakterien der gleichen Morphologie wie die oben isolierten wurden auch in einer Anreicherung für Chromatien von einem Süßwasser-Standort beobachtet: Schlamm und Wasser aus einem Waldteich waren mit Cellulose-Pulver und CaSO_4 versetzt und in einem Standzylinder an einem Nordfenster inkubiert worden (s. B.1., Probe Nr. 6). Als bald entstand Schwefelwasserstoff, und es kam zu einer Vermehrung von Chromatien. Im Bodensatz wurden neben vielen anderen Bakterien auch gleitende Filamente entdeckt. Daraufhin wurde der Inhalt in eine große Flasche gegeben, die nach der Hungate-Technik anaerob verschlossen wurde. Nach einwöchiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde eine hohe H_2S -Konzentration nachgewiesen. Glaswandung, Bodensatz und abgestorbene Pflanzenteile waren mit einem weißen, seidenglänzenden Belag überzogen. Dieser Belag bestand fast nur aus gleitend beweglichen Zellfäden, die morphologisch nicht von denen zu unterscheiden waren, die aus dem Jadebusen isoliert worden waren. Da anaerobe Bedingungen geherrscht hatten, ferner auch in den Filamenten nie lichtbrechende Schwefeltröpfchen beobachtet wurden, konnte es sich nicht um fädige, farblose Schwefelbakterien handeln. Es gelang aber nicht, die hier von einem Süßwasserstandort angereicherten Zellfäden in weiteren Passagen mit dem synthetischen Süßwassermedium zu erhalten. So wurden als organische Substrate Acetat, und höhere Fettsäuren, Lactat, Succinat und Fumarat, auch zusammen mit dem Extrakt-Gemisch, angeboten; weiterhin wurden verschiedene Konzentrationen an NaCl , MgCl_2 , KCl , CaCl_2 und NaHCO_3 eingesetzt. Stets verschwanden jedoch die anfangs so zahlreichen gleitenden Filamente in den weiteren Passagen. In

einigen dieser Ansätze setzte sich alsbald Desulfotomaculum acetoxidans durch.

In allen parallelen Passagen, die zusätzlich zu Acetat das Extrakt-Gemisch enthielten, wurden keine anderen Zelltypen als in den reinen definierten Medien angereichert. Im Falle der gleitenden Zellfilamente aus dem Jadebusen war allerdings das Extrakt-Gemisch notwendig, um ein befriedigendes Wachstum zu erzielen.

Durch Dithionit wurden beimpfte Anreicherungs-passagen stets gefördert. Auch das Wachstum der isolierten Reinkulturen begann schneller, wenn nach der Überimpfung jeweils Dithionit zugesetzt wurde. Für das Wachstum von Desulfotomaculum acetoxidans war Dithionit sogar stets erforderlich (s. 1.1.).

Die mit Acetat isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien erhielten folgende Stammbezeichnungen:

1ac2 : Stäbchenförmiges, bewegliches Bakterium mit spitzen Enden; Fähigkeit zur Bildung von Sporen. Ausgangsmaterial: Gülle aus einer Schweinehaltung. Der Stamm wurde bereits als Desulfotomaculum acetoxidans mit der ursprünglichen Stammbezeichnung 5575 beschrieben (WIDDEL und PFENNIG, 1977).

2ac9 : Ovale, unbewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Graben in der Nähe vom Jadebusen.

3ac10: Ovale bis stäbchenförmiges, unbewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.

4ac11: Recht großes, ovales, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einer faulenden Anschwemmung von Algen auf Helgoland.

5ac10: Gleitend bewegliche Zellfilamente. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.

1.2.2. Anreicherungen und Isolierungen mit Propionat

Faulschlamm, Gülle, die Proben aus den Gräben und Teichen sowie Panseninhalt lieferten Anreicherungen kleiner, ovaler, oft zitronenförmig oder zwiebförmig zugespitzter Zellen. Ein unbeweglicher Sulfatreduzierer dieser Art wurde aus dem Dorfgraben (Stamm 1pr3), ein beweglicher aus dem Waldteich, Probe Nr. 4, isoliert (Stamm 2pr4).

In den Anreicherungen mit Gülle und Panseninhalt trat ferner Desulfotomaculum acetoxidans auf; dieses Bakterium wuchs jedoch nicht mehr nach Übertragung in Agar-Schüttelkulturen mit Propionat. Wahrscheinlich verwertete Desulfotomaculum acetoxidans in den betreffenden Anreicherungen Acetat, welches von anderen Sulfatreduzierern durch Oxidation von Propionat gebildet wurde.

Auch in allen marinen Anreicherungen wuchsen stets die kleinen, ovalen Bakterien, die hier häufig Zellketten bildeten; zugespitzte Zellen waren viel seltener als in den Anreicherungen von Süßwasser-Standorten. Auch diese marinen Bakterien hatten, ähnlich wie die mit Acetat angereicherten (s. 1.2.1.), eine starke Tendenz, im Bodensatz zu wachsen. Die hier mit Propionat erhaltenen kleinen, ovalen Bakterien wurden besonders häufig von Amöben verzehrt. Nur durch gründliches Suspendieren und häufiges Übertragen in neues Medium konnten die Anreicherungen vor völligem Verzehr durch Amöben bewahrt werden. Alle Anreicherungen von marinen Standorten ließen sich gut in dem synthetischen Meerwassermedium I weiterführen. Aus einer der Passagen, die aus dem Jadebusen angereichert worden waren, wurde mit Propionat ein beweglicher Sulfatreduzierer isoliert (Stamm 3pr10).

In den marinen Anreicherungen wuchsen außer kleinen, ovalen Bakterien auch größere, die den unter 1.2.1. mit Acetat ange-

reicherten sehr ähnlich waren. In den Agar-Schüttelkulturen mit Propionat wurden jedoch nur die Kolonien der erwähnten kleinen, ovalen Sulfatreduzierer gefunden. Die größeren Bakterien wuchsen sofort weiter, wenn die betreffenden Anreicherungen in Medium mit Acetat übertragen wurden. Man darf hier also ebenfalls vermuten, daß sich die größeren Bakterien in den Propionat-Anreicherungen von Acetat ernährten, das von Propionat-verwertenden Sulfatreduzierern ausgeschieden wurde.

Im Sediment der marinen Anreicherungen mit Propionat wurden wiederum die unter 1.2.1. beschriebenen gleitenden Zellfilamente beobachtet.

Mit Medien, die zusätzlich zu Propionat noch das Extrakt-Gemisch enthielten, wurden genau die gleichen Zelltypen wie mit Propionat allein angereichert. Ein Zusatz von Dithionit stimulierte sowohl das Wachstum der Anreicherungen als auch das der Reinkulturen.

Die mit Propionat isolierten Sulfatreduzierer erhielten die folgenden Stammbezeichnungen:

- 1pr3 : Ovales, unbewegliches Bakterium mit zitronenförmig oder zwiebel förmig zugespitzten Zellen. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Dorfgraben.
- 2pr4 : Ovales, bewegliches Bakterium mit bisweilen zugespitzten Enden: Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Waldteich.
- 3pr10: Ovales, bewegliches Bakterium; Zellen nur selten zugespitzt. Ausgangsmaterial: Schllick aus dem Jadebusen.

1.2.3. Anreicherungen und Isolierungen mit Butyrat

In den mit Gülle und Panseninhalt beimpften Anreicherungen entwickelte sich stets Desulfotomaculum acetoxidans, der mit dem hier verwendeten Butyrat schneller wuchs als in entsprechenden Ansätzen mit Acetat. Ein geeignetes Verfahren zur Anreicherung von Desulfotomaculum acetoxidans bestand somit darin, Butyrat-Medien mit Gülle oder Panseninhalt zu beimpfen. Da bereits eine Reinkultur dieses Bakterientyps existierte, wurden hier keine weiteren Stämme isoliert.

Faulschlamm sowie die Schlämme aus den Gräben und Teichen lieferten Anreicherungen vibrioider, beweglicher Bakterien, die sich hinsichtlich Zellform und Größe in allen Anreicherungen sehr ähnelten. Ein Stamm, der im Agar schwach grünliche Kolonien bildete, wurde isoliert (Stamm 1bu8); die betreffende Anreicherungskultur stammte aus dem Bewässerungsgraben.

Aus den marinen Schlämmen wurden verschieden große, vibrioide, bewegliche Bakterien angereichert, die sich auch gut in dem synthetischen Meerwassermedium vermehrten. Die vibrioiden Bakterien wuchsen in den ersten Passagen bevorzugt im Sediment, ähnlich wie die mit Acetat und Propionat angereicherten Bakterien mariner Herkunft. Drei Stämme vibrioider Sulfatreduzierer, die sich in der Zellgröße unterschieden, wurden aus den Anreicherungen mit Schlick vom Jadebusen durch Agar-Schüttelkulturen in Reinkultur isoliert (Stämme 2bu10, 3bu10 und 4bu10).

In den marinen Anreicherungen entwickelten sich auch ovale und stäbchenförmige Bakterien, die jedoch in den Agar-Schüttelkulturen mit Butyrat keine Kolonien bildeten; wahrscheinlich handelte es sich wiederum um Sulfatreduzierer, die Acetat verwerteten, welches von Butyrat-oxidierenden Bakterien ausgeschieden wurde (vgl. 1.2.2.). Gleitende Zellfilamente (s. 1.2.1.) wurden ebenfalls in den marinen Anreicherungen mit Butyrat beobachtet.

Die zusätzlich mit dem Extrakt-Gemisch versetzten Medien führten zur Entwicklung der gleichen Bakterientypen wie die rein synthetischen Medien mit Butyrat allein. Dithionit ermöglichte wiederum sowohl in Anreicherungen als auch in Reinkulturen einen schnelleren Wachstumsbeginn.

Die mit Butyrat isolierten Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien wurden wie folgt bezeichnet:

1bu8 : Mittelgroßes, vibrioides, bewegliches Bakterium.
Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Graben.

2bu10: Kleines vibrioides, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.

3bu10: Mittelgroßes, vibrioides, sehr schnell bewegliches Bakterium mit lichtoptisch sichtbarer Geißel. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.

4bu10: Großes, stäbchenförmiges bis vibrioid gekrümmtes Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.

1.2.4. Anreicherungen und Isolierungen mit Palmitat und Stearat

Palmitat und Stearat waren, im Gegensatz zu den bisher verwendeten Substraten, in Kulturmedien unlöslich. Die langkettigen Fettsäuren fielen stets als Erdalkalisalze ("Kalkseifen") in Form weißer Flocken aus. Um eine möglichst feine Verteilung zu erhalten, wurden Palmitat und Stearat aus den verflüssigten Stammlösungen (s. B.3.4.1.) zunächst einem Medium ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$, aber auch ohne höhere Konzentrationen an $NaCl$ zugesetzt; erst danach wurden die noch fehlenden Salze zugegeben. (s. B.3.3.2.). Diese Art der Zubereitung war selbstverständlich nicht mit dem natürlichen Meerwassermedium möglich, welches für alle Anreicherungen mit marinen Schlämmen anfangs immer verwendet wurde. In diesen Fällen wurde zunächst das synthetische Meerwassermedium nach B.3.3.2. mit Palmitat bzw. Stearat zube-

reitet. Nach dem Sedimentieren der weißen Flocken wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Die verbliebene Suspension der Erdalkalisalze von Palmitat bzw. Stearat wurde dann mit einer Pipette in das natürliche Meerwassermedium übertragen. Für die Herstellung von Agar-Schüttelkulturen wurden die geschmolzenen Stammlösungen von Palmitat bzw. Stearat zuerst immer dem verflüssigten, konzentrierten Agar zugesetzt, so wie es unter B.4.1.1. beschrieben ist.

Wurden Palmitat und Stearat in den Anreicherungen verwertet, so lebten die betreffenden Bakterien in den Flocken der Erdalkalisalze und somit auch immer im Bodensatz. Das überstehende Kulturmedium blieb daher zunächst klar. Erst nachdem nahezu alles Palmitat bzw. Stearat verbraucht worden war, wurden die Bakterien auch im Überstand gefunden. Die weißen Flocken verschwanden schließlich völlig.

Mit Palmitat wurden aus den Schlämmen der Gräben und Teiche verschieden große, hauptsächlich bewegliche Bakterien mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Vibrioform angereichert. In den ersten Anreicherungen mit Faulschlamm ging mit einer Sulfatreduktion gleichzeitig eine starke Bildung von Methan aus dem zugesetzten Palmitat einher. Nach weiteren Passagen ließ jedoch die Produktion von Methan schnell nach, und die von H_2S wurde intensiver; dabei vermehrten sich kleine, ebenfalls vibrioiden Bakterien. In den mit Panseninhalt beimpften Kulturen wurde das Palmitat erst nach mehrwöchiger Inkubationszeit unter Bildung von H_2S verwertet; auch in diesen Ansätzen wurden kleine, vibrioiden Bakterien angereichert. In den angelegten milchig trüben Agar-Schüttelkulturen mit Palmitat waren in der Durchsicht so gut wie keine Kolonien zu erkennen. Daher wurde ein gebündelter Lichtstrahl senkrecht zur Blickrichtung fast tangential auf das Röhrchen gerichtet, sodaß nur der äußerste, dem Auge zugewandte Abschnitt der Agarsäule erhellt wurde. Bei dieser Art der Beleuchtung wurden im trüben Agar klare Höfe sichtbar, in deren Zentrum jeweils eine kleine Kolonie lag. Alle aus derartigen Kolonien isolierten Bakterien wuchsen gut

in zweiten Schüttelkulturen mit einem Gemisch aus Butyrat, 5 mmol/l, Capronat, 2 mmol/l und Caprylat, 0,5 mmol/l; diese löslichen Fettsäuren bildeten keinerlei Trübungen im Medium und im Agar, sodaß die Isolierung von Stämmen in Reinkultur wesentlich erleichtert wurde. Ein großer, vibrioider, beweglicher sowie ferner ein kleiner, ovaler bis schwach vibrioid gekrümmter, unbeweglicher Sulfatreduzierer wurden aus dem Dorfgraben isoliert (Stämme 1pa3 und 2pa3). Eine Reinkultur eines kleinen, ovalen bis vibrioiden, beweglichen Sulfatreduzierers wurde aus dem Bewässerungsgraben erhalten (Stamm 3pa8).

In Anreicherungen mit Gülle wurde Palmitat nicht verwertet.

Die Anreicherungen mit Palmitat aus den marinen Schlämmen enthielten eine Vielzahl unterschiedlich großer, vibrioider, beweglicher Bakterien; diese ließen sich auch sehr gut in synthetischem Meerwassermedium I kultivieren. Auch die hier angereicherten marinen Bakterien wuchsen in den milchigen Agar-Schüttelkulturen mit Palmitat als kleine Kolonien mit klaren Höfen (s. o.). Zweite Agar-Schüttelkulturen wurden dann wieder mit dem genannten Gemisch aus Butyrat, Capronat und Caprylat hergestellt. Ein kleiner, vibrioider, beweglicher Sulfatreduzierer wurde aus dem Schlick des Jadebusen isoliert (Stamm 4pa10). Aus der Lagune am Mittelmeer wurde eine Reinkultur eines kleinen, schlanken, seltener gekrümmten, beweglichen Sulfatreduzierers erhalten (Stamm 5pa13). Auch größere Zellformen vibrioider Sulfat-reduzierender Bakterien wurden aus den marinen Anreicherungen isoliert; deren Kulturen wurden jedoch nicht weitergeführt.

In den marinen Anreicherungen mit Palmitat wurden ebenfalls die charakteristischen ovalen und stäbchenförmigen Bakterien gefunden, bei denen es sich wahrscheinlich wieder um Acetat-verwertende Sulfatreduzierer handelte; diese konnten nämlich nicht mit Palmitat isoliert werden (vgl. 1.2.2. und 1.2.3.). Im Bodensatz fanden sich ferner noch die gleitenden Zellfäden, die unter 1.2.1. eingehender beschrieben sind.

Durch Zusatz von Extrakt-Gemisch zum Medium konnten keine anderen Zelltypen angereichert werden als mit Palmitat allein. Dithionit förderte wiederum den Wachstumsbeginn von Anreicherungen sowie Reinkulturen.

Folgende Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien wurden mit Palmitat isoliert:

- 1pa3 : Großes, vibrioides, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Graben.
- 2pa3 : Kleines, ovales bis vibrioid gekrümmtes, unbewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Graben.
- 3pa8 : Kleines, ovales bis vibrioid gekrümmtes, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einem Graben.
- 4pa10: Kleines, vibrioides, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlick aus dem Jadebusen.
- 5pa13: Kleines, stäbchenförmiges bis vibrioid gekrümmtes, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einer Lagune am Mittelmeer.

Anreicherungen mit Stearat wuchsen gegenüber den entsprechenden mit Palmitat deutlich langsamer, obwohl sich diese zwei langkettigen Fettsäuren nur um 2 C-Atome pro Molekül unterscheiden. Auch waren die mit Stearat wachsenden Populationen weniger reichhaltig als die vormals mit Palmitat erhaltenen: Die Schlämme aus dem Faulraum, den Gräben und den Teichen lieferten nur kleine, vibrioider, größtenteils bewegliche Bakterien, von denen ein Stamm isoliert wurde (Stamm 1st1). In Anreicherungen mit Gülle und Panseninhalt wurde kein H₂S gebildet. Aus den marinen Proben wurden kleine, stäbchenförmige oder ovale bis vibrioider, zum Teil bewegliche Bakterien unter Sulfatreduktion angereichert. Weil nun bereits mit einer der langkettigen Fett-

säuren, dem Palmitat, etliche unterschiedliche Sulfatreduzierer isoliert worden waren, wurde von den mit Stearat erhaltenen Reinkulturen nur eine weitergeführt:

1st1 : Kleines, vibrioides, bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Faulschlamm

1.2.5. Anreicherungen und Isolierungen mit Benzoat

Anreicherungen mit Benzoat benötigten in der jeweils ersten Passage für eine meßbare Bildung von Schwefelwasserstoff längere Zeit als die Anreicherungen mit den Fettsäuren.

Unter den Ansätzen in Süßwassermedium bildeten die mit Faulschlamm beimpften zuerst H_2S ; gleichzeitig wurde auch Methan produziert. Nach zwei Wochen nahm die H_2S -Konzentration nicht mehr zu, und es wurden zweite Passagen beimpft; in diesen wurde dann kein Methan mehr gebildet, während die Sulfatreduktion intensiver wurde. In den Anreicherungen entwickelten sich coccoide Bakterien, von denen einige langsam beweglich waren. Daneben wurden auch kleine, stäbchenförmige, bewegliche sowie kleine, vibrioide, bewegliche Zellen als charakteristische Formen in der Anreicherung beobachtet. In weiteren Passagen setzten sich dann die coccoiden Bakterien durch; diese verloren alsbald ihre Beweglichkeit ganz. Sehr ähnliche coccoide Bakterien aus Faulschlamm waren bereits unter 1.2.1. als verhältnismäßig langsam wachsende Anreicherung mit Acetat erhalten worden. Daher wurde nun auch eine höhere Passage der zuvor mit Acetat angereicherten Kultur in Medium mit Benzoat überimpft: Bereits nach zwei Tagen wuchsen die coccoiden Bakterien unter kräftiger Bildung von H_2S mit dem neuen Substrat weiter, und zwar bedeutend besser als zuvor mit Acetat. Mit Benzoat war demnach der gleiche Bakterientyp angereichert worden wie bereits mit Acetat. Zunächst wurden in den Anreicherungen aus Faulschlamm mit Benzoat als Substrat höhere Zelldichten erreicht als mit irgendeiner der Fettsäuren. In den weiteren Folgepassagen jedoch erreichten die coccoiden Bakterien von Mal zu Mal geringere Zell-

dichten. In den parallelen Passagen, die zusätzlich das Extrakt-Gemisch enthielten, wurde das Wachstum nach mehreren Überimpfungen ebenfalls zunehmend schwächer. Immerhin war es aber aufgrund einer geringen Stimulation durch das Extrakt-Gemisch noch möglich, das coccoide Bakterium in Reinkultur zu isolieren (Stamm 1be1); diese wuchs jedoch dann so schlecht, daß eine weitere Bearbeitung des mit Benzoat isolierten Stammes nicht möglich erschien. Nun ließ der allmähliche, aber auffallende Rückgang des Wachstums eine Verknappung einer lebensnotwendigen, nur in Spuren benötigten Substanz vermuten. Ein vielfältiges Angebot organischer Wachstumsfaktoren war durch den Zusatz von Vitaminen (Vitamin-Gemisch und B_{12}) und des Extrakt-Gemischs gegeben. Daher wurde zunächst geprüft, ob im Medium solche Spurenelemente fehlten, deren biologische Bedeutung häufiger diskutiert wurde. Den Ansätzen wurden das Spurenelement-Gemisch II (F, V, Se, Sn, J, W) sowie Chrom(III) in einer Endkonzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l und Titan zugesetzt (s. B.3.4.6.). Die Elemente B, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn und Mo waren allen Medien von vornherein zugegeben worden. Immer dann, wenn das Spurenelement-Gemisch II zugegen war, erreichten die coccoiden Bakterien wieder die anfänglichen hohen Zelldichten, auch in den rein synthetischen Medien mit Benzoat. Als wirksamer Bestandteil für den hier mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer erwies sich das Selen.

Nach WAGNER und ANDREESSEN (1977), LEONHARDT und ANDREESSEN (1977) sowie ANDREESSEN (1978) benötigen einige Bakterien für bestimmte Reaktionsschritte Selen häufig zusammen mit Molybdän oder auch Wolfram. Nunmehr mußten auch bei der Verwertung von Benzoat durch Sulfat-reduzierende Bakterien ähnliche Reaktionsmechanismen vermutet werden. Daher wurden nochmals neue Medien unter Zusatz von Selen und Wolfram mit den Schlämmen beimpft; Molybdän war bereits von vornherein vorhanden. Auch allen schon laufenden Anreicherungen mit Benzoat wurden Selen und Wolfram zugesetzt.

Aus den Gräben und dem Moorteich wurden unter starker Produktion von H_2S ebenfalls coccoide Bakterien angereichert. Da diese dem bereits isolierten Stamm sehr ähnlich waren, wurde von einer Isolierung abgesehen. Aus den mit Faulschlamm beimpften Anreicherungen wurde mit Benzoat noch ein weiteres Bakterium isoliert; es handelte sich dabei um einen Sulfatreduzierer mit ovalen, oft nahezu coccoiden Zellen, die langsam beweglich waren (Stamm 2be1).

In Anreicherungen mit Schlick aus dem Jadebusen und dem Limfjord wuchsen wiederum coccoide Bakterien. Bewegliche Zellen in geringer Zahl wurden lediglich in den ersten Passagen beobachtet. Die Bakterien vermehrten sich auch in Süßwassermedium und glichen dem bereits in Reinkultur existierenden coccoiden Stamm; weitere coccoide Bakterien wurden daher nicht isoliert.

Zwei sehr unterschiedliche Bakterientypen herrschten in Anreicherungs-passagen aus dem Schlamm der Lagune vor: Glaswandung und Bodensatz waren mit einem seidenglänzenden Belag aus dicken, gleitenden Filamenten überzogen; in geringer Zahl waren diese bereits in den entsprechenden Anreicherungen mit Acetat beobachtet worden (s. 1.2.1.). Bakterien, die als zusammenhängende Zellpakete wuchsen, fanden sich im Bodensatz. Bereits mit Acetat waren in Sedimenten mariner Anreicherungen Zellanhäufungen erhalten worden. Die hier mit Benzoat gewachsenen Zellpakete waren aber noch wesentlich kompakter und hatten das Aussehen von Methanosarcina (ZHILINA, 1976); allerdings wurde hier kein Methan, sondern Schwefelwasserstoff produziert. Daneben kamen allmählich auch freischwebende, ovale, nur selten bewegliche Einzelzellen auf.

Zunächst wurde versucht, die Sarcinen-ähnlichen und die ovalen Bakterien zu isolieren, denn diese ließen sich leicht in dem synthetischen Meerwassermedium I kultivieren. Je mehr Folgepassagen beimpft wurden, desto größer wurde der Anteil an Einzelzellen. Mit dem Überstand einer solchen Anreicherung wurden Agar-Schüttelkulturen beimpft. Die daraufhin im Agar

gewachsenen Kolonien bestanden ausschließlich aus Zellpaketen. Wurden diese Kolonien jedoch in flüssiges Medium übertragen, so wuchsen nicht nur Zellpakete, sondern auch wieder frei schwebende Einzelzellen; nur wenige von diesen waren beweglich. Mit zweiten Agar-Schüttelkulturen für eine weitere Reinigung wiederholte sich das Phänomen: Während im Agar nur Kolonien aus den Sarcinen-ähnlichen Zellaggregaten zu finden waren, wuchsen nach der Beimpfung von flüssigem Medium auch Einzelzellen; bewegliche Zellen fehlten jedoch von nun an ganz. Der hier isolierte Sulfatreduzierer (Stamm 3be13) existierte also in zwei verschiedenen morphologischen Erscheinungsformen. Daher darf man auch annehmen, daß die Zellpakete und die einzelnen ovalen Zellen in den Anreicherungen der gleichen Art angehörten wie der hier isolierte Stamm.

Für Versuche zur Isolation der dicken, gleitenden Filamente konnte nicht das synthetische Meerwassermedium I verwendet werden; in diesem starben die Zellfäden nämlich schnell ab. Daher wurde zunächst das natürliche Meerwassermedium beibehalten. Das Wachstum der Filamente ließ sich durch das Extrakt-Gemisch stimulieren. Es war jedoch nicht möglich, diese sonderbaren Organismen in Folgepassagen noch weiter anzureichern. Die beschriebenen Sarcinen-ähnlichen Zellpakete und die ovalen Zellen, die schon ohnehin in der Überzahl waren, überwuchsen die Filamente von Mal zu Mal mehr. Daher wurde auf die zweite Anreicherungs-passage zurückgegriffen; aus dieser wurden Zellfäden von der Glaswandung mit Medium in eine Pasteur-Pipette aufgenommen und durch anaerobes Waschen von der Mehrzahl der ovalen Bakterien befreit; dazu diente wieder die in Abb. 5 dargestellte Apparatur mit dem elektronenmikroskopischen Grid als Sieb. Die gleitenden Bakterien waren so dick und so lang, daß einzelne Zellfäden mit dem bloßen Auge zu erkennen waren. Daher konnten die nun vorgereinigten Zellfäden jeweils einzeln mit einer sterilen Pasteur-Pipette aufgenommen und unter direkter Beobachtung in sterilem Medium weiter gewaschen werden. Als Waschgefäße dienten kleine Röhrchen, wie sie unter B.4.3.2. beschrieben sind. Nachdem ein Zellfaden jeweils 5 bis 6 dieser Röhrchen passiert

hatte, wurde er in Medium mit Benzoat und Extrakt-Gemisch inkubiert. Insgesamt wurden 5 Ansätze mit jeweils einem gewaschenen Filament beimpft. Im unteren Abschnitt der für die Anzucht verwendeten, spitz zulaufenden Röhrrchen war das Zellfilament leicht ausfindig zu machen; dessen Wachstum konnte daher unter der Stereolupe verfolgt werden. Einer der beimpften Ansätze erwies sich schließlich als Reinkultur (Stamm 4be13). Die Zellfäden wuchsen unter Bildung von H_2S an den Glaswandungen. Um, wie bereits im Falle der mit Acetat isolierten Filamente, auch hier wieder einen Bodensatz anzubieten, wurde Aluminiumphosphat zugesetzt (s. B.3.4.8.). In diesem voluminösen, synthetischen Sediment wuchsen die dicken Zellfäden wesentlich besser als an den Glaswandungen.

In Ansätzen, die zusätzlich das Extrakt-Gemisch enthielten, wurden keine anderen Zelltypen angereichert als mit Benzoat allein in rein synthetischem Medium. Der Reinkultur der dicken, fädigen Bakterien wurde als einziger weiterhin das Extrakt-Gemisch zugesetzt, da hier das Wachstum durch die natürlichen komplexen Wuchsstoffe entscheidend beschleunigt wurde. Durch Zusatz von Dithionit wurde der Wachstumbeginn aller überimpften Anreicherungen und Reinkulturen mit Benzoat wiederum deutlich gefördert.

Die mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer erhielten folgende Stammbezeichnungen:

- 1be1 : Coccoides, unbewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Faulschlamm.
- 2be1 : Ovale bis coccoides, langsam bewegliches Bakterium. Ausgangsmaterial: Faulschlamm.
- 3be13: Bakterium, das sowohl in Form Sarcinen-ähnlicher Zellpakete als auch ovaler, unbeweglicher Einzelzellen wuchs. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einer Lagune am Mittelmeer.

4be13: Dicke, gleitend bewegliche Zellfilamente. Ausgangsmaterial: Schlamm aus einer Lagune am Mittelmeer.

2. Anreicherungsversuche mit Alkanen

Nach den Anreicherungen und Isolierungen mit Fettsäuren und mit Benzoesäure wurde noch geprüft, ob auch Methan und höhere Alkane unter rein anaeroben Bedingungen als Substrate für Sulfatreduzierende Bakterien dienen können. In diesen Versuchen war es weniger wichtig, die Herkunft der einzelnen Schlammproben (s. B.1.) zu berücksichtigen, als überhaupt eine Umsetzung von Alkanen nachzuweisen. Daher wurden die Schlämme von Süßwasserstandorten, also die aus Gräben, Teichen und dem Faulbehälter der Kläranlage, in einer Flasche vereinigt und unter einer Stickstoffatmosphäre gründlich miteinander vermischt; ebenso wurde mit den marinen Schlämmen verfahren. Für die Anreicherungsversuche wurden Süßwassermedium (s. Tab. 2) und natürliches Meerwassermedium (s. B.3.3.4.) unter Zusatz des Vitamin-Gemischs (s. B.3.4.4.) verwendet; außer Molybdän (10^{-7} mol/l) waren auch noch Selen und Wolfram (jeweils 10^{-8} mol/l) zugegen.

Vor den Versuchen zur Verwertung von Methan wurden Anreicherungen in Süß- und Meerwassermedium beimpft, die Methanol, 25 mmol/l, und etwas Acetat, 1 mmol/l, enthielten. Für möglicherweise vorhandene Sulfatreduzierer, die mit Methan wachsen, dürfte nämlich Methanol ein leicht verwertbares Substrat sein und somit bereits eine gewisse Vorauslese bewirken. Auch Kontrollansätze ohne Methanol wurden beimpft. Die Anreicherungen wurden in Flaschen mit Gärröhrrchen (s. B.2.2.) bei 29 °C anaerob inkubiert. Sowohl in dem Süß- als auch dem Meerwassermedium mit Methanol kam es bereits nach kurzer Zeit zu einer kräftigen Produktion von Methan. Eine Bestimmung der H_2S -Konzentration in den Ansätzen mit Methanol und den Kontrollansätzen zeigte, daß mit Methanol als Substrat stets nur sehr geringe Mengen Sulfat reduziert wurden; Methanol wurde demnach zum weitaus größten Teil zu Methan umgesetzt, obwohl in allen Medien reichlich

Sulfat vorhanden war. Auch die Folgepassagen bildeten fast nur Methan und kaum Schwefelwasserstoff. In den Anreicherungen mit Süßwassermedium waren mikroskopisch ausschließlich coccoide, unbewegliche Bakterien zu erkennen, die bisweilen Sarcinen-ähnliche Zellpakete bildeten und wahrscheinlich der Gattung Methanosarcina (BRYANT, 1974) angehörten. In der marinen Anreicherung mit Methanol wuchsen vor allem sehr kleine, unbewegliche Bakterien, die im Mikroskop fast nur als Punkte zu erkennen waren. Für die anschließenden Versuche zur Verwertung von Methan wurden jeweils 100 ml Süß- bzw. Meerwassermedium in flachen Flaschen mit 250 ml Inhalt mit stets gleichen Anteilen aus den vermischten Schlämmen sowie den oben erhaltenen, ausgewachsenen Methanol-Anreicherungen versetzt. Es wurden mehrere parallele Ansätze beimpft, die dann mit 85 % CH_4 und 15 % CO_2 begast wurden. Kontrollansätze enthielten N_2 anstelle von CH_4 . Die Flaschen wurden bei 29 °C in horizontaler Lage inkubiert und täglich zweimal kurz geschüttelt. Aber selbst nach 10 Wochen konnte weder ein Verbrauch von Methan noch eine Bildung von H_2S festgestellt werden. Somit wurden auch keinerlei Hinweise für eine Sulfatreduktion mit Methan als Elektronendonator erhalten.

Die Verwertung höherer Alkane wurde mit einem Gemisch aus Hexan, Heptan und Octan sowie ferner einem Gemisch aus Tetradecan und Hexadecan (s. 3.4.1.) geprüft; die betreffenden flüssigen Kohlenwasserstoffe wurden zu gleichen Anteilen zusammengegeben. Als Impfmateriale dienten die vermischten Schlämme, denen noch die Sedimente aus den unter 1.2.4. erhaltenen zweiten Anreicherungsphasen mit Palmitat und Stearat zugesetzt wurden. In den Anreicherungen mit den höheren Fettsäuren konnte nämlich bereits eine gewisse Selektion solcher Sulfatreduzierer stattgefunden haben, die auch höhere Kohlenwasserstoffe verwerten konnten. Süß- und Meerwassermedium in flachen Flaschen mit 100 ml Inhalt wurden zu stets gleichen Anteilen mit Impfmateriale versetzt und dann mit jeweils 2 ml der betreffenden flüssigen Alkane überschichtet; dabei blieb noch ein gewisser Gasraum in den Flaschen erhalten. Die Flaschen wurden nach der Hungate-

Technik verschlossen. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Kohlenwasserstoffe. Zu Beginn der Inkubation wurden die Kohlenwasserstoffe durch Schütteln emulgiert (s. 3.5.4.). Nach 10 Wochen wurde in den Ansätzen mit Alkanen immer noch genau die gleiche H_2S -Konzentration gemessen wie in den Kontrollansätzen. Der vorhandene Schwefelwasserstoff war größtenteils durch das den Medien stets zugesetzte Sulfid bedingt; geringe Mengen an H_2S konnten ferner durch eine Sulfatreduktion mit Schlammbestandteilen gebildet worden sein. Während der Anreicherungen mit langkettigen Fettsäuren hatte die Verwertung von Palmitat bzw. Stearat stets zu einem starken Anstieg der H_2S -Konzentration geführt. Die nunmehr erhaltenen Ergebnisse zeigten hingegen, daß sich die Kohlenwasserstoffe unter den gewählten Versuchsbedingungen inert verhielten.

3. Charakterisierung der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien

3.1. Ermittlung der Wachstumsansprüche

Die isolierten Reinkulturen Sulfat-reduzierender Bakterien waren unter den für Anreicherung und Isolation gewählten Bedingungen ohne Schwierigkeiten zu kultivieren. Dennoch brauchten diese Bedingungen noch nicht die optimalen für das Wachstum jedes einzelnen Stammes zu sein. Daher sollten nun die Wachstumsansprüche der Sulfatreduzierer näher untersucht werden. So wurde geprüft, ob bei anderen Salzkonzentrationen, pH-Werten und Temperaturen ein noch besseres Wachstum zu erzielen war. Dann wurde auch nach Substanzen gesucht, die als weitere Zusätze zum Medium eine stimulierende Wirkung hatten. In diesem Zusammenhang wurden dann ferner diejenigen von den sieben bisher stets zugesetzten Vitaminen ermittelt, die von den einzelnen Stämmen tatsächlich benötigt wurden; auf diese Weise konnten dann Minimalmedien bezüglich organischer Wachstumsfaktoren erstellt werden. Schließlich war auch noch die Frage nach der geeigneten Aufbewahrung zur Erhaltung der Stämme von Interesse.

3.1.1. Ermittlung geeigneter Salzkonzentrationen

Die Bedeutung der Konzentrationen von Mineralsalzen zeigte sich zunächst aufgrund von Beobachtungen an zwei isolierten Stämmen.

1) Die Zellen des mit Acetat isolierten Sulfatreduzierers 2ac9 hatten sich während der Anreicherung in Süßwassermedium nur schlecht entwickelt (s. 1.2.1.). Durch höhere Konzentrationen an NaCl und MgCl₂ konnte das Wachstum dann entscheidend verbessert werden. Hier wurde nun gezeigt, daß die Zellen auch dann bereits besser wuchsen, wenn die Konzentration nur eines dieser Salze im Süßwassermedium erhöht wurde; optimal war aber erst die gleichzeitige Erhöhung der NaCl- und der MgCl₂-Konzentration. Für die Anzucht von Stamm 2ac9 bewährte sich das Brackwassermedium I (s. Tab. 2).

2) Der mit Benzoat isolierte dicke, fädige Sulfatreduzierer 4be13 konnte zunächst nur in natürlichem Meerwassermedium kultiviert werden (s. 1.2.5.); in dem synthetischen Meerwassermedium I bildeten die Zellen bereits nach kurzer Zeit unregelmäßige Formen und starben schnell ab. Um von natürlichem Meerwasser unabhängig zu sein, sollte daher auch für diesen Stamm ein geeignetes synthetisches Medium zusammengestellt werden. Zunächst wurde geprüft, ob für das Wachstum der dicken Filamente einige Hauptbestandteile des Meerwassers (s. Anhang) in der natürlichen hohen Konzentration benötigt wurden. Daher wurden Ansätze mit synthetischem Meerwassermedium beimpft, in denen jeweils die Konzentration von NaCl, MgCl₂, KCl oder CaCl₂ auf die entsprechende des natürlichen Meerwassers erhöht worden war. Die Salze wurden dem Meerwassermedium I aus konzentrierten, sterilen Stammlösungen zugesetzt. In diesen Versuchsreihen wuchsen die dicken Filamente immer nur dann, wenn höhere Konzentrationen an Calcium-Ionen vorhanden waren. Bei weniger als 4 mmol Ca²⁺/l wurden die Zellfäden unbeweglich und bildeten unregelmäßige, im Wachstum gehemmte Formen. Höhere Mg²⁺-Konzentrationen als in synthetischem Meerwassermedium I hatten eine nur geringe Verbesserung des Wachstums zur Folge. Nicht ein-

deutig festzustellen war, ob die Filamente bei der gegenüber Meerwassermedium I nur wenig höheren K⁺-Konzentration des natürlichen Meerwassers ebenfalls besser wuchsen. Die geringfügige Erhöhung der Na⁺-Konzentration mit NaCl auf die des natürlichen Meerwassers war ohne Bedeutung; dagegen wurden die Zellfäden allmählich geschädigt, wenn die NaCl-Konzentration von Meerwassermedium I um nur 100 mmol/l erniedrigt wurde. Für die dicken, gleitenden Filamente erwies sich schließlich ein synthetisches Meerwassermedium als optimal, das in Tab. 2 als Meerwassermedium II aufgeführt ist; die darin vorliegenden Konzentrationen an Na⁺-, K⁺-, Ca²⁺- und letztlich auch Cl⁻-Ionen sind fast so hoch wie in Meerwasser; die Mg²⁺-Konzentration beträgt etwa 50 % der von natürlichem Meerwasser.

NaCl, MgCl₂ und CaCl₂ gehören offenbar zu jenen Salzen, deren Konzentrationen für Nährmedien Sulfat-reduzierender Bakterien größere Bedeutung haben können. Daher wurde nun geprüft, welchen Einfluß unterschiedliche Konzentrationen dieser Salze auf das Wachstum der isolierten Stämme hatten.

Aufgrund häufigen Vorkommens und guter Löslichkeit ihrer Salze können die Ionen Na⁺, Mg²⁺ und Cl⁻ im Wasser natürlicher Standorte bis zu sehr hohen Konzentrationen vorkommen. Daher wurde zunächst untersucht, wie die isolierten Stämme auf verschiedene Konzentrationen von NaCl und MgCl₂ reagierten. Um eine negative Wirkung zu starker Konzentrationsunterschiede beim Überimpfen auszuschließen, wurden die Konzentrationen stufenweise erhöht bzw. erniedrigt. Für Stämme aus Süßwassermedium wurden höhere Konzentrationen und schließlich auch das natürliche Meerwassermedium vorgegeben. Umgekehrt wurde mit marinen Stämmen verfahren, die mit Ausnahme von Stamm 4be13 bereits

Tab. 3, S. 154 - 155: Wachstum der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien bei verschiedenen Salzkonzentrationen [mmol/l]. Die aufgrund dieser Beobachtungen nun weiterhin verwendeten Medien sind mit einem Kreis gekennzeichnet. Symbole: ++ = gutes Wachstum; + = etwas verlangsamtes Wachstum; +- = schlechtes Wachstum
- = kein Wachstum

Tab. 3 (Erläuterungen s. S. 153)

Stamm	Süßwasser- medium NaCl, 20 MgCl ₂ , 2 CaCl ₂ , 1	Brackwasser- medium I NaCl, 120 MgCl ₂ , 6 CaCl ₂ , 1	Brackwasser- medium II NaCl, 225 MgCl ₂ , 10 CaCl ₂ , 1	Meerwasser- medium I NaCl, 340 MgCl ₂ , 15 CaCl ₂ , 1	Meerwasser- medium II NaCl, 340 MgCl ₂ , 27 CaCl ₂ , 9	natürliches Meerwasser- medium (s. 3.3.4.)
1ac2	⊕⊕	+ -	-	-	-	-
2ac9	+ -	⊕⊕	++	++	++	++
3ac10	-	+ -	+	⊕⊕	++	++
4ac11	-	-	+	⊕⊕	++	++
5ac10	-	+	⊕⊕	++	++	++
1pr3	⊕⊕	+	+ -	-	-	-
2pr4	⊕⊕	++	++	+	+	+
3pr10	-	-	+	⊕⊕	++	++
1bu8	⊕⊕	++	+ -	-	-	-

2bu10	+ -	+ -	+	⊕⊕	++	++
3bu10	-	+ -	+	⊕⊕	++	++
4bu10	⊕⊕	++	++	++	++	++
1pa3	⊕⊕	++	+	+	+	+
2pa3	⊕⊕	+	+ -	-	-	-
3pa8	⊕⊕	+	+ -	-	-	-
4pa10	+ -	+ -	+	⊕⊕	++	++
5pa13	-	+ -	+	⊕⊕	++	++
1st1	+	⊕⊕	++	++	++	++
1be1	+	⊕⊕	++	++	++	++
2be1	⊕⊕	+	-	-	-	-
3be13	-	+	⊕⊕	+	+	+
4be13	-	-	-	-	⊕⊕	++

während der Anreicherungen (s. 1.2.) alle erfolgreich in das synthetische Meerwassermedium I übertragen worden waren: Diese Stämme wurden in Medien mit noch geringeren Salzkonzentrationen überimpft. Stets wurde die Konzentration von NaCl und die von MgCl₂ gleichzeitig und auch im etwa gleichen Verhältnis verändert. Für die Versuche wurde noch ein Brackwassermedium II (s. Tab. 2) zusammengestellt, dessen Salzgehalt etwa zwischen dem von Brackwassermedium I und Meerwassermedium I lag. Die Ergebnisse gehen aus Tab. 3 hervor. Für einige Stämme wurden Salzkonzentrationen ermittelt, die für das Wachstum noch günstiger waren als die der ursprünglichen Medien. War das Wachstum eines Stammes, wie zum Beispiel das von 4bu10, bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gleich gut, so wurde für weitere Versuche aus praktischen Gründen das Medium mit dem geringsten Salzgehalt vorgezogen.

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluß eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration auf das Wachstum der Bakterien hatte. In den Kulturmedien mit den oben ermittelten geeigneten Konzentrationen an NaCl und MgCl₂ wurde der CaCl₂-Gehalt auf 5 mmol/l erhöht. Die Ergebnisse zeigten, daß als einziger Stamm nur 4be13 höhere Konzentrationen an Ca²⁺-Ionen benötigte; alle übrigen Stämme wurden durch den Zusatz von CaCl₂ nicht beeinflusst.

Die aufgrund dieser Versuche nun weiterhin verwendeten Medien gehen ebenfalls aus Tab. 3 hervor.

3.1.2. pH- und Temperatur-Optima

Die für das Wachstum der isolierten Bakterien optimalen pH-Werte und Temperaturen wurden nach B.7. durch vergleichende Wachstumsmessungen in anaerob verschlossenen Röhrchen bestimmt. Der Einfluß verschiedener vorgegebener pH-Werte wurde stets aufgrund des anfänglichen Wachstums ermittelt. Das pH-Optimum von Sulfatreduzierern, die bisher mit den unlöslichen Fett-

säuren wuchsen, mußte daher mit einem löslichen Substrat, dem Butyrat, bestimmt werden; alle mit langkettigen Fettsäuren isolierten Sulfatreduzierer vermochten nämlich auch Butyrat zu verwerten. Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurden für diese Stämme wieder Palmitat und Stearat verwendet; dabei wurden die Zeiten miteinander verglichen, die bei den verschiedenen Temperaturen bis zum vollständigen Verbrauch der weißen Flocken benötigt wurden. Das Wachstum von Zellpaketen und Filamenten konnte stets nur aufgrund qualitativer Beobachtungen bewertet werden (s. B.6.2.). Tab. 4 zeigt die ermittelten pH- und Temperatur-Optima sowie auch niedrigste und höchste pH-Werte bzw. Temperaturen, bei denen noch ein Wachstum beobachtet wurde. Die Stämme 3bu10 und 2pa3 wurden durch Änderungen des pH-Werts in einem gewissen Bereich kaum beeinflusst, zeigten also kein ausgeprägtes pH-Optimum.

3.1.3. Lichtempfindlichkeit

Während der Optimierung der Wachstumsbedingungen waren einige Kulturen des Sarcinen-ähnlichen Sulfatreduzierers 3be13 in einem Aquarium als Wasserbad inkubiert worden, das unweit von einem Fenster stand. In diesen Ansätzen wurde dann weder ein Wachstum noch eine Bildung von H₂S beobachtet. Entsprechende Kulturen, die im Dunkeln (Brutschrank oder Brutraum) inkubiert wurden, wuchsen dagegen stets. Die Ursache für die beobachtete Wachstumshemmung war das Tageslicht. Bereits diffuses Tageslicht mit einer Beleuchtungsstärke von 2000 Lux hemmte das Wachstum von Stamm 3be13 vollständig. Aufgrund dieser Erfahrung wurden auch alle anderen Stämme stets im Dunkeln inkubiert und

Tab. 4, S. 158 - 159: pH- und Temperatur-Optima der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien. Die in Klammern angegebenen Zahlen sind die niedrigsten bzw. höchsten pH-Werte und Temperaturen, bei denen noch ein Wachstum beobachtet wurde (pH-Bereich, Temperatur-Bereich). Die von den einzelnen Stämmen benötigten Vitamine sind ebenfalls mit aufgeführt (s. 3.1.5.).

Tab. 4 (Erläuterungen s. S. 157)

Stamm	pH-Optimum	(-Bereich)	Temp.-Optimum	(-Bereich)	benötigte Vitamine
			[°C]		
1ac2	7.1	(6.6 - 7.6)	36	(20 - 40)	Biotin
2ac9	7.3	(6.2 - 8.5)	32	(10 - 37)	4-Aminobenzoat, Biotin
3ac10	7.2	(5.8 - 8.5)	32	(10 - 37)	Biotin
4ac11	7.1	(6.1 - 8.3)	31	(10 - 37)	4-Aminobenzoat, Biotin
5ac10	7.6	(6.5 - 8.8)	30	(15 - 36)	Biotin
1pr3	7.2	(6.0 - 8.6)	39	(10 - 43)	4-Aminobenzoat
2pr4	7.2	(6.6 - 8.1)	30	(10 - 36)	-
3pr10	7.4	(6.6 - 8.1)	29	(10 - 36)	4-Aminobenzoat
1bu8	6.9	(5.4 - 8.2)	34	(15 - 39)	4-Aminobenzoat
2bu10	7.7	(6.6 - 8.7)	34	(15 - 40)	-

3bu10	7 - 8	(6.4 - 8.6)	32	(15 - 37)	Biotin
4bu10	7.6	(6.6 - 8.6)	35	(15 - 39)	-
1pa3	7.7	(6.5 - 9.3)	34	(15 - 39)	-
2pa3	7 - 8	(6.5 - 8.6)	34	(15 - 39)	-
3pa8	7.6	(6.6 - 8.6)	35	(15 - 39)	-
4pa10	7.5	(6.8 - 8.2)	30	(15 - 37)	-
5pa13	6.8	(5.8 - 8.2)	35	(15 - 40)	-
1st1	7.3	(6.5 - 8.2)	35	(20 - 39)	-
1be1	7.3	(6.7 - 7.9)	35	(15 - 40)	4-Aminobenzoat, Biotin, Thiamin
2be1	7.4	(6.7 - 7.9)	35	(20 - 40)	4-Aminobenzoat, Biotin
3be13	7.4	(6.7 - 8.0)	33	(15 - 38)	-
4be13	7.0	(6.6 - 7.5)	32	(15 - 37)	4-Aminobenzoat, Biotin, B ₁₂

aufbewahrt. Während der Handhabung der Sulfatreduzierer im Labor wurde ein stärkerer oder unnötig langer Lichteinfall in die Kulturgefäße vermieden.

3.1.4. Stimulation des Wachstums durch Suppline

Während der Anreicherungen mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoat waren auch Passagen mit zusätzlichen Wuchsstoffen in Form des Extrakt-Gemischs beimpft worden; dadurch sollte die Entwicklung eventuell vorhandener Sulfatreduzierer mit komplexen Wachstumsansprüchen ermöglicht werden. In den Ansätzen mit zusätzlichem Extrakt-Gemisch waren dann zwar keine anderen Bakterien angereichert worden als in den rein synthetischen Medien; doch für die Isolation der zwei fädigen, gleitenden Stämme 5ac10 und 4be13 mußten die komplexen Wuchsstoffe zugesetzt werden, um ein ähnlich befriedigendes Wachstum wie bei den übrigen 20 Sulfatreduzierern zu erzielen. Die fädigen Bakterien hatten kein absolutes Bedürfnis für die Wuchsstoffe im Extrakt-Gemisch, wurden aber durch diese stark stimuliert. Das Extrakt-Gemisch war aus Faulwasser, Gärextrakt und Gülleextrakt zusammengestellt worden (s. B.3.4.7.) und enthielt somit anaerobe Abbauprodukte aus biologischem Material unterschiedlicher Herkunft.

Nunmehr sollte untersucht werden, wie die drei Komponenten des Extrakt-Gemischs jeweils einzeln auf das Wachstum der fädigen Sulfatreduzierer wirkten. Da es sich hier nunmehr um Reinkulturen handelte, konnten ferner auch noch Hefeextrakt und Pansenflüssigkeit auf eine stimulierende Wirkung geprüft werden; in Anreicherungen führten nämlich Hefeextrakt und Pansenflüssigkeit zu einer stärkeren Entwicklung unerwünschter gärender Bakterien. Für physiologische Untersuchungen sind jedoch rein synthetische Medien bekannter Zusammensetzung vorteilhafter als komplexe. Daher wurde versucht, das Bakterienwachstum auch durch Verwendung chemisch definierter Verbindungen als Suppline zu stimulieren. Für die Sulfatreduzierer kamen vor allem

solche Verbindungen als mögliche Suppline in Frage, die an den natürlichen Standorten und wohl auch im Extraktgemisch und der Pansenflüssigkeit als Abbauprodukte von Zellbestandteilen vorkommen können. Aus der Vielzahl der möglichen Verbindungen wurden hier Succinat als C₄-Dicarbonsäure, die gerad- und verzweigtkettigen Fettsäuren in Carbonsäure-Gemisch I und die organischen Säuren mit cyclischen Substituenten in Carbonsäure-Gemisch II eingesetzt (s. B.3.4.7.). Von den in Carbonsäure-Gemisch I enthaltenen Verbindungen waren die verzweigtkettigen Fettsäuren und Valerianat als Wuchsstoffe für Pansenbakterien nachgewiesen worden (BRYANT, 1973). Das Carbonsäure-Gemisch II enthielt Verbindungen, die als Gärungsprodukte aus aromatischen Aminosäuren gebildet werden können (SCOTT et al., 1964; ELSDEN et al., 1976); weil die Biosynthese der in diesen Substanzen vorhandenen Ringsysteme verhältnismäßig kompliziert ist, kann man vermuten, daß die in Carbonsäure-Gemisch II enthaltenen Verbindungen für bestimmte anaerobe Bakterien eine Bedeutung als Wuchsstoffe haben. Im Zusammenhang mit diesen Experimenten sollte auch noch festgestellt werden, wie das Wachstum der fädigen Sulfatreduzierer durch Agar als voluminöse Gerüstsubstanz im Medium beeinflußt wurde. Der Vorteil eines Bodensatzes für die Entwicklung der gleitend beweglichen Filamente war bereits durch den Zusatz von Aluminiumphosphat als anorganischem, synthetischem Sediment aufgefallen (s. 1.2.1. und 1.2.5.). Daher wurden nun für die gleitenden Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 auch Medien mit gewaschenem Agar, 2 g/l, nach 3.3.3. hergestellt; in dieser Konzentration erfüllte der Agar bereits das gesamte Kulturvolumen, ermöglichte aber noch gutes Pipettieren.

Für die Experimente zur Stimulation des Wachstums durch komplexe und definierte Verbindungen wurden weiterhin noch einige morphologisch oder physiologisch möglichst unterschiedliche Vertreter der insgesamt 22 isolierten Sulfatreduzierer ausgewählt. Dabei handelte es sich um Stämme, die für spätere Untersuchungen auch in Massenkultur angezogen werden sollten; für diese Massenkulturen konnten wachstumsfördernde Zusätze einen praktischen Vorteil bieten.

Die Stimulation einer Bakterienkultur durch eine Substanz soll hier so verstanden werden, daß diese Substanz nicht oder nicht wesentlich als Energiequelle dient, jedoch das Wachstum auf dem gegebenen Substrat als der eigentlichen Energiequelle beschleunigt. Im Falle von Spurenelementen und Vitaminen ist diese Voraussetzung schon aufgrund der anorganischen Natur bzw. der sehr geringen Konzentrationen erfüllt. Die hier in ihrer Wirkung als Supplie geprüften Zusätze führten dagegen zu höheren Konzentrationen organischer Verbindungen im Medium. Daß eine beobachtete Wachstumsförderung eine echte Stimulation war, mußte daher jeweils experimentell sichergestellt werden; die als Wuchsstoffe zugesetzten Verbindungen durften also nicht selbst zu der eigentlichen Energiequelle werden. Nun war der Gehalt der als Supplie zu prüfenden Substanzen im Medium bereits von vornherein so gewählt worden, daß bei einer Oxidation dieser Zusätze viel weniger Sulfat zu H_2S reduziert werden konnte als bei der Umsetzung des eigentlichen Elektronendonators (s. B.3.4.7.). So vermochte zum Beispiel die Menge des bisher häufig verwendeten Extrakt-Gemischs im Medium (20 ml/l) als Substrat für Sulfatreduzierende natürliche Mischpopulationen maximal 2,1 mmol H_2S pro l Medium zu liefern; mit den Fettsäuren und Benzoat wurden jedoch selbst in Reinkulturen bei entsprechend erhöhten Substratkonzentrationen nicht selten bis zu 20 mmol H_2S pro l gebildet. Daß die Wachstumsförderung der fädigen Sulfatreduzierer durch das Extrakt-Gemisch tatsächlich eine Stimulation war, konnte gezeigt werden: Mit dem Extrakt-Gemisch allein bildeten die gleitenden Sulfatreduzierer geringere Zelldichten und auch viel weniger H_2S als bei gleichzeitiger Gegenwart von Acetat bzw. Benzoat. Auch bei den folgenden Untersuchungen wurde im Falle einer Wachstumsförderung jeweils geprüft, inwieweit das Supplin selbst zu einem Wachstum und zu einer Bildung von H_2S führte.

Bevor die einzelnen Zusätze auf ihre stimulierende Wirkung geprüft wurden, mußte noch das Extrakt-Gemisch in den Kulturen der fädigen Sulfatreduzierer ausverdünnt werden. Daher wurden einige Folgepassagen mit Acetat bzw. Benzoat allein beimpft,

sodaß das Wachstum der Filamente deutlich verlangsamt wurde. Für die Wachstumversuche mit Desulfotomaculum acetoxidans (Stamm 1ac2) und Stamm 1pa3 sollte auch noch zusätzlich Butyrat als Substrat verwendet werden, denn dieses hatte für die zwei genannten Stämme eine größere Bedeutung: Desulfotomaculum acetoxidans konnte nämlich leicht mit Butyrat angereichert werden (s. 1.2.3.), und auch der hier mit Acetat isolierte Stamm 1ac2 wuchs ausgezeichnet mit Butyrat. Für die mit Palmitat oder Stearat isolierten Sulfatreduzierer wurde Butyrat bisweilen ersatzweise als eine lösliche Fettsäure verwendet (s. 1.2.4. und 3.1.2.).

Für die Wachstumsversuche in Gegenwart der verschiedenen Zusätze wurden der jeweils optimale pH-Wert und die optimale Temperatur gewählt. Die Vermehrung der freischwebenden Bakterien wurde durch Trübungsmessungen direkt in den Kulturröhrchen nach B.6.1. verfolgt. Das Wachstum von Stamm 1pa3 mit Palmitat und das der fädigen Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 konnte nur aufgrund qualitativer Beobachtungen bewertet werden (s. B.6.2.).

Die aus den Experimenten ermittelten Verdopplungszeiten der geprüften Stämme in Gegenwart verschiedener Zusätze sind in Tab. 5 aufgeführt. Sowohl die komplexen als auch die chemisch definierten Zusätze vermochten in einigen Fällen das Wachstum deutlich zu beschleunigen. Für weitere Versuche sollten jedoch die betreffenden Supplie nur dann verwendet werden, wenn die Verdopplungszeit dadurch entscheidend verkürzt werden konnte. War dagegen die stimulierende Wirkung nicht sehr ausgeprägt und das Supplin gar noch komplexer Natur, so sollte weiterhin auf derartige Zusätze zugunsten eines einfachen, definierten Mediums verzichtet werden:

Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans: Das Wachstum mit Acetat wurde durch Gärextrakt, Gülleextrakt oder Pansenflüssigkeit deutlich, durch das Carbonsäure-Gemisch I weniger gefördert. Mit Butyrat als Substrat wurden etwa doppelt so hohe Wachstums-

raten wie mit Acetat erreicht. Auch das Wachstum auf Butyrat konnte durch die genannten Zusätze noch etwas beschleunigt werden. Die beobachtete Stimulation hätte jedoch für die noch geplanten Versuche keine entscheidenden Vorteile gebracht; Stamm 1ac2 wurde daher bei weiteren Experimenten in Minimalmedium mit Acetat bzw. Butyrat allein angezogen.

Stamm 2ac9: Mit Gärextrakt, Gülleextrakt oder Pansenflüssigkeit waren die Verdopplungszeiten nur wenig kürzer als in Minimalmedium. Weil Stamm 2ac9 bereits mit Acetat allein ein gutes Wachstum zeigte, wurde weiterhin von einem Zusatz der komplexen Wachstoffsstoffe abgesehen.

Stamm 5ac10: Gärextrakt, Gülleextrakt oder Pansenflüssigkeit stimulierten das Wachstum dieses fädigen Sulfatreduzierers auf Acetat erheblich. Nahezu die gleiche Wirkung zeigten Succinat oder das Carbonsäure-Gemisch I. Die wirksamsten Verbindungen in Carbonsäure-Gemisch I waren die geradkettigen Fettsäuren, wie durch Verwendung von Einzellösungen gezeigt werden konnte. Die beste Wirkung wurde dennoch zusammen mit den verzweigt-kettigen Fettsäuren erzielt. Bei gleichzeitigem Zusatz vermochten Succinat und Carbonsäure-Gemisch I die stimulierende Wirkung der natürlichen Wachstoffsstoffe voll zu ersetzen. Auch auf den Zusatz geringer Mengen Fumarat, 0,4 mmol/l, Propionat, 0,4 mmol/l, und sogar Formiat, 0,7 mmol/l, reagierte Stamm 5ac10 mit einer deutlichen Beschleunigung des Wachstums. In Agarmedium wuchs dieser fädige Sulfatreduzierer nicht schneller als in Medium mit Aluminiumphosphat als Sediment. Am besten geeignet für die

Tab. 5, S. 165: Wirkung komplexer und definierter Zusätze zum Medium auf das Wachstum einiger Sulfat-reduzierender Bakterien. Für die fädigen Stämme 5ac10 und 4be13 wurden außer den Medien mit anorganischem Sediment (S) auch in einigen Fällen Medien mit Agar (A), 2 g/l, verwendet. Die Verdopplungszeiten von Stamm 1pa3 beim Wachstum mit Palmitat und die der fädigen Sulfatreduzierer konnten nur annähernd nach B.6.2. bestimmt werden. Bei einer guten Stimulation ist die Verdopplungszeit unterstrichen. • = nicht gemessen

Tab. 5 (Erläuterungen s. S. 164)

Stamm	Substrat	Gemessene Verdopplungszeiten [h] in Gegenwart verschiedener Zusätze:								
		ohne Suppline	Faul- wasser	Gär- extrakt	Gülle- extrakt	Pansen- flüssig- keit	Succinat	Carbon- säure- Gemisch I	Carbon- säure- Gemisch I +	Succinat
1ac2	Acetat	30	30	25	25	25	30	28	28	28
	Butyrat	15	15	12	12	12	15	14	14	14
2ac9	Acetat	21	21	19	20	20	21	21	21	21
5ac10	Acetat	120	100	30	30	30	40	40	30	30
		A: 120	•	30	30	30	•	•	30	30
1pr3	Propio- nat	10	10	8	8	8	10	9	9	9
1pa3	Butyrat	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Palmitat	15	15	15	15	15	15	15	15	15
1be1	Benzoat	35	35	24	24	24	35	24	24	24
4be13	Benzoat	100	50	30	30	30	50	50	40	40
		A: 50	•	30	30	30	•	•	30	30

weiteren Kulturen mit Acetat war somit ein Medium mit Succinat und Carbonsäure-Gemisch I als Supplinen und mit Aluminiumphosphat als synthetischem Sediment.

Stamm 1pr3: Bereits in definiertem Medium mit Propionat allein wuchs Stamm 1pr3 schneller als irgendein anderer der geprüften Stämme. Von der schwachen stimulierenden Wirkung von Gärextrakt, Gülleextrakt, Pansenflüssigkeit oder Carbonsäure-Gemisch I wurde daher bei weiteren Versuchen kein Gebrauch gemacht.

Stamm 1pa3: Das Wachstum auf Butyrat oder Palmitat konnte durch keinen der Zusätze sichtbar beschleunigt werden. Es fiel auf, daß Stamm 1pa3 mit Palmitat trotz der Unlöslichkeit dieser Fettsäure keineswegs langsamer wuchs als mit dem löslichen Butyrat.

Stamm 1be1: Gärextrakt, Gülleextrakt, Pansenflüssigkeit und das Carbonsäure-Gemisch I hatten eine gute stimulierende Wirkung auf das Wachstum mit Benzoat als Elektronendonator. Als besonders wirksame Bestandteile von Carbonsäure-Gemisch I erwiesen sich Valerianat, 2-Methylbutyrat und Heptanat; auch Propionat, ebenfalls eine Fettsäure mit ungerader Anzahl an C-Atomen pro Molekül, stimulierte das Wachstum. Die optimale stimulierende Wirkung wurde erst durch das komplette Carbonsäure-Gemisch I erreicht. Die Verdopplungszeit mit Benzoat allein war für viele Versuche ausreichend, zumal Stamm 1be1 höhere Zelldichten als viele andere Stämme erreichte; für Massenanzuchten war jedoch der Zusatz von Carbonsäure-Gemisch I vorteilhaft.

Stamm 4be13: Das Wachstum auf Benzoat wurde durch Gärextrakt, Gülleextrakt oder Pansenflüssigkeit stark, durch Faulwasser schwächer stimuliert. Auch Succinat oder das Carbonsäure-Gemisch I beschleunigten das Wachstum, aber etwas weniger als die natürlichen Wuchsstoffe. Eine für Stamm 4be13 besonders wirksame Komponente aus dem Carbonsäure-Gemisch I wurde nicht ermittelt; jede Einzellösung der darin enthaltenen Fettsäuren

förderte nämlich das Wachstum etwas, aber stets weniger als das komplette Gemisch. Bei gleichzeitigem Zusatz von Succinat und Carbonsäure-Gemisch I war die Stimulation noch etwas stärker, als bei Vorgabe nur einer dieser Lösungen; doch hatten Succinat und Carbonsäure-Gemisch I auch zusammen stets eine etwas geringere Wirkung als die komplexen Wuchsstoffe. Immerhin wuchs aber Stamm 4be13 bei gleichzeitigem Zusatz von Succinat und Carbonsäuregemisch I mit Verdopplungszeiten, die für viele Versuche ausreichend waren. Enthielt das Medium Agar, so wuchs Stamm 4be13 mit Benzoat allein auffallend schneller als in Medium mit dem anorganischen Sediment. Wurden dem Agarmedium noch Succinat und Carbonsäure-Gemisch I zugesetzt, so war die Stimulation ebensogut wie mit den natürlichen Wuchsstoffen. Somit war Agarmedium für die Kultur des dicken, fädigen Sulfatreduzierers sehr vorteilhaft. Für Massenkulturen mußte selbstverständlich das Medium mit dem anorganischen Bodensatz aus Aluminiumphosphat verwendet werden, denn die Filamente konnten aus Agarmedium nicht abgeerntet werden.

Die stimulierende Wirkung von Supplinen trat bei den Stämmen 5ac10, 1be1 und 4be13 am stärksten in Erscheinung. Wie später gezeigt wurde, konnten die Verbindungen, durch die das Wachstum dieser Sulfatreduzierer stark beschleunigt wurde (Fettsäuren bzw. Succinat), auch als Elektronendonatoren verwertet werden. Dennoch war dieser fördernde Effekt ebenso wie jeder andere hier beobachtete eine Stimulation des Wachstums auf dem eigentlichen organischen Substrat; wurden nämlich die jeweiligen stimulierenden Substanzen allein angeboten, so wurden stets viel geringere Zellerträge und auch viel weniger H₂S gebildet als in Gegenwart von Elektronendonatoren und Supplinen zusammen.

Eine stimulierende Wirkung von Hefeextrakt auf die hier untersuchten Stämme wurde nicht beobachtet. Auch das Carbonsäure-Gemisch II zeigte keinerlei wachstumsfördernde Wirkung, auch dann nicht, wenn diese Lösung mit Succinat und Carbonsäure-Gemisch I zusammen eingesetzt wurde.

Die Ansätze mit Hefeextrakt dienten gleichzeitig zur Reinheitskontrolle (s. B.5.) der hier untersuchten Stämme: Unter dem Mikroskop waren keine anderen als die jeweils isolierten Bakterien zu erkennen.

3.1.5. Vitaminbedürfnis

Nunmehr waren auch die fädigen, gleitenden Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 wie alle übrigen Stämme ohne Zusatz des komplexen Extrakt-Gemischs in definierten, rein synthetischen Medien kultivierbar. Daher konnten von den sieben bisher zugesetzten Vitaminen diejenigen ermittelt werden, welche von jedem einzelnen Stamm tatsächlich benötigt wurden. Allen Kulturmedien waren bisher stets 4-Aminobenzoat, Biotin, B₁₂, Nicotinat, Pantothenat, Pyridoxamin und Thiamin von vornherein zugesetzt worden.

Zunächst wurden die isolierten Stämme mehrere Male hintereinander in Vitamin-freies Medium überimpft. Für die fädigen Sulfatreduzierer wurden bei diesen Versuchen die definierten Medien mit Succinat und dem Carbonsäure-Gemisch I als Supplinen und mit Aluminiumphosphat als Sediment verwendet. Ein Vitaminbedürfnis war daran zu erkennen, daß nach einer bestimmten Anzahl von Passagen kein Wachstum mehr stattfand. Daraufhin wurden jeweils sieben Ansätze aus dem betreffenden Medium hergestellt, in denen immer eines der Vitamine fehlte; hierfür dienten die unter B.3.4.4. genannten speziellen Vitamin-Gemische und die Lösung von Vitamin B₁₂. Ferner wurden Kontrollansätze vorbereitet, die alle sieben Vitamine enthielten. Aus der Passage, in der soeben noch ein Wachstum zu erkennen war, wurden dann die hier zusammengestellten Medien beimpft. Mit einer Wirkung der Vitamine mußte bereits in viel niedrigeren Konzentrationen als den hier gegebenen gerechnet werden. Um eine Verschleppung kleinster Mengen an Vitaminen bei der Herstellung und beim Beimpfen der Ansätze auszuschließen, wurde jeweils immer eine saubere Pipette verwendet. Die Ansätze, in denen wäh-

rend der anschließenden Inkubation kein Wachstum stattfand, ließen auf die benötigten Vitamine schließen; diese wurden dann den Medien der betreffenden Sulfatreduzierer zugesetzt. Wuchsen die Stämme in diesen Folgepassagen fortan genauso wie vormals mit den sieben Vitaminen, so konnte von nun an auf einen Zusatz der übrigen Vitamine verzichtet werden. Ließ jedoch das Wachstum nach, so mußte nochmals in der beschriebenen Weise geprüft werden, welche weiteren der sieben Vitamine benötigt wurden; es lag nämlich dann ein Bedürfnis für Vitamine vor, die noch in besonders geringen Konzentrationen wirksam waren.

Die von den Sulfatreduzierern jeweils benötigten Vitamine sind in Tab. 4 zusammen mit den pH- und Temperatur-Optima aufgeführt. Bei jedem nachgewiesenen Vitaminbedürfnis handelte es sich um ein absolutes, denn ohne die betreffenden Vitamine war nie ein Wachstum möglich. Etliche der isolierten Sulfatreduzierer, in der Mehrzahl die vibrioiden, benötigten keinerlei Vitamine. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse war es nun möglich, alle isolierten Stämme in Minimalmedien bezüglich organischer Wachstumsfaktoren zu kultivieren; die im Einzelfall benötigten Vitamine wurden den Medien aus den Stammlösungen (s. B.3.4.4.) zugesetzt.

Schließlich sollte noch geprüft werden, ob noch andere als die bisher verwendeten Vitamine das Wachstum einiger Stämme zu stimulieren vermochten. Als zusätzliche Vitamine bzw. Vitamin-ähnliche Stoffe wurden Cholin, Folat, Hämin, Inosit, Liponat, Menadion, Pyridoxal, Pyridoxol und Riboflavin (s. B.3.4.4.) angeboten. Für die Versuche wurden wiederum die Stämme ausgewählt, an denen auch die Wirkung der Suppline im vorhergehenden Kapitel untersucht worden war; dabei handelte es sich um die Sulfatreduzierer 1ac2, 2ac9, 5ac10, 1pr3, 1pa3, 1be1 und 4be13. Die Verdopplungszeiten in Gegenwart der genannten Vitamine wurden mit den Verdopplungszeiten in Medien ohne zusätzliche Vitamine verglichen. Für die fädigen Sulfatreduzierer wurden wieder die Medien mit anorganischem Sediment, Succinat und Carbonsäure-Gemisch I verwendet. Aus den Vergleichsmessungen ging her-

vor, daß keines der zusätzlichen Vitamine das Wachstum der hier geprüften Stämme zu stimulieren vermochte.

3.1.6. Wirkung zusätzlicher Spurenelemente

Die zur Anreicherung, Isolierung und Anzucht bisher verwendeten Medien enthielten stets die Elemente B, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn und Mo. Während der Isolierung von Stamm 1be1 mit Benzoat war dann dessen Bedürfnis für Selen als zusätzliches Spurenelement aufgefallen (s. 1.2.5.). Vielleicht benötigten auch noch andere Sulfatreduzierer für ihre besonderen Abbauleistungen unter den streng anaeroben Bedingungen weitere, bisher nicht zugesetzte Spurenelemente. Sollte das der Fall sein, so hätten die betreffenden Stämme diese zusätzlichen essentiellen Spurenelemente bisher aus den Verunreinigungen der verwendeten Medien bezogen. Falls nun diese Verunreinigungen für ein optimales Wachstum noch nicht ausreichend waren, sollte sich ein Bedürfnis bei Zugabe der betreffenden Elemente in einer Stimulation des Wachstums bemerkbar machen. Für die Experimente wurden wiederum die Stämme 1ac2, 2ac9, 5ac10, 1pr3, 1pa3, 1be1 und 4be13 ausgewählt. Geprüft werden sollte die Wirkung einiger Elemente, deren biologische Bedeutung für Bakterien bzw. auch höhere Lebewesen bereits bekannt ist oder in jüngerer Zeit diskutiert wurde (s. z. B. HOEKSTRA et al., 1974; LANG, 1974; ANDREESSEN, 1978). Die hier eingesetzten Elemente waren F, Ti, V, Cr(III), Se, Sn, J und W; die verwendeten Stammlösungen sind unter B.3.4.6. aufgeführt. In den Medien der mit Benzoat isolierten Stämme waren Selen und Wolfram bereits vorhanden. Beim pft wurden Ansätze, denen die genannten Spurenelemente entweder zusammen oder gar nicht zugesetzt worden waren. Für die fädigen Sulfatreduzierer wurden die Medien mit dem anorganischen Sediment und mit Succinat und Carbonsäure-Gemisch I als Supplinen verwendet. Die Meßergebnisse zeigten jedoch, daß keiner der hier untersuchten Stämme auf die zusätzlichen Spurenelemente mit einem besseren Wachstum reagierte. Den Medien der mit Benzoat wachsenden Stämme wurden allerdings weiterhin Se und W zugesetzt. Inwieweit Selen, Wolfram und auch Molybdän von diesen

Stämmen für die Verwertung von Benzoat und anderen Verbindungen benötigt wurden, war Gegenstand der weiteren Untersuchungen zum Bedürfnis für Spurenelemente in Kapitel 6.1.

3.1.7. Aufbewahrung und Haltbarkeit der Kulturen

Alle isolierten Sulfatreduzierer mußten unabhängig von den jeweils laufenden Untersuchungen als sogenannte Stammkulturen vermehrungsfähig gehalten werden. Nun ist es aber recht aufwendig, eine größere Anzahl von Stämmen immer sogleich nach Beendigung des Wachstums in neues Medium zu überimpfen. Daher wurden parallel zu den Experimenten Erfahrungen darüber gesammelt, wie lange und unter welchen Bedingungen eine Kultur aufbewahrt werden konnte, ohne daß diese alsbald ihre Vermehrungsfähigkeit verlor.

Stets wurde für eine Stammkultur das organische Substrat verwendet, mit welchem der Sulfatreduzierer auch isoliert worden war. Zur Aufbewahrung dienten Flaschen mit 50 ml Inhalt, die im Dunkeln gelagert wurden. Die Haltbarkeit der Bakterienstämme hing vor allem davon ab, bei welchen Temperaturen die Kulturen aufbewahrt wurden. Ausgewachsene Kulturen, die weiterhin bei den optimalen oder auch annähernd optimalen Temperaturen gehalten wurden, starben bereits nach wenigen Tagen ab. Doch auch niedrige Temperaturen (Kühlschrank) waren nicht immer für eine Lagerung der Stämme geeignet. Die verschiedenen Maßnahmen, die sich für eine Erhaltung der Stämme bewährt haben, seien im folgenden genannt:

Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans: Eine ideale Möglichkeit zur Erhaltung von Stamm 1ac2 war dadurch gegeben, daß dieser Sulfatreduzierer Sporen zu bilden vermochte (s. 1.1.). Während der Anreicherungsphasen waren in älteren Kulturen häufig zellen mit Sporen beobachtet worden. Die nunmehr vorliegende Reinkultur vermochte dagegen bei der Inkubationstemperatur (35 - 36 °C) keine Sporen mehr zu bilden. Derartige Kulturen, die unter den optimalen Bedingungen in kurzer Zeit ausgewachsen

waren, starben verhältnismäßig schnell ab: Die Bakterien blieben bei einer Lagerung bei 2 bis 4 °C (Kühlschrank) nur wenige Wochen, bei 20 bis 22 °C nur noch einige Tage lang vermehrungsfähig. In Agar-Schüttelkulturen mit Acetat bildete Stamm 1ac2 jedoch auch weiterhin Sporen. In flüssigem Medium wurden Sporen gebildet, wenn der Sulfatreduzierer mit Acetat bei 20 bis 22 °C, also verlangsamt wuchs. Versporete Kulturen waren mindestens ein Jahr lang im Kühlschrank haltbar. Zur Reaktivierung wurde die versporete Stammkultur in Medium mit Acetat überimpft und zunächst bei der optimalen Temperatur inkubiert. Bis zu einem erneuten Wachstumsbeginn vergingen allerdings häufig mehr als 3 Wochen. Ein Zusatz von Gülleextrakt (s. B.3.4.7.) erleichterte die Reaktivierung. Ferner wurde die Menge an zugegebenem Dithionit für die Folgepassagen aus versporeten Kulturen auf 0,25 bis 0,30 mmol/l erhöht. Nach einem sichtbaren Wachstumsbeginn wurde die Kultur dann in neues Medium ohne Gülleextrakt mit Acetat allein überimpft; diese Passage wurde nunmehr bei 20 bis 22 °C (Raumtemperatur) inkubiert, um die Sporenbildung zu veranlassen. Nach etwa 6 Wochen wurde die versporete Kultur dann im Kühlschrank aufbewahrt. Völlig ungeeignet für Stammkulturen des Sulfatreduzierers 1ac2 war Butyrat als Substrat; mit dieser Fettsäure wuchsen die Bakterien zwar ausgezeichnet, bildeten jedoch niemals Sporen, auch nicht bei Raumtemperatur. Alle mit Butyrat angezogenen Kulturen verloren schon innerhalb einer Woche ihre Vermehrungsfähigkeit.

Stamm 5pa13: Dieser aus marinem Schlamm isolierte Sulfatreduzierer wuchs mit einer Verdopplungszeit von etwa 11 h schneller als andere der isolierten Bakterien auf Palmitat. Leider hatten die Zellen die für Laborexperimente unangenehme Eigenschaft, nach Beendigung des Wachstums alsbald zu lysieren, und zwar im Kühlschrank ebensoschnell wie bei Raumtemperatur. Die im Kühlschrank gelagerten Kulturen waren nach einem Monat häufig nicht mehr vermehrungsfähig; wurden die Bakterien dagegen bei Raumtemperatur aufbewahrt, so waren auch nach 2 Monaten immer noch einige nicht lysierte, zum Teil sogar bewegliche Zellen unter dem Mikroskop zu entdecken. Wenn eine bei Raum-

temperatur gelagerte Kultur dann in frisches Medium überimpft wurde, so war die neue Passage häufig nach einer Woche wieder ausgewachsen. Für die Erhaltung von Stamm 5pa13 wurde daher das beimpfte Medium zunächst bei der optimalen Temperatur (35 °C) inkubiert. Noch bevor die Kultur ganz ausgewachsen war, wurde sie aus dem Brutraum entfernt und bis zur nächsten Überimpfung in 2 bis 3 Monaten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Wachstum in frisch beimpften Medien begann schneller, wenn Dithionit zugesetzt wurde.

Stamm 4be13: Die dicken, fädigen Sulfatreduzierer lysierten bei einer Lagerung im Kühlschrank innerhalb einiger Wochen vollständig. Dagegen blieben Kulturen, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, monatelang vermehrungsfähig. Am besten geeignet für die Erhaltung der dicken Filamente war Medium mit Agar, das nur Benzoat als Substrat und die benötigten Vitamine enthielt, jedoch keine weiteren stimulierenden Zusätze; in diesem Medium waren die Stammkulturen oft länger als 6 Monate haltbar. Weil die Filamente auch schon bei Raumtemperatur gut zu wachsen vermochten, wurden die beimpften Agarmedien stets bei 20 bis 22 °C gehalten. Für den Wachstumsbeginn in frisch beimpftem Medium war ein Zusatz von Dithionit vorteilhaft.

Übrige Stämme: Die ausgewachsenen Kulturen aller anderen, oben nicht genannten Sulfat-reduzierenden Bakterien waren am längsten bei 2 bis 4 °C haltbar. Im Abstand von 3 bis 6 Monaten wurden die Stämme in neues Medium übertragen und zunächst bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert. Bevor die Stammkulturen ganz ausgewachsen waren, wurden die Flaschen aus dem Brutraum entfernt und bei 2 bis 4 °C aufbewahrt; die mit Palmitat wachsenden Sulfatreduzierer wurden kühl gelagert, sobald die weißen Flocken der Erdalkalisalze verbraucht waren. Nach dem Überimpfen alter Stammkulturen konnte die Anlaufphase in dem jeweils neuen Medium durch Zusatz von Dithionit und Gärextrakt oder Gülleextrakt verkürzt werden.

3.2. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.2.1. Zellform, Beweglichkeit

Form und Abmessungen von Zellen der isolierten Sulfatreduzierer sind in Tab. 6 aufgeführt und aus den lichtoptischen Aufnahmen, den Abbildungen 7 bis 34, ersichtlich. Nicht abgebildet sind die ovalen Zellen von Stamm 2pr4 und die vibrioiden Zellen von Stamm 2bu10; diese waren nämlich in ihrer Form den Zellen von Stamm 3pr10 (Abb. 17) bzw. Stamm 4pa10 (Abb. 26) sehr ähnlich. Je nach Wachstumsbedingungen konnten die Zellen vieler Sulfatreduzierer länger oder kürzer sein als die abgebildeten. Einige Bakterien, die im gedrungenen Zustand nur selten eine Krümmung zeigten, waren im langgestreckten Zustand eindeutig vibrioid. So trat bei den Stämmen 2pa3 und 3pa8, die in Abb. 24 bzw. Abb. 25 nahezu oval sind, bei extremen pH-Werten oder Temperaturen oberhalb des Optimums der vibrioiden Charakter in Erscheinung. Abb. 28 zeigt die unterschiedlichen Zellformen von Stamm 1st1 beim Wachstum auf Stearat und auf Butyrat.

Die Mehrzahl der frei im Medium schwebenden Sulfatreduzierer war aktiv beweglich. Der Bewegungsapparat war jedoch nur in einem Fall lichtoptisch sichtbar: Die Zellen von Stamm 3bu10 zeigten häufiger einen Geißel-ähnlichen Anhang, der in Abb. 19 jedoch nur schwach zu erkennen ist; dieser konnte im Elektronenmikroskop als Geißelbündel identifiziert werden (Abb. 20). Während der Anreicherung der Stämme 3ac10 (s. 1.2.1.), 1be1 und 3be13 (s. 1.2.5.) waren einige bewegliche Zellen beobachtet worden, die vielleicht der gleichen Art angehört hatten; seit der Isolation konnten bewegliche Formen jedoch nie wieder auffindig gemacht werden. Tatsächlich wurden bei den Stämmen 3ac10 und 3be13 elektronenmikroskopisch einige Zellen mit Geißeln gefunden (s. Tab. 6).

Der Sulfatreduzierer 3be13 bildete sowohl einen Bodensatz aus Sarcinen-ähnlichen Aggregaten als auch freischwebende, regelmäßige, ovale Einzelzellen. Wurden die Aggregate mit Hilfe

eines Kolbenhomogenisators oder zwischen Objektträger und Deckglas zerdrückt, so waren die herausgelösten Einzelzellen vielfach eckig und unregelmäßig geformt. Der Bodensatz aus den Zellpaketen war in den Kulturen stets vorhanden, auch wenn zum Beimpfen frischer Medien immer nur der Überstand mit den Einzelzellen verwendet wurde. Die Zellaggregate im Bodensatz enthielten sehr unterschiedliche Anzahlen von Zellen und waren demzufolge auch verschieden groß; es handelte sich dabei um Wachstumsstadien, die auffallende Ähnlichkeit mit denen von Methanosarcina (ZHILINA, 1976) oder einer Sarcinen-ähnlichen Art von Cyanobakterien (WATERBURY und STANIER, 1978) hatten.

In den Filamenten der Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 waren deutlich die Einzelzellen zu erkennen. Eine Scheide war nicht vorhanden. Die Zellfäden waren gleitend beweglich und benötigten für diese Lebensweise einen Untergrund. Um ein Festhaften an der Glaswandung zu vermeiden, wurde den Medien Aluminiumphosphat als ein synthetisches Sediment (s. B.3.4.8.) oder auch Agar (s. B.3.3.3.) zugesetzt. Aus dem synthetischen Sediment formten die Fäden häufig röhrenähnliche Gebilde, die insbesondere von den dicken Filamenten als gut sichtbare Kriechspuren hinterlassen wurden (s. Abb. 33); diese Röhren hatten jedoch nur geringe Festigkeit. Abb. 32 zeigt die dicken Filamente von Stamm 4be13 bei schwacher Vergrößerung in einer Flasche mit Agarmedium. In diesem Kulturmedium waren bisweilen Filamente mit einer Länge von einigen mm auffindig zu machen. Während der gleitenden Bewegung wurde bei den Zellfäden, insbesondere bei den dicken von Stamm 4be13, häufig eine gleichzeitige Drehung um die Längsachse beobachtet. Traf ein Filament auf einen Widerstand, zum Beispiel ein anderes Individuum, so kehrte der Zellfaden seine Bewegungsrichtung und auch den Drehsinn binnen weniger Sekunden um. Bisweilen wanden sich die dicken Zellfäden in auffallend regelmäßigen Schraubenwindungen seilartig umeinander (s. Abbildung am Anfang der Arbeit). Alternde Kulturen der fädigen Sulfatreduzierer verloren allmählich die Fähigkeit zur Bewegung. Ein besonderer Teilungsmechanismus, wie zum Beispiel bei Beggiatoa durch Lyse bestimmter Zellen, der sogenann-

ten Necridien (STROHL und LARKIN, 1978), wurde nicht beobachtet. Die Teilung der fädigen Sulfatreduzierer schien einfach darauf zu beruhen, daß sich zwei benachbarte Zellen im Filament voneinander trennten.

3.2.2. Zelleinschlüsse

In den Zellen von Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, aus Agar-Kolonien oder älteren Kulturen mit Acetat waren häufig zwei Arten von Einschlüssen zu erkennen: Nahe der Zellmitte lagen hintereinander ein runder, stark lichtbrechender und ein kegelförmiger, im Hellfeld rötlich schimmernder Körper (Abb. 7). Chloroform vermochte diese Einschlüsse nicht aufzulösen. Natriumhypochlorit (s. B.8.1.) zerstörte zunächst die Zellen; die Einschlüsse wurden dabei voneinander getrennt und dann ebenfalls aufgelöst. Die kegelförmigen Körper in den Zellen verschwanden bei Anwendung von Druck, wie zum Beispiel beim Abzentrifugieren bei über $30\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ aus einer Flüssigkeitssäule von mehr als 5 cm Höhe (radiale Richtung); somit dürfte es sich bei diesen kegelförmigen Einschlüssen um Gasvakuolen handeln. Weil nun Stamm 1ac2 aus einer pasteurisierten Kolonie isoliert worden war, kann der kugelförmige, stark lichtbrechende Einschuß nur noch als die Spore gedeutet werden. Diese Identifikation der Zelleinschlüsse von Desulfotomaculum acetoxidans steht auch im Einklang mit den Beobachtungen von DUDA und MAKAR'EVA (1977), die in Clostridium corinoforum ebenfalls Sporen mit angrenzender, kegelförmiger Gasvakuole nachgewiesen hatten.

In vielen vibrioiden Bakterien, ferner den fädigen Sulfatreduzierern 5ac10 und 4be13 sowie den Stämmen 1be1 und 3be13 waren unterschiedlich große, tröpfchenförmig oder granuliert erscheinende Zelleinschlüsse zu erkennen. Diese Einschlüsse konnten nicht mit Natriumhypochlorit gelöst werden, verschwanden aber bei Behandlung mit Chloroform (s. B.8.1.). Als abgeerntete Massenkulturen der Stämme 1pa3 und 4be13 für die Pigmentanalyse in 3.4. aufgeschlossen und zentrifugiert wurden, fand sich im

Pellet der Zelltrümmer eine weiße Zone aus einer kompakten Substanz; diese konnte in Chloroform gelöst werden und ergab nach dem Verdunsten des Lösungsmittels eine völlig durchsichtige, wasserunlösliche, zellophanähnliche Masse. Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, daß es sich bei den tröpfchenförmigen oder granulierten Zelleinschlüssen um den Speicherstoff Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB) handelte.

3.2.3. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung negativ kontrastierter Zellen (s. B.9.) diente vor allem dazu, die Art der Begeißelung aufzuklären. Die Ergebnisse sind Tab. 6 zu entnehmen. Man erkennt, daß auch Bakterien, die in Reinkultur unbeweglich waren, durchaus Geißeln besitzen konnten: Die Zellen der Stämme 3ac10 und 3be13 hatten bisweilen eine polare Geißel, obwohl in den Reinkulturen nie bewegliche Formen gesehen wurden. Während der Anreicherung dieser Sulfatreduzierer waren allerdings auch einige bewegliche Zellen gleicher Morphologie beobachtet worden. Alle gefundenen Geißeln waren polar inseriert. Der vibrioiden Stamm 3bu10 hatte als einziger ein Geißelbündel (Abb. 20), das bis zu 10 Einzelgeißeln enthielt. Die Geißel des vibrioiden Sulfatreduzierers 1pa3 ist in Abb. 23 stark vergrößert dargestellt. Die Geißel war von einer Scheide umgeben, die eine regelmäßige, jedoch sehr feine und demzufolge nur schwach zu erkennende Querstruktur zeigte.

Stamm 1pr3 war unbegeißelt, aber von einer großen Anzahl feiner, langer, dünner Fortsätze umgeben (Abb. 16). Gebilde dieser Art an anderen Bakterien waren von TWEEDY et al. (1968) und MAYER (1969) als Fimbrien (Pili) beschrieben worden.

Tab. 6, S. 178 - 181: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen an den isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien.
• = nicht untersucht

Tab. 6 (s. S. 177)

Stamm	Zellform	Zellabmessungen: Durchmesser x Länge [µm]
1ac2	stäbchenförmig, leicht gekrümmt, spitze Enden	1 - 1,5 x 3,5 - 9
2ac9	oval	1 - 1,5 x 1,7 - 2,5
3ac10	stäbchenförmig bis oval	1 - 1,2 x 2,5 - 3,5
4ac11	oval	1,5 - 2 x 2,5 - 3,5
5ac10	Zellfilamente	Filam.: 2,5 - 3 x ≤ 2000 Zellen: 2,5 - 3 x 2,5 - 3,5
1pr3	zitronen- oder zwiebförmig	1 - 1,3 x 1,8 - 2
2pr4	oval, bisweilen zitronenförmig	1 - 1,3 x 1,8 - 2
3pr10	oval, selten zitronenförmig	1 - 1,3 x 1,8 - 2
1bu8	vibrioid	1 x 2,5 - 3,5
2bu10	vibrioid	0,7 x 1,5 - 3
3bu10	vibrioid	0,8 - 1,2 x 2 - 3,5

Zelleinschlüsse	Beweg- lichkeit	elektronen- mikroskopische Beobachtungen	Gram- Färbung
Sporen, Durchm. 1,5 µm, und Gasvakuolen	+	1 polare Geißel, Durchm. 27 nm	-
-	-	Spuren von Schleim	-
-	-	1 polare Geißel (selten)	-
-	+	1 polare Geißel	-
PHB	gleitend	.	+
-	-	Fimbrien	-
-	+	1 polare Geißel	-
-	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	polares Geißel- bündel, bis zu 10 Einzelgeißeln	-

Tab. 6, Fortsetzung

Stamm	Zellform	Zellabmessungen: Durchmesser x Länge [µm]
4bu10	stäbchenförmig bis vibrioid	1,5 x 3 - 4,5
1pa3	vibrioid	1,5 x 3 - 5,5
2pa3	oval bis vibrioid	0,5 - 0,7 x 1,3 - 1,7
3pa8	oval bis vibrioid	0,7 - 1 x 1,3 - 1,7
4pa10	vibrioid	0,6 x 1,5 - 3
5pa13	stäbchenförmig bis vibrioid	0,5 - 0,7 x 1,5 - 3
1st1	vibrioid	0,5 - 0,7 x 1,5 - 4
1be1	coccoid	1,5 - 2,2
2be1	oval bis coccoid	1,4 - 1,8 x 1,8 - 2,5
3be13	Sarcinen-ähnliche Aggregate oder ovale Einzelzellen	1 - 1,5 x 1,5 - 2,5
4be13	Zellfilamente	Filam.: 6 - 8 x ≤ 4000 Zellen: 6 - 8 x 9 - 13

Zelleinschlüsse	Beweg- lichkeit	elektronen- mikroskopische Beobachtungen	Gram- Färbung
PHB	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	1 polare Geißel mit Scheide	-
PHB	-	-	-
PHB	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	1 polare Geißel	-
PHB	+	1 polare Geißel	-
-	+	1 polare Geißel	-
PHB	-	Schleimhülle	-
-	+	1 polare Geißel	+
PHB	-	1 polare Geißel (selten)	-
PHB	gleitend	.	+

Die Zellen des coccoiden Sulfatreduzierers 1be1 waren größtenteils von einem breiten, strukturlosen Hof umgeben (nicht abgebildet); dieser konnte als Schleimhülle gedeutet werden, denn abzentrifugierte Zellen dieses Stammes hatten eine schleimige Konsistenz. Auch einige Schleim-freie Zellen dieses Bakteriums wurden im Elektronenmikroskop ausfindig gemacht. Weit geringere Mengen an Schleim als Stamm 1be1 hatten die Zellen des Sulfatreduzierers 2ac9; der Schleim war hier in Form feiner, unregelmäßiger, kontrastarmer Streifen nahe am Bakterium zu erkennen (Abb. 10).

Das interessanteste Ziel elektronenmikroskopischer Untersuchungen an fädigen, gleitenden Bakterien wäre sicherlich die Aufklärung des Bewegungsmechanismus. Untersuchungen zu diesem Thema dürften jedoch recht aufwendig sein, denn bis heute gibt es über den Mechanismus der Gleitbewegung trotz etlicher Bemühungen um eine Aufklärung nur Vermutungen; diese gründen sich vor allem auf Beobachtungen an dem gleitenden Cyanobakterium Oscillatoria (HALFEN und CASTENHOLZ, 1970; CASTENHOLZ, 1973). Auf eine elektronenmikroskopische Untersuchung der fädigen, gleitenden Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 wurde daher im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

3.2.4. Gram-Färbung

Alle isolierten Sulfatreduzierer wurden auf ihr Verhalten gegenüber einer Gram-Färbung nach B.8.2. untersucht. Vorversuche hatten gezeigt, daß der Unterschied zwischen blau gefärbten, Gram-positiven und nicht gefärbten, Gram-negativen Zellen durch eine Gegenfärbung häufig überdeckt wurde. Daher wurde von einer Gegenfärbung abgesehen; stattdessen wurden die Gram-negativen Bakterien im Phasenkontrast identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Von den 22 insgesamt untersuchten Stämmen waren die ovalen Zellen von Stamm 2be1 und die Filamente der Stämme 5ac10 und 4be13 Gram-positiv, während alle übrigen Sulfatreduzierer Gram-negativ waren. Die Zellen der Fila-

mente wurden allerdings ungleichmäßig gefärbt; nach der Gram-Färbung enthielten diese sowohl weniger als auch stärker blau gefärbte Bereiche, was wahrscheinlich auf den reichlich vorhandenen granulären Speicherstoff zurückzuführen war.

Abb. 7 - 34, S. 184 - 194: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien

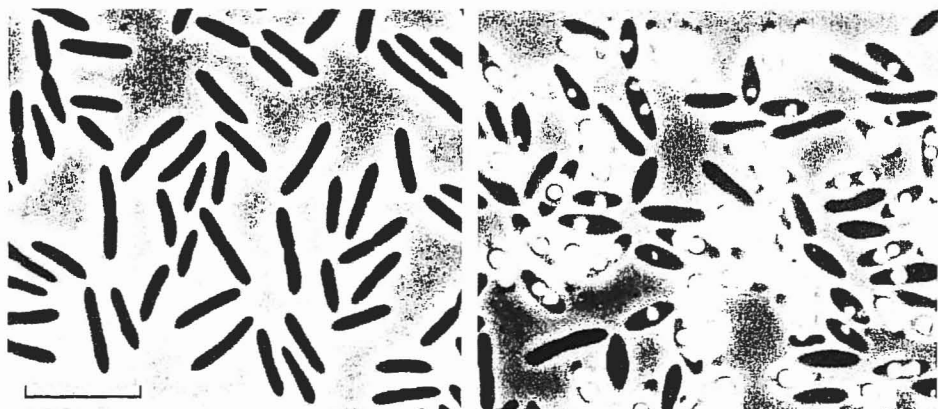


Abb. 7: Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, gewachsen mit Acetat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

links : Vegetative Zellen aus einer Flüssigkeitskultur
rechts: Zellen mit Sporen und Gasvakuolen aus einer Agar-Kolonie

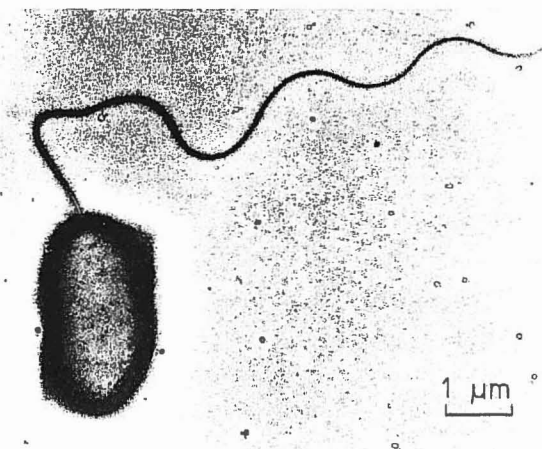


Abb. 8: Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, mit Geißel. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Dr. R. Lurz) nach Negativkontrastierung mit Wolframatophosphorsäure

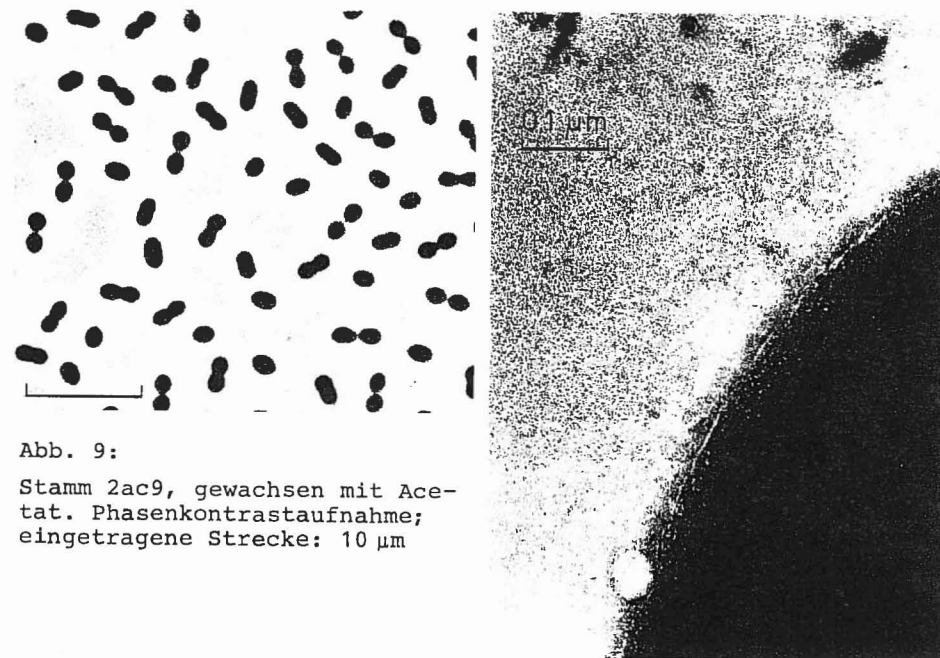


Abb. 9:
Stamm 2ac9, gewachsen mit Acetat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

Abb. 10:
Stamm 2ac9 mit Schleimspuren. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Prof. Dr. F. Mayer) nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat

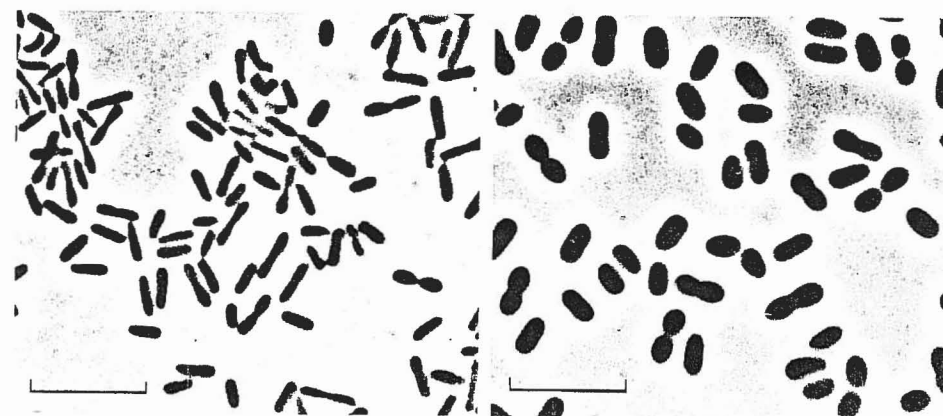


Abb. 11:
Stamm 3ac10, gewachsen mit Acetat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

Abb. 12:
Stamm 4ac11, gewachsen mit Acetat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

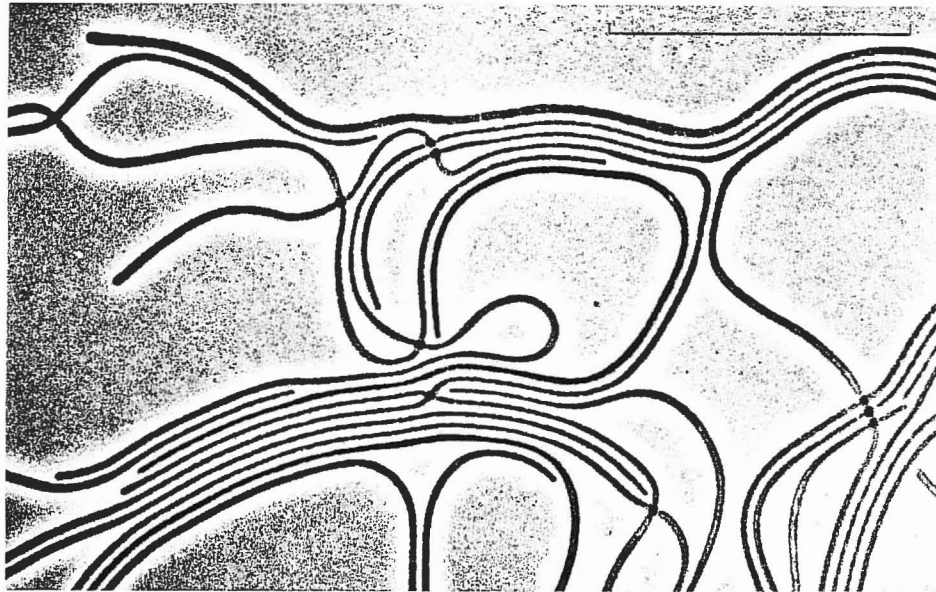


Abb. 13: Stamm 5ac10, Zellfilamente, gewachsen mit Acetat.
Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 0,1 mm

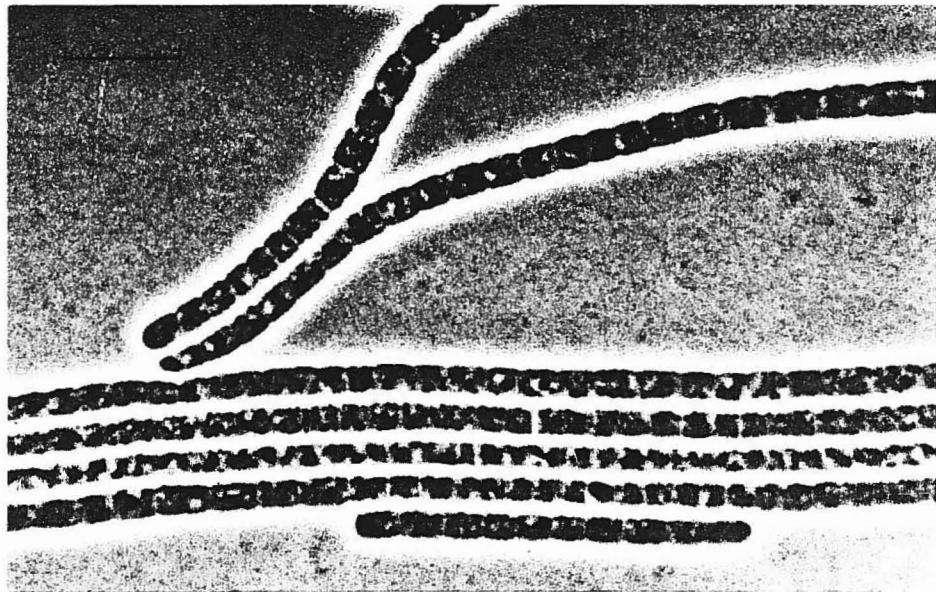


Abb. 14: Stamm 5ac10, Zellfilamente, gewachsen mit Acetat.
Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

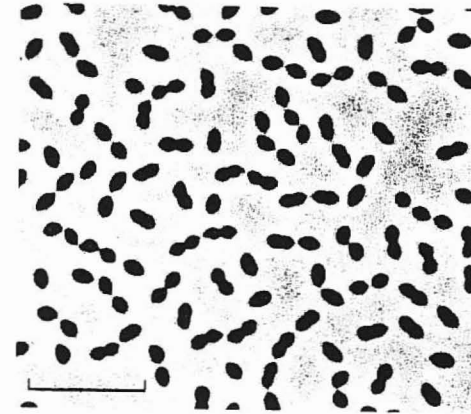


Abb. 15:
Stamm 1pr3, gewachsen mit Propionat. Phasenkontrastaufnahme;
eingetragene Strecke: 10 μ m

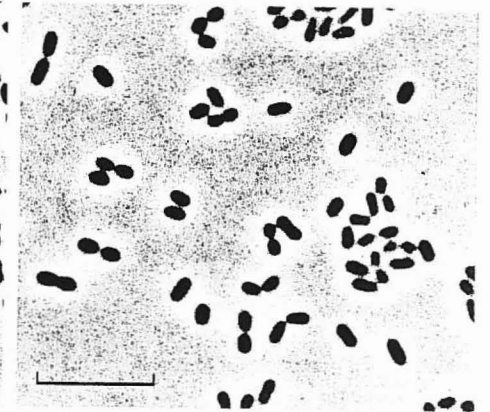


Abb. 17:
Stamm 3pr10, gewachsen mit Propionat. Phasenkontrastaufnahme;
eingetragene Strecke: 10 μ m

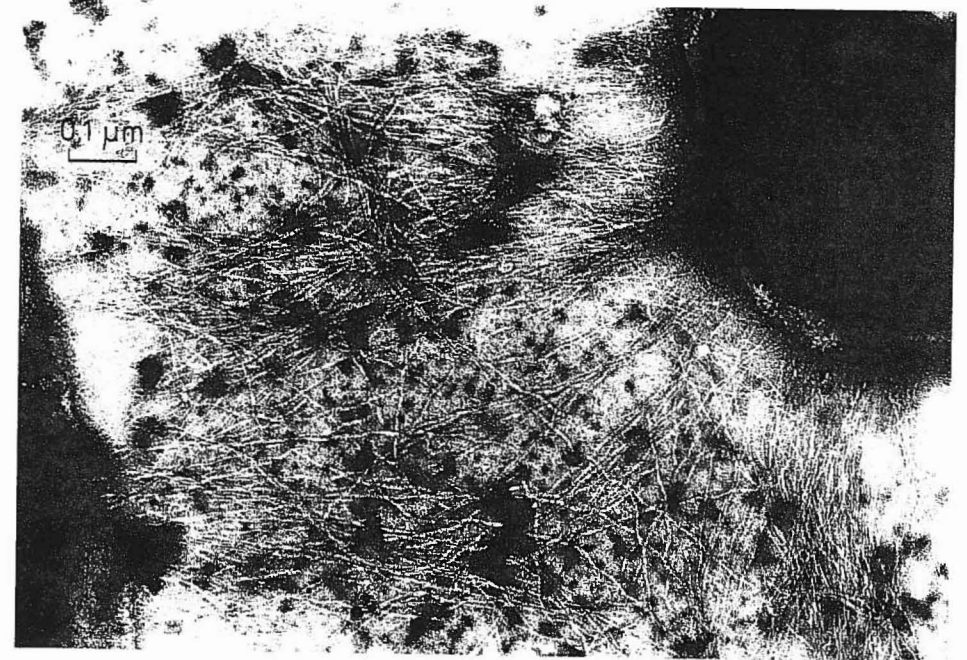


Abb. 16: Stamm 1pr3, Fimbrien zwischen zwei Zellen. Elektronen-
mikroskopische Aufnahme (Prof. Dr. F. Mayer) nach
Negativkontrastierung mit Uranylacetat

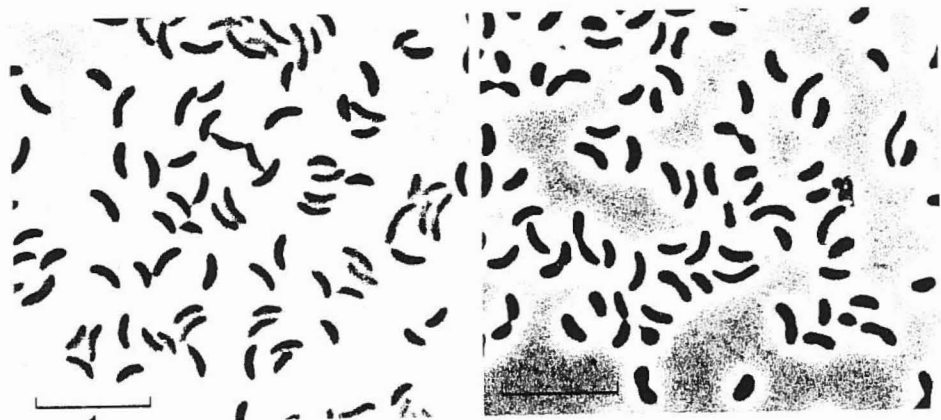


Abb. 18:
Stamm 1bu8, gewachsen mit Butyrat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

Abb. 19:
Stamm 3bu10, gewachsen mit Butyrat. Einige Geißeln sind schwach erkennbar. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

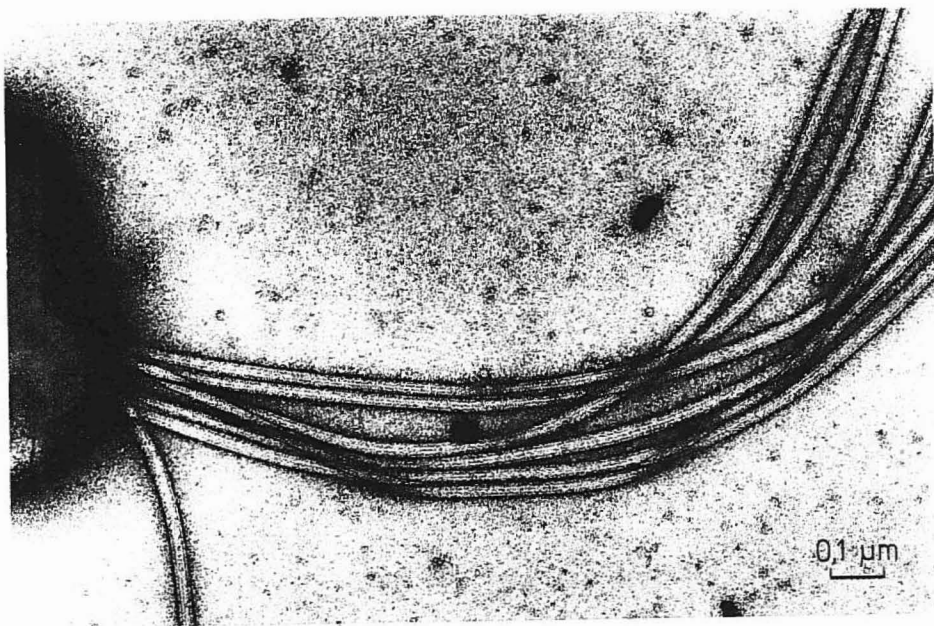


Abb. 20: Stamm 3bu10, Geißelbündel. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Dr. E. Spiess) nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat

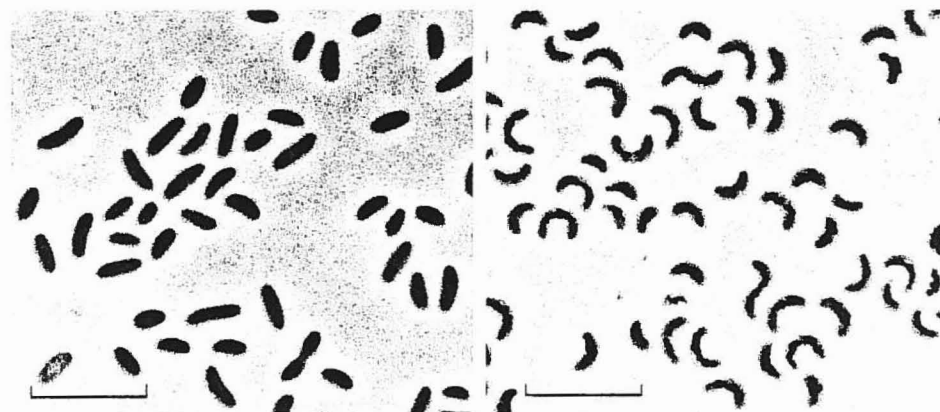


Abb. 21:
Stamm 4bu10, gewachsen mit Butyrat. Die Zellen enthalten PHB als Speicherstoff. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

Abb. 22:
Stamm 1pa3, gewachsen mit Palmitat. Die Zellen enthalten PHB als Speicherstoff. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

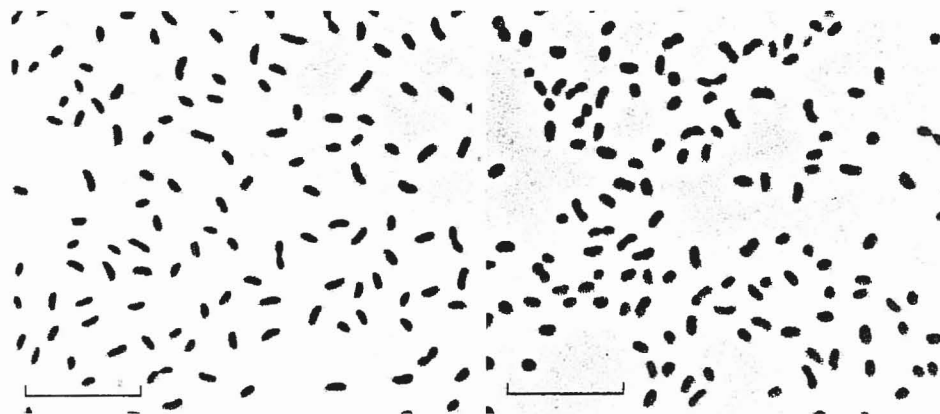


Abb. 24:
Stamm 2pa3, gewachsen mit Palmitat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

Abb. 25:
Stamm 3pa8, gewachsen mit Palmitat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μ m

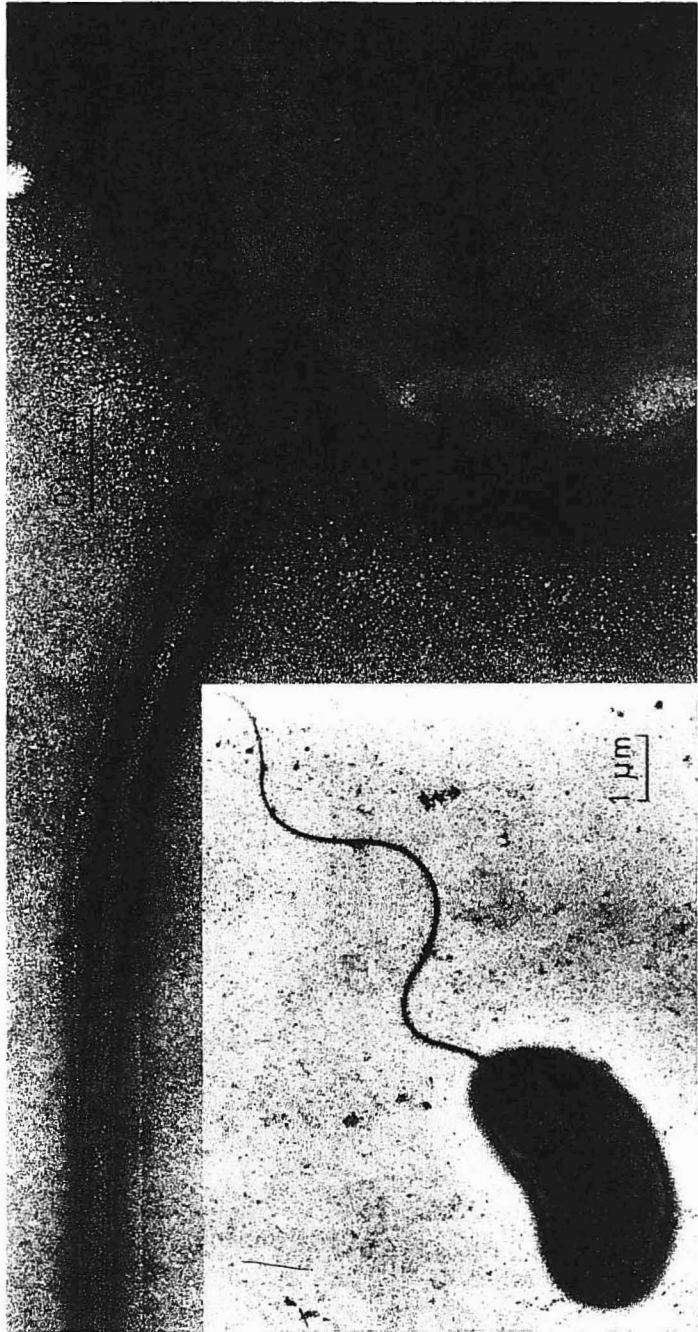


Abb. 23: Stamm 1pa3 mit Geißel. Elektronenmikroskopische Aufnahme (Prof. Dr. F. Mayer) nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat.

kleines Feld: Übersichtsaufnahme

großes Feld: Geißel mit Scheide

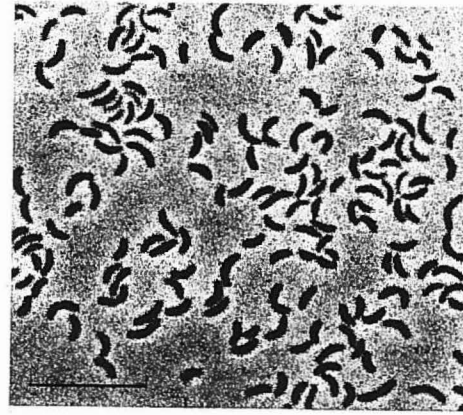


Abb. 26:

Stamm 4pa10, gewachsen mit Palmitat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μm

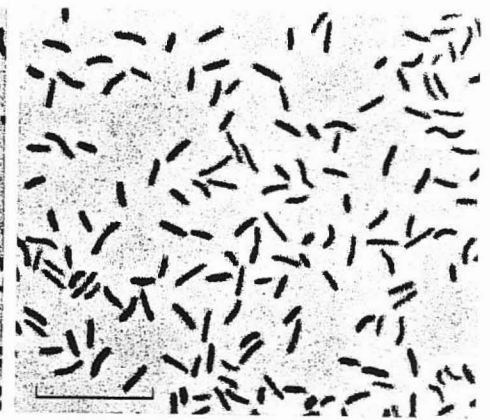


Abb. 27:

Stamm 5pa13, gewachsen mit Palmitat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μm

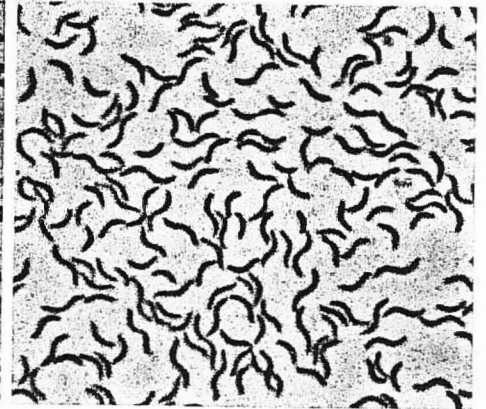
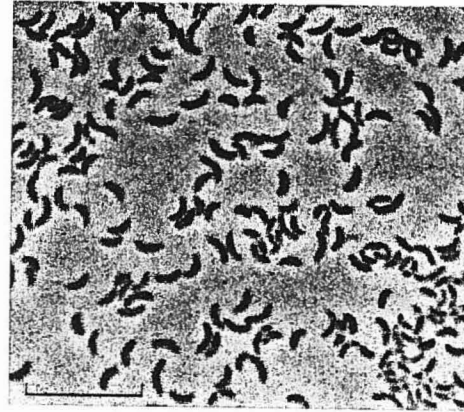


Abb. 28: Stamm 1st1, Zellformen auf verschiedenen Substraten. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 μm

links : gewachsen mit Stearat

rechts: gewachsen mit Butyrat

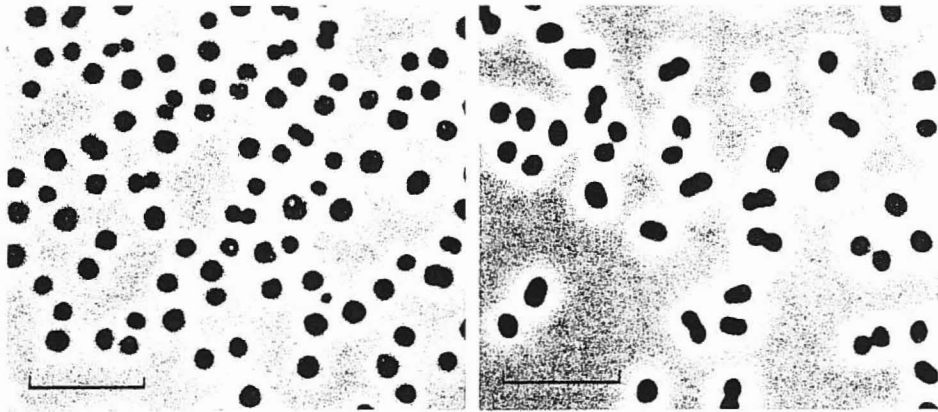


Abb. 29:
Stamm 1be1, gewachsen mit Benzoat. Die Zellen enthalten PHB als Speicherstoff. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

Abb. 30:
Stamm 2be1, gewachsen mit Benzoat. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

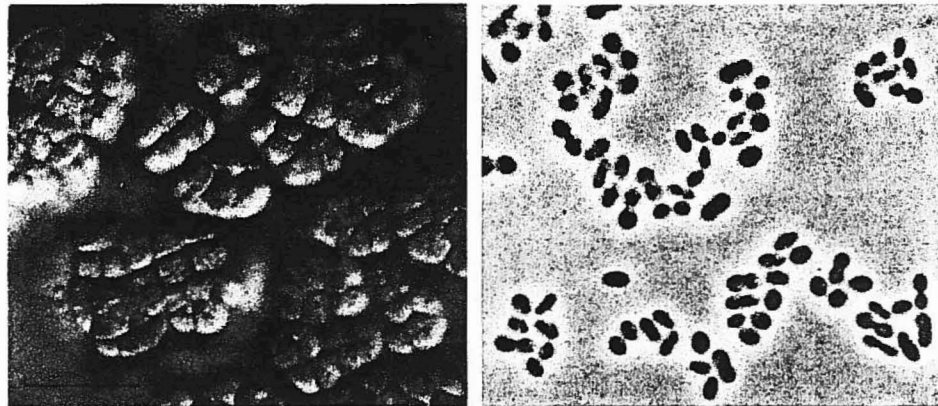


Abb. 31: Stamm 3be13, gewachsen mit Benzoat. Eingetragene Strecke: 10 µm

links : Sarcinen-ähnliche Zellaggregate aus dem Bakteriensediment. Interferenzkontrastaufnahme
rechts: Freischwebende Zellen aus dem Überstand mit Speicherstoff aus PHB. Phasenkontrastaufnahme

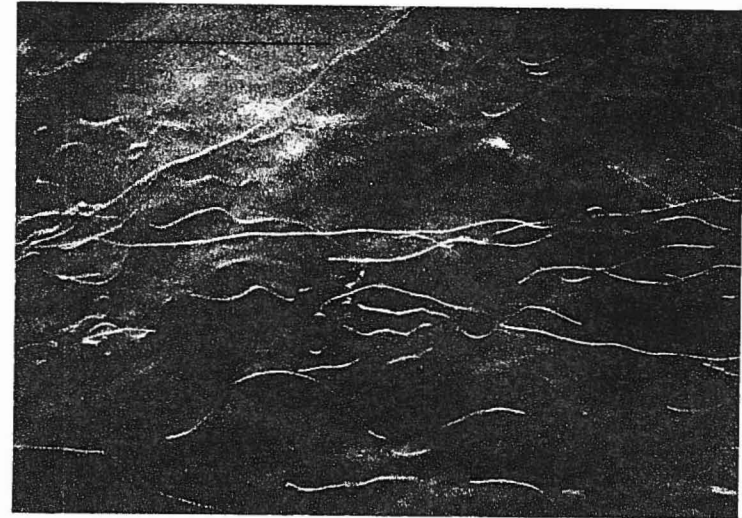


Abb. 32: Stamm 4be13, gewachsen mit Benzoat. Die Zellfilamente wurden in Medium mit 2 g Agar/l direkt im Kulturgefäß (Flasche) fotografiert. Eingetragene Strecke: 1 mm

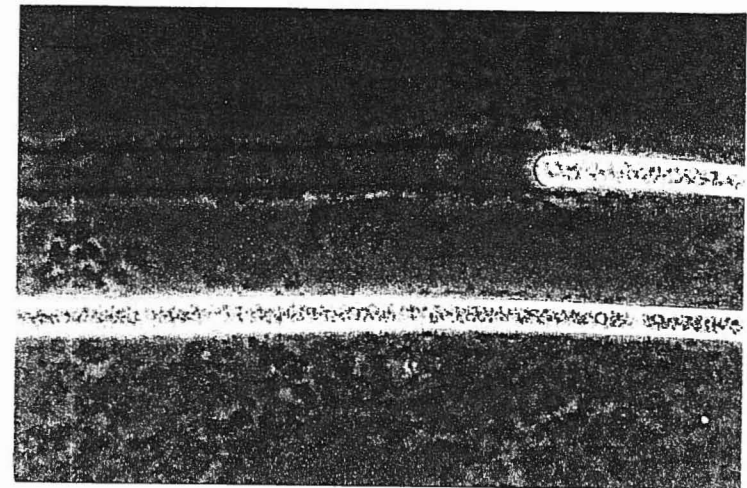


Abb. 33: Stamm 4be13, gewachsen mit Benzoat in Medium mit Aluminiumphosphat als einem synthetischen Sediment; das obere Filament hinterläßt eine aus dem Sediment geformte Röhre als Kriechspur. Die granulären Einschlüsse in den Zellen bestehen aus dem Speicherstoff PHB. Phasenkontrastaufnahme; eingetragene Strecke: 10 µm

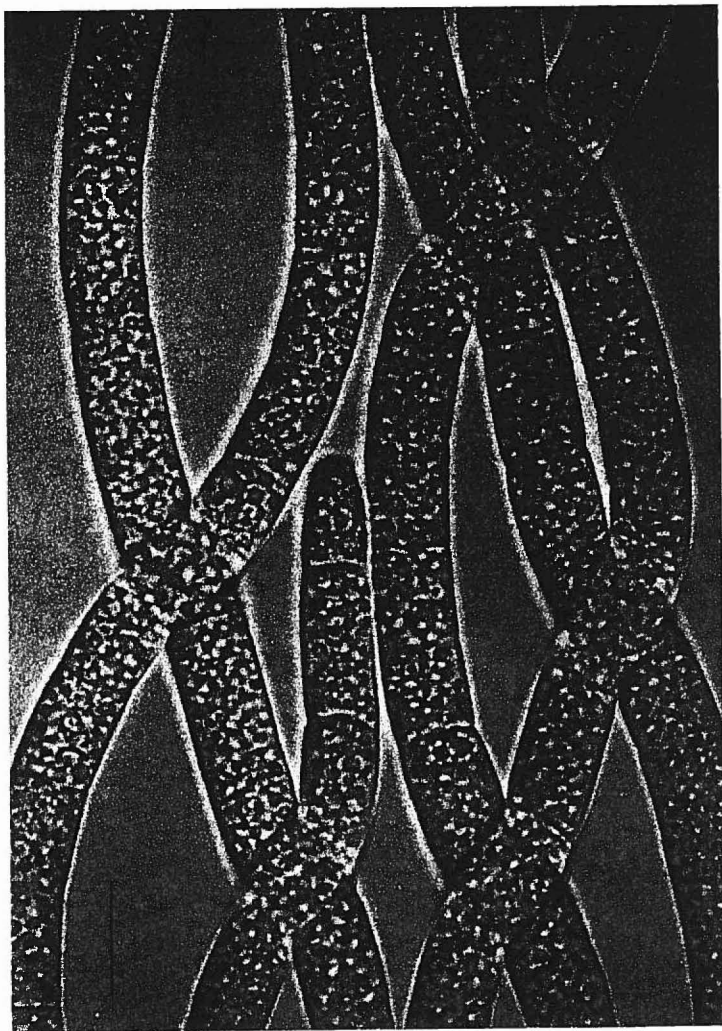


Abb. 34: Stamm 4be13, gewachsen mit Benzoat. Die Zellen der Filamente enthalten Speicherstoff aus PHB. Hellfeldaufnahme, eingetragene Strecke: 10 µm

3.3. Verwertung verschiedener organischer und anorganischer Substrate

Die isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien wurden nunmehr auf ihre Fähigkeit geprüft, andere Elektronendonatoren als die bisher eingesetzten (Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat, Benzoat) zu verwerten. Ferner wurde anhand einiger Stämme untersucht, welche weiteren Verbindungen anstelle von Sulfat als Elektronenakzeptoren dienen konnten, und ob auch in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors ein Wachstum durch Vergärung bestimmter organischer Substrate möglich war.

Für die Versuchsansätze wurden die für einen Stamm jeweils optimalen Kulturbedingungen gewählt. Den Medien der fädigen, gleitend beweglichen Sulfatreduzierer wurden zur Stimulation (s. 3.1.4.) geringe Mengen Succinat und Carbonsäure-Gemisch I zugegeben, sofern nicht auf autotrophes Wachstum zu prüfen war. Außerdem wurde für diese Filamente wiederum Aluminiumphosphat als Sediment eingesetzt (s. B.3.4.8.). Für alle übrigen Stämme wurden Minimalmedien verwendet, die als organische Verbindungen nur die jeweiligen Substrate und eventuell benötigte Vitamine enthielten. Alle mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer waren bisher in Gegenwart von Selen und Wolfram kultiviert worden (s. 1.2.5.). Auch für die nun folgenden Versuche wurden den Medien dieser Stämme stets Selen und Wolfram zugesetzt; Molybdän war im Medium von vornherein vorhanden. Selen und Wolfram wurden ebenfalls zugegeben, wenn die nicht mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer auf die Fähigkeit zur Verwertung cyclischer Verbindungen sowie von Formiat oder Wasserstoff geprüft werden sollten. Schließlich wurde Selen auch noch zugesetzt, wenn Nitrat als Elektronenakzeptor angeboten wurde (vgl. ENOCH und LESTER, 1972).

Die auf Verwertbarkeit zu prüfenden Substanzen wurden in den unter B.3.4.1. und B.3.4.2. angegebenen Konzentrationen angewandt; sind zwei Konzentrationen für eine Verbindung genannt, so galt für die folgenden Versuche der niedrigere Wert. In Vor-

versuchen hatten insbesondere Formiat, Caprylat, Pelargonat, Caprinat, Laurinat, die Hydroxybenzoate und Sulfit in höheren Konzentrationen häufig eine Giftwirkung gezeigt. Für jeden Stamm wurden auch Kontrollansätze hergestellt, denen kein Elektronendonator bzw. kein Elektronenakzeptor zugesetzt wurde. Zum Beimpfen dienten nur gut gewachsene, frische Vorkulturen.

Eine Substanz galt dann als verwertbar, wenn gegenüber dem Kontrollansatz ein sichtbares und aufgrund der Trübung auch meßbares Wachstum des betreffenden Sulfatreduzierers stattfand; in Gegenwart von Schwefelverbindungen als Elektronenakzeptoren mußte eine Bildung von H_2S nachweisbar sein. Einige der Verbindungen, die in höheren Konzentrationen das Wachstum hemmten, lieferten bei den verwendeten geringen Mengen nur ein schwaches Wachstum und wenig H_2S . Um auch mit solchen Substraten die Umsetzungen und die Vermehrung der Zellen gegenüber dem Leerwert deutlich hervorzuheben, wurde die betreffende Substanz noch in weiteren kleinen Portionen während des Wachstums zugesetzt; anstelle von Formiat wurde bei diesen wiederholten Zugaben das Ameisensäure-Formiat-Gemisch (s. B.3.4.1.) verwendet, um so einem zu starken Anstieg des pH-Werts durch den Verbrauch des $H\text{-COO}^-$ -Ions entgegenzuwirken.

Wenn ein Wachstum stattfand, so wurde der Ansatz auch mikroskopisch geprüft. Somit war gleichzeitig eine Möglichkeit zur Reinheitskontrolle des betreffenden Sulfatreduzierers mit verschiedenen Substraten gegeben (s. B.5.). Während der folgenden Untersuchungen wurden jedoch nie andere Bakterien als die jeweils eingesetzten Sulfatreduzierer beobachtet.

Die Tabellen 7 bis 11 geben die Ergebnisse der Prüfung verschiedener organischer und anorganischer Verbindungen auf Verwertbarkeit wieder. Wuchs ein Stamm mit einem Substrat im Vergleich zu dem bisher verwendeten (Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat, Benzoat bzw. Sulfat) nur wenig langsamer, ebensoschnell oder gar schneller, so wurde von einem guten Wachstum (++) gesprochen. Kam es dagegen mit der neuen Verbin-

121
dung nur noch zu Wachstumsraten, die schätzungsweise weniger als halb so hoch wie die ursprünglichen waren, so wurde das Resultat als langsames Wachstum (+) bezeichnet.

3.3.1. Elektronendonatoren

Die Ergebnisse der Prüfung verschiedener biochemischer Substanzklassen als Elektronendonatoren für eine Sulfatreduktion gehen aus den Tabellen 7 bis 9 hervor.

Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, benötigte für einen sichtbaren Wachstumsbeginn mit Butyrat etwa 1 Woche. Wenn jedoch das Wachstum dann einsetzte, so wuchs dieser Stamm in allen weiteren Passagen mit Butyrat wesentlich schneller als mit Acetat (s. Tab. 5). Auf Äthanol oder Butanol begann das Wachstum von Stamm 1ac2 erst nach 1 bis 2 Wochen, auf iso-Butyrat oder Valerianat gar erst nach 3 bis 4 Wochen. Ein Wachstum auf Formiat wurde ebenfalls erst nach 3 Wochen beobachtet; in einigen parallelen Ansätzen mit Formiat blieb das Wachstum ganz aus. Alle übrigen Stämme benötigten für die Anpassung an die neuen Elektronendonatoren selten länger als 1 Woche; dennoch wurden auch die Ansätze dieser Sulfatreduzierer mindestens 3 Wochen inkubiert, falls nicht bereits innerhalb dieses Zeitraums ein Wachstum stattfand.

Die Verwertung von Wasserstoff oder Formiat wurde sowohl unter autotrophen Bedingungen als auch in Gegenwart geringer Mengen Acetat (0,7 mmol/l) als Kohlenstoffquelle geprüft. Zum Nachweis eines autotrophen Wachstums durften außer eventuell benötigten Vitaminen keine anderen organischen Verbindungen mehr vorhanden sein. Daher wurden mit den betreffenden Kulturen mindestens 4 aufeinanderfolgende Passagen ohne Zusatz weiterer organischer Kohlenstoffquellen beimpft; auf diese Weise wurden die anfangs noch vorhandenen organischen Verbindungen ausverdünnt.

Tab. 7: Prüfung der mit Acetat und Propionat isolierten Stämme auf ein Wachstum mit verschiedenen Verbindungen als Elektronendonatoren in Gegenwart von Sulfat. Symbole ++ = gutes Wachstum; + = langsames Wachstum; - = kein Wachstum; · = nicht geprüft

	1ac2	2ac9	3ac10	4ac11	5ac10	1pr3	2pr4	3pr10
Wasserstoff, autotroph	-	-	-	-	+	-	-	-
Wasserstoff mit Acetat	-	-	-	-	++	++	++	++
Äthanol	++	-	++	-	-	++	++	++
Propanol-(1) mit Acetat	-	-	·	·	-	++	·	·
n-Butanol-(1) mit Acetat	+	-	·	·	-	++	·	·
Formiat, autotroph	-	-	-	-	+	-	-	-
Formiat mit Acetat	+	-	-	-	++	-	-	++
Acetat	++	++	++	++	++	-	-	-
Propionat	-	-	-	-	++	++	++	++
n-Butyrat	++	-	-	-	++	-	+	-
iso-Butyrat	+	-	·	·	++	-	·	·
n-Valerianat	+	-	-	-	++	-	-	-
2-Methylbutyrat	-	-	·	·	++	-	·	·
3-Methylbutyrat	-	-	·	·	++	-	·	·
n-Capronat	-	-	-	-	++	-	-	-
n-Heptanat	-	-	·	·	++	-	·	·

- 198 -

n-Caprylat	-	-	·	·	++	-	·	·
n-Pelargonat	-	-	·	·	++	-	·	·
n-Caprinat	-	-	·	·	++	-	·	·
n-Laurinat	-	-	·	·	++	-	·	·
n-Myristinat	-	-	·	·	+	-	·	·
n-Palmitat	-	-	·	·	-	-	·	·
n-Stearat	-	-	·	·	-	-	·	·
Lactat	-	-	+	+	++	++	++	++
Pyruvat	-	-	-	-	++	++	++	++
Succinat	-	-	·	·	++	-	·	·
Fumarat	-	-	·	·	++	-	·	·
Malat	-	-	·	·	-	-	·	·
Cyclohexancarboxylat	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoat	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	·	·	-	-	·	·
Fructose	-	-	·	·	-	-	·	·
Maltose	-	-	·	·	-	-	·	·
Cellobiose	-	-	·	·	-	-	·	·

- 199 -

Tab. 8: Prüfung der mit Butyrat, Palmitat und Stearat isolierten Stämme auf ein Wachstum mit verschiedenen Verbindungen als Elektronendonatoren in Gegenwart von Sulfat. Symbole: ++ = gutes Wachstum; + = langsames Wachstum; - = kein Wachstum; * = nicht geprüft

	1bu8	2bu10	3bu10	4bu10	1pa3	2pa3	3pa8	4pa10	5pa13	1st1
Wasserstoff, autotroph	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wasserstoff mit Acetat	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Äthanol	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propanol-(1) mit Acetat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
n-Butanol-(1) mit Acetat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Formiat, autotroph	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Formiat mit Acetat	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++
Acetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Propionat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
n-Butyrat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
iso-Butyrat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	++
n-Valerianat	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2-Methylbutyrat	*	*	*	*	++	*	*	*	*	+
3-Methylbutyrat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
n-Capronat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Heptanat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++

- 200 -

n-Caprylat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Pelargonat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Caprinat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Laurinat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Myristinat	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
n-Palmitat	-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
n-Stearat	-	-	-	+	+	+	+	++	++	++
Lactat	++	+	++	++	++	-	-	-	++	-
Pyruvat	++	+	++	++	++	-	-	-	++	-
Succinat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Fumarat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Malat	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Cyclohexancarboxylat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Fructose	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Maltose	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-
Cellobiose	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-

- 201 -

Tab. 9: Prüfung der mit Benzoat isolierten Stämme auf ein Wachstum mit verschiedenen Verbindungen als Elektronendonatoren in Gegenwart von Sulfat. Symbole: ++ = gutes Wachstum; + = langsames Wachstum; - = kein Wachstum; • = nicht geprüft

	1be1	2be1	3be13	4be13
Wasserstoff, autotroph	-	-	++	-
Wasserstoff mit Acetat	-	+	++	-
Äthanol	++	++	++	-
Propanol-(1) mit Acetat	++	•	++	-
n-Butanol-(1) mit Acetat	++	•	++	-
Formiat, autotroph	++	-	++	-
Formiat mit Acetat	++	++	++	++
Acetat	+	+	+	+
Propionat	++	+	++	++
n-Butyrat	++	++	++	++
iso-Butyrat	++	•	-	++
n-Valerianat	++	++	++	++
2-Methylbutyrat	++	•	+	+
3-Methylbutyrat	+	•	++	++
n-Capronat	++	++	++	++
n-Heptanat	++	++	++	++
n-Caprylat	++	++	++	++
n-Pelargonat	++	++	++	++
n-Caprinat	++	+	++	++
n-Laurinat	++	-	++	-
n-Myristinat	++	-	++	-
n-Palmitat	+	-	-	-
n-Stearat	-	-	-	-

Tab. 9, Fortsetzung

	1be1	2be1	3be13	4be13
Lactat	++	++	++	-
Pyruvat	++	+	++	-
Succinat	-	•	+	++
Fumarat	-	•	++	++
Malat	-	•	-	+
Adipat	-	-	-	-
Pimelat	-	-	-	-
Cyclohexancarboxylat	++	++	++	-
Benzoat	++	++	++	++
Hippurat	-	-	++	+
Phenylacetat	++	++	++	++
3-Phenylpropionat	++	++	++	++
2-Hydroxybenzoat	+	-	-	-
3-Hydroxybenzoat	-	++	++	-
4-Hydroxybenzoat	-	+	++	++
Nicotinat	-	-	-	-
Harnsäure	-	-	-	-
Glucose	-	•	-	-
Fructose	-	•	-	-
Maltose	-	•	-	-
Cellobiose	-	•	-	-

Die höheren Alkohole Propanol und Butanol wurden stets zusammen mit etwas Acetat (0,7 mmol/l) eingesetzt; nach MECHALAS und RITTENBERG (1960) muß nämlich damit gerechnet werden, daß bestimmte Sulfatreduzierer diese Alkohole zwar als Elektronendonatoren, nicht aber als Kohlenstoffquellen verwerten können (s. auch A.2.2.).

Die mit den verschiedenen Fettsäuren gewachsenen Kulturen der Sulfat-reduzierenden Bakterien wurden auf die gebildeten Produkte geprüft (s. 4.).

Schließlich wurde nochmals auf eine Verwertung von Alkanen als Elektronendonatoren für eine Sulfatreduktion geprüft. Bei den Anreicherungsversuchen mit Kohlenwasserstoffen (s. 2.) war keinerlei Bildung von Schwefelwasserstoff beobachtet worden. Nunmehr sollte jedoch untersucht werden, ob höhere Kohlenwasserstoffe vielleicht durch einige Reinkulturen von Sulfatreduzierern dann oxidiert werden können, wenn diese von vornherein in hohen Zelldichten zugegen sind. Für diese Versuche wurden einige möglichst unterschiedliche Stämme ausgewählt, die höhere Fettsäuren zu verwerten vermochten und auch mit diesen zunächst vorkultiviert wurden: In jeweils 200 ml des betreffenden Mediums wurden die Stämme 5ac10, 1be1 und 3be13 mit Capronat sowie die Stämme 1pa3, 5pa13 und 1st1 mit Palmitat angezogen. Die ausgewachsenen Kulturen wurden durch Zentrifugieren abgeerntet. Die Zellen eines jeden Sulfatreduzierers wurden in drei flachen Flaschen von 100 ml Inhalt in jeweils 80 ml Medium ohne ein organisches Substrat resuspendiert. Die drei Ansätze mit einem Stamm wurden zu gleichen Teilen mit anaerob autoklaviertem Schlamm von einem Süßwasser- bzw. Meerwasser-Standort versetzt. In den ersten Ansatz wurden dann immer Hexan, Heptan, und Octan und in den zweiten Tetradecan und Hexadecan gegeben; dem dritten Ansatz als Kontrolle wurden keine Alkane zugesetzt. In allen Flaschen verblieb ein Gasraum. Die Kohlenwasserstoffe in den anaerob verschlossenen Flaschen wurden zu Beginn der Inkubation durch Schütteln emulgiert, so wie es unter B.3.5.4. beschrieben ist. In keinem der Ansätze mit Alkanen wurde jedoch

eine Bildung von H_2S gegenüber der betreffenden Kontrolle gemessen. Die Stämme 5ac10, 1pa3, 5pa13, 1st1, 1be1 und 3be13 vermochten demnach keine Alkane als Elektronendonatoren für die Sulfatreduktion zu verwerten.

3.3.2. Elektronenakzeptoren

Zur Prüfung verschiedener Verbindungen als Elektronenakzeptoren wurden die Medien in Tab. 2 ohne Sulfat zubereitet. Als Elektronendonatoren wurden hier nur die organischen Substrate eingesetzt, mit denen die betreffenden Stämme auch isoliert worden waren; lediglich für die mit Palmitat und Stearat isolierten Stämme wurde Butyrat als eine lösliche Fettsäure verwendet. Tab. 10 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Drei der untersuchten Stämme wuchsen nicht mit Thiosulfat; von diesen Stämmen vermochten wiederum zwei auch kein Sulfit zu verwerten. Eine Wachstumshemmung konnte hier jedoch ausgeschlossen werden; denn sobald den Ansätzen nur wenig Sulfat aus einer sterilen Lösung zugesetzt wurde, begann das Wachstum.

Eine Verwertung von Schwefel wurde nie beobachtet. Bei einigen Stämmen wurde bisweilen nur eine geringfügige Bildung von H_2S aus Schwefel gegenüber dem Kontrollansatz gemessen; in zweiten Passagen mit Schwefel und dem betreffenden Elektronendonator fand dann aber nicht mehr die geringste Reduktion von Schwefel statt. Andere der geprüften Sulfatreduzierer wurden durch Schwefel sogar gehemmt: Wurden den Stämmen 1ac2, 2ac9, 5ac10, 1pa3 und 4be13 Schwefel und gleichzeitig Sulfat angeboten, so fand weder eine Bildung von Schwefelwasserstoff noch ein Wachstum statt.

Fumarat und Malat wurden nie als Elektronenakzeptoren verwertet; eine Giftwirkung der jeweils eingesetzten Konzentration (10 mmol/l) konnte anhand von Kontrollansätzen mit zusätzlichem Sulfat ausgeschlossen werden. Stamm 3be13 wuchs zwar mit Benzoyl und Fumarat, doch war das Wachstum mit Fumarat allein

Tab. 10: Prüfung einiger Sulfatreduzierer auf ein Wachstum mit verschiedenen Verbindungen als Elektronenakzeptoren; die verwendeten Elektronendonatoren waren Acetat für die Stämme 1ac2, 2ac9 und 5ac10, Propionat für Stamm 1pr3, Butyrat für die Stämme 1pa3 und 1st1 sowie Benzoat für die Stämme 1be1, 3be13 und 4be13. Symbole: ++ = gutes Wachstum; + = langsames Wachstum; - = kein Wachstum. Die positiven Wachstumsergebnisse mit Sauerstoff (mikroaerobe Bedingungen) sind in Klammern aufgeführt, weil Sauerstoff dabei wahrscheinlich nicht direkt verwertet wurde.

	1ac2	2ac9	5ac10	1pr3	1pa3	1st1	1be1	3be13	4be13
Sulfat	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Sulfit	-	++	++	++	++	++	++	+	-
Thiosulfat	-	++	++	++	-	+	++	+	-
Schwefel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumarat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Sauerstoff	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-

ebensogut. Eine Analyse des Mediums der ausgewachsenen Kultur nach B.12.6. und B.12.9. zeigte, daß in Gegenwart und in Abwesenheit von Benzoat aus Fumarat stets Acetat, Propionat und Succinat im gleichen molaren Verhältnis gebildet wurden (s. auch 4.5.). Somit dürfte es sich hier um ein reines Gärungswachstum von Stamm 3be13 auf Fumarat gehandelt haben, ohne daß das gleichzeitig vorhandene Benzoat oxidiert wurde.

Nitrat wurde von einem der untersuchten Stämme, nämlich 1pr3, verwertet. Die negativen Wachstumsergebnisse der übrigen Stämme mit Nitrat beruhten nicht etwa auf einer Unverträglichkeit; sobald nämlich Sulfat zugesetzt wurde, begann das Wachstum wie üblich.

Auf eine Verwertung von Nitrit als Elektronenakzeptor zu prüfen, war wenig sinnvoll. Nitrit reagierte nämlich bereits in einer rein chemischen Reaktion bei Raumtemperatur mit dem Schwefelwasserstoff des Mediums zu gelbem Polysulfid oder gar kolloidalem, weißem Schwefel; je niedriger der pH-Wert des Mediums war, desto schneller und intensiver verlief diese Reaktion.

Zur Prüfung einer Verwertung von Sauerstoff wurde Weichagar nach B.3.5.5. mit den betreffenden Kulturen beimpft. Den verwendeten Vorkulturen war weniger Sulfat zugesetzt worden, als es der sonst gebildeten Menge an H₂S durch den jeweiligen Stamm entsprach; auf diese Weise war das Wachstum durch Sulfat begrenzt worden. In den Röhrrchen, die mit den Stämmen 2ac9, 5ac10, 1pr3, 1st1, 1be1 und 3be13 beimpft worden waren, bildeten sich unter der Atmosphäre mit 10 % O₂ etwa 5 mm von der Agaroberfläche entfernt deutliche Wachstumszonen aus; diese bestanden nicht etwa aus Schwefel oder sonstigen Präzipitaten, sondern ausschließlich aus den Kolonien des betreffenden Sulfatreduzierers. Oberhalb und unterhalb dieser Zonen wurde nicht das geringste Wachstum beobachtet. In unbeimpften Kontrollansätzen oder in den Röhrrchen, die unter einer rein anaeroben Gasatmosphäre inkubiert wurden, blieb die Wachstumszone aus.

In den Ansätzen, die zusätzlich Sulfat enthielten, fand unter der Sauerstoff-haltigen Atmosphäre ein gleichmäßiges Wachstum vom unteren Ende des Röhrchens bis hin zu einem bestimmten Abstand von der Agaroberfläche statt. Es ist jedoch fraglich, ob das beobachtete Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff auf einer direkten Verwertung dieses sehr reaktionsfähigen Oxidationsmittels beruhte, durch welches streng anaerobe Bakterien sonst schnell abgetötet werden (s. Diskussion); daher sind auch die positiven Wachstumsergebnisse in Tab. 10 unter Vorbehalt aufgeführt.

3.3.3. Wachstum mit organischen Substraten in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors

Keines der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien vermochte das betreffende zur Isolation verwendete Substrat (Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat, Benzoat) in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors zu verwerten. Nunmehr sollte aber geprüft werden, ob vielleicht Lactat, Pyruvat, Fumarat oder Malat beim Fehlen eines Elektronenakzeptors ein Wachstum ermöglichen. Für die Versuche wurden selbstverständlich nur solche Sulfatreduzierer ausgewählt, welche mit diesen Verbindungen bereits in Gegenwart von Sulfat ein Wachstum gezeigt hatten. Um das eventuell noch vorhandene Sulfat auszuverdünnen, waren mehrere Folgepassagen ohne Zusatz eines Elektronenakzeptors notwendig. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 aufgeführt.

Bei der Vergärung von Pyruvat wurde nie eine Bildung von Wasserstoff beobachtet, die sich beim Öffnen der Schraubdeckel der Flaschen als Überdruck bemerkbar gemacht hätte (s. 4.5.).

Die mit Lactat und Fumarat gewachsenen Kulturen wurden auf die gebildeten Gärungsprodukte geprüft (s. 4.5.).

Tab. 11: Prüfung verschiedener Sulfatreduzierer auf ein Wachstum durch Vergärung von Lactat, Pyruvat, Fumarat oder Malat in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors. Aufgeführt sind nur solche Stämme, die bereits in Gegenwart von Sulfat mit mindestens einer der genannten Verbindungen ein Wachstum gezeigt hatten. Einige der negativen Wachstumsergebnisse wurden aufgrund der Ergebnisse aus den Tabellen 7 bis 9 eingesetzt, denn eine Verbindung, die in Gegenwart von Sulfat nicht verwertet wird, kann auch kein Wachstum durch Gärung ermöglichen. Symbole: ++ = gutes Wachstum; + = langsames Wachstum; - = kein Wachstum; . = nicht geprüft.

	3ac10	4ac11	5ac10	1pr3	2pr4	3pr10	1bu8	2bu10
Lactat	-	-	-	++	++	+	-	-
Pyruvat	-	-	-	++	++	+	++	+
Fumarat	.	.	-	-
Malat	.	.	-	-

	3bu10	4bu10	1pa3	5pa13	1be1	2be1	3be13	4be13
Lactat	-	-	-	-	+	-	+	-
Pyruvat	++	+	++	++	++	-	+	-
Fumarat	.	.	-	.	-	.	+	-
Malat	.	.	-	.	-	.	-	-

3.4. Nachweis wichtiger Pigmente

Von den isolierten Sulfatreduzierern wurden die sieben Stämme 1ac2, 2ac9, 5ac10, 1pr3, 1pa3, 1be1 und 4be13 eingehender auf das Vorhandensein von Cytochromen und der Sulfit-Reduktasen Desulfovirdin bzw. P-582 geprüft.

Die Bakterien für die Pigmentanalysen wurden mit den organischen Substraten angezogen, die auch bei der Isolation verwendet worden waren (Acetat, Propionat, Palmitat bzw. Benzoat und Sulfat). Den Medien für die fädigen Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 wurden zusätzlich Aluminiumphosphat als Sediment (s. B.3.4.8.) sowie Succinat und das Carbonsäure-Gemisch I als Suppline (s. B.3.4.7.) zugesetzt. Die ausgewachsenen Zellen wurden abgeerntet und gewaschen, so wie es unter B.10. beschrieben ist; um die fädigen Sulfatreduzierer dabei weitgehend von dem zugesetzten Sediment zu befreien, wurden diese mit der genannten Citrat-Lösung gewaschen. Beim Entfernen der Zelltrümmer aus den mit Ultraschall aufgeschlossenen Bakteriensuspensionen durfte im Falle des coccoiden Stammes 1be1 nur schwach zentrifugiert werden ($30\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$); der Stamm bildete nämlich Schleim, der bei hochtourigem Zentrifugieren der aufgeschlossenen Zellen einen größeren Anteil vorhandener Cytochrome mit in das Pellet riß. In den Zelltrümmern der Stämme 1pa3 und 4be13 fanden sich auffallende Mengen einer weißen, kompakten Masse, die in 3.2.2. als Poly- β -hydroxybuttersäure identifiziert wurde.

Bei den folgenden Analysen sollte jeweils unterschieden werden, ob ein Pigment im Cytoplasma löslich war oder gebunden an Membranen vorlag. Die zellfreien Extrakte wurden daher nach B.10.1. in jeweils eine Cytoplasma- und eine Membranfraktion aufgetrennt.

3.4.1. Cytochrome

Die Absorptionsmaxima der gemessenen Redox-Differenzspektren der Zellfraktionen sind in Tab. 12 aufgeführt; die Banden deuteten auf Cytochrome hin, bei denen es sich nach BARTSCH (1968) um b- und c-Typ-Cytochrome handelte. Für den eindeutigen Nachweis von b- und c-Typ-Cytochromen wurden die betreffenden Zellfraktionen weiter nach B.10.2. differenziert. Die b-Typ-Cytochrome konnten aufgrund der Extrahierbarkeit von Protohäm mit Aceton-HCl von den c-Typ-Cytochromen mit nicht extrahierbaren Häm-Gruppen unterschieden werden. Die charakteristischen Absorptionsmaxima der Pyridin-Hämochrome, die durch die Differenzierung aus den Zellfraktionen erhalten wurden, gehen ebenfalls aus Tab. 12 hervor. Abb. 35 zeigt die Absorptionsspektren von Cytochromen aus der Membranfraktion von Stamm 2ac9: Das obere Redox-Differenzspektrum (1) ist das der Membranen in dem zur Suspension verwendeten K-phosphat-Puffer, also das der unbehandelten Membranfraktion. Die zwei unteren Spektren zeigen das Ergebnis der Extraktion mit Aceton-HCl; das mittlere Redox-Differenzspektrum (2) ist das von extrahiertem Protohäm aus b-Typ-Cytochrom in Pyridin-NaOH, während das untere Spektrum (3) das von c-Typ-Cytochrom im Extraktionsrückstand ist, ebenfalls aufgenommen in Pyridin-NaOH.

Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, enthielt als einziger ausschließlich b-Typ-Cytochrom. In allen übrigen der geprüften Sulfatreduzierer wurden sowohl b- als auch c-Typ-Cytochrome nachgewiesen. Der fädige Sulfatreduzierer 5ac10 enthielt allerdings nur sehr wenig b-Typ-Cytochrom. Die b-Typ-Cytochrome der Stämme 1ac2 und 5ac10 waren an die Membranen gebunden, also unlöslich. In dem dicken, fädigen Sulfatreduzierer 4be13 fanden sich b- und auch c-Typ-Cytochrome zum weitaus größten Teil in der Membranfraktion; die geringe Menge der anfangs im Cytoplasma gefundenen löslichen Cytochrome konnte nach der Differenzierung mit Aceton-HCl nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in dem coccoiden Sulfatreduzierer 1be1 war der Anteil der löslichen Cytochrome gering im Vergleich zu dem Anteil der an die Membran gebundenen Cytochrome.

Tab. 12 (Erläuterungen s. S. 213)

Stamm	Zellfraktion	Zellfraktion in K-phosphat-Puffer			Aceton-HCl-Extrakt in Pyridin-NaOH			Extraktionsrückstand in Pyridin-NaOH			identifizierte Cytochrome
		γ	β	α [nm]	γ	β	α [nm]	γ	β	α [nm]	
1ac2	Cytopl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Membr.	426	530	559	418	528	557	-	-	-	b
2ac9	Cytopl.	420	524	554	417	526	557	415	522	550	b, c
	Membr.*	427	527	558	420	525	556	415	521	550	b, c
5ac10	Cytopl.	420	524	552	-	-	-	415	522	550	c
	Membr.	424	530	558	(420	526	557)	415	522	550	(b) c
1pr3	Cytopl.	419	524	553	417	525	557	415	522	550	b, c
	Membr.	425	525	557	419	524	556	414	519	549	b, c
1pa3	Cytopl.	420	524	553	518	524	556	415	521	550	b, c
	Membr.	426	529	558	420	526	557	414	522	550	b, c
1be1	Cytopl.	(420	526	554)	(?	526	557)	(414	521	551)	(b, c)
	Membr.	421	525	554	419	526	557	414	520	551	b, c
4be13	Cytopl.	(420	524	558)	?	?	?	?	?	?	?
	Membr.	422	528	556	419	526	557	414	522	551	b, c

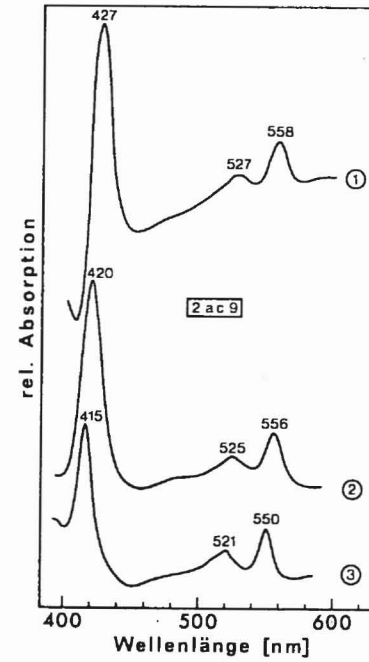


Abb. 35: Redox-Differenzspektren (Dithionit-reduziert minus Luft-oxidiert) von Cytochromen der Membranfraktion des Sulfatreduzierers 2ac9:

- 1) Membranen in K-phosphat-Puffer
- 2) Aceton-HCl-Extrakt in Pyridin-NaOH (Protohäm aus b-Typ-Cytochrom)
- 3) Rückstand von der Aceton-HCl-Extraktion in Pyridin-NaOH (c-Typ-Cytochrom)

Tab. 12, S. 212: Identifizierung von b- und c-Typ-Cytochromen aus den Cytoplasma- und Membranfraktionen verschiedener Sulfatreduzierer; aufgeführt sind die Absorptionsmaxima (γ-, β- und α-Banden) der Redox-Differenzspektren (Dithionit-reduziert minus Luft-oxidiert) der Zellfraktionen in K-phosphat-Puffer sowie die der Aceton-HCl-Extrakte und der Extraktionsrückstände in Pyridin-NaOH. Waren die Maxima nur schwach ausgeprägt (wenig Cytochrom), so sind die betreffenden Werte in Klammern angegeben. Die Differenzspektren von Cytochromen der Membranfraktion von Stamm 2ac9 (*) sind in Abb. 35 (oben) dargestellt.

3.4.2. Desulfovirdin

Auf das Vorhandensein von Desulfovirdin wurde nach B.10.3. sowohl spektrometrisch als auch aufgrund der roten Fluoreszenz in alkalischer Lösung im UV-Licht geprüft.

Die zwei morphologisch sehr unterschiedlichen Sulfatreduzierer 5ac10 (Filamente) und 1be1 (coccoide Zellen) enthielten Desulfovirdin, welches in der Cytoplasmafraktion zu finden und demnach löslich war. Die Absorptionsspektren der Cytoplasmafrak-

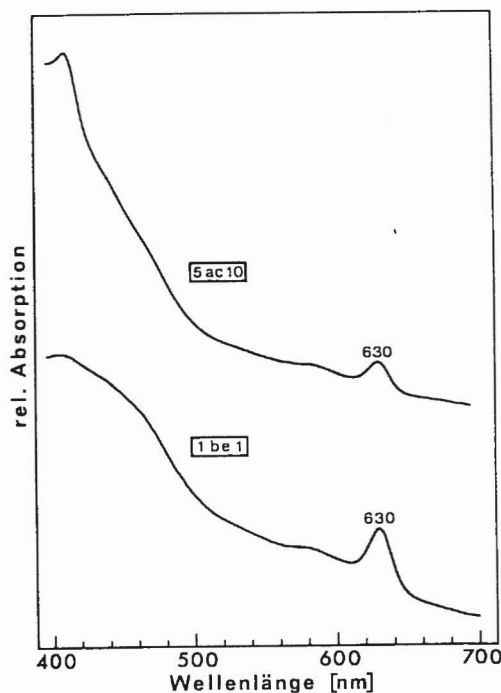


Abb. 36: Nachweis von Desulfovirdin: Die Absorptionsspektren der Luft-oxidierten Cytoplasmafraktionen des fädigen Sulfatreduzierers 5ac10 und des coccoiden Sulfatreduzierers 1be1 wurden gegenüber reinem Wasser aufgenommen. Desulfovirdin lieferte ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 630 nm.

tionen dieser Stämme zeigten jeweils ein sehr deutliches Maximum bei 630 nm (s. Abb. 36); dieses Maximum wurde durch die reduzierende Wirkung von Dithionit nicht beeinflusst. Nach Zusatz von etwas Natronlauge zu einer Probe der Cytoplasmafraktion von Stamm 5ac10 bzw. 1be1 wurde im UV-Licht (365 nm) eine leuchtend rote Fluoreszenz beobachtet. In den Absorptionsspektren der Cytoplasma- und auch der Membranfraktionen der Stämme 1ac2, 2ac9, 1pr3, 1pa3 und 4be13 fehlte das typische Maximum von Desulfovirdin; auch der Fluoreszenz-Test fiel bei diesen Stämmen negativ aus. Daraufhin wurden mit dem Fluoreszenz-Test auch alle übrigen, hier noch nicht untersuchten Stämme auf Desulfovirdin geprüft. Für die Gewinnung der benötigten Zellmassen der übrigen Stämme waren kleine Kulturvolumina von jeweils etwa 0,5 l ausreichend. Die mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen wurden jetzt lediglich von den Zelltrümmern befreit, um so möglichst lichtdurchlässige Extrakte zu erhalten; von einer Auftrennung in Cytoplasma- und Membranfraktionen wurde bei diesen Stämmen abgesehen. Der Fluoreszenz-Test erbrachte wiederum sehr eindeutige Ergebnisse: Unter allen übrigen untersuchten Sulfatreduzierern wurde Desulfovirdin nur noch in dem vibrioiden Stamm 1bu8 nachgewiesen; dieser Sulfatreduzierer war während der Anreicherungen unter den sonstigen vibrioiden Bakterien durch grünliche Kolonien aufgefallen (s. 1.2.3.).

3.4.3. Kohlenmonoxid-Differenzspektren und Nachweis von P-582

Die Sulfit-Reduktase P-582 wurde nach B.10.4. aufgrund des CO-Differenzspektrums nachgewiesen. Sowohl Cytoplasma- als auch Membranfraktionen der Stämme wurden geprüft. Die Maxima und Minima der erhaltenen CO-Differenzspektren gehen aus Tab. 13 hervor. TRUDINGER (1970) gibt für das CO-Differenzspektrum des Cytoplasmas von Desulfotomaculum nigrificans, in welchem P-582 entdeckt wurde, Maxima bei 412, 551 und 596 nm sowie Minima bei 432, 571 und 621 nm an; für das gereinigte Pigment werden entsprechende Maxima bei 414, 550 und 594 nm sowie Minima bei 427, 571 und 620 nm angegeben. Aufgrund des von TRUDINGER aufgezeichneten CO-Differenzspektrums des Cytoplasmas von

Tab. 13: Absorptionsmaxima und -minima der Kohlenmonoxid-Differenzspektren (Dithionit-reduziert, + CO, minus Dithionit-reduziert) von Cytoplasma- und Membranfraktionen verschiedener Sulfatreduzierer in K-phosphat-Puffer. Absorptionsschultern sind in Klammern angegeben. Die Spektren der mit einem Stern (*) gekennzeichneten Zellfraktionen sind in Abb. 37 (S. 217) dargestellt.

Stamm	Zellfraktion	Maxima [nm]	Minima [nm]
1ac2	Cytopl.*	412, 550, 596	432, 572, 621
	Membr.	520	531, 561
2ac9	Cytopl.*	412, 540, 568, 593	425, 554, 617
	Membr.	414, 543, (570)	428, 555
5ac10	Cytopl.*	412, 537, 568, 596	422, 521, 552, 580
	Membr.	412, 540, (567)	422, 553
1pr3	Cytopl.*	415, 539, (569,) 596	431, 524, 553
	Membr.	412, 538, 569	423, 522, 553
1pa3	Cytopl.*	413, (424,) 544, 597	438, 555, 622
	Membr.	415, 542, 598	429, 555, 615
1be1	Cytopl.	414, 542, (568)	432, 553
	Membr.*	412, 538, 569	422, 523, 554
4be13	Cytopl.*	413, (524,) 547, 593	434, 568, 619
	Membr.	414	423, 553

Desulfotomaculum nigrificans konnte P-582 auch in Stamm 1ac2, *Desulfotomaculum acetoxidans*, identifiziert werden. Ein sehr ähnliches CO-Differenzspektrum lieferte die Cytoplasmafraktion des dicken, fädigen Sulfatreduzierers 4be13; die Maxima und Minima waren hier gegenüber den entsprechenden der Cytoplasmafraktion von Stamm 1ac2 etwas verschoben und kamen bereits

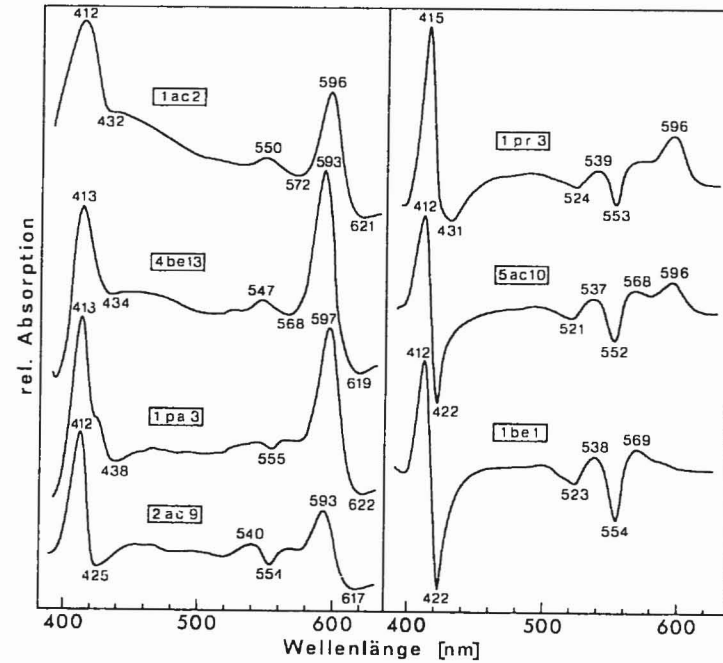


Abb. 37: Kohlenmonoxid-Differenzspektren (Dithionit-reduziert, + CO, minus Dithionit-reduziert) von Zellfraktionen aus verschiedenen Sulfatreduzierern in K-phosphat-Puffer:

- Stamm 1ac2: Cytoplasma
- Stamm 4be13: Cytoplasma
- Stamm 2ac9: Cytoplasma
- Stamm 1pa3: Cytoplasma
- Stamm 5ac10: Cytoplasma
- Stamm 1pr3: Cytoplasma
- Stamm 1be1: Membranen

denen des von TRUDINGER gereinigten Pigments näher. Somit dürfte auch Stamm 4be13 die Sulfit-Reduktase P-582 enthalten. In den Stämmen 1ac2 und 4be13 lag P-582 ebenso wie in *Desulfotomaculum nigrificans* in der Cytoplasmafraktion vor, war also löslich.

Etliche der erhaltenen CO-Differenzspektren zeigten charakteristische Minima bei 422 bis 428 nm und bei 553 bis 555 nm, sowie häufig ein etwas breiteres Maximum bei 537 bis 540 nm; ein sehr ausgeprägtes Beispiel für diese Art von CO-Differenzspektren lieferte die Membranfraktion von Stamm 1be1, das in Abb. 37 rechts unten dargestellt ist. Ganz ähnliche CO-Differenzspektren beschrieben JONES (1971) und WESTON und KNOWLES (1973) als die von c-Typ-Cytochromen. Somit dürften auch die betreffenden hier gemessenen Spektren durch CO-Komplexe vorhandener Cytochrome verursacht worden sein. Die in Abb. 37 dargestellten CO-Differenzspektren der Cytoplasmafraktionen der Stämme 1pa3, 2ac9, 1pr3 und 5ac10 deuten auf unterschiedliche, in der genannten Reihenfolge steigende Mengen an CO-Komplexen von Cytochromen hin. Leider überlagern nun die CO-Differenzspektren der Cytochrome die von möglicherweise vorhandenem P-582. Aufgrund des CO-Differenzspektrums der Cytoplasmafraktion von Stamm 1pa3 kann man noch vermuten, daß P-582 vorhanden war. Die CO-Differenzspektren der Cytoplasmafraktionen der Stämme 2ac9, 1pr3 und 5ac10 sind dagegen bereits stark durch die Absorption der CO-Komplexe von Cytochromen geprägt, sodaß eine Aussage über vorhandenes P-582 kaum noch möglich ist. Das Vorkommen von P-582 in Stamm 5ac10 muß auch deshalb als unwahrscheinlich gelten, weil in diesem Bakterium bereits die Sulfat-Reduktase Desulfovirdin nachgewiesen wurde (s. 3.4.2.). Aus dem CO-Differenzspektrum der Cytoplasmafraktion des coccoiden Sulfatreduzierers 1be1, die ebenfalls Desulfovirdin enthielt, wurde kein Hinweis auf P-582 erhalten. Um nun in den Stämmen 1pa3, 2ac9, 2pr3 und 5ac10 das Vorhandensein von P-582 mit

Tab. 14 (Erläuterungen s. S. 218)

Stamm	Cytochrom-Typ	Desulfovirdin	P-582	GC-Gehalt [mol%]
1ac2	b	-	+	37,5
2ac9	b, c	-	?	45,9
3ac10	.	-	.	.
4ac11	.	-	.	.
5ac10	b, c	+	?	34,5
1pr3	b, c	-	?	59,9
2pr4	.	-	.	.
3pr10	.	-	.	.
1bu8	.	+	.	.
2bu10	.	-	.	.
3bu10	.	-	.	.
4bu10	.	-	.	.
1pa3	b, c	-	?	52,7
2pa3	.	-	.	.
3pa8	.	-	.	.
4pa10	.	-	.	.
5pa13	.	-	.	.
1st1	.	-	.	.
1be1	b, c	+	-	57,4
2be1	.	-	.	.
3be13	.	-	.	.
4be13	.	-	+	41,6

Tab. 14, S. 219: Nachgewiesene Pigmente (s. 3.4.) und GC-Gehalt der DNS (s. 3.5.) einer Auswahl von Stämmen der mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoesäure isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien. Auf Vorhandensein von Desulfovirdin wurden alle Stämme geprüft. Symbole: + = vorhanden; ? = Vorhandensein noch nicht eindeutig nachgewiesen bzw. widerlegt; - = nicht vorhanden; . = nicht geprüft

Sicherheit nachweisen bzw. ausschließen zu können, wäre eine Auftrennung der Cytoplasmafraktionen durch Säulenchromatographie erforderlich; weil von einer solchen im Rahmen der Arbeit abgesehen wurde, kann die Frage nach dem Vorkommen von P-582 noch nicht für alle der untersuchten Stämme beantwortet werden.

3.5. GC-Gehalt der DNS

Die gleichen sieben Stämme der Sulfatreduzierer, die eingehender auf ihre Pigmente geprüft worden waren (1ac2, 2ac9, 5ac10, 1pr3, 1pa3, 1be1 und 4be13), wurden auch auf den Gehalt der DNS an Guanin + Cytosin in mol%, kurz GC-Gehalt genannt, untersucht. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Hippe, Göttingen, übernommen. Der GC-Gehalt wurden aufgrund der thermischen Denaturierung (s. B.11.) bestimmt. Zur Anzucht der benötigten Massenkulturen der Stämme 2ac9, 1pr3 und 1pa3 dienten die Minimalmedien mit den organischen Substraten, die auch bei der Isolation verwendet worden waren (Acetat, Propionat bzw. Palmitat). Stamm 1ac2 wurde nunmehr auf Butyrat und Stamm 1be1 auf Benzoat mit gleichzeitig zugesetztem Carbonsäure-Gemisch I angezogen, um so ein schnelleres Wachstum zu erzielen (s. 3.1.4.). Den Kulturen der fädigen Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 wurden, wie schon häufiger, Aluminiumphosphat als synthetisches Sediment und Succinat und Carbonsäure-Gemisch I als Supplie zugesetzt.

Die ermittelten Werte für den GC-Gehalt der untersuchten Stämme sind in Tab. 14 aufgeführt, in welcher auch gleichzeitig eine Übersicht der nachgewiesenen Pigmente gegeben ist.

4. Quantitative Messungen zum Umsatz organischer Substrate durch die isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien

Mit der Isolierung der Reinkulturen unter 1. war der Beweis dafür erbracht worden, daß Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoat von Sulfat-reduzierenden Bakterien als Substrate für die Energiekonservierung und zum Aufbau der Zellsubstanz direkt verwertet werden können. In Abwesenheit von Sulfat vermochte keiner der isolierten Stämme mit den Fettsäuren oder Benzoat zu wachsen. Die organischen Säuren konnten demnach nicht durch Gärung verwertet werden, sondern nur als Elektrodendonatoren für einen externen Elektronenakzeptor. Als Bilanz der Umsetzungen war eine Oxidation der organischen Substrate zu erwarten. Die bisher bekannten Sulfatreduzierer oxidierten die verwertbaren organischen Verbindungen, wie z. B. Lactat, Pyruvat oder Äthanol, unvollständig zu Acetat, das stets ein Endprodukt war (s. A.2.2.). Weil nun aber etliche der neu isolierten Sulfatreduzierer auch Acetat zu verwerten vermochten, mußte die Frage nach der Umsetzung von Substraten neu gestellt werden. Es galt daher, die Oxidation der verschiedenen organischen Säuren quantitativ in stöchiometrischen Messungen zu untersuchen.

Die Stöchiometrie der Umsetzungen wurde nach B.13. durch Wachstumsversuche in Flaschen mit 1 l Inhalt ermittelt. Gemessen wurde dabei, welche Mengen an Produkten und an bakterieller Zellmasse beim Umsatz bekannter Mengen organischer Substrate mit Sulfat oder anderen Elektronenakzeptoren gebildet wurden. Aus den Daten wurde die Gleichung für die jeweilige ATP-liefernde Reaktion ermittelt, also die Dissimilationsgleichung. Die Menge des organischen Substrats, die ausschließlich für die Reduktion des Elektronenakzeptors gedient hatte, mußte berechnet werden. Von der insgesamt verbrauchten Menge an organischem Substrat wurde daher derjenige Anteil subtrahiert, der für die Synthese von Bakterienmasse gedient hatte. Das synthetisierte Zellmaterial wurde nach B.6.3. als Trockenmasse ermittelt. Diejenige Menge eines organischen Substrats, die für die Synthese

einer bestimmten Menge an Zellmaterial nötig war, wurde berechnet, indem die von HARDER und VAN DIJKEN (1976) angegebene Summenformel für Trockenmasse zugrunde gelegt wurde. Diese Summenformel, $C_4H_8O_2N$, wurde noch vereinfacht, indem das gebundene NH_3 durch das kaum schwerere H_2O ersetzt wurde. In der nunmehr erhaltenen Summenformel, $C_4H_7O_3$, war der Oxidationsgrad des Kohlenstoffs gegenüber der ursprünglichen Formel unverändert geblieben. War das organische Substrat seiner Summenformel nach stärker oxidiert als Trockenmasse, so mußte bei der Synthese gleichzeitig CO_2 entstehen. War dagegen das Substrat stärker reduziert als Trockenmasse, so wurde bei der Synthese der Zellsubstanz ein Einbau von CO_2 postuliert. Auf diese Weise wurden die Assimilationsgleichungen erhalten. Mit Hilfe dieser Assimilationsgleichungen wurde berechnet, wieviel vom organischen Substrat (in mol bzw. mmol) für die Bildung von 1 g bzw. 1 mg Trockenmasse benötigt wurde. Die bei den quantitativen Untersuchungen in dieser Arbeit angewandten Assimilationsgleichungen sind in Tab. 15 zusammengefaßt. Der Anteil an H_2S , der in das gebildete Zellmaterial eingeht, ist im Vergleich zu der Menge der benötigten Kohlenstoffquelle immer sehr gering und wurde daher vernachlässigt. Daher wurde die gebildete Menge an H_2S gleichgesetzt mit der verbrauchten Menge an Sulfat. Das ermittelte molare Verhältnis der verbrauchten Substrate zu den gebildeten Produkten gab Auskunft über die Stöchiometrie der jeweiligen dissimilatorischen Sulfatreduktion.

In den Reaktionsgleichungen sollte auch die elektrolytische Dissoziation berücksichtigt werden. Sulfat als Anion der sehr starken Schwefelsäure liegt unter physiologischen Bedingungen ausschließlich als SO_4^{2-} -Ion vor. Fettsäuren und Kohlendioxid existieren aufgrund der pK_a -Werte (s. Anhang) bei einem pH-Wert von 7.0 zum größten Teil als $R\cdot COO^-$ - bzw. HCO_3^- -Ionen. Auch im Falle von Schwefelwasserstoff dürfte bei einem pH-Wert von 7.0 und einer Temperatur von $30^\circ C$ der Anteil an HS^- -Ionen bereits ein wenig größer sein als der an freiem H_2S .

Tab. 15: Die bei stöchiometrischen Messungen verwendeten Assimilationsgleichungen für die Synthese von Zellsubstanz aus Formiat, Acetat, Propionat, Palmitat bzw. Benzooat. Die bakterielle Zellsubstanz wurde stets als Trockenmasse bestimmt, für welche die Summenformel $C_4H_7O_3$ angenommen wurde.

Assimilationsgleichung	Verbrauch von organischem Substrat für die Bildung von 1,0 g Trockenmasse
$17 H\cdot COO^- + 7 H_2O \longrightarrow 2 (C_4H_7O_3) + 9 HCO_3^- + 8 OH^-$	0,0824 mol Formiat
$17 CH_3COO^- + 11 H_2O \longrightarrow 8 (C_4H_7O_3) + 2 HCO_3^- + 15 OH^-$	0,0206 mol Acetat
$17 CH_3CH_2COO^- + 5 HCO_3^- + 15 H_2O \longrightarrow 14 (C_4H_7O_3) + 22 OH^-$	0,0118 mol Propionat
$17 CH_3(CH_2)_4COO^- + 96 HCO_3^- + 67 H_2O \longrightarrow 92 (C_4H_7O_3) + 113 OH^-$	0,00179 mol Palmitat
$17 C_6H_5COO^- + HCO_3^- + 71 H_2O \longrightarrow 30 (C_4H_7O_3) + 18 OH^-$	0,00550 mol Benzooat

4.1. Oxidation von Acetat

Acetat wurde nicht nur von den Sulfat-reduzierenden Bakterien verwertet, die damit isoliert worden waren; darüberhinaus vermochten auch der mit Stearat isolierte Stamm 1st1 und alle mit Benzoat isolierten Stämme, 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13, Acetat zu oxidieren. Das Wachstum der einzelnen Stämme mit Acetat war jedoch unterschiedlich gut. So vermochte Stamm 2ac9 zwar keinen anderen Elektronendonator als Acetat zu verwerten, wuchs jedoch von allen Stämmen mit Acetat am schnellsten und zu den höchsten Zelldichten. Wurde in dem Kulturmedium für Stamm 2ac9 der Gehalt an Acetat und Sulfat entsprechend erhöht, so wurden nicht selten mehr als 20 mmol H₂S pro l gebildet. Die marinen mit Acetat isolierten Stämme 3ac10 und 4ac11 wuchsen fast so gut wie Stamm 2ac9. Stamm 1ac2, Desulfotomaculum acetoxidans, wuchs mit Acetat bereits merklich langsamer als Stamm 2ac9 und bildete nie mehr als 10 mmol H₂S pro l. Die mit Benzoat isolierten Stämme 1be1 und 2be1 vermehrten sich mit Acetat als Substrat noch langsamer als Desulfotomaculum acetoxidans. Die Verdopplungszeit des fädigen Sulfatreduzierers 5ac10 war in Minimalmedium mit Acetat sehr lang und betrug nie weniger als 100 h; durch Zusatz von Supplinen (s. 3.1.4.) konnte jedoch das Wachstum dieser Filamente auf Acetat stark beschleunigt werden. Ähnlich langsam wie Stamm 5ac10 wuchs auch der mit Benzoat isolierte fädige Sulfatreduzierer 4be13 mit Acetat allein; das Wachstum dieses Bakteriums konnte aber ebenfalls durch Zusatz von Supplinen stimuliert werden. Der mit Stearat isolierte Stamm 1st1 und der mit Benzoat isolierte Stamm 3be13 vermochten zwar Sulfat mit Acetat als Elektronendonator noch langsam zu reduzieren; die Zellen vermehrten sich jedoch bei dieser Umsetzung so wenig, daß in zweiten Passagen mit Acetat kein sichtbares Wachstum mehr beobachtet wurde.

Die Stöchiometrie der Sulfatreduktion mit Acetat sollte an Stämmen untersucht werden, die unterschiedlich gut mit diesem Elektronendonator wuchsen; ausgewählt wurden Stamm 2ac9, der mit Acetat am schnellsten wuchs, ferner Stamm 1ac2, der sich

bereits etwas langsamer vermehrte, sowie Stamm 1st1, der mit Acetat nur ein sehr schwaches Wachstum lieferte. Stamm 1st1 wurde mit Palmitat vorkultiviert. Vorversuche mit Desulfotomaculum acetoxidans hatten gezeigt, daß das Wachstum bei geringen Acetat-Konzentrationen (unterhalb etwa 5 mmol/l) häufig erst nach einer längeren Verzögerung begann. Daher wurde für die stöchiometrischen Messungen in allen Ansätzen einer Reihe eine gleichhohe Acetat-Konzentration von 20 mmol/l vorgegeben; begrenzt wurde das Wachstum durch unterschiedliche Konzentrationen des Elektronenakzeptors Sulfat. Beim Wachstum mit Acetat und Sulfat wurde bisher immer ein Anstieg des pH-Werts beobachtet. Daher wurden pro mmol vorgegebenen Sulfats noch zusätzlich 0,15 mmol HCl, jedoch maximal 2,5 mmol/l, aus einer sterilen Stammlösung zugesetzt; somit lag der pH-Wert eines Ansatzes umso weiter unterhalb des betreffenden Optimums, je mehr Sulfat verbraucht werden sollte. Auf diese Weise wurde eine stärkere Alkalisierung des Mediums vermieden. Zu jeder Meßreihe gehörte stets ein Kontrollansatz ohne Sulfat, der ebenso wie die übrigen Ansätze beimpft und inkubiert wurde. In den Kulturen der Stämme 2ac9 und 1ac2 war deutlich zu erkennen, daß die Dauer des Wachstums umso länger und die erreichten Zelldichten umso höher waren, je mehr Sulfat vorgegeben worden war. Ein Ansatz wurde jeweils einen Tag nach dem sichtbaren Wachstumsstillstand aus dem Brutraum entfernt und bei 20 °C gelagert. Die Kulturen von Stamm 1st1 wuchsen, wie erwartet, sehr langsam und zeigten kaum erkennbare Unterschiede in den Zelldichten. Daher wurden alle Ansätze mit Stamm 1st1 für eine Dauer von 5 Wochen inkubiert.

Die Ergebnisse der stöchiometrischen Untersuchungen zur Sulfatreduktion mit Acetat zeigt Tab. 16. Schwefelwasserstoff wurde nach Umsetzung zu Methylenblau nach B.12.1. colorimetrisch bestimmt; die Bakterienmasse wurde als Trockenmasse nach B.6.3. und die Acetat-Konzentration nach B.12.6. mit Hilfe eines Gaschromatographen ermittelt. Die angegebenen Werte für den Verbrauch von Acetat sowie für die Bildung von Trockenmasse und Schwefelwasserstoff sind bereits die korrigierten Resultate;

diese wurden erhalten, indem von den Meßwerten aus den jeweiligen Ansätzen die Meßwerte aus den Kontrollen subtrahiert wurden. Man erkennt, daß bei der Dissimilation von 1 mol Acetat auch stets 1 mol H₂S gebildet wurde. Der produzierte Schwefelwasserstoff konnte nur aus dem zugesetzten Sulfat stammen; dieses war von den Stämmen 2ac9 und 1ac2 vollständig verbraucht

Tab. 16: Quantitative Untersuchungen zum Wachstum der Sulfatreduzierer 2ac9, 1ac2 und 1st1 bei einer stets gleichen Anfangskonzentration von Acetat, 20 mmol/l, und unterschiedlichen vorgegebenen Konzentrationen von Sulfat. Die Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff, gebil-

	Sulfat, gegeben [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Acetat, insgesamt verbraucht [mmol/l]
Stamm 2ac9	4,0	4,05	19,7	4,56
	8,0	7,84	39,5	9,11
	12,0	11,51	58,4	13,44
	16,0	15,98	78,8	17,98
Stamm 1ac2	2,0	2,06	9,8	2,25
	4,0	3,95	17,8	4,46
	6,0	6,06	23,9	6,73
	8,0	7,83	27,7	8,65
Stamm 1st1	4,0	1,23	0,0	1,20
	7,0	2,56	0,9	2,69
	10,0	4,71	4,4	5,11
	20,0	7,41	7,8	7,55
	30,0	8,49	10,6	8,69
	40,0	8,32	9,7	8,78

worden, denn in den Kulturüberständen konnte mit Barium-Ionen (s. B.12.3.) kein Sulfat mehr nachgewiesen werden. Dagegen hatte Stamm 1st1 immer nur einen Teil vom zugesetzten Sulfat verbraucht; je höher der Überschuß an Sulfat war, desto mehr vermochte dieser Stamm davon während der gegebenen Inkubationsdauer zu reduzieren, desto höher war also die Umsetzungsge-

dete Zellmasse (als Trockenmasse) und verbrauchtes Acetat sind bereits die korrigierten Werte, stellen also die Differenzen gegenüber den Kontrollansätzen ohne Sulfat dar. Die Erträge sind in Abb. 38 gegen die für die Reduktion von Sulfat (Dissimilation) verbrauchte Menge Acetat aufgetragen.

Acetat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]	Acetat, verbraucht zur Reduktion von Sulfat [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Acetat	Ertrags- koeffizient: Y _{Ac.} (Sulfat) [g/mol]
0,41	4,15	0,98/1	4,75
0,81	8,30	0,94/1	4,76
1,20	12,24	0,94/1	4,77
1,62	16,36	0,98/1	4,82
0,20	2,05	1,00/1	4,78
0,37	4,09	0,97/1	4,35
0,49	6,24	0,97/1	3,83
0,57	8,08	0,97/1	3,43
0,00	1,20	1,03/1	0,00
0,02	2,67	0,96/1	0,34
0,09	5,02	0,94/1	0,88
0,16	7,39	1,00/1	1,06
0,22	8,47	1,00/1	1,25
0,20	8,58	0,97/1	1,13

schwindigkeit. In allen Ansätzen hatte eine vollständige Oxidation von Acetat stattgefunden, die durch die folgende Reaktionsgleichung darzustellen ist:



Bei dieser Schreibweise der Reaktion entstehen zwar keine OH^- -Ionen bzw. werden keine H^+ -Ionen verbraucht; dennoch steht die Gleichung durchaus im Einklang mit dem beobachteten Anstieg des pH-Werts während der Reduktion von Sulfat mit Acetat. Die Produkte reagieren nämlich als Anionen (konjugate Basen) der schwächeren Säuren (vgl. Anhang) stärker alkalisch als die Reaktanten.

In der linken Hälfte von Abb. 38 sind die erhaltenen Bakterienmassen (Erträge) aufgetragen in Abhängigkeit von der Menge Acetat, die allein für die Dissimilation verbraucht wurde. Die anfänglichen qualitativen Beobachtungen zum Wachstum der drei hier untersuchten Stämme mit Acetat spiegeln sich in den Ertragskoeffizienten wieder. Mit Ertragskoeffizient ist das jeweilige Verhältnis von gebildeter Bakterienmasse zur oxidierten Menge des organischen Substrats gemeint. Für den Ertragskoeffizienten soll in diesem Falle das Symbol $Y_{\text{Ac.}}(\text{Sulfat})$ verwendet werden (Ac. steht für Acetat). Mit Stamm 2ac9 wurden die höchsten Erträge pro mol Acetat erhalten, deren genaue Proportionalität zur umgesetzten Menge des Substrats auffällt. Wegen dieser Proportionalität kann der Ertragskoeffizient von Stamm 2ac9 von der Geraden der graphischen Auftragung abgelesen werden; man erhält $Y_{\text{Ac.}}(\text{Sulfat}) = 4,77 \text{ g/mol}$. Stamm 1ac2 erreichte nur bei geringen Substratumsätzen den Ertragskoeffizienten von Stamm 2ac9; mit steigendem Verbrauch von Acetat wurde der Ertragskoeffizient von Stamm 1ac2 geringer. Im Falle von Stamm 1st1 lagen die Ertragskoeffizienten weit unterhalb von denen der beiden oben genannten Stämme.

Ferner sollte auch die jeweils gebildete Bakterienmasse bei der Oxidation von Acetat mit Sulfit oder Thiosulfat anstelle von Sulfat bestimmt werden. Mit Stamm 1ac2 waren solche Versuche

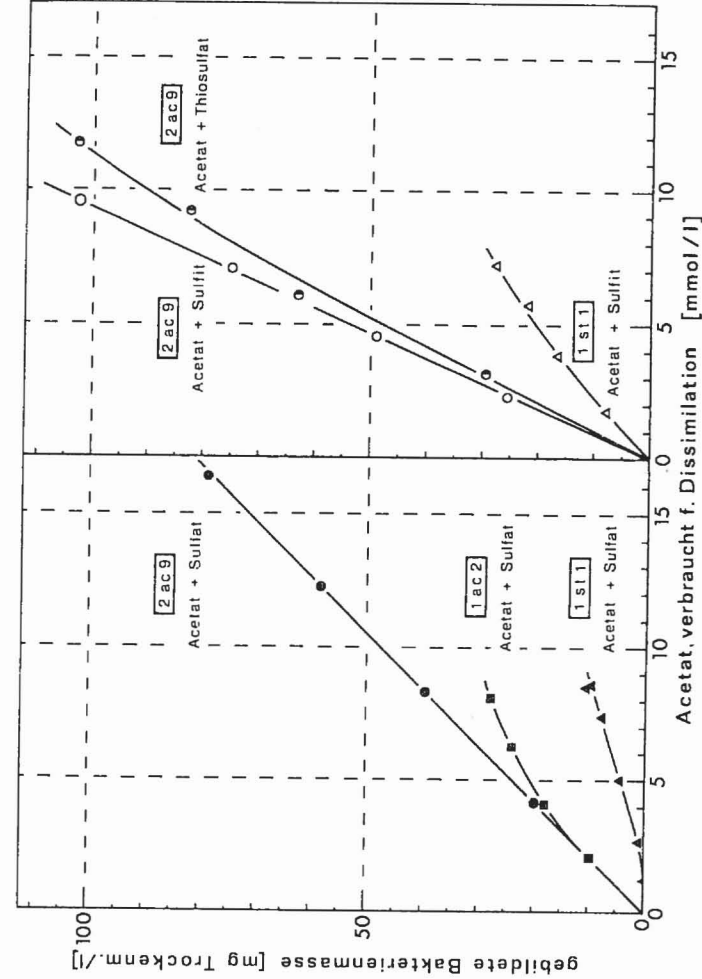


Abb. 38: Erträge der Stämme 2ac9, 1ac2 und 1st1 bei der Oxidation von Acetat mit Sulfat (linke Hälfte) bzw. mit Sulfit oder Thiosulfat (rechte Hälfte). Für Stamm 1ac2 konnte nur Sulfat als Elektronenakzeptor eingesetzt werden, denn dieses Bakterium vermochte weder Sulfit noch Thiosulfat zu verwerten. Stamm 1st1 lieferte mit Thiosulfat ein nur schwaches Wachstum; Erträge dieses Sulfatreduzierers mit Thiosulfat wurden nicht bestimmt.

Tab. 17: Quantitative Untersuchungen zum Wachstum der Stämme 2ac9 und 1st1 mit Acetat und Sulfit (a) und von Stamm 2ac9 mit Acetat und Thiosulfat (b). Allen Ansätzen wurde Acetat in einer stets gleichen Anfangskonzentration von 20 mmol/l zugesetzt, während Sulfit bzw. Thiosulfat in unterschiedlichen Mengen vorgegeben wurden. Die

a)	Sulfit, gegeben [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Acetat, insgesamt verbraucht [mmol/l]
Stamm 2ac9	3,0	3,07	25,7	2,82
	6,0	6,12	49,2	5,56
	9,0	9,35	75,2	8,63
	12,0	12,36	102,8	11,7
Stamm 1st1	2,5	2,48	7,9	1,94
	5,0	5,17	16,7	4,22
	7,5	7,73	22,0	6,20
	10,0	10,03	27,9	7,83

b)	Thiosulfat, gegeben [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Acetat, insgesamt verbraucht [mmol/l]
Stamm 2ac9	3,0	6,16	29,6	3,81
	6,0	11,79	63,2	7,37
	9,0	17,09	82,9	10,93
	12,0	22,96	103,2	13,88

Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff, gebildete Zellmasse (als Trockenmasse) und verbrauchtes Acetat stellen bereits die Differenzen gegenüber den Kontrollansätzen ohne Sulfit bzw. ohne Sulfat dar. Die Erträge sind in Abb. 38 gegen die Menge Acetat aufgetragen, die für die Reduktion des jeweiligen Elektronenakzeptors verbraucht wurde.

Acetat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]	Acetat, verbraucht zur Reduktion von Sulfit [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Acetat	Ertrags- koeffizient: Y _{Ac.} (Sulfit) [g/mol]
0,53	2,29	1/0,75	11,22
1,01	4,55	1/0,74	10,82
1,55	7,08	1/0,76	10,62
2,12	9,58	1/0,78	10,73
0,16	1,78	1/0,72	4,44
0,34	3,88	1/0,75	4,30
0,45	5,75	1/0,74	3,83
0,57	7,26	1/0,72	3,84

Acetat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]	Acetat, verbraucht zur Reduktion von Thiosulfat [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Acetat	Ertrags- koeffizient: Y _{Ac.} (Thios.) [g/mol]
0,61	3,20	1,9/1	9,25
1,30	6,07	1,9/1	10,41
1,71	9,22	1,9/1	8,99
2,13	11,75	2,0/1	8,78

nicht möglich, denn dieses Bakterium vermochte weder Sulfit noch Thiosulfat zu verwerten (s. Tab. 10). Stamm 1st1 lieferte mit Thiosulfat ein nur schwaches Wachstum; daher wurde von Ertragsmessungen mit diesem Sulfatreduzierer auf Thiosulfat abgesehen. Somit blieben für die Versuche das Wachstum von Stamm 2ac9 mit Sulfit und Thiosulfat und das von Stamm 1st1 mit Sulfit. Sulfit durfte wegen seiner Giftigkeit nur nach und nach während des Wachstums in kleinen Portionen zugesetzt werden (s. B.13.). Beim Wachstum mit Acetat und Sulfit stieg der pH-Wert noch stärker als beim Wachstum mit Acetat und Sulfat. Daher wurden nunmehr 0,3 mmol HCl aus einer sterilen Stammlösung für 1 mmol zu verwertendes Sulfit zugesetzt. Die Salzsäure wurde ebenfalls in Portionen unmittelbar vor dem jeweiligen Zusatz von Sulfit in das Medium gegeben und mit diesem kurz vermischt; wird umgekehrt zuerst Sulfit und dann HCl zugesetzt, so kommt es an der Zugabestelle der Säure zur Bildung von Polythionaten, Polysulfid und kolloidalem Schwefel. Bei der Reduktion von Thiosulfat mit Acetat war gegenüber der von Sulfat eine Bildung von zusätzlichem freiem Schwefelwasserstoff zu erwarten. Um einem zu starken Anstieg der Konzentration an freiem H₂S und einer dadurch bedingten eventuellen Wachstumshemmung entgegenzuwirken, wurden 0,25 mmol Na₂CO₃ aus einer sterilen Stammlösung für 1 mmol zu verwertendes Thiosulfat zugegeben; wurde hierfür mehr als 1 mmol Na₂CO₃ pro 1 Medium benötigt, so wurde diese Menge auf 2 bis 3 Portionen verteilt, die während des Wachstums nacheinander in bestimmten Zeitabständen zugesetzt wurden. Auch bei den jetzigen Versuchen war die Acetat-Konzentration in allen Ansätzen stets gleich hoch (20 mmol/l), während Sulfit bzw. Thiosulfat in begrenzenden Mengen zugegeben wurden. Tab. 17 zeigt die erhaltenen Ergebnisse als bereits korrigierte Werte. Die Oxidation von Acetat mit Sulfit bzw. Thiosulfat läßt sich durch folgende Dissimilationsgleichungen wiedergeben:



In der rechten Hälfte von Abb. 38 sind die Erträge in Abhängigkeit von der oxidierten Menge Acetat aufgetragen. Auch hier besteht wieder ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Ertrag und Substratumsatz. Aus der Auftragung liest man einen Ertragskoeffizienten von $Y_{\text{Ac.}}(\text{Sulfit}) = 10,75 \text{ g/mol}$ ab. Der Ertragskoeffizient von Stamm 2ac9 war also bei der Oxidation von Acetat mit Sulfit mehr als doppelt so hoch wie bei der von Acetat mit Sulfat. Ähnlich gute Erträge wie mit Sulfit lieferte Stamm 2ac9 auch mit Thiosulfat. Stamm 1st1 wuchs zwar mit Sulfit schneller und zu höheren Zelldichten als mit Sulfat als Elektronenakzeptor; doch waren die Ertragskoeffizienten von Stamm 1st1 auch mit Sulfit immer noch niedriger als die von Stamm 2ac9 mit Sulfat (vgl. Tab. 16 und 17).

Schließlich wurde noch gezeigt, daß Acetat auch von den fädigen Sulfatreduzierern 5ac10 und 4be13 als Elektronendonator verwendet und stöchiometrisch oxidiert wurde. Die fädigen Sulfatreduzierer wuchsen mit Acetat allein sehr langsam und wurden bisher immer durch Zusatz verschiedener Supplimente stimuliert. Aus den Messungen mit den Stämmen 2ac9, 1ac2 und 1st1 ging hervor, daß die für die Zellsynthese verbrauchte Menge Acetat nur etwa 10 % der insgesamt verbrauchten betrug. Daher wurde bei den stöchiometrischen Versuchen mit den fädigen Sulfatreduzierern von der Bestimmung der Zellerträge abgesehen; es genügte nunmehr, die Umsetzungen in kleinen Flaschen von 50 ml Inhalt zu bestimmen, so wie es ebenfalls unter B.13. beschrieben ist. Die benötigten Vorkulturen der Stämme 5ac10 und 4be13 wurden mit Acetat bzw. Benzoat in Medien mit Aluminiumphosphat als Sediment und Gülleextrakt (s. B.3.4.7.) als stimulierendem Zusatz angezogen. Die Überstände der ausgewachsenen Kulturen wurden jeweils mit einer sterilen Pipette vorsichtig abgesaugt; die Sedimente mit den Zellfilamenten wurden sogleich zum Waschen in den betreffenden sterilen Grundmedien suspendiert, die kein Sulfat und auch keinerlei organische Zusätze enthielten. Nachdem sich die Filamente und das Aluminiumphosphat erneut abgesetzt hatten, wurden die Überstände wiederum entfernt. Dann wurden die Sedimente mit den Sulfatreduzierern in die geeichten kleinen Flaschen über-

Tab. 18: Quantitative Messungen zum Wachstum der fädigen, gleitend beweglichen Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13 mit Acetat und Sulfat. Die Stämme waren in Minimalmedien mit Acetat ohne Sulfat, mit Sulfat ohne Acetat oder mit Acetat und Sulfat zusammen übertragen worden. Die verbrauchte Menge Acetat war die Differenz zwischen der anfangs vorgegebenen und der nach der Inkubation gemessenen Menge; ebenso ergab sich die gebildete Menge H₂S aus der vor und der nach der Inkubation ermittelten Konzentration. Nur bei gleichzeitiger Gegenwart von Acetat und Sulfat wurden größere Mengen H₂S produziert.

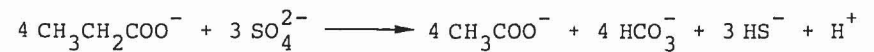
	Acetat, gegeben [mmol/l]	Sulfat, gegeben [mmol/l]	Acetat, verbraucht [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]
Stamm 5ac10	15,0	0,0	0,0	0,37
	0,0	20,0	0,0	0,22
	15,0	20,0	14,6	14,0
Stamm 4be13	15,0	0,0	0,1	0,26
	0,0	20,0	0,0	0,0
	15,0	20,0	13,1	12,2

führt; die Medien in diesen Flaschen enthielten entweder nur Sulfat, nur Acetat oder Acetat und Sulfat zusammen, jedoch keinerlei Suppline. Vor dem endgültigen Verschließen der Flaschen wurde noch die H₂S-Konzentration in jedem Ansatz gemessen; das entnommene Probevolumen wurde mit sterilen Glasperlen wieder aufgefüllt. Während der Inkubation wurden die Ansätze täglich einmal umgeschwenkt. Die nach 20 Tagen erhaltenen Ergebnisse gehen aus Tab. 18 hervor. Der darin angegebene Verbrauch von Acetat ist bereits die Differenz zwischen der anfangs vorgegebenen und der nach der Inkubation gemessenen Konzentration. Ebenso stellt die genannte Menge an gebildetem H₂S die Differenz zwischen der vor und der nach der Inkubation bestimmten Konzentration dar. Bedeutende Mengen an H₂S waren nur in den Ansätzen entstanden, denen Acetat und Sulfat gleichzeitig zuge-

setzt worden waren; pro mol verbrauchten Acetats war nahezu 1 mol H₂S gebildet worden. Berücksichtigt man einen geringen Verbrauch von Acetat für die Zellsynthese, so bestätigen die Ergebnisse aus Tab. 18 erneut die Reaktionsgleichung (s. o.) für die vollständige Oxidation von Acetat mit Sulfat als Elektronenakzeptor.

4.2. Oxidation von Propionat

Die mit Propionat isolierten Sulfatreduzierer 1pr3, 2pr4 und 3pr10 vermochten kein Acetat zu verwerten. In den Medien ausgewachsener Kulturen dieser drei Stämme wurde gaschromatographisch (s. B.12.6.) stets nahezu 1 mol Acetat pro mol anfangs zugesetzten Propionats gefunden. Diese Beobachtungen sprachen für eine unvollständige Oxidation von Propionat zu Acetat als Endprodukt. Die genaue Stöchiometrie dieser Umsetzung sowie die dabei gebildeten Zellerträge wurden mit Stamm 1pr3 gemessen, der mit Propionat von allen Stämmen am schnellsten wuchs. Ansätze in Flaschen von 1 l Inhalt (s. B.13.) mit einem Überschuß an Sulfat (20 mmol/l) und unterschiedlichen vorgegebenen Konzentrationen von Propionat und ebenso ein Kontrollansatz ohne Propionat wurden mit Stamm 1pr3 beimpft. In den ausgewachsenen Kulturen wurden wiederum Schwefelwasserstoff (s. B.12.1.), die gebildete Zellmasse (s. B.6.3.) und flüchtige Fettsäuren (s. B.12.6.) bestimmt. Tab. 19 zeigt die bereits gegen die Kontrolle korrigierten Ergebnisse. Propionat war stets vollständig verbraucht worden; als organisches Oxidationsprodukt wurde Acetat nachgewiesen. Aus dem Verhältnis der gebildeten Menge an Schwefelwasserstoff und an Acetat zu der jeweils verbrauchten Menge an Propionat erhält man die folgende Reaktionsgleichung, nach welcher Propionat unvollständig oxidiert wird:



Der Sulfatreduzierer 1pr3 vermochte auch Nitrat als Elektronenakzeptor zu verwerten. Allerdings war das Wachstum mit Propionat und Nitrat etwas langsamer als das mit Propionat und Sulfat. Wurden Sulfat und Nitrat gleichzeitig angeboten, so wurde zuerst das Sulfat reduziert. Stamm 1pr3 war recht unempfindlich gegen Nitrat, denn eine Konzentration von 20 mmol/l wurde ohne weiteres ertragen. Mit der Verwertung von Nitrat ging ein Anstieg des pH-Werts einher. Nitrat wurde nicht zu Nitrit reduziert, wie die Prüfung einer ausgewachsenen Kultur nach B.12.5. zeigte. Da beim Öffnen der Schraubverschlüsse ferner kein Überdruck bemerkt wurde, war auch eine Reduktion zu N₂ unwahrscheinlich; bei 25 °C und 1 atm beträgt nämlich die Löslichkeit von N₂ in Wasser nur etwa 0,6 mmol/l. Denkbare Produkte waren somit noch Distickstoffmonoxid, N₂O, das in Wasser wesentlich besser löslich ist als N₂, oder Ammoniak bzw. Ammonium. Für eine Klärung mußte die Stöchiometrie der Reduktion von Nitrat mit Propionat untersucht werden. Die beim Wachstum von Stamm 1pr3 mit Propionat und Nitrat erreichten Bakterienrübungen

Tab. 19: Quantitative Messungen zum Wachstum des Sulfatreduzierers 1pr3 mit unterschiedlichen vorgegebenen Konzentrationen an Propionat und einem Überschuß an Sulfat (20 mmol/l). Das vorgegebene Propionat wurde stets

Propionat, gegeben u. verbraucht [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Acetat, gebildet [mmol/l]
5,0	3,67	26,0	4,78
10,0	7,07	46,5	9,45
15,0	10,81	61,9	13,89

zeigten, daß die Erträge mit Nitrat etwa denen mit Sulfat entsprechen mußten, also im Vergleich zum Substratumsatz niedrig waren. Die Ermittlung der Dissimilationsgleichung mußte daher auch möglich sein, ohne die gebildete Bakterienmasse zu bestimmen. In geeichten kleinen Flaschen (s. B.13.) wurden Ansätze vorbereitet, die Propionat und Nitrat entweder in ungleichen oder in äquimolaren Konzentrationen enthielten. Den Kontrollansätzen wurden zwar entsprechende Mengen an Propionat, jedoch kein Nitrat zugesetzt. Die Kontrollen waren vor allem darum notwendig, weil den Medien stets NH₄Cl als Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Zum Beimpfen diente eine bereits mit Nitrat gewachsene Vorkultur. Die Flaschen wurden dabei soweit gefüllt, daß noch ein kleiner Gasraum zwischen der Flüssigkeitsoberfläche und der Gummidichtung des Schraubverschlusses blieb. Nachdem das Wachstum gegenüber den Kontrollansätzen sichtbar begonnen hatte, wurden den Flaschen von etwa 50 ml Inhalt jeweils 0,1 ml sterile Salzsäure, 2,0 mol/l, zugesetzt; dadurch sollte eine mögliche stärkere Alkalisierung des Mediums vermieden wer-

vollständig verbraucht. Die Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff, gebildete Zellmasse (als Trockenmasse) und gebildetes Acetat stellen bereits die Differenzen gegenüber dem Kontrollansatz ohne Propionat dar.

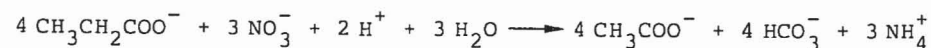
Propionat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]	Propionat, verbraucht zur Reduktion von Sulfat [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Acetat Propionat	Ertrags- koeffizient: Y _{Pr.} (Sulfat) [g/mol]
0,31	4,69	$\frac{0,78}{1}$ / 1,02	5,54
0,55	9,45	$\frac{0,75}{1}$ / 1,00	4,92
0,73	14,27	$\frac{0,76}{1}$ / 0,97	4,34

Tab. 20: Quantitative Messungen zum Wachstum des Sulfatreduzierers 1pr3 mit unterschiedlichen Konzentrationen an Propionat und Nitrat in einem Medium ohne Sulfat. Die Angaben für verbrauchtes Propionat, gebildetes Acetat und gebildetes Ammonium stellen die Differenzen zu den Werten aus Kontrollansätzen ohne Nitrat dar.

Propionat, gegeben [mmol/l]	Nitrat, gegeben [mmol/l]	Propionat, verbraucht [mmol/l]	Acetat, gebildet [mmol/l]	NH ₄ ⁺ gebildet [mmol/l]	molares Verhältnis: NH ₄ ⁺ /Acetat
5,0	15,0	5,00	4,55	3,31	0,73/1
10,0	10,0	9,95	9,03	6,83	0,76/1
15,0	5,0	6,92	6,35	4,20	0,66/1

den. Nach dem Wachstum wurden die Ansätze gaschromatographisch (s. B.12.6.) auf flüchtige Fettsäuren geprüft. In Gegenwart von wenig Nitrat und einem Überschuß an Propionat war mehr Acetat gebildet worden, als eine Reduktion von Nitrat nur bis zum Distickstoffmonoxid erlaubt hätte. Daher wurde im Kulturmedium das freie Ammonium als Ammoniak durch Wasserdampf-Destillation und anschließende Titration nach B.12.4 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefaßt. Die Angaben für den Verbrauch von Propionat und die Bildung von Acetat und Ammonium stellen die Differenzen zu den Meßwerten aus den Kontrollansätzen dar. Tatsächlich war in allen Ansätzen, denen Nitrat zugegeben worden war, als Reduktionsprodukt Ammonium gebildet worden. Auch mit Nitrat als Elektronenakzeptor oxidierte Stamm 1pr3 sein organisches Substrat nur unvollständig, denn pro mol anfangs zugesetzten Propionats war stets nahezu 1 mol Acetat gebildet worden; diese Menge Acetat kann stellvertretend für diejenige Menge Propionat stehen, die ausschließlich für die Reduktion von Nitrat verbraucht worden war. Ebenso stellt die Menge an gebildetem Ammonium die bei der Dissimilation freigesetzte dar, während die assimilierte Menge Ammonium bei der

Analyse nicht erfaßt wurde. Für die beobachteten Umsetzungen kommt nur die folgende Dissimilationsgleichung in Frage:



Nitrat nimmt bei der Reduktion zu Ammonium ebenso wie Sulfat bei der Reduktion zu Sulfid 8 Elektronen auf.

Auch einige der Sulfatreduzierer, die mit anderen organischen Säuren isoliert worden waren, wuchsen mit Propionat (s. Tab. 7 - 9). So vermochten die fädigen Sulfatreduzierer 5ac10 und 4be13, die übrigen mit Benzoat isolierten Stämme 1be1, 2be1 und 3be13 sowie auch der mit Stearat isolierte Stamm 1st1 Propionat als Elektronendonator zu verwerten. Diese Stämme oxidierten auch Acetat. Bis auf Stamm 1st1 vermehrten sich die hier genannten Stämme mit Propionat als Substrat schneller als mit Acetat; deren Wachstum mit Propionat war aber wiederum langsamer als das der direkt mit Propionat isolierten Stämme 1pr3, 2pr4 und 3pr10. Nun konnte in den ausgewachsenen Kulturen der Stämme 5ac10, 1st1, 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13, denen zuvor Propionat zugesetzt worden war, kein Acetat nachgewiesen werden; ferner bildeten diese Stämme pro mol zugesetzten Propionats mehr als doppelt soviel H₂S wie die Stämme 1pr3, 2pr4 und 3pr10. Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Stämme 5ac10, 1st1, 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13 nicht nur Acetat, sondern auch Propionat vollständig zu oxidieren vermochten. Darin unterschieden sich diese Sulfatreduzierer von den direkt mit Propionat isolierten Stämmen, die zwar schneller wuchsen, jedoch nur zu einer unvollständigen Oxidation fähig waren. Von Ertragsbestimmungen mit Sulfatreduzierern, die Propionat vollständig oxidierten, wurde abgesehen.

4.3. Oxidation von Butyrat und höheren Fettsäuren

Mit Butyrat und den höheren Fettsäuren war eine Vielzahl von Sulfatreduzierern angereichert und isoliert worden, die alle eine mehr oder weniger stark ausgeprägte vibrioide Zellform

hatten. Während der mit Stearat isolierte Stamm auch Acetat und Propionat langsam verwertete, vermochten alle mit Butyrat und Palmitat isolierten Vibrio-ähnlichen Sulfatreduzierer weder Acetat noch Propionat zu oxidieren. Die Unfähigkeit zur Oxidation von Acetat oder Propionat zeigte sich auch anhand der Kulturen, die mit höheren Fettsäuren gewachsen waren: Aus Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen pro Molekül bildeten die mit Butyrat und Palmitat isolierten Stämme stets Acetat, und zwar pro mol der betreffenden Fettsäure umso mehr, je höher die Anzahl der Kohlenstoffatome pro Molekül war. So wurden bei der Oxidation von 1 mol Butyrat, Capronat, Caprylat, Caprinat, Laurinat, Myristinat, Palmitat oder Stearat jeweils nahezu 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, bzw. 9 mol Acetat ins Medium ausgeschieden. In Kulturen, denen eine Fettsäure mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen pro Molekül zugesetzt worden war, wurden nach dem Wachstum immer Acetat und Propionat zusammen gefunden. Die aus 1 mol Valerianat gebildete Menge Acetat betrug nahezu 1 mol, die aus 1 mol Heptanat gebildete fast 2 mol und die aus 1 mol Pelargonat gebildete nahezu 3 mol; die ausgeschiedene Menge Propionat war dagegen von der Anzahl der Kohlenstoffatome im Substrat unabhängig und entsprach stets ziemlich genau der anfangs eingesetzten molaren Konzentration von Valerianat, Heptanat bzw. Pelargonat. Auf eine etwas andere Weise wurde 2-Methylbutyrat durch Stamm 1pa3 (s. Tab. 8) umgesetzt; während die aus Valerianat (n-Valerianat) gebildeten molaren Mengen an Acetat und Propionat etwa gleich waren, wurde beim Wachstum mit dem isomeren 2-Methylbutyrat dreimal soviel Acetat wie Propionat ins Medium ausgeschieden. Aufgrund der hier genannten Beobachtungen war nun anzunehmen, daß die mit Butyrat und Palmitat isolierten Sulfatreduzierer ihre Substrate nur unvollständig oxidierten, ähnlich wie die bisher bekannten und die neuen mit Propionat isolierten Arten.

Der mit Stearat isolierte Sulfatreduzierer 1st1 vermochte als einziger der vibrioiden Stämme Acetat zu oxidieren (s. Tab. 16), wenn auch nicht besonders schnell; Propionat wurde ebenfalls langsam verwertet und vollständig oxidiert (s. 4.2.). In ausge-

wachsenen Kulturen von Stamm 1st1 mit Butyrat oder höheren Fettsäuren wurden weder Acetat noch Propionat nachgewiesen. Ferner bildete dieser Sulfatreduzierer pro mol einer verbrauchten höheren Fettsäure etwa dreimal soviel Schwefelwasserstoff wie die mit Butyrat und Palmitat isolierten Vibrio-ähnlichen Stämme. Somit besteht kein Zweifel, daß Stamm 1st1 nicht nur Acetat und Propionat, sondern auch alle anderen verwertbaren Fettsäuren vollständig oxidierte. Wiederum fiel auf, daß Stamm 1st1 mit den Fettsäuren langsamer wuchs als die Stämme, die nur zu einer unvollständigen Oxidation fähig waren (vgl. 4.2.).

Am Beispiel von Palmitat wurden die genaue Stöchiometrie der Oxidation höherer Fettsäuren mit Sulfat als Elektronenakzeptor und die dabei gebildeten Zellerträge bestimmt. Für diese Messungen wurden von den Vibrio-ähnlichen Stämmen zwei Vertreter ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Verwertung von Acetat unterschieden, nämlich die Stämme 1pa3 und 1st1. In Ansätzen in großen Flaschen (1 l Inhalt) mit einem Überschuß an Sulfat (20 mmol/l) wurden verschiedene Mengen an Palmitat vorgegeben; die besondere Zubereitung dieser Medien ist unter B.3.3.2. und B.13. beschrieben. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Palmitat beimpft. Während der Inkubation wurden die Flaschen flach gelegt und mindestens alle 15 h einmal kräftig umgeschwenkt. Waren die weißen, flockigen Erdalkalisalze von Palmitat verbraucht und die Medien durch die Bakterien homogen getrübt, so wurde der betreffende Ansatz noch einen Tag lang bei der optimalen Temperatur inkubiert und dann bei Raumtemperatur aufbewahrt. Als alle Ansätze ausgewachsen waren, wurden Schwefelwasserstoff (s. B.12.1.), Bakterienmasse (s. B.6.3.) und flüchtige Fettsäuren (s. B.12.6.) bestimmt. Die Ergebnisse in Tab. 21 sind die Differenzen zu den Meßwerten aus den Kontrollansätzen. Stamm 1pa3 hatte Palmitat stets nur bis zu Acetat oxidiert; die pro mol oxidierten Palmitats gebildeten Mengen an H₂S und Acetat stehen im Einklang mit der folgenden Dissimilationsgleichung:



In den Ansätzen mit Stamm 1st1 konnte gaschromatographisch keine flüchtige Fettsäure nachgewiesen werden. Pro mol Palmitat hatte dieser Stamm etwa dreimal soviel H₂S gebildet wie Stamm 1pa3. Für eine theoretisch vollständige Oxidation von Palmitat mit Sulfat berechnet man eine Bildung von 11,5 mol H₂S pro mol oxidierten Palmitats. Von der Kultur, der die geringste Menge an Palmitat zugesetzt worden war, wurde dieser theoretische Wert erreicht. Die zwei übrigen Ansätze hatten etwa 10 % weniger Schwefelwasserstoff als erwartet gebildet. Nun zeigten die Kulturen von Stamm 1st1 stets einen durchdringenden, charakte-

Tab. 21: Quantitative Messungen zur Verwertung von Palmitat durch die Sulfatreduzierer 1pa3 und 1st1, die sich in ihrer Fähigkeit zur Oxidation von Acetat unterscheiden: Stamm 1st1 vermochte Acetat zu verwerten, Stamm 1pa3 dagegen nicht. Bei einem Überschuß an Sulfat von

	Palmitat, gegeben u. verbraucht	H ₂ S, gebildet	Zellmasse, gebildet (Ertrag)	Acetat, gebildet
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mg/l]	[mmol/l]
Stamm 1pa3	0,70	2,42	23,6	5,04
	1,40	4,87	46,6	10,15
	2,10	6,92	72,7	15,38
Stamm 1st1	0,50	5,05	35,4	0,0
	1,00	9,19	62,3	0,0
	1,50	14,09	86,2	0,0

ristischen Geruch, der neben dem von Schwefelwasserstoff deutlich wahrzunehmen war und an Mercaptane erinnerte. Ein derartiger Geruch war aus Kulturen anderer Stämme nicht bekannt. Die für diesen Geruch verantwortlichen Substanzen waren etwas weniger flüchtig als Schwefelwasserstoff. Ferner erschien bei der gaschromatographischen Analyse der Kulturen von Stamm 1st1 kurz nach dem Einspritzen der Probe ein scharfer Peak, der keiner Fettsäure zugeordnet werden konnte und bei der Untersuchung der anderen Sulfatreduzierer nie aufgetreten war. Bei der Oxidation von Substraten durch Stamm 1st1 fanden demnach Nebenreaktionen

20 mmol/l wurden unterschiedliche Mengen an Palmitat vorgegeben, die stets vollständig verbraucht wurden. Die Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff, gebildete Zellmasse (als Trockenmasse) und gebildetes Acetat stellen die Differenzen zu dem jeweiligen Kontrollansatz ohne Palmitat dar.

Palmitat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15)	Palmitat, verbraucht zur Reduktion von Sulfat	molares Verhältnis: H ₂ S/Acetat Palmitat	Ertrags- koeffizient: Y _{Pa.} (Sulfat)
[mmol/l]	[mmol/l]		[g/mol]
0,04	0,66	$\frac{3,67/7,64}{1}$	35,8
0,08	1,32	$\frac{3,69/7,69}{1}$	35,3
0,13	1,97	$\frac{3,51/7,81}{1}$	36,9
0,06	0,44	$\frac{11,5/---}{1}$	80,5
0,11	0,89	$\frac{10,3/---}{1}$	70,0
0,15	1,35	$\frac{10,4/---}{1}$	63,9

statt, die noch andere Produkte als Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid lieferten. Die Ergebnisse in Tab. 21 zeigen jedoch, daß die Hauptreaktion der Verwertung von Palmitat durch Stamm 1st1 eindeutig nach der folgenden Dissimilationsgleichung ablief:



Während der Anreicherungsversuche mit Butyrat hatten sich in den Passagen, die mit Gülle oder Pansenflüssigkeit beimpft worden waren, keine vibrioiden Sulfatreduzierer entwickelt, sondern stets die typischen Zellen von Desulfotomaculum acetoxidans. Aus diesen Anreicherungen war jedoch kein Stamm isoliert worden, denn zu jenem Zeitpunkt existierte bereits die mit Acetat erhaltene Reinkultur, Stamm 1ac2, der Art Desulfotomaculum acetoxidans. Stamm 1ac2 wuchs ebenfalls gut mit Butyrat; auch iso-Butyrat und Valerianat wurden verwertet, jedoch langsamer als Butyrat. In ausgewachsenen Kulturen von Stamm 1ac2 wurden pro mol eingesetzten Butyrats oder iso-Butyrats etwa 1 mol Acetat gefunden; aus 1 mol Valerianat wurden etwa 0,5 mol Acetat und genau 1 mol Propionat gebildet. Die erwähnten Vibrio-ähnlichen Stämme, die zu keiner vollständigen Oxidation fähig waren, bildeten größere Mengen Acetat aus Butyrat bzw. Valerianat (s. o.). Weil Stamm 1ac2 jedoch Acetat zu verwerten vermochte, muß das ausgeschiedene Acetat als Zwischenprodukt bezeichnet werden, das bei Bedarf weiter oxidiert werden konnte. In den Kulturen von Stamm 1ac2 mit Äthanol wurde ebenfalls eine Ausscheidung von Acetat beobachtet, und zwar etwa 0,7 mmol pro mol anfangs zugesetzten Äthanol. Propionat wurde dagegen von Stamm 1ac2 nicht verwertet, sodaß das aus Valerianat gebildete Propionat als ein echtes Endprodukt aufzufassen ist.

Mit Butyrat und höheren Fettsäuren wuchsen auch noch weitere Sulfatreduzierer, die nicht mit diesen Verbindungen angereichert und isoliert worden waren, nämlich die fädigen Stämme 5ac10 und 4be13 sowie die anderen mit Benzoat isolierten Stämme

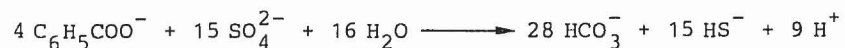
1be1, 2be1 und 3be13. Diese Sulfatreduzierer vermochten auch Acetat oder Propionat zu oxidieren. In den Kulturen der genannten fünf Stämme, die mit Butyrat oder den höheren Fettsäuren gewachsen waren, konnten weder Acetat noch Propionat nachgewiesen werden. Pro mol einer zugesetzten höheren Fettsäure bildeten die Stämme 5ac10, 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13 etwa dreimal soviel H₂S wie die Vibrio-ähnlichen Stämme, die kein Acetat und kein Propionat zu verwerten vermochten. Daher muß wie im Falle von Stamm 1st1 (s. o.) angenommen werden, daß die hier genannten fünf Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien alle verwertbaren Fettsäuren vollständig oxidierten. Diese Stämme wuchsen mit Butyrat oder einer der höheren verwertbaren Fettsäuren stets schneller als mit Acetat allein, aber wiederum langsamer als die Vibrio-ähnlichen Stämme, welche die Fettsäuren nur unvollständig oxidierten.

4.4. Oxidation von Benzoat

Die mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13 vermochten, wie bereits erwähnt, alle Acetat und Propionat sowie auch höhere Fettsäuren zu verwerten. Bei Vorgabe einer das Wachstum begrenzenden Menge Benzoat von 2 mmol/l bildeten diese Stämme annähernd gleichhohe Konzentrationen von H₂S. In den ausgewachsenen Kulturen wurden gaschromatographisch keine flüchtigen Fettsäuren nachgewiesen. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die vier Stämme Benzoat in der gleichen Bruttoreaktion umsetzten.

Die genaue Stöchiometrie der Oxidation von Benzoat und die dabei gebildete Bakterienmasse wurden mit Stamm 1be1 bestimmt. In großen Flaschen (1 l Inhalt) mit Minimalmedium wurden bei einem Überschuß von Sulfat (20 mmol/l) verschiedene Konzentrationen an Benzoat vorgegeben; als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Benzoat. Nach dem Wachstum wurden Schwefelwasserstoff, und die gebildete Bakterienmasse bestimmt (s. B.12.1. und B.6.3.); Benzoat war mit Hilfe eines Hochdruck-Flüssigkeits-

chromatographen (s. B.12.7.) in den ausgewachsenen Ansätzen nicht mehr nachzuweisen und demnach vollständig verbraucht worden. Auch flüchtige Fettsäuren (s. B.12.6.) wurden, wie schon erwartet, im Medium nicht gefunden. Tab. 22 zeigt die Ergebnisse als Differenzen zu den Meßwerten aus dem Kontrollansatz ohne Benzoat. Das Verhältnis von gebildetem Schwefelwasserstoff zu verbrauchtem Benzoat erfüllt sehr genau die folgende Dissimilationsgleichung:



Benzoat wurde also vollständig oxidiert.

Tab. 22: Quantitative Messungen zum Wachstum von Stamm 1be1 in Gegenwart von überschüssigem Sulfat (20 mmol/l) und unterschiedlichen vorgegebenen Mengen an Benzoat. Die Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff und gebil-

Benzoat, gegeben u. verbraucht [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Benzoat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]
0,80	2,69	16,6	0,09
1,60	5,32	33,2	0,18
2,40	7,89	50,4	0,28

4.5. Umsetzung organischer Substrate in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors

Von den 22 insgesamt isolierten Stämmen Sulfat-reduzierender Bakterien vermochten 11 Stämme durch Vergärung von Pyruvat in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors zu wachsen (s. Tab. 11). Die für die Ansätze verwendeten verschraubbaren Rührchen und Flaschen waren vollständig gefüllt worden und enthielten zu Beginn 10 mmol Pyruvat pro l Medium. Beim Öffnen der Kulturgefäße von Stämmen, die Pyruvat vergären konnten, wurde weder während des Wachstums noch unmittelbar danach ein Überdruck bemerkt. Daher konnten bei der Vergärung von Pyruvat durch die betreffenden Sulfatreduzierer keine bedeutenden Mengen an molekularem Wasserstoff entstanden sein; bei 25 °C und einem Druck von 1 atm lösen sich nämlich nur etwa 0,7 mmol H₂ pro l Wasser. Der Umsetzung von Pyruvat wurde jedoch hier nicht weiter nachgegangen, denn eine Vergärung von Pyruvat durch Sulfat-reduzierende Bakterien ist schon seit längerem bekannt.

dete Zellmasse (als Trockenmasse) sind die Differenzen zu den Meßwerten aus dem Kontrollansatz ohne Benzoat. Benzoat war stets vollständig verbraucht worden; flüchtige Fettsäuren, wie z. B. Acetat, wurden nicht als Produkte nachgewiesen.

Benzoat, verbraucht zur Reduktion von Sulfat [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Benzoat	Ertrags- koeffizient: Y _{Be.} (Sulfat) [g/mol]
0,71	3,79/1	23,4
1,42	3,74/1	23,4
2,12	3,72/1	23,8

Zu einem Wachstum durch Vergärung von Lactat waren alle mit Propionat isolierten Stämme, 1pr3, 2pr4 und 3pr10, fähig; ferner konnten auch zwei der mit Benzoat isolierten Stämme, nämlich 1be1 und 3be13, Lactat vergären (s. Tab. 11). Die Stämme 1pr3 und 2pr4 wuchsen mit Lactat in Medium ohne Sulfat nur wenig langsamer als in Gegenwart von Sulfat als Elektronenakzeptor; dagegen war das Wachstum der Stämme 3pr10, 1be1 und 3be13 mit Lactat beim Fehlen von Sulfat bereits bedeutend langsamer als in den Medien mit Sulfat. Die ausgewachsenen Kulturen wurden auf flüchtige Fettsäuren (s. B.12.6.) geprüft. Als Gärungsprodukte wurden Acetat und Propionat gefunden; das Verhältnis dieser Produkte zueinander war von Stamm zu Stamm verschieden, wie die Ergebnisse in Tab. 23 zeigen. Von genauen Gärungsanalysen zur Ermittlung der jeweiligen Reaktionsgleichung wurde abgesehen.

Der mit Benzoat isolierte Sulfatreduzierer 3be13 vermochte beim Fehlen eines externen Elektronenakzeptors auch Fumarat zu verwerten; das Wachstum war allerdings verhältnismäßig langsam.

Tab. 23: Nachgewiesene Produkte und deren molares Verhältnis untereinander bei der Vergärung von Lactat bzw. Fumarat durch Sulfat-reduzierende Bakterien in Abwesenheit eines externen Elektronenakzeptors.

Stamm	Substrat	nachgewiesene Gärungsprodukte	molares Verhältnis
1pr3	Lactat	Acetat, Propionat	1,0 : 1,3
2pr4	Lactat	Acetat, Propionat	1,0 : 1,5
3pr10	Lactat	Acetat, Propionat	1,0 : 1,3
1be1	Lactat	Acetat, Propionat	6,2 : 1,0
3be13	Lactat	Acetat, Propionat	8,5 : 1,0
3be13	Fumarat	Acetat, Propionat, Succinat	6,3 : 1,1 : 1,0

Die mit Fumarat gewachsene Kultur dieses Sulfatreduzierers wurde auf flüchtige Fettsäuren und Succinat (s. B.12.9.) geprüft. Als Produkte wurden Acetat, Propionat und Succinat gefunden. Das Verhältnis dieser Produkte untereinander war unabhängig davon, ob der Kultur noch zusätzlich Benzoat zugesetzt worden war oder nicht (vgl. 3.3.3.).

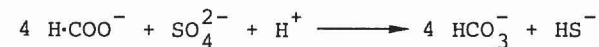
5. Einige Untersuchungen zum autotrophen Wachstum

Die Sulfat-reduzierenden Bakterien mit den Stammbezeichnungen 5ac10, 1st1, 1be1 und 3be13 vermochten mit H₂ und CO₂ bzw. mit Formiat ohne Zusatz einer weiteren organischen Kohlenstoffquelle zu wachsen, also autotroph (s. Tab. 7 - 9); dabei benötigten die Stämme 1st1 und 3be13 nicht einmal Vitamine (s. Tab. 4). Stamm 1st1 wuchs mit Formiat allein ebensoschnell wie bei gleichzeitiger Gegenwart von Acetat. Die Stämme 5ac10, 1be1 und 3be13 vermehrten sich dagegen unter autotrophen Bedingungen langsamer als mit Acetat als Kohlenstoffquelle; allerdings ließ sich das autotrophe Wachstum der zwei Stämme 1be1 und 3be13 durch häufiges Übertragen in Folgepassagen deutlich verbessern, sodaß nahezu die Wachstumraten wie in Gegenwart von Acetat erreicht wurden. Die beobachtete stimulierende Wirkung von Acetat bei den Sulfatreduzierern 5ac10, 1be1 und 3be13 beruhte nicht etwa darauf, daß anstelle von Wasserstoff bzw. Formiat nunmehr Acetat zu dem eigentlichen Elektronendonator wurde; wenn nämlich die geringe, hier verwendete Menge Acetat (0,7 mmol/l) allein eingesetzt wurde, so wuchsen die betreffenden Sulfatreduzierer viel langsamer und zu viel geringeren Zelldichten als mit Wasserstoff bzw. Formiat als zusätzlichen Elektronendonatoren.

Mit einem der autotroph wachsenden Sulfatreduzierer sollten die gebildeten Erträge in stöchiometrischen Messungen ermittelt werden. Die Stämme 5ac10 und 3be13 waren für genaue Ertragsmessungen wenig geeignet; der fädige Sulfatreduzierer 5ac10 benötigte nämlich für ein gutes Wachstum ein Sediment (s. 1.2.1.), und der Sarcinen-ähnliche Stamm 3be13 wuchs zum Teil als schwer

zu entfernender Belag an der Glaswandung. Die Zellen von Stamm 1be1 bildeten Schleim, der beim Abernten der verhältnismäßig geringen Bakterienmassen, die mit den gegebenen Formiat-Konzentrationen gebildet wurden, störend sein konnte. Somit erschien der vibrioide Stamm 1st1 für die Messungen am besten geeignet. Weil Stamm 1st1 keinen Wasserstoff zu verwerten vermochte, konnte für die Experimente nur Formiat verwendet werden. Als Versuchsgefäße dienten große Flaschen (1 l Inhalt, s. B.13.) mit Medium, das Sulfat im Überschuß (20 mmol/l) und unterschiedliche Konzentrationen an Formiat enthielt. Stamm 1st1 war verhältnismäßig unempfindlich gegen Formiat, sodaß ohne weiteres eine Konzentration bis zu 12 mmol/l eingesetzt werden konnte. Einem Kontrollansatz wurde kein Formiat zugesetzt. Beimpft wurde mit einer frischen Vorkultur, die schon seit mehreren Passagen autotroph mit Formiat wuchs. Eine gaschromatographische Analyse der verwendeten Stammlösung nach B.12.6. hatte gezeigt, daß das käufliche Natriumformiat keine nachweisbaren Mengen an Acetat oder Propionat enthielt. Während des Wachstums

wurden den Ansätzen pro mmol Formiat noch 0,25 mmol HCl aus einer sterilen Stammlösung zugesetzt. In den ausgewachsenen Kulturen wurden dann Schwefelwasserstoff (s. B.12.1.) und die Bakterienmasse (s. B.6.3.) bestimmt. Ferner wurde nach B.12.8. anhand der eingeengten Kulturüberstände geprüft, wieweit das vorgegebene Formiat verbraucht war. Die Ergebnisse in Tab. 24 stellen die Differenzen zu den Meßwerten aus dem Kontrollansatz dar. Die drei niedrigeren vorgegebenen Mengen an Formiat (3, 6 bzw. 9 mmol/l) waren bis auf einen Rest von etwa 0,1 mmol/l verbraucht worden; die höchste vorgegebene Menge an Formiat (12 mmol/l) war sogar vollständig verwertet worden. Insbesondere die Werte in der ersten und in der letzten Reihe von Tab. 24 erfüllen recht genau die folgende Dissimilationsgleichung:



Tab. 24: Quantitative Messungen zum autotrophen Wachstum des vibrioiden Sulfatreduzierers 1st1 mit unterschiedlichen vorgegebenen Konzentrationen an Formiat und einem Überschuß an Sulfat von 20 mmol/l. Die Angaben für gebildeten Schwefelwasserstoff und gebildete Zellmasse,

Formiat, gegeben [mmol/l]	H ₂ S, gebildet [mmol/l]	Zellmasse, gebildet (Ertrag) [mg/l]	Formiat, insgesamt verbraucht [mmol/l]
3,0	0,57	7,0	2,9
6,0	1,08	12,6	5,9
9,0	1,69	18,5	8,9
12,0	2,56	24,4	12,0

die als Trockenmasse bestimmt wurde, sind die Differenzen zu den Meßwerten aus dem Kontrollansatz ohne Formiat; die Menge an verbrauchtem Formiat wurde als Differenz zwischen der anfangs vorgegebenen und der nach dem Wachstum noch gefundenen Konzentration bestimmt.

Formiat, verbraucht für Zellmasse (nach Tab. 15) [mmol/l]	Formiat, verbraucht zur Reduktion von Sulfat [mmol/l]	molares Verhältnis: H ₂ S/Formiat	Ertrags- koeffizient: Y _{Fo} (Sulfat) [g/mol]
0,58	2,32	0,25/1	3,02
1,04	4,86	0,22/1	2,59
1,52	7,38	0,23/1	2,51
2,01	9,99	0,26/1	2,44

Mit den Stämmen 1st1 und 3be13 wurde ferner geprüft, ob das autotrophe Wachstum auf einer Fixierung von CO_2 über den Calvin-Cyclus beruhte. Zur Gewinnung der benötigten Zellmasse wurden Kulturvolumina von jeweils 2 l, die auf mehrere Gefäße verteilt waren, mit den Stämmen beimpft. Die verwendeten Vorkulturen wuchsen bereits seit einigen Passagen unter autotrophen Bedingungen. Stamm 3be13 wurde mit einem Gemisch aus 80 % H_2 und 20 % CO_2 angezogen (s. B.2.1. und B.3.5.3.); während des Wachstums wurde noch zweimal erneut mit H_2 und CO_2 begast. Für Stamm 1st1 kam hier wiederum nur Formiat als Substrat für die autotrophe Anzucht in Frage; der gut wachsenden Kultur wurde dann noch einmal Formiat zugesetzt, und zwar als Ameisensäure-Formiat-Gemisch (s. 3.4.1.). Die Untersuchungen an den frisch abgeernteten Zellen, die freundlicherweise Herr Dr. B. Bowien, Göttingen, übernahm, erbrachten jedoch keinerlei Hinweise für einen Einbau von CO_2 durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase eines Calvin-Cyclus.

6. Versuche zur Wirkung von Spurenelementen

Während der Anreicherungen und Isolierungen Sulfat-reduzierender Bakterien mit Benzoat (s. 1.2.5.) war der zuerst isolierte Stamm 1be1 durch sein Bedürfnis für das Spurenelement Selen aufgefallen. Daraufhin wurden auch alle anderen mit Benzoat angereicherten und isolierten Sulfatreduzierer stets in Gegenwart von Selen (10^{-8} mol/l) kultiviert, ohne anfangs auf ein tatsächliches Bedürfnis zu prüfen. Wenn ein Bakterium Selen als Spurenelement benötigt, so kann nach WAGNER und ANDREESEN (1977), LEONHARDT und ANDREESEN (1977) sowie ANDREESEN (1978) auch mit einem zusätzlichen Bedürfnis für Molybdän oder sogar Wolfram gerechnet werden. Daher wurde den Kulturmedien mit Benzoat bisher außer Selen auch noch Wolfram (10^{-8} mol/l) vorsorglich zugesetzt; Molybdän war in allen Medien bereits vorhanden (10^{-7} mol/l).

Für alle folgenden Versuche zur Wirkung der Spurenelemente wurden die benötigten Grundmedien (s. Tab. 2) ohne Zusatz von Molybdän hergestellt. Molybdän wurde dann ebenso wie Selen oder Wolfram aus sterilen Stammlösungen zugesetzt (s. B.3.4.6.). Für die hier zu untersuchenden Sulfatreduzierer wurden die Minimalmedien mit den jeweils benötigten Vitaminen (s. Tab. 4) ohne Zusatz von Supplinen verwendet; dem Medium für den fädigen, gleitend beweglichen Sulfatreduzierer 4be13 wurde Aluminiumphosphat als synthetisches Sediment zugegeben (s. B.3.4.8.).

6.1. Bedeutung spezieller Spurenelemente für die Verwertung von Benzoat und weiteren Verbindungen

Nunmehr sollte im Einzelnen untersucht werden, ob von den mit Benzoat isolierten Stämmen (1be1, 2be1, 3be13, 4be13) auch noch andere als Stamm 1be1 Selen benötigten, und ob ferner ein Bedürfnis für Molybdän oder Wolfram vorlag. Um ein Bedürfnis nachzuweisen, wurden die Bakterien wiederholt in neue Passagen übertragen, denen das betreffende Spurenelement nicht mehr zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurde jeweils ein paralleler Ansatz beimpft, der das Spurenelement enthielt. Bei der Zubereitung mußte unbedingt vermieden werden, daß zwischen den zu vergleichenden Ansätzen auch nur geringste Mengen der Spurenelemente etwa durch das Pipettieren verschleppt wurden. Ein Bedürfnis konnte sich erst dann bemerkbar machen, wenn das Spurenelement nach mehrfachem Überimpfen ausverdünnt war; die Ansätze, in denen das Spurenelement fehlte, zeigten dann in allen weiteren Passagen fortan ein schwächeres Wachstum als die Kontrollansätze.

Zunächst wurden alle mit Benzoat isolierten Stämme in mehrere Folgepassagen ohne Wolfram, aber noch mit Selen und Molybdän überimpft. Dabei stellte sich heraus, daß das Fehlen von Wolfram bei keinem der vier Stämme eine Verminderung des Wachstums zur Folge hatte. Für die nächsten Experimente wurde daher Wolfram nicht mehr zugesetzt.

Anschließend wurden die mit Benzoat wachsenden Stämme wiederholt in Passagen übertragen, in denen entweder Selen oder Molybdän fehlten oder auch beide Elemente. Das Bedürfnis von Stamm 1be1 für Selen machte sich wiederum deutlich bemerkbar; ebenso zeigte sich jetzt, daß dieser Sulfatreduzierer auch Molybdän benötigte, denn in den Ansätzen ohne Molybdän fand stets ein nur sehr schwaches Wachstum statt. Sobald eine an Selen oder Molybdän verarmte Kultur in Medium überimpft wurde, das die Spurenelemente enthielt, wuchsen die Bakterien wieder wie ursprünglich. Das Wachstum von Stamm 2be1 wurde durch die Verarmung an Selen oder Molybdän in den aufeinanderfolgenden Passagen entweder gar nicht oder nur wenig vermindert; die Resultate waren nicht eindeutig reproduzierbar, denn in einer nächsten beimpften Versuchsreihe konnte das Wachstum ohne Zusatz von Selen oder Molybdän wiederum ebenso gut sein wie im Kontrollansatz. Die Kontrollansätze mit Selen und Molybdän zeigten jedoch stets ein unverändert gutes Wachstum, sodaß im Falle von Stamm 2be1 ein Bedürfnis für diese Spurenelemente vermutet werden konnte. Der Sulfatreduzierer 3be13 benötigte für das Wachstum mit Benzoat nur Molybdän, während ein Bedürfnis für Selen nicht nachgewiesen werden konnte. In den Ansätzen, in denen Molybdän fehlte, wuchs Stamm 3be13 kaum und produzierte nur sehr wenig H_2S ; wurde eine solche Kultur dann in Medium mit Molybdän überimpft, so wuchsen die Bakterien alsbald wieder gut. Der fädige Sulfatreduzierer 4be13 zeigte weder ein Bedürfnis für Selen noch für Molybdän: Die Filamente wuchsen in allen Ansätzen gleich gut und bildeten gleich hohe Konzentrationen von H_2S , unabhängig von den jeweils vorhandenen Spurenelementen.

Alle mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat und Stearat wachsenden Sulfatreduzierer wurden bisher in Gegenwart von Molybdän, jedoch ohne Zusatz von Selen und Wolfram kultiviert. Seit der Anreicherung und Isolierung dieser Stämme wurde nie eine Verminderung oder gar ein Ausbleiben des Wachstums beobachtet und daher auch nie ein Hinweis für ein fehlendes Spurenelement erhalten. Während der Optimierung der Wachstumsbedingungen war unter anderem auch geprüft worden, ob das Wachstum einiger Sul-

fatreduzierer auf Acetat, Propionat, Butyrat oder Palmitat durch ein Gemisch bestimmter zusätzlicher Spurenelemente beschleunigt werden konnte (s. 3.1.6.); dieses Gemisch enthielt auch Selen und Wolfram. Eine stimulierende Wirkung wurde jedoch nicht festgestellt. Alle mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat und Stearat wachsenden Stämme wurden auch etliche Male hintereinander in Medien ohne Molybdän überimpft; keiner der Stämme reagierte jedoch auf das Fehlen von Molybdän mit einer Verminderung des Wachstums. Nunmehr stellte sich die Frage, ob das nachweisbare Bedürfnis von Stamm 1be1 für Selen und Molybdän und das von Stamm 3be13 für Molybdän sowie auch das wahrscheinliche Bedürfnis von Stamm 2be1 für Selen und Molybdän mit der Verwertung von Benzoat im Zusammenhang standen. Daher wurde untersucht, ob die betreffenden mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer auch für das Wachstum mit anderen Elektronendonatoren Selen bzw. Molybdän benötigten. Für die Versuche mit Stamm 1be1 wurde eine größere Anzahl unterschiedlicher Elektronendonatoren eingesetzt. Die Bedeutung der Spurenelemente für das Wachstum mit anderen Verbindungen wurde in der gleichen Weise wie vormals mit Benzoat als Substrat untersucht: Durch wiederholtes Überimpfen in Medium ohne Selen bzw. ohne Molybdän wurden diese Elemente ausverdünnt. Dabei stellte sich heraus, daß Stamm 1be1 beim Wachstum mit Phenylacetat oder 3-Phenylpropionat ebenfalls Selen und Molybdän benötigte; für die Verwertung von 2-Hydroxybenzoat mußte dagegen nur Molybdän zugesetzt werden, nicht jedoch Selen. Beim Wachstum mit Äthanol, Formiat, Acetat, Heptanat, Lactat oder Cyclohexancarboxylat benötigte Stamm 1be1 weder Selen noch Molybdän. Wurden die mit diesen Verbindungen in Abwesenheit von Selen und Molybdän wachsenden Kulturen von Stamm 1be1 in Medium mit Benzoat übertragen, das ebenfalls kein Selen oder Molybdän enthielt, so zeigte sich wieder das Bedürfnis für die Spurenelemente. Beim Wachstum der Stämme 2be1 und 3be13 mit Lactat oder Heptanat wurden ebensowenig Hinweise auf ein Bedürfnis für Selen oder Molybdän erhalten. Heptanat wurde in den Versuchen deshalb verwendet, weil es wie Benzoat eine Carbonsäure mit 7 Kohlenstoffatomen pro Molekül ist. Für die Untersuchungen an Stamm 4be13 wurden Heptanat und Fumarat als

Stamm bzw. Stämme	Substrat	nachweislich benötigte Spurenelemente
1be1	Äthanol	-
	Formiat	-
	Acetat	-
	n-Heptanat	-
	Lactat	-
	Cyclohexancarboxylat	-
	Benzoat	Se, Mo
	Phenylacetat	Se, Mo
	3-Phenylpropionat	Se, Mo
2-Hydroxybenzoat	Mo	
2be1	n-Heptanat	-
	Lactat	-
	Benzoat	Se, Mo (?)
3be13	n-Heptanat	-
	Lactat	-
	Benzoat	Mo
4be13	n-Heptanat	-
	Fumarat	-
	Benzoat	-
.ac..	Acetat	-
.pr..	Propionat	-
.bu..	Butyrat	-
.pa..	Palmitat	-
1st1	Stearat	-

alternative Elektronendonatoren gewählt; dieser fädige Sulfat-reduzierer, der auch beim Wachstum mit Benzoat kein Bedürfnis für Selen oder Molybdän gezeigt hatte, benötigte diese Spurenelemente ebensowenig für die Verwertung der anderen Verbindungen. In Tab. 25 ist zusammengefaßt, mit welchen Verbindungen als Elektronendonatoren die einzelnen Sulfatreduzierer auf ein Bedürfnis für Spurenelemente geprüft wurden.

6.2. Wirkung von Selen, Molybdän und chemisch ähnlichen Elementen in verschiedenen Konzentrationsbereichen

Stamm 1be1 war wegen der ausgeprägten Abhängigkeit von zuge-setztem Selen oder Molybdän beim Wachstum auf Benzoat ein ge-eigneter Versuchsorganismus, an welchem die Wirkung der Spurenelemente in verschiedenen Konzentrationsbereichen studiert werden konnte. Von Interesse war die Frage, bis herab zu welchen Konzentrationen der Einfluß von Selen bzw. Molybdän noch zu be-merken war, und ebenso, oberhalb welcher Konzentrationen Selen oder Molybdän das Wachstum hemmten. Schließlich wurde noch ge-prüft, ob vielleicht anstelle von Selen oder Molybdän auch che-misch ähnliche Elemente eine Wirkung auf das Wachstum von Stamm 1be1 mit Benzoat hatten. Im chemischen Verhalten sind vor allem solche Elemente einander ähnlich, die der gleichen Gruppe im Periodensystem angehören. Aber auch schräg benachbarte Elemente (Richtung von links oben nach rechts unten) ähneln einander bisweilen in einigen Eigenschaften. Als ein dem Selen verwand-tes Element kam für die geplanten Versuche nur Tellur in Frage.

Tab. 25, S. 256: Prüfung der mit Benzoat isolierten Sulfatredu-zierer auf ein Bedürfnis für Selen oder Molybdän als Spurenelemente beim Wachstum mit verschiedenen Verbindungen. Geprüft wurden ebenfalls alle mit Acetat (.ac..), Propionat (.pr..), Butyrat (.bu..), Palmitat (.pa..) und Stearat (1st1) isolierten Sulfatreduzie-rer, und zwar mit der jeweiligen Fettsäure als orga-nischem Substrat. Symbole: (?) = nicht eindeutig nach-gewiesen; - = nicht nachgewiesen

Dagegen boten sich mehrere Elemente an, deren chemisches Verhalten in einigen Punkten an das von Molybdän erinnert, nämlich Vanadin, Chrom, Wolfram, Rhenium und Uran; das Element Uran zählt zwar zu den Actiniden, kommt jedoch wie die Elemente der VI. Nebengruppe in der Wertigkeitsstufe +6 als der höchsten vor, sodaß eine gewisse Ähnlichkeit auch mit Molybdän besteht. Die dem Selen bzw. Molybdän ähnlichen Elemente wurden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt; welche Verbindungen der Elemente dabei verwendet wurden, ist unter B.3.4.6. aufgeführt. Ausgegangen wurde von den Kulturen des Sulfatreduzierers 1be1 mit Benzoat, die an Selen oder an Molybdän verarmt waren und demzufolge ein nur schwaches Wachstum zeigten. Mit der Kultur ohne Selen wurden Ansätze beimpft, die zwar alle Molybdän in der gleichen Konzentration (10^{-7} mol/l) enthielten, jedoch Selen bzw. Tellur in Konzentrationsstufen, die sich jeweils immer um eine Zehnerpotenz unterschieden. Ebenso wurden mit der an Molybdän verarmten Kultur Ansätze beimpft, die Selen in stets gleicher Konzentration enthielten, aber die Elemente V, Cr, Mo, W, Re bzw. U in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Sobald die Bakterien in den am schnellsten wachsenden Ansätzen der Versuchsreihen die Dichte erreicht hatten, die einer ausgewachsenen Kultur von Stamm 1be1 entsprach, wurde die Trübung aller Ansätze nach B.6.1. in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 500 nm bestimmt. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt; dabei wurde immer die Kultur mit dem niedrigsten Gehalt des betreffenden Spurenelements (10^{-10} mol/l) zum Beimpfen der nächsten Konzentrationsreihe verwendet. In Tab. 26 sind die ermittelten Bakterientrübungen aus den entsprechenden Ansätzen der Wiederholungen als Mittelwerte angegeben; lediglich bei Trübungen, die bei einer gegebenen Konzentration des betreffenden Elements während der Wiederholungen sehr unterschiedlich ausfielen, ist der maximal erreichte Wert angegeben.

Selen wirkte ab etwa 10^{-9} mol/l wachstumsfördernd. Durch 10^{-6} mol/l wurde das Wachstum bereits etwas, durch 10^{-5} mol/l vollständig gehemmt.

Tab. 26: Einfluß von Selen, Molybdän und chemisch ähnlichen Elementen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen auf das Wachstum von Stamm 1be1 mit Benzoat und Sulfat. Die Elemente wurden als Selenit, Tellurit, Vanadat, Chrom(III), Molybdat, Wolframat, Perhenat bzw. Carbonatouranat zugesetzt. Angegeben sind die nach gleicher Inkubationsdauer erreichten wahren (s. B.6.1.) Bakterientrübungen als Mittelwerte mehrerer Wiederholungen; fielen die erreichten Trübungen bei den Wiederholungen sehr unterschiedlich aus, so ist anstelle des Mittelwerts die maximal erreichte (§) Trübung angegeben. * = nicht ermittelt

zugesetzte Konzentration von Se oder Te bzw. V, Cr, Mo, W, Re oder U	erreichte Trübung, 500 nm, 1 cm, in Gegenwart von									
	Se	Te	V	Cr	Mo	W	Re	U	10^{-8} mol Se/l und	
0 mol/l	0,134	0,155	0,203	0,215	0,205	0,207	0,233	0,177		
$1 \cdot 10^{-10}$ mol/l	0,193	§ 0,315	0,189	0,226	0,212	0,241	0,205	0,258		
$1 \cdot 10^{-9}$ mol/l	0,394	§ 0,608	0,243	0,174	0,248	0,358	0,224	0,212		
$1 \cdot 10^{-8}$ mol/l	0,632	§ 0,548	0,195	0,242	0,349	0,481	0,206	0,199		
$1 \cdot 10^{-7}$ mol/l	0,585	§ 0,324	0,236	0,219	0,572	0,486	0,257	0,201		
$1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	§ 0,430	0,046	0,239	0,203	0,610	0,468	0,191	0,168		
$1 \cdot 10^{-5}$ mol/l	0,068	.	0,263	0,244	0,496	0,418	0,194	0,138		
$1 \cdot 10^{-4}$ mol/l	0,048	0,046	.	.		

Bei der Verwendung von Tellur anstelle von Selen wurde ebenfalls eine positive Wirkung auf das Wachstum von Stamm 1be1 beobachtet. Die Ergebnisse in den Ansätzen mit Tellur fielen jedoch bei den Wiederholungen sehr unterschiedlich aus; so konnte eine bestimmte Tellur-Konzentration in einem Ansatz nur eine schwache Stimulation bewirken, in einem nächsten Ansatz dagegen ein ebensogutes Wachstum wie Selen. Wenn jedoch Tellur das Wachstum auf Benzoat stimulierte, so wirkte es bereits in noch niedrigerer Konzentration als Selen, nämlich schon ein wenig bei 10^{-10} mol/l. Tellur war noch giftiger als Selen; bereits eine Konzentration von 10^{-6} mol/l hemmte das Wachstum stets vollständig.

Der Einfluß von Molybdän auf das Wachstum machte sich ab etwa 10^{-8} mol/l bemerkbar; Molybdän war im Vergleich zu Selen oder Tellur viel weniger toxisch, denn 10^{-5} mol/l hemmten das Wachstum von Stamm 1be1 noch nicht.

Wolfram hatte stets einen ähnlich positiven Einfluß auf das Wachstum wie Molybdän. Dabei wirkte Wolfram bereits in niedrigeren Konzentrationen als Molybdän, nämlich ab etwa 10^{-9} mol/l. Die mit Wolfram maximal erreichten Zelldichten waren hingegen etwas geringer als die in Gegenwart von Molybdän erhaltenen. Auch Wolfram war nur wenig toxisch, denn es wurde wie Molybdän noch in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l ertragen.

Vanadin, Chrom, Rhenium und Uran zeigten anstelle von Molybdän keinerlei positive Wirkung auf das Wachstum von Stamm 1be1 mit Benzoat. Ebensowenig wurde eine Hemmung durch die hier angewandten Konzentrationen dieser Elemente beobachtet. Chrom wurde ferner noch in der dem Molybdat entsprechenden sechswertigen Stufe als Chromat eingesetzt, jedoch ebenso ohne wachstumsfördernde Wirkung. Chromat, das ein wesentlich stärkeres Oxidationsmittel als das homologe Molybdat ist, dürfte in dem reduzierenden Medium ohnehin alsbald in die dreiwertige Stufe übergehen.

Nach Abschluß der Versuche mit Spurenelementen wurden den Medien der mit Benzoat wachsenden Sulfatreduzierer wieder Selen (10^{-8} mol/l), Molybdän (10^{-7} mol/l) und Wolfram (10^{-8} mol/l) zugesetzt, auch dann, wenn kein Bedürfnis nachzuweisen war; denn immerhin war es denkbar, daß die betreffenden Stämme ihren Bedarf an Spurenelementen bisher stets aus Verunreinigungen der Medien gedeckt hatten. Um nun weiterhin von einem Vorhandensein solch möglicher Verunreinigungen unabhängig zu sein, wurde von vornherein für eine Mindestkonzentration dieser Spurenelemente im Medium gesorgt.

7. Versuche zur Syntrophie von Sulfatreduzierern mit Methanbakterien

Acetat, Propionat, Butyrat, höhere Fettsäuren und Benzoat sind Verbindungen, die unter anaeroben Bedingungen auch in Abwesenheit von Sulfat umgesetzt werden können, und zwar zu Methan und Kohlendioxid (STADTMAN und BARKER, 1951; CHYNOWETH und MAH, 1971; FERRY und WOLFE, 1976; FINA et al., 1978; BARESI et al., 1978; MAH et al., 1978; McINERNEY et al., 1979; ZEHNDER et al., 1980). Bis heute sind jedoch keine Methanbakterien bekannt, die andere organische Säuren als Formiat oder Acetat verwerten (WOLFE, 1971; ZEIKUS, 1977). Die Umsetzung von Propionat, Butyrat, höheren Fettsäuren bzw. Benzoat zu Methan ist nur deshalb möglich, weil die Methanbakterien in syntropher Mischkultur mit weiteren Bakterien leben; erst diese anderen, die sogenannten H_2 -bildenden acetogenen Bakterien bilden aus Propionat, Butyrat, höheren Fettsäuren bzw. Benzoat die Verbindungen, die von den Methanbakterien verwertet werden, nämlich H_2 und Acetat. BRYANT et al. (1977) konnten zeigen, daß auch Sulfat-reduzierende Bakterien beim Fehlen von Sulfat in syntropher Mischkultur mit Methanbakterien zu wachsen vermochten; diese Mischkultur setzte Lactat oder Äthanol zu Methan um. Daher lag es nahe, auch einige der mit Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoat isolierten Sulfatreduzierer auf die Fähigkeit zu prüfen, bei Abwesenheit von Sulfat in Syntrophie mit Methanbakterien zu wachsen. Die Sulfatreduzierer müßten dann imstande

sein, die aus den organischen Verbindungen abgespaltenen Reduktionsäquivalente ins Medium in Form von Verbindungen auszuscheiden, die von Methanbakterien verwertet werden können; außer einer Freisetzung von Wasserstoff ist auch eine von Formiat denkbar. Eine Ausscheidung von Wasserstoff oder Formiat ist bei solchen Sulfatreduzierern am wahrscheinlichsten, welche diese Substanzen auch umgekehrt in Gegenwart von Sulfat als Elektrodendonatoren verwerten können. Daher erschienen für die Experimente zur Syntrophie die Stämme geeignet, bei denen ein Wachstum mit Wasserstoff oder Formiat nachgewiesen worden war (s. Tab. 7 - 9). Weil für die Versuche nur Süßwassermedium verwendet werden sollte, beschränkte sich die Auswahl auf die Stämme 1ac2, 1pr3, 2pr4, 1bu8, 1st1, 1be1 und 2be1; ferner wurde noch der Stamm 1pa3 als ein Sulfatreduzierer hinzugezogen, der kein H_2 und auch kein Formiat zu verwerten vermochte.

7.1. Anreicherung und Isolierung von Methanbakterien

Zunächst galt es, für die Versuche geeignete Methanbakterien zu finden; diese sollten daher aus Anreicherungen isoliert werden, in denen bereits Fettsäuren durch Mischpopulationen zu Methan umgesetzt wurden. Für eine solche Anreicherung wurde Süßwassermedium (s. Tab. 2) ohne Sulfat verwendet, dem Butyrat, 6 mmol/l, Capronat, 2 mmol/l, und Caprylat, 1 mmol/l, sowie das Vitamin-Gemisch (s. B.3.4.4.) und Se, Mo und W als Spurenelemente zugesetzt wurden. Etwa 80 ml dieses Mediums wurden in einer Flasche (100 ml Inhalt) mit etwas Faul- und Grabenschlamm beimpft. Ferner sollte bereits eine gewisse Populationsdichte von Sulfatreduzierern vorgegeben werden, die bei einer Fähigkeit zur Syntrophie von vornherein das geeignete Milieu zur Entwicklung der Methanbakterien schaffen könnten. Daher wurden aus frisch gewachsenen Kulturen der Sulfatreduzierer 1bu8 und 1st1 jeweils 10 ml abzentrifugiert und nach dem Abgießen der Überstände in der Anreicherung resuspendiert. Das Kulturgefäß wurde anaerob begast, mit einem Gärröhrchen verschlossen (s. B.2.2.) und bei 29 °C inkubiert. Nach einigen Tagen begann die Methanbildung. In Abständen von etwa 2 Wochen wurden Folgepassagen beimpft,

denen auch wieder die Sulfatreduzierer zugesetzt wurden. Nach einigen Überimpfungen fielen in den Anreicherungen neben den zahlreichen zugesetzten vibrioiden Sulfatreduzierern auch sehr schlanke, schwach spirilloid gekrümmte, bewegliche Bakterien auf. Mit der jüngsten Anreicherungsphase wurden Verdünnungsreihen für Rollröhrchen nach B.4.4. hergestellt, die im Agar 5 mmol Formiat pro l, 1 mmol Acetat pro l, Faulwasser und Gülleextrakt (s. B.3.4.7.) enthielten; begast wurde mit einem Gemisch aus 80 % H_2 und 20 % CO_2 . Während der Inkubation entwickelten sich Kolonien drei verschiedener Typen von Bakterien, von denen jeweils ein Stamm über eine zweite Verdünnungsreihe mit Rollröhrchen in Reinkultur isoliert wurde. Außerdem war noch das Methanbakterium vorhanden, das unter 1.2.1. mit Acetat isoliert worden war. Die Bakterien die somit für die Versuche zu Syntrophie zur Verfügung standen, seien im folgenden kurz charakterisiert:

- a) Das bereits in der Anreicherung beobachtete, sehr schlanke, schwach spirilloid gekrümmte Bakterium konnte in Reinkultur isoliert werden. Der Stamm vermochte mit H_2 und CO_2 oder mit Formiat zu wachsen; in der Gasphase wurde nach dem Wachstum Methan nachgewiesen (s. B.12.10.). Methanol oder Acetat wurden nicht verwertet. Geringe Mengen von Acetat wurden aber als Kohlenstoffquelle benötigt. Ein Zusatz von Vitaminen war nicht erforderlich. Das Bakterium wuchs bei 35 °C noch etwas besser als bei der anfangs gewählten Temperatur von 29 °C. Es handelte sich hier um ein Methanbakterium, das nach der Beschreibung von FERRY et al. (1974) der Gattung Methanospirillum angehören dürfte. In frisch beimpften Reinkulturen dieses Stammes begann das Wachstum schneller, wenn wenig Dithionit, 0,07 mmol/l, zugesetzt wurde.
- b) Als weiteres Methanbakterium wurde aus den Rollröhrchen ein Stamm isoliert, der coccoide, bisweilen auch etwas eckige, unbewegliche Einzelzellen oder Zellpaare bildete; die Kolonien in den Rollröhrchen enthielten auch häufiger Sarcinenähnliche Aggregate. H_2 und CO_2 sowie Methanol wurden ver-

wertet, nicht dagegen Formiat. Nach einer Anlaufphase von einigen Wochen wuchs der Stamm auch langsam mit Acetat. Für das Wachstum mit Wasserstoff oder Methanol war kein Zusatz von Acetat als Kohlenstoffquelle erforderlich. Als Vitamine wurden 4-Aminobenzoat und Pantothenat benötigt. Das Wachstum war bei 35 °C schneller als bei 29 °C. Die gleichen morphologischen und physiologischen Eigenschaften zeigte auch der anfangs unter 1.2.1. mit Acetat isolierte Stamm. Nach der Beschreibung von BRYANT (1974) waren hier zwei Stämme der Gattung Methanosarcina isoliert worden.

- c) Schließlich wurde noch ein Bakterium isoliert, das ovale, bewegliche Zellen bildete, die bisweilen paarweise hintereinander lagen. Der Stamm wuchs mit H₂ und CO₂ oder mit Formiat, ohne daß eine organische Kohlenstoffquelle benötigt wurde. Ein gutes Wachstum war mit Fructose möglich. Methan wurde nicht gebildet; dagegen wurde Acetat ins Medium ausgeschieden. Als Vitamine wurden Pantothenat, Pyridoxamin und Thiamin benötigt. Das Bakterium wuchs bei 35 °C schneller als bei 29 °C. Nach der Beschreibung von BALCH et al. (1977) handelte es sich hier um einem Stamm der Gattung Acetobacterium.

Die erhaltenen Reinkulturen von Methanospirillum, Methanosarcina und Acetobacterium wurden jeweils in Sulfat-freiem Minimalmedium mit etwas erhöhtem Sulfid-Gehalt (s. B.3.3.7.) unter einer Atmosphäre aus 80 % H₂ und 20 % CO₂ kultiviert. Als Spurenelemente wurden außer Mo auch noch vorsorglich Se und W zugesetzt.

7.2. Beobachtungen an Mischkulturen

Für die Experimente zur Bildung von Methan in syntrophen Mischkulturen mit Sulfatreduzierern erschien Methanospirillum besonders gut geeignet, denn dieses Bakterium vermochte sowohl Wasserstoff als auch Formiat zu verwerten. In kleinen Flaschen (50 ml Inhalt) wurden jeweils 30 ml Süßwassermedium ohne Sulfat

mit Acetat, 1 mmol/l, und den jeweils benötigten Vitaminen versetzt; auch die Spurenelemente Se, Mo und W waren wieder zugegen. Für die Mischkulturen der sonst in Brackwassermedium I kultivierten Stämme 1st1 und 1be1 wurde ebenfalls das Süßwassermedium verwendet, in welchem diese Sulfatreduzierer nur wenig langsamer wuchsen. Dann wurden die von den betreffenden Sulfatreduzierern spezifisch verwerteten Verbindungen (Propionat, Butyrat, Palmitat bzw. Benzoat) zugesetzt; dem Ansatz für Stamm 1ac2 wurde Butyrat, dem für Stamm 1st1 diesmal Palmitat zugegeben. Für die Stämme der hier ausgewählten Sulfatreduzierer, die Lactat zu verwerten vermochten, wurde auch dieses in parallelen Ansätzen verwendet. Die vorbereiteten Medien wurden jeweils mit 6 ml einer gut wachsenden Kultur von Methanospirillum und mit 3 ml der Kultur des jeweiligen Sulfatreduzierers beimpft. Die Flaschen wurden anaerob begast und mit einem Gärröhrchen nach B.2.2. steril verschlossen. Die Mischkulturen mit den Stämmen 2pr4, 1pa3 und 1bu8 wurden bei 29 °C inkubiert, die mit den Stämmen 1ac2, 1pr3, 1st1, 1be1 und 2be1 bei 35 °C. Eine Bildung von Methan wurde jedoch nur in einer Mischkultur beobachtet, nämlich der mit Stamm 1bu8 auf Lactat als Substrat; aus Butyrat wurde in der Mischkultur mit Stamm 1bu8 ebensowenig Methan gebildet wie in den Mischkulturen der übrigen Sulfatreduzierer mit anderen Substraten. In Tab. 27 ist nochmals zusammengefaßt, welche Stämme Sulfat-reduzierender Bakterien mit welchem Substrat auf die Fähigkeit zur Syntrophie mit Methanospirillum geprüft wurden. Die Mischkultur von Stamm 1bu8 mit Methanospirillum auf Lactat als Substrat war stabil; beide Bakterien wuchsen in Folgepassagen zusammen weiter und setzten Lactat zu Methan um. Die Stämme 1pr3, 2pr4 und 1be1 wuchsen in den Ansätzen mit Lactat, obwohl kein Methan gebildet wurde; dieses Wachstum war deshalb möglich, weil die drei Sulfatreduzierer Lactat in Abwesenheit von Sulfat vergären konnten (s. 3.3.3.).

Die Stämme 1pr3, 2pr4, 1bu8 und 2be1 wurden ferner auf ein syntrophes Zusammenwirken mit den zwei isolierten Stämmen von Methanosarcina geprüft, wobei Propionat, Butyrat bzw. Benzoat

Tab. 27: Ergebnisse der Versuche mit Mischkulturen von Methanospirillum und verschiedenen Stämmen Sulfat-reduzierender Bakterien in Abwesenheit von Sulfat. Nur in einem Ansatz, dem mit Stamm 1bu8 auf Lactat als Substrat, wuchsen beide Bakterientypen in Syntrophie unter Bildung von Methan.

Sulfatreduzierer (Stammbezeichnung)	Substrat	Bildung von Methan durch <u>Methanospirillum</u>
1ac2	Butyrat	-
1pr3	Propionat	-
	Lactat	-
2pr4	Propionat	-
	Lactat	-
1bu8	Butyrat	-
	Lactat	+
1pa3	Palmitat	-
	Lactat	-
1st1	Palmitat	-
1be1	Benzoat	-
	Lactat	-
2be1	Benzoat	-
	Lactat	-

als Substrate dienen sollten. Die Ansätze wurde in analoger Weise wie die mit Methanospirillum hergestellt; lediglich ein Zusatz von Acetat als Kohlenstoffquelle entfiel. Auch in diesen Mischkulturen wurde kein Methan gebildet.

Schließlich wurde auch noch der isolierte Stamm von Acetobacterium in Mischkulturen mit Sulfatreduzierern vereinigt. Für diese Experimente wurden Stamm 1st1 mit Palmitat und die Stämme 1be1 und 2be1 mit Benzoat eingesetzt. Bei einem syntrophen Zusammenwirken von Sulfatreduzierern mit Acetobacterium ist eine Bildung von Acetat zu erwarten. In den Ansätzen wurde jedoch weder ein Wachstum noch eine Ausscheidung von Acetat beobachtet.

D. DISKUSSION

In anaeroben Nährmedien mit Acetat als einzigem organischen Substrat zur Anreicherung von Purpurbakterien aus Schlämmen waren bisweilen größere Mengen an H_2S gebildet worden. Durch Überimpfen der betreffenden Ansätze in Folgepassagen und Inkubation im Dunkeln konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Schwefelwasserstoff die Folge einer dissimilatorischen Sulfat-reduktion war. Das für diese Umsetzung verantwortliche Bakterium wurde schließlich in Reinkultur isoliert; es handelte sich um einen stäbchenförmigen, zur Bildung von Sporen fähigen Sulfatreduzierer, der mit Acetat als alleinigem Elektronendonator und alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen vermochte und daher den Namen Desulfotomaculum acetoxidans erhielt. Dieses Bakterium stellte eine neue Art mit einer ungewöhnlichen Stoffwechselleistung dar, denn keiner der bis dahin bekannten Sulfatreduzierer vermochte Acetat zu verwerten; vielmehr galten die Sulfat-reduzierenden Bakterien als eine physiologische Gruppe von Mikroorganismen, die ihre organischen Substrate unvollständig oxidieren und als häufigstes Endprodukt Acetat ausscheiden. Daraufhin wurden von verschiedenen Standorten noch weitere Sulfatreduzierer mit Acetat angereichert und isoliert, die sich morphologisch von Desulfotomaculum acetoxidans unterschieden. Für die Anreicherungsversuche wurden ferner höhere Fettsäuren als Acetat, nämlich Propionat, Butyrat, Palmitat und Stearat, sowie auch eine aromatische Verbindung, das Benzoat, verwendet. Auch mit diesen organischen Säuren konnten jeweils verschiedene Stämme neuartiger Sulfat-reduzierender Bakterien in Reinkultur isoliert werden. Eine Verwertung von höheren Fettsäuren oder Benzoat als Elektronendonatoren durch Reinkulturen Sulfat-reduzierender Bakterien war ebenfalls bislang nicht bekannt.

Die Stöchiometrie der Oxidation der als Elektronendonatoren eingesetzten Verbindungen wurde anhand mehrerer Stämme untersucht. Die Messungen zeigten, daß es unter den isolierten Sulfatreduzierern sowohl Stämme gab, die zu einer vollständigen

Oxidation fähig waren, als auch solche, die ihre Substrate nur unvollständig oxidierten. Weil die vollständige Oxidation ebenso wie die Verwertung von Fettsäuren oder Benzoat eine neue Darstellung der Ernährungsphysiologie Sulfat-reduzierender Bakterien erfordern, sollen zunächst die Umsetzungen der verschiedenen Substrate durch die isolierten Stämme erörtert werden.

Die neuen Sulfatreduzierer waren aber nicht nur hinsichtlich der Ernährungsphysiologie von den bisher bekannten verschieden; darüber hinaus zeigten die morphologischen Merkmale, daß etliche der isolierten Stämme nicht in die bekannten Gattungen Desulfovibrio, Desulfotomaculum oder Desulfomonas eingeordnet werden konnten. Daher sollten die isolierten Sulfatreduzierer taxonomisch beschrieben werden, soweit die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten dafür ausreichend waren.

Aus der Biochemie werden dann noch drei voneinander verhältnismäßig unabhängige Themenbereiche aufgegriffen, die sich aus Beobachtungen während der Isolation, der Charakterisierung und den stöchiometrischen Untersuchungen ergaben: Dabei handelt es sich um die aus den Ertragsmessungen entstehenden Fragen zur Energiekonservierung, ferner um die Fähigkeit zu autotrophem Wachstum sowie um das nachgewiesene Bedürfnis für Selen und Molybdän für die Verwertung bestimmter aromatischer Verbindungen.

Letztlich soll auch noch auf die ökologische Bedeutung eingegangen werden, welche die neuen Typen Sulfat-reduzierender Bakterien aufgrund ihrer Stoffwechselleistung für das anaerobe Abbaugeschehen im Stoffkreislauf der Natur haben könnten.

1. Substratumsetzungen der isolierten Sulfat-reduzierenden Bakterien

Sulfat-reduzierende Bakterien wurden bisher trotz der morphologischen Unterschiede (vibrioiden Zellen, stäbchenförmige Zellen mit Sporenbildung, stäbchenförmige Zellen ohne Sporenbildung)

immer zusammen als eine physiologische Gruppe dargestellt, weil diese Anaerobier aufgrund einer gemeinsamen besonderen Stoffwechselleistung von anderen eindeutig abgegrenzt werden können: Sulfat kann stets als externer Akzeptor für die aus den Dehydrogenierungen der Substrate stammenden Reduktionsäquivalente verwendet und zu Schwefelwasserstoff reduziert werden. Der daraus resultierende Bruttoumsatz organischer Verbindungen zu ausschließlich höher oxidierten Produkten ist gärenden Bakterien nicht möglich. Bei der Verwertung der Mehrzahl der organischen Substrate sind Sulfatreduzierer auf den externen Elektronenakzeptor angewiesen; anstelle von Sulfat können dabei häufig auch andere Schwefelverbindungen reduziert werden. Ein reines Gärungswachstum in Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren ist nur mit wenigen der als Elektronendonatoren bekannten Verbindungen möglich (s. A.2.2.).

Auch die neu isolierten Stämme vermochten die für die Anreicherung verwendeten Substrate, Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat und Benzoat, nur in Gegenwart von Sulfat oder anderen Elektronenakzeptoren zu verwerten. Einige Substrate konnten von verschiedenen Stämmen auch vergoren werden.

1.1. Oxidation organischer Elektronendonatoren durch Sulfatreduzierende Bakterien

Die weitaus größte Zahl organischer Substrate liefert beim Abbau durch den Stoffwechsel chemotropher Lebewesen als Intermediärprodukte C_2 -Einheiten in der gebundenen Form von Acetyl-Coenzym A. In aeroben Organismen wird, von wenigen Ausnahmen abgesehen, die aktivierte Essigsäure weiter oxidiert, und zwar über den Tricarbonsäure-Cyclus; als Endprodukt entsteht CO_2 , in welchem Kohlenstoff die höchste Oxidationsstufe hat. Die weitergehende Oxidation der Acetat-Einheit ist also stets vollständig. Weil eine große Differenz im Redoxpotential zwischen den aus Acetat freigesetzten Reduktionsäquivalenten und Sauerstoff besteht, erlaubt die aerobe Endoxidation einen hohen ATP-Gewinn durch Elektronentransport. In Abwesenheit von Sauerstoff

hingegen enden viele Abbauwege des Energiestoffwechsels beim Acetat, welches das wohl häufigste Ausscheidungsprodukt der chemotrophen anaeroben Bakterien ist. Der einzige bisher bekannte Anaerobier, bei dem eine Endoxidation nachgewiesen wurde, war Desulfuromonas acetoxidans (PFENNIG und BIEBL, 1976); dieses Bakterium oxidierte Acetat zu CO_2 , wobei elementarer Schwefel als Elektronenakzeptor diente und zu H_2S reduziert wurde.

Außer der vollständigen Oxidation zu CO_2 gibt es noch eine zweite Möglichkeit für einen weiteren Abbau der Essigsäure-Einheit, nämlich die anaerobe Umsetzung von Acetat zu Methan und CO_2 (JERIS und McCARTY, 1965; SMITH und MAH, 1966, 1978; BARESI et al., 1978; MAH et al., 1978; ZEHNDER et al., 1980). Dabei handelt es sich aber nicht um eine Oxidation von Acetat, sondern um eine Disproportionierung zu der höchsten und der niedrigsten Oxidationsstufe des Kohlenstoffs.

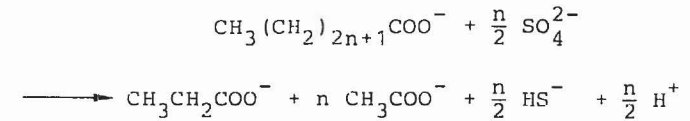
1.1.1. Unvollständige Oxidation der organischen Elektronendonatoren

Die bisher bekannten Arten der Gattungen Desulfovibrio, Desulfotomaculum und Desulfomonas oxidierten ihre organischen Substrate stets unvollständig zu Acetat oder bisweilen zu Homologen von Acetat (MECHALAS und RITTENBERG, 1960). Die Analyse von Kulturmedien der mit Propionat (s. C.4.2.), Butyrat und Palmitat (s. C.4.3.) isolierten Sulfatreduzierer hat gezeigt, daß die Oxidation der Fettsäuren durch diese Stämme ebenfalls unvollständig war. Acetat war ein Endprodukt, das nicht weiterverwertet werden konnte. Daher darf man annehmen, daß auch andere organische Verbindungen als Fettsäuren, soweit diese verwertbar waren, von den hier genannten Sulfatreduzierern nur unvollständig oxidiert wurden. Eine Ausnahme bildete lediglich die Verwertung von Formiat durch die Stämme 3pr10 und 4pa10, bei welcher das einzig mögliche Produkt einer weiteren Oxidation nur CO_2 sein konnte (vgl. A.2.2.).

Die Dissimilationsgleichungen für die unvollständige Oxidation von Propionat und Palmitat wurden bereits unter C.4.2. bzw. C.4.3. entwickelt. Bei der unvollständigen Oxidation aller unverzweigten höheren Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen pro Molekül wurde immer nur Acetat gebildet. Die pro mol der verschiedenen Fettsäuren gefundenen Mengen Acetat sowie die erwähnte Dissimilationsgleichung für Palmitat sprechen dafür, daß die höheren Fettsäuren schrittweise durch Abspaltung von C₂-Einheiten oxidiert wurden, also durch die sogenannte β-Oxidation. Für die unvollständige Oxidation unverzweigter Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen pro Molekül mit Sulfat als Elektronenakzeptor gilt folgende allgemeine Reaktionsgleichung:



Als Produkte der unvollständigen Oxidation von unverzweigten Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen pro Molekül wurden Acetat und Propionat zusammen gefunden. Die pro mol der betreffenden Fettsäuren ausgeschiedenen Mengen an Acetat und Propionat stehen ebenfalls im Einklang mit einem Abbau durch β-Oxidation: Bei einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen verbleibt pro Molekül ein Propionyl-Rest (C₃-Einheit); weil alle Sulfatreduzierer, die Butyrat und höhere Fettsäuren unvollständig oxidierten, kein Propionat zu verwerten vermochten, mußte der Propionyl-Rest als Propionat ausgeschieden werden. Grundsätzlich kann bei Sulfat-reduzierenden Bakterien immer dann mit einer Bildung anderer organischer Endprodukte als Acetat gerechnet werden, wenn die Oxidation bestimmter Substrate zu Stoffwechselprodukten führt, für deren Abbau bis zum Acetat die notwendige Enzymausstattung fehlt. Schon MECHALAS und RITTENBERG (1960) hatten gezeigt, daß Desulfovibrio höhere Alkohole als Äthanol nur zu den entsprechenden Carbonsäuren dehydrogenierte, die nicht weiterverwertet werden konnten. Die unvollständige Oxidation unverzweigter Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl von Kohlenstoffatomen pro Molekül läßt sich in der folgenden allgemeinen Dissimilationsgleichung darstellen:

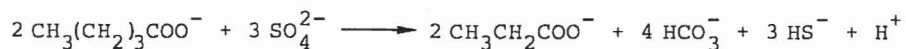


Mit Stamm 1pa3 wurde gezeigt, daß auch das dem n-Valerianat isomere 2-Methylbutyrat ebenfalls zu Acetat und Propionat abgebaut wurde. Aus 2-Methylbutyrat wurden die Produkte jedoch in einem anderen molaren Verhältnis untereinander gebildet als aus n-Valerianat (s. C.4.3.). Die Umsetzung von 2-Methylbutyrat wurde jedoch nicht eingehender untersucht.

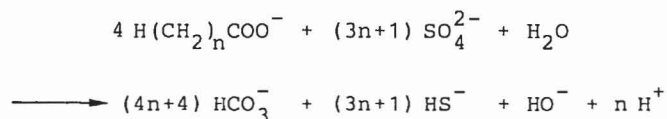
1.1.2. Vollständige Oxidation der organischen Elektronendonatoren

Acetat wurde nicht nur von den Sulfatreduzierern oxidiert, die mit dieser Verbindung isoliert worden waren; darüber hinaus vermochten nämlich noch der mit Stearat isolierte Stamm 1st1 und alle mit Benzoat isolierten Stämme Acetat zu verwerten, wenngleich auch langsamer als die direkt mit Acetat isolierten Sulfatreduzierer. Stöchiometrische Messungen mit fünf morphologisch sehr unterschiedlichen Stämmen (s. C.4.1.) bestätigten die eingangs dargestellte biochemische Erfahrung, daß eine Oxidation von Acetat immer vollständig ist und zu CO₂ als Endprodukt führt. Aufgrund des biochemischen Prinzips vom Abbau organischer Verbindungen über aktivierte Essigsäure sollten alle Sulfat-reduzierenden Bakterien, die Acetat verwerten, auch noch andere verwertbare Verbindungen vollständig oxidieren können. Diese Annahme findet ihre Bestätigung in der quantitativ gemessenen vollständigen Oxidation von Palmitat durch Stamm 1st1 (s. C.4.3.) und der von Benzoat durch Stamm 1be1 (s. C.4.4.). Beim Wachstum von Desulfotomaculum acetoxidans, Stamm 1ac2, mit Äthanol, Butyrat oder iso-Butyrat wurde allerdings eine Ausscheidung von Acetat als Zwischenprodukt beobachtet. Die Oxidation von Valerianat durch diesen Stamm lieferte noch zusätzlich Propionat; dieses war im Gegensatz zu Acetat kein verwertbares Substrat und somit ein Endprodukt. Pro mol Valerianat wurde

1 mol Propionat gebildet. Für den Abbau von Valerianat durch Stamm 1ac2 gilt somit folgende Dissimilationsgleichung:



Die beobachtete Ausscheidung von Propionat durch Stamm 1ac2 zeigt, daß die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur vollständigen Oxidation bei einigen Elektronendonatoren eingeschränkt sein kann: Ebenso, wie die unvollständige Oxidation von Substraten nicht immer nur Acetat als organisches Endprodukt liefert, so müssen auch die zur vollständigen Oxidation fähigen Sulfatreduzierer nicht unbedingt ausschließlich CO_2 als Endprodukt bilden; wenn nämlich im Stoffwechsel dieser Bakterien aus dem Substrat eine organische Verbindung entsteht, die wegen einer begrenzten Enzymausstattung nicht weiter umgesetzt werden kann, so muß diese Verbindung als Endprodukt ins Medium ausgeschieden werden. Die übrigen isolierten Sulfatreduzierer, die außer mit Acetat auch mit Butyrat und höheren Fettsäuren zu wachsen vermochten, konnten jedoch ebenso Propionat oxidieren. Daher sollte die Oxidation der von diesen Stämmen verwerteten höheren Fettsäuren stets vollständig sein und nach der folgenden allgemeinen Dissimilationsgleichung erfolgen:



Mit $n = 1$ erhält man aus dieser allgemeinen Gleichung als speziellen Fall die unter C.4.1. aufgestellte Dissimilationsgleichung für die Oxidation von Acetat mit Sulfat, mit $n = 0$ die unter C.5. gegebene Dissimilationsgleichung für die Oxidation von Formiat. Die Dissimilationsgleichung für die vollständige Oxidation von Benzoat wurde bereits unter C.4.4. entwickelt.

1.1.3. Die zwei physiologischen Untergruppen der Sulfat-reduzierenden Bakterien

Die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der isolierten Arten zeigen, daß bei einer neuen Darstellung der Sulfat-reduzierenden Bakterien als physiologische Gruppe wesentliche Erweiterungen erforderlich sind. Alle bislang bekannten Sulfatreduzierer verwerteten eine recht begrenzte Anzahl von Substraten, unter denen Wasserstoff, Äthanol, Formiat, Lactat, Pyruvat, Fumarat und Malat die wichtigsten waren. Alle organischen Verbindungen außer Formiat (und Oxamat, s. A.2.2.) wurden stets unvollständig zu Acetat (bzw. Homologen) oxidiert, welches nicht weiterverwertet werden konnte. Durch die Isolation der neuen Stämme mit Fettsäuren und Benzoat wurden weitere biologisch bedeutende Substanzklassen gefunden, die von Sulfatreduzierern direkt verwertet werden können. Die sicherlich entscheidendste Erweiterung in der Ernährungsphysiologie dieser streng anaeroben Bakterien bringen diejenigen Stämme, welche zur Verwertung von Acetat und somit zu einer vollständigen Oxidation fähig waren. Diese Fähigkeit ist ein Merkmal, aufgrund dessen die Sulfat-reduzierenden Bakterien sinnvoll in zwei physiologische Untergruppen eingeteilt werden können: Die erste umfaßt solche Sulfatreduzierer, die ihre organischen Substrate unvollständig oxidieren und kein Acetat verwerten können; in diese Untergruppe gehören demnach sowohl die bisher bekannten Arten als auch die neuen mit Propionat, Butyrat und Palmitat isolierten Stämme. Zu der zweiten Untergruppe zählen all die neuen Stämme, die Acetat verwerteten und auch andere organische Verbindungen vollständig zu Kohlendioxid oxidieren konnten. Eine weitere Aufteilung dieser Untergruppen aufgrund ernährungsphysiologischer Merkmale ist wenig sinnvoll, wie die in den Tabellen 7 bis 9 aufgeführten verwertbaren Elektronendonatoren zeigen: Eine Einteilung aufgrund der Verwertung anderer Substrate als Acetat hätte vielfache Überschneidungen zur Folge.

Untergruppe I : Sulfatreduzierer mit unvollständiger Oxidation

Organische Verbindungen werden mit Sulfat als Elektronenakzeptor unvollständig zu Acetat oxidiert, welches ein Endprodukt ist und nicht verwertet werden kann; aus bestimmten Verbindungen können auch höhere Homologe von Acetat entstehen. Acetat kann lediglich als Kohlenstoffquelle für die Synthese von Zellmaterial assimiliert werden. Die Untergruppe umfaßt folgende Sulfatreduzierer:

Die bekannten Arten der Gattung Desulfovibrio (POSTGATE und CAMPBELL, 1966; ROZANOVA und KHUDYAKOVA, 1974; ROZANOVA und NAZINA, 1976);

die bekannten Arten der Gattung Desulfotomaculum (CAMPBELL und POSTGATE, 1965) mit Ausnahme von Desulfotomaculum acetoxidans (WIDDEL und PFENNIG, 1977);

Desulfomonas pigra (MOORE et al., 1976);

die mit Propionat isolierten ovalen bis zitronenförmigen Sulfatreduzierer mit den Stammbezeichnungen 1pr3, 2pr4 und 3pr10 (s. Tab. 6 und 7 und Abb. 15 - 17);

die mit Butyrat isolierten Vibrio-ähnlichen Sulfatreduzierer mit den Stammbezeichnungen 1bu8, 2bu10, 3bu10, 4bu10, 1pa3, 2pa3, 3pa8, 4pa10 und 5pa13 (s. Tab. 6 und 8 und Abb. 18 - 27).

Untergruppe II: Sulfatreduzierer mit vollständiger Oxidation

Acetat und weitere organische Verbindungen werden mit Sulfat als Elektronenakzeptor vollständig zu CO₂ oxidiert. Eine Ausscheidung von Acetat als Zwischenprodukt ist jedoch bisweilen möglich. Einige der zur vollständigen Oxidation fähigen Sulfatreduzierer wachsen mit Acetat als alleinigem organischen Substrat nur sehr langsam und verwerten bevorzugt andere orga-

nische Verbindungen. Der Abbau einiger weniger Substrate kann auch zu organischen Produkten führen, die nicht weiter oxidiert werden können. Zu der Untergruppe zählen folgende Sulfatreduzierer:

Desulfotomaculum acetoxidans (WIDDEL und PFENNIG, 1977; s. Tab. 6 und 7 sowie Abb. 7 und 8);

die übrigen mit Acetat isolierten ovalen bis stäbchenförmigen Sulfatreduzierer mit den Stammbezeichnungen 2ac9, 3ac10, 4ac11 sowie der ebenfalls mit Acetat isolierte Filament-bildende Stamm 5ac10 (s. Tab. 6 und 7 und Abb. 9 - 14);

der mit Stearat isolierte vibrioide Stamm 1st1 (s. Tab. 6 und 8 und Abb. 28);

die mit Benzoat isolierten coccoiden, ovalen, Sarcinen-ähnlichen und Filament-bildenden Sulfatreduzierer mit den Stammbezeichnungen 1be1, 2be1, 3be13 bzw. 4be13 (s. Tab. 6 und 9 und Abb. 29 - 34).

1.2. Verwertung alternativer Elektronenakzeptoren anstelle von Sulfat

1.2.1. Verwertung von Sulfit oder Thiosulfat

Die Experimente mit alternativen Elektronenakzeptoren haben gezeigt, daß viele der isolierten Stämme anstelle von Sulfat auch Sulfit oder Thiosulfat als Elektronenakzeptoren zu verwerten vermochten. Eine derartige Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien ist schon seit langem bekannt (POSTGATE, 1951; ISHIMOTO et al., 1954 a) und wiederholt bestätigt worden (z. B. SENEZ, 1962; BADZIONG und THAUER, 1978). Biochemisch ist diese Verwertung von Sulfit bzw. Thiosulfat durchaus verständlich: In allen bisher untersuchten Sulfatreduzierern war stets Sulfit das erste Intermediärprodukt der Reduktion von Sulfat über APS;

eine intermediäre Bildung von Thiosulfat wurde vielfach angenommen (KOBAYASHI et al., 1969; SUH und AKAGI, 1969; AKAGI und ADAMS, 1973; KOBAYASHI et al., 1974; DRAKE und AKAGI, 1976). Die Stämme 1ac2, 1pa3 und 4be13 vermochten jedoch kein Thiosulfat zu verwerten, die zwei Stämme 1ac2 und 4be13 nicht einmal Sulfit (s. Tab. 10). Eine Bildung von Sulfit aus Sulfat sollte aber auch in den beiden letztgenannten Sulfatreduzierern schon allein deshalb stattfinden, weil in diesen die Sulfit-Reduktase P-582 spektrophotometrisch nachgewiesen wurde (s. C.3.4.3.). Die negativen Wachstumsergebnisse der Stämme 1ac2 und 4be13 mit Sulfit beruhen daher wahrscheinlich auf der Unfähigkeit, diese Schwefelverbindung in die Zelle aufzunehmen. Mit einem fehlenden Aufnahmemechanismus kann auch erklärt werden, weshalb die Stämme 1ac2, 1pa3 und 4be13 kein Thiosulfat verwerteten; ebenso könnte man aber auch aus dieser Beobachtung schließen, daß für die drei genannten Sulfatreduzierer die von SIEGEL (1975) sowie CHAMBERS und TRUDINGER (1975) geäußerte Vermutung zutrifft, nach welcher Thiosulfat kein wirkliches Intermediärprodukt der Sulfatreduktion ist.

1.2.2. Verhalten gegenüber Schwefel, Fumarat und Malat

Keiner der Stämme, die auf eine Verwertung alternativer Elektronenakzeptoren geprüft wurden, vermochte mit Schwefel zu wachsen. Somit unterschieden sich diese Sulfatreduzierer von den von BIEBL und PFENNIG (1977) untersuchten Stämmen; dabei handelte es sich nämlich um Sulfatreduzierer, die anstelle von Sulfat auch Schwefel reduzieren konnten, das als Elektronendonator verwendete Äthanol aber wie die übrigen bekannten Arten unvollständig oxidierten. Von den hier isolierten Sulfatreduzierern wurden einige Stämme sogar durch Schwefel gehemmt, wie durch gleichzeitigen Zusatz von Sulfat und Schwefel zum Medium gezeigt werden konnte (s. C.3.3.2.). Diese Hemmung durch Schwefel beruhte wahrscheinlich auf einer Erhöhung des Redoxpotentials im Medium. Weil alle Schwefelverbindungen außer Sulfat leicht reagieren, können diese nämlich das Redoxpotential des Sulfid-haltigen, reduzierenden Mediums entscheidend beein-

flussen. Im Medium ist wahrscheinlich nicht der sehr schwer lösliche elementare Schwefel die reaktive Form, sondern das gelbe Polysulfid, HS_n^- , das sich bis zu einer gewissen Konzentration aus HS^- -Ionen und Schwefel bildet und mit dem ungelösten Schwefel im Gleichgewicht steht. Durch Zusatz von Schwefel wird die Konzentration der reduzierten Komponente, die von Sulfid bzw. Schwefelwasserstoff, erniedrigt, während die Konzentration der oxidierten Komponente, die von Polysulfid, erhöht wird; daraus resultiert eine Erhöhung des Redoxpotentials gemäß der sogenannten Nernstschen Gleichung. Für das System S/HS^- berechnet man bei $\text{pH} = 7.0$ und einer HS^- -Konzentration von 1 mmol/l in Gegenwart von überschüssigem, ungelöstem Schwefel ein Redoxpotential von $E_h = -0,18 \text{ V}$ (bei 25°C und 1 atm). Den gegenteiligen Effekt von Schwefel zeigte Dithionit: Durch Zusatz geringer Mengen dieses starken Reduktionsmittels wurde der Wachstumsbeginn frisch beimpfter Kulturen beschleunigt (s. C.1.2.) oder gar erst ermöglicht (s. C.1.1.). Nimmt man für Dithionit und dessen oxidierte Form, das Sulfit, eine gleich hohe Konzentration von 0,1 mmol/l, so berechnet man für das System $2\text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ bei $\text{pH} = 7.0$ ein Redoxpotential von $E_h = -0,41 \text{ V}$ (bei 25°C und 1 atm). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die neu isolierten Sulfatreduzierer zum Wachstum ein außergewöhnlich negatives Redoxpotential benötigten, welches mit der Gegenwart von Schwefel bzw. Polysulfid nicht zu vereinbaren ist.

Fumarat oder Malat wurden von den geprüften Sulfatreduzierern ebensowenig als Elektronenakzeptoren verwertet wie Schwefel. Die Resultate können jedoch nicht bei allen der untersuchten Stämme mit einem fehlenden Aufnahmesystem erklärt werden; als Elektronendonatoren konnten diese Dicarbonsäuren nämlich in einigen Fällen verwertet werden, und zwar Fumarat von den Stämmen 5ac10, 3be13 und 4be13 sowie Malat noch zusätzlich von Stamm 4be13. Stamm 3be13 vermochte sogar beim Fehlen eines Elektronenakzeptors durch Disproportionierung von Fumarat zu wachsen (s. C.3.3.3.). Die drei genannten Sulfatreduzierer hatten also durchaus einen Aufnahmemechanismus für Fumarat bzw. auch Malat.

In den Stämmen 5ac10, 3be13 und 4be13 fehlte demnach ein System, das Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor zu reduzieren vermochte. In den Experimenten mit alternativen Elektronenakzeptoren wurden allerdings immer nur diejenigen Verbindungen als Elektronendonatoren eingesetzt, welche auch für die Isolation verwendet worden waren (Acetat, höhere Fettsäuren, Benzoat). Nicht geprüft wurde, ob eine Reduktion von Fumarat oder Malat mit Elektronendonatoren möglich war, die ein sehr niedriges Redoxpotential haben, wie zum Beispiel Wasserstoff oder Formiat. Einige obligat anaerobe Bakterien, wie Desulfovibrio-Arten (MILLER und WAKERLEY, 1966; MILLER et al., 1970; BARTON et al., 1970), Vibrio succinogenes (KRÖGER, 1975), Bacteroides fragilis (MACY et al., 1975) und Desulfuromonas acetoxidans (PFENNIG und BIEBL, 1976) sowie fakultativ anaerobe Bakterien, wie zum Beispiel Escherichia coli (MACY et al., 1976) vermögen Fumarat oder auch Malat als Elektronenakzeptoren zu verwerten; die dissimilatorische Fumaratreduktion zu Succinat ermöglicht diesen Bakterien über einen Elektronentransport eine Energiekonservierung für das Wachstum.

Nunmehr bietet sich ein interessanter Vergleich an zwischen den zur vollständigen Oxidation fähigen Sulfatreduzierern und Desulfuromonas acetoxidans (PFENNIG und BIEBL, 1976): In beiden Fällen wurde Acetat als Elektronendonator verwertet und vollständig zu CO₂ oxidiert. Bezüglich der verwerteten Elektronenakzeptoren verhielten sich die Bakterien jedoch komplementär: Etliche der Acetat-oxidierenden Sulfatreduzierer verwerteten als Elektronenakzeptoren außer Sulfat auch Sulfit oder Thiosulfat, jedoch keinen Schwefel und kein Fumarat. Desulfuromonas acetoxidans konnte dagegen Schwefel oder Fumarat verwerten, aber keine der höher oxidierten Schwefelverbindungen.

1.2.3. Dissimilatorische Reduktion von Nitrat zu Ammonium

Einer der geprüften Sulfatreduzierer, nämlich der mit Propionat isolierte Stamm 1pr3, vermochte anstelle von Sulfat auch mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu wachsen. Dabei wurde Nitrat

stöchiometrisch zu Ammonium reduziert. Das als Elektronendonator verwendete Propionat wurde dabei ebenso wie mit Sulfat nur unvollständig zu Acetat oxidiert (s. C.4.2.). Das Wachstum von Stamm 1pr3 mit Nitrat darf man als dissimilatorische Nitratreduktion bezeichnen, denn mit Propionat allein, ohne Gegenwart eines Elektronenakzeptors, wurde kein Wachstum beobachtet. Stamm 1pr3 wuchs jedoch mit Nitrat etwas langsamer als mit Sulfat; bei gleichzeitiger Gegenwart von Sulfat und Nitrat wurde stets Sulfat als Elektronenakzeptor bevorzugt. Demnach ist der Stoffwechsel von Stamm 1pr3 im wesentlichen auf die Reduktion von Sulfat ausgerichtet, während die von Nitrat eine untergeordnete Rolle spielen dürfte. Eine Reduktion von Nitrat zu Ammonium durch Sulfatreduzierer war schon zuvor einmal beobachtet worden, und zwar bei einem Stamm von Desulfovibrio (M. P. BRYANT, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurde mehrfach von anderen, nicht Sulfat-reduzierenden Bakterien berichtet, die ebenfalls Nitrat zu freiem, gelöstem Ammonium zu reduzieren vermochten, und zwar Bacillus subtilis (KLAESER, 1914; HALL und McVICAR, 1955; VERHOEVEN, 1956), Clostridium welchii (WOODS, 1938), Escherichia coli (McNALL und ATKINSON, 1956), Bacillus licheniformis (VERHOEVEN, 1956), Vibrio succinogenes (WOLIN et al., 1961), Enterobacter (Aerobacter) aerogenes (HADJIPETROU und STOUTHAMER, 1965), Clostridium perfringens (HASAN und HALL, 1975) sowie Campylobacter sputorum (STOUTHAMER et al., 1979). Von den genannten Bakterien sind die Clostridien und Vibrio succinogenes obligat anaerob. Die sogenannten echten Denitrifizierer sind dagegen fakultativ anaerobe Bakterien, die beim Fehlen von Sauerstoff Nitrat als Elektronenakzeptor verwerten und nur bis zum Nitrit, Distickstoffmonoxid oder elementarem Stickstoff reduzieren (PAYNE, 1973).

1.2.4. Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff

Während der Versuche zur Verwertung verschiedener Elektronenakzeptoren wurde auch Sauerstoff anstelle von Sulfat in einer Gasphase über Zellsuspensionen in Weichagar eingesetzt. Erstaunlicherweise ermöglichte die Anwesenheit von O₂ einigen

Sulfatreduzierern, sich in einem gewissen Abstand von der Agaroberfläche in Form einer Wachstumszone zu vermehren. In Kapitel 1.2.2. wurde jedoch gezeigt, daß die neuen Stämme zum Wachstum wahrscheinlich ein ungewöhnlich negatives Redoxpotential benötigten; dieses dürfte noch niedriger sein als das Redoxpotential, welches für das Wachstum der bisher bekannten Sulfatreduzierer erforderlich war, die bereits als streng anaerob galten. Ein derart negatives Redoxpotential ist jedoch in Gegenwart selbst geringster Konzentrationen von Sauerstoff nicht möglich. Daher ist es auch unwahrscheinlich, daß die betreffenden Stämme Sauerstoff direkt verwerteten. Vielmehr muß angenommen werden, daß Sauerstoff zunächst an oder nahe der Agaroberfläche mit einem Bestandteil des Mediums auf rein chemische Weise reagierte; das Oxidationsprodukt wäre dann von den betreffenden Sulfatreduzierern nicht nur toleriert, sondern sogar als Elektronenakzeptor verwertet worden. Als solche Oxidationsprodukte kamen nur Schwefelverbindungen in Frage, die aus dem stets zugesetzten Sulfid gebildet wurden. Saure Lösungen von Sulfid, in denen dieses also hauptsächlich als freier Schwefelwasserstoff vorliegt, werden durch Sauerstoff vor allem zu elementarem Schwefel oxidiert. Bei höheren pH-Werten, bei denen überwiegend HS^- -Ionen oder sogar S^{2-} -Ionen vorliegen, ist dagegen Thiosulfat ein wesentliches Oxidationsprodukt. Insbesondere Spuren von Salzen der Schwermetalle Mn, Fe, Co, Ni und Cu beschleunigen als Katalysatoren die Oxidation von Sulfid mit O_2 zu Thiosulfat erheblich (GMELINS Handbuch, S [B], 1960, S. 91 - 93; CHEN et al., 1972). In Untersuchungen von CLINE und RICHARDS (1969) und von SOROKIN (1970) wurde ferner gezeigt, daß auch an natürlichen Standorten Thiosulfat das Hauptprodukt der Oxidation von Sulfid mit Sauerstoff ist. Die genannten, katalytisch wirkenden Schwermetalle waren den hier verwendeten Medien als Spurenelemente zugesetzt worden (s. B.3.2.). Weiterhin fällt bei einem Vergleich der Resultate in Tab. 10 untereinander auf, daß nur solche Stämme ein Wachstum unter der Sauerstoff-haltigen Atmosphäre gezeigt hatten, die auch Thiosulfat zu verwerten vermochten. Daher darf man annehmen, daß bei dem beobachteten Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff in Wirklichkeit Thiosulfat und

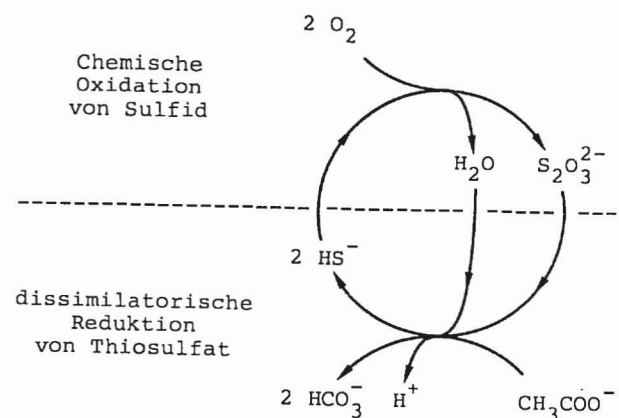


Abb. 39: Erklärung für das Wachstum Sulfat-reduzierender Bakterien in Abwesenheit von Sulfat unter einer O_2 -haltigen Atmosphäre am Beispiel von Acetat als Elektronendonator: O_2 reagiert mit Sulfid rein chemisch zu Thiosulfat, welches von den Bakterien wieder zu Sulfid reduziert wird; aus der Umsetzung resultiert ein Schwefelkreislauf, über welchen Acetat mit O_2 indirekt oxidiert wird.

eventuell noch andere Schwefelverbindungen verwertet wurden. Aus Sulfid und Sauerstoff entstand in einer rein chemischen Reaktion Thiosulfat, welches von den Bakterien wieder dissimilatorisch zu Sulfid reduziert wurde. Im oberen Bereich der betreffenden Weichagar-Kulturen unter der Sauerstoff-haltigen Atmosphäre spielte sich demnach ein Schwefelkreislauf ab; dieser ließe sich mit Acetat als Elektronendonator in der Weise darstellen, wie es Abb. 39 zeigt. Weil die Schwefelverbindungen ständig zirkulieren, kann die vorhandene Menge von Sulfid und Thiosulfat zusammen gering sein im Vergleich zu der oxidierten Menge Acetat. Durch einen solchen Kreislauf wird Acetat bruttomäßig mit Sauerstoff oxidiert. Selbstverständlich steht dabei den Sulfat-reduzierenden Bakterien für die Gewinnung von ATP nicht die gesamte freie Enthalpie dieser Bruttoreaktion zur Verfügung, sondern nur der Anteil aus der Oxidation von Acetat

mit Thiosulfat. Ein erheblicher Anteil der gesamten freien Reaktionsenthalpie wird bei der chemischen Oxidation von Sulfid mit Sauerstoff ausschließlich in Entropie verwandelt. Im natürlichen Schwefelkreislauf (s. A.2.5.) kann auch die freie Enthalpie der Oxidation von Sulfid biochemisch für eine ATP-Gewinnung genutzt werden, und zwar von farblosen Schwefelbakterien und Thiobacilli; ferner ist dort Sulfat ein wesentliches Oxidationsprodukt.

1.3. Vergärung organischer Substrate in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors

Die Mehrzahl der isolierten Sulfatreduzierer, die Pyruvat als Elektronendonator verwerten konnten (s. Tab. 7 - 9), vermochte auch in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors mit Pyruvat zu wachsen, also durch Gärung (s. Tab. 11). Eine Vergärung von Pyruvat durch Sulfat-reduzierende Bakterien hatten bereits POSTGATE (1952; 1963 b), ISHIMOTO et al. (1954 a) und SENEZ (1954) nachgewiesen; dabei wurde Pyruvat zu Acetat, CO_2 und H_2 umgesetzt. Dagegen bildeten die hier untersuchten Stämme keine nachweisbaren Mengen von molekularem Wasserstoff (s. C.3.3.3.); die Pyruvat-Vergärung wurde jedoch nicht weiter untersucht. Vermutlich wurde Wasserstoff auf organische Elektronenakzeptoren übertragen, die aus dem Pyruvat gebildet wurden. Auch eine Reduktion eines Teils von Pyruvat zu Lactat oder gar Propionat ist denkbar. Die Stämme 5ac10 und 2be1 vermochten mit Pyruvat nur in Gegenwart eines Elektronenakzeptors zu wachsen. Offenbar war in diesen zwei Sulfatreduzierern eine Energiekonservierung nur durch Elektronentransport möglich, während die phosphoroklastische Spaltung von Pyruvat nicht für eine ATP-Gewinnung genutzt werden konnte.

Auch Lactat erlaubte einigen Sulfatreduzierern ein Wachstum in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors. Dieses Gärungswachstum wurde auf eine Bildung flüchtiger Fettsäuren untersucht, wobei Acetat und Propionat als Produkte gefunden wurden. Bei der Vergärung von Lactat durch Propionibacterium oder Clostridium

propionicum werden Acetat und Propionat in einem molaren Verhältnis von 1:2 gebildet (BARKER, 1956, S. 73). Die untersuchten Sulfatreduzierer bildeten hingegen mehr Acetat, als der bekannten Propionsäure-Gärung entspräche (s. Tab. 23). Extreme Beispiele sind die mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer 1be1 und 3be13, die mehr als 6mal bzw. mehr als 8mal soviel Acetat wie Propionat bildeten. Daher muß angenommen werden, daß bei der beobachteten Vergärung von Lactat die abgespaltenen Reduktionsäquivalente noch in Form weiterer, nicht nachgewiesener Verbindungen ausgeschieden wurden. Eine zusätzliche Bildung von Butyrat aus Lactat, wie bei bestimmten Clostridien (AZOVA, 1959; KUTZNER, 1963/64) oder Pansenbakterien (BARNETT und REID, 1961, S. 44, 59 - 65; HUNGATE, 1966, S. 76, 77), wurde jedoch nicht beobachtet. Im Falle der Stämme 1be1 und 3be13 ist auch denkbar, daß überschüssige Reduktionsäquivalente für eine Reduktion von CO_2 zu Acetat verwendet wurden, denn diese Stämme vermochten auch autotroph zu wachsen (s. C.5.); so könnte auch erklärt werden, weshalb gerade diese zwei Sulfatreduzierer aus Lactat viel mehr Acetat als Propionat bildeten. Die Frage nach der Stöchiometrie der Lactat-Vergärung durch die neu isolierten Sulfatreduzierer kann jedoch zunächst noch nicht beantwortet werden, denn im Rahmen dieser Arbeit wurde von genaueren Analysen zur Aufstellung von Gärungsbilanzen abgesehen. Es fällt jedoch auf, daß alle zum Gärungswachstum auf Lactat fähigen Sulfatreduzierer in Gegenwart eines Elektronenakzeptors Propionat oxidieren konnten; allerdings konnten nicht alle Stämme, die zu einer Verwertung von Propionat fähig waren, auch Lactat vergären. Die enzymatische Ausstattung für einen Abbau von Propionat erlaubte es offenbar in einigen Fällen, beim Fehlen des externen Elektronenakzeptors auch umgekehrt Propionat als ein Gärungsprodukt zu bilden; dieses ist als stark reduzierte Verbindung eine geeignete Ausscheidungsform für Reduktionsäquivalente. Eine Vergärung von Lactat ist in der Vergangenheit bereits einmal erwähnt worden: SENEZ (1954) zeigte, daß Desulfovibrio desulfuricans Lactat zu vergären vermochte, allerdings extrem langsam.

Fumarat konnte, soweit geprüft wurde, von dreien der isolierten Sulfatreduzierer als Elektronendonator verwertet werden, und zwar von den Stämmen 5ac10, 3be13 und 4be13; beim Fehlen eines Elektronenakzeptors vermochte von diesen Sulfatreduzierern jedoch nur Stamm 3be13 durch Dismutierung von Fumarat zu wachsen; auch hier war Acetat das vorherrschende Gärungsprodukt, ähnlich wie bereits bei der Vergärung von Lactat durch denselben Stamm. Daneben wurden noch Propionat und Succinat nachgewiesen. Propionat könnte durch Decarboxylierung aus Succinat entstanden sein, welches neben Acetat wahrscheinlich das ursprüngliche Produkt der Disproportionierung von Fumarat war. Genaue Gärungsbilanzen wurden nicht ermittelt.

Eine Vergärung von Malat durch einen der untersuchten Sulfatreduzierer wurde nicht beobachtet. Der fädige Stamm 4be13 vermochte Malat nur in Gegenwart von Sulfat zu verwerten. Allerdings wurde noch nicht jeder isolierte Sulfatreduzierer auf die Fähigkeit zur Verwertung von Malat geprüft.

2. Taxonomische Einordnung der neu isolierten Sulfatreduzierer

Bereits die bisher bekannten Sulfat-reduzierenden Bakterien stellten in morphologischer Hinsicht eine uneinheitliche Gruppe dar. Weil morphologische Merkmale bisher zu den wichtigsten Kriterien für eine Klassifizierung zählten, mußte die Gruppe der Sulfatreduzierer in verschiedenen Gattungen beschrieben werden: Die Gattung Desulfovibrio (POSTGATE und CAMPBELL, 1966) enthielt zunächst nur Arten mit vibrioider Zellform, die alle unfähig waren, Sporen zu bilden. Später wurden auch zwei stäbchenförmige Sulfatreduzierer in nicht ganz treffender Weise als Desulfovibrio thermophilus (ROZANOVA und KHUDYAKOVA, 1974) bzw. Desulfovibrio baculatus (ROZANOVA und NAZINA, 1976) beschrieben und somit dieser Gattung zugeordnet. Stäbchenförmige Sulfatreduzierer, die Sporen zu bilden vermochten, wurden in der Gattung Desulfotomaculum (CAMPBELL und POSTGATE, 1965) zusammengefaßt. Der als neue Art einer neuen Gattung beschriebene Sulfatreduzierer Desulfomonas pigra (MOORE et al., 1976) bildete

stäbchenförmige Zellen, glich aber bezüglich einiger Merkmale auch den Desulfovibrio-Arten.

Vibrioide und stäbchenförmige Zellen schienen somit die morphologischen Typen Sulfat-reduzierender Bakterien zu sein, die mit den üblicherweise verwendeten Substraten, wie Lactat, Pyruvat, Äthanol oder Malat, bevorzugt angereichert wurden. Erst unter den selektiven Bedingungen mit Fettsäuren oder Benzoat als organischen Substraten traten auch Sulfatreduzierer mit noch anderen Zellformen hervor. Bei einer taxonomischen Beschreibung dieser Stämme soll jedoch die Zahl neuer Gattungen nach Möglichkeit niedrig gehalten werden. Daher wird versucht, die Beschreibung der bekannten Gattungen so zu erweitern, daß die Merkmale auch eine Einordnung einiger der neuen Stämme erlauben. Die Sulfatreduzierer mit zitronenförmigen, coccoiden, Sarcinen-bildenden und Filament-bildenden Zellen machen jedoch eine Beschreibung neuer Gattungen erforderlich, denn diese morphologischen Merkmale sind von denen der bisher bekannten Arten recht verschieden.

Weitere für die Klassifizierung wichtige Merkmale sind das Verhalten gegenüber der Gram-Färbung und der GC-Gehalt der DNS. Arten einer Gattung sollten sich bei der Gram-Färbung einheitlich Gram-negativ oder Gram-positiv verhalten sowie keine allzu großen Differenzen im GC-Gehalt aufweisen.

Ernährungsphysiologische Merkmale haben nur in bestimmten Fällen eine größere Bedeutung für die Taxonomie: So wurden zum Beispiel phototrophe Bakterien, Methanbakterien oder auch Sulfat-reduzierende Bakterien zuerst im Hinblick auf die physiologische Fähigkeit bearbeitet, die den drei Gruppen ihre Namen gegeben hat; diese hervorstechenden physiologischen Merkmale waren bei der Klassifizierung der genannten Bakterien ein entscheidendes Ordnungsprinzip, das sogar noch bei der Aufstellung von Gattungen mitwirkte. Die Bedeutung solcher spezifischen physiologischen Merkmale für die Taxonomie zeigt sich im Falle der Sulfat-reduzierenden Bakterien zum Beispiel bei der hypo-

thetischen Vorstellung, die bekannten Desulfovibrio-Arten wären bislang nur mit Gärsubstraten isoliert worden, und die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion wäre noch nicht entdeckt worden; sicherlich wären diese Bakterien dann nicht in einer Gattung zusammengefaßt, sondern unterschiedlichen Gruppen zugeordnet worden. Alle übrigen wachstums- und ernährungsphysiologischen Eigenschaften Sulfat-reduzierender Bakterien, wie das jeweilige pH- und Temperatur-Optimum, das Bedürfnis für Vitamine und andere Wachstumsfaktoren sowie die Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Elektronendonatoren sind zwar wichtige stamm- oder artspezifische Merkmale; für eine Gattungsbeschreibung sind diese Eigenschaften jedoch unwesentlich. So vermochten zum Beispiel etliche der neuen, morphologisch unterschiedlichen Stämme außer Fettsäuren bzw. Benzoesäure auch Lactat, Pyruvat oder Äthanol zu verwerten (s. Tab. 7 - 9), also die bevorzugten Substrate der bekannten Arten.

Das Vorhandensein von Cytochrom c_3 hatte sich als spezifisches Merkmal der Gattung Desulfovibrio erwiesen (POSTGATE und CAMPBELL, 1966; LeGALL und POSTGATE, 1973). Dagegen ist eine Pigmentanalyse, bei der nur zwischen b- und c-Typ-Cytochromen unterschieden wird, für eine Taxonomie unzureichend; denn sowohl in Desulfovibrio- als auch Desulfotomaculum-Arten kommen b- und c-Typ-Cytochrome zusammen vor (HATCHIKIAN, 1972 b; JONES, 1972). Ebenso enthielten alle neu isolierten Sulfatreduzierer, deren Pigmente untersucht wurden, mit Ausnahme von Stamm 1ac2 Cytochrome vom b- und c-Typ zusammen (s. Tab. 12), wengleich auch in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Sollte also eine Klassifizierung Sulfat-reduzierender Bakterien aufgrund von Cytochromen möglich sein, so nur dann, wenn diese aufgetrennt, spektrophotometrisch untersucht und chemisch charakterisiert werden. Von derartigen Analysen wurde jedoch in dieser Arbeit abgesehen. Somit bleibt auch noch die Frage offen, ob die mit Butyrat, Palmitat und Stearat isolierten vibrioiden Stämme alle Cytochrom c_3 enthielten.

Die Sulfit-Reduktase Desulfovibrin galt anfangs als ein weiteres charakteristisches Merkmal der Gattung Desulfovibrio.

MILLER und SALEH (1964) zeigten jedoch, daß ein Stamm von Desulfovibrio desulfuricans (Norway 4) kein Desulfovibrin enthielt; in diesem Sulfatreduzierer wurde später die Sulfit-Reduktase Desulforubidin gefunden (LEE et al., 1973 a). Von den zehn vibrioiden Stämmen der neu isolierten Sulfatreduzierer enthielt nur Stamm 1bu8 Desulfovibrin. Darüber hinaus wurde dieses grüne Pigment noch in dem fädigen, gleitenden Stamm 5ac10 und dem coccoiden Stamm 1be1 gefunden, also sogar in Sulfatreduzierern, die morphologisch weder mit Desulfovibrio noch untereinander in Beziehung standen (s. Abb. 13, 14, 18 und 29). Die in Desulfotomaculum nigrificans entdeckte Sulfit-Reduktase P-582 (TRUDINGER, 1970) wurde zwar auch in einem Stamm (1ac2) gefunden, der morphologische Merkmale der Gattung Desulfotomaculum aufwies und bereits als Desulfotomaculum acetoxidans beschrieben wurde (WIDDEL und PFENNIG, 1977); weiterhin enthielten aber der dicke, fädige Sulfatreduzierer 4be13 und wahrscheinlich auch der vibrioiden Stamm 1pa3 das Pigment P-582 (s. C.3.4.3.). Daher kann ein Vorhandensein der Sulfit-Reduktasen Desulfovibrin, P-582 oder auch Desulforubidin nur als stammspezifische, allenfalls noch artspezifische Eigenschaft gewertet werden, nicht jedoch als Gattungsmerkmal.

Im folgenden sind die neu isolierten Sulfatreduzierer nach morphologischen Gesichtspunkten (s. Tab. 6 und Abb. 7 - 34) nacheinander einzeln oder in Gruppen aufgeführt. In dieser Aufstellung wird erörtert, welche Stämme aufgrund der unter C.3. erhaltenen Daten in eine der bekannten Gattungen eingeordnet werden können, und welche Stämme eine Beschreibung neuer Gattungen erforderlich machen.

Stäbchenförmige bis ovale Sulfatreduzierer

Stamm 1ac2. Die Zellform und die Fähigkeit zur Bildung von Sporen (s. Abb. 7) sprechen für eine Einordnung als Desulfotomaculum, ebenso die negative Gram-Färbung. Auch der GC-Gehalt der DNS von 37,5 mol% weicht nur wenig von dem der anderen Desulfotomaculum-Arten ab, bei denen er zwischen 41,7 und 45,5 mol%

lag. Daher wurde Stamm 1ca2 als Desulfotomaculum acetoxidans beschrieben (WIDDEL und PFENNIG, 1977). Die in Stamm 1ac2 nachgewiesenen Pigmente, b-Typ-Cytochrome und P-582, stellen innerhalb der Gattung keine neuen Merkmale dar. Dagegen ist aufgrund der Begeißelung und der Ernährungsphysiologie eine Erweiterung der Gattungsbeschreibung notwendig: Die bekannten Arten waren peritrich begeißelt und oxidierten ihre Substrate unvollständig. Stamm 1ac2 war polar begeißelt (s. Abb. 8) und vermochte Acetat zu verwerten und auch andere Substrate vollständig zu oxidieren.

Stämme 2ac9, 3ac10 und 4ac11. Eine Bildung von Sporen wurde in diesen mit Acetat isolierten Stämmen nie beobachtet. Insbesondere die ovalen Zellen der Stämme 2ac9 und 4ac11 waren sehr gedrun- gen (s. Abb. 9 und 12) und zeigten somit kaum Ähnlichkeit mit den schlanken Zellen der Desulfotomaculum-Arten. Von den drei Stämmen wurde bisher nur Stamm 2ac9 auf Pigmente und den GC-Gehalt der DNS geprüft. Daher liegt es nahe, zuerst diesen Sulfatreduzierer als neue Art einer neuen Gattung zu beschreiben. Als Artbezeichnung wird Desulfobacter postgatei vorgeschlagen. Vermutlich lassen sich auch die Stämme 3ac10 und 4ac11 in diese Gattung einordnen, doch wäre zuvor auch der GC-Gehalt der DNS dieser Stämme zu ermitteln.

Stamm 2be1. In morphologischer Hinsicht erinnert dieser mit Benzoat isolierte Sulfatreduzierer (s. Abb. 30) an die gedrun- genen Zellen der Stämme 2ac9 und 4be11. Ein großer Unterschied besteht jedoch darin, daß sich Stamm 2be1 Gram-positiv verhielt und somit als Vertreter einer eigenen neuen Gattung anzusehen ist; die übrigen Stämme mit dieser Zellform waren Gram-negativ. Pigmente und der GC-Gehalt wurden in Stamm 2be1 noch nicht bestimmt. Ferner wäre nach einer treffenden taxonomischen Be- zeichnung zu suchen.

Stämme 1pr3, 2pr4 und 3pr10. Die Zellen der drei mit Propionat isolierten Stämme waren alle einheitlich groß. Die Unterschiede in der Zellform können als Abwandlungen eines morphologischen

Grundtyps, des Kurzstäbchens, aufgefaßt werden. Stamm 1pr3 hatte überwiegend spitze Enden, sodaß die Zellen im Umriß zitronen- oder zwiebel förmig wirkten (s. Abb. 15). Bei Stamm 2pr4 kam diese Gestalt seltener zum Ausdruck, die Zellen hatten häufiger runde Enden. Stamm 3pr10 bildete fast nur runde Zellenden aus (s. Abb. 17), während zitronenförmige Zellen die Ausnahme waren. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit ist es wahrscheinlich, daß alle drei Sulfatreduzierer in die gleiche Gat- tung eingeordnet werden können. Die stets sehr gedrungene Zell- gestalt und die Tatsache, daß nie eine Sporenbildung beobachtet wurde, sprechen gegen eine Einordnung als Desulfotomaculum. Stamm 1pr3 wurde bereits auf Cytochrome und den GC-Gehalt der DNS geprüft; der verhältnismäßig hohe GC-Gehalt von 59,9 mol% weicht ebenfalls erheblich von dem der Desulfotomaculum-Arten (s. o.) ab. Für Stamm 1pr3 als der ersten Art einer neuen Gat- tung wird der Name Desulfobulbus propionicus vorgeschlagen.

Vibrioider Sulfatreduzierer

Mit Butyrat und den höheren Fettsäuren wurden vibrioider Sulfat- reduzierer unterschiedlicher Größe isoliert. Die Sulfatreduzie- rer mit den Stammbezeichnungen 4bu10 (Abb. 21), 2pa3 (Abb. 24), 3pa8 (Abb. 25) und 5pa13 (Abb. 27) waren häufig oval bis stäb- chen förmig, also nicht immer sofort als vibrioider Zellen zu er- kennen; unter veränderten Kulturbedingungen, wie bei extremen pH-Werten, höheren Temperaturen oder anderen Substraten, kam aber auch hier der vibrioider Charakter deutlich zum Ausdruck. Die veränderliche Zellgestalt vibrioider Sulfatreduzierer steht durchaus im Einklang mit älteren Erfahrungen: BUTLIN et al. (1949 b) berichteten, daß die Zellen Sulfat-reduzierender Bak- terien in frühen Kulturen zunächst stäbchen förmig oder gar coccoid aussahen; in Folgepassagen wurde dann die Vibrioform beobachtet.

Stämme 1bu8, 2bu10, 3bu10, 4bu10, 1pa3, 2pa3, 3pa8, 4pa10 und 5pa13. Von den neu isolierten vibrioiden Sulfatreduzierern wur- de bisher nur Stamm 1pa3 auf Cytochrome und den GC-Gehalt der

DNS geprüft; der GC-Gehalt von 52,7 mol% erlaubt eine Einordnung in die Gattung Desulfovibrio, für deren Arten ein GC-Gehalt zwischen 46,1 und 61,2 mol% angegeben wird. Wahrscheinlich können auch die übrigen vibrioiden Sulfatreduzierer in dieselbe Gattung eingeordnet werden. Die Gattung enthielte dann neben Stamm "Norway 4" der Art Desulfovibrio desulfuricans (MILLER und SALEH, 1964) etliche weitere Stämme, die kein Desulfovibridin enthalten (s. Tab. 14). Eine neue ernährungsphysiologische Eigenschaft in der Gattung Desulfovibrio wäre die Fähigkeit zur Verwertung von Fettsäuren. Alle mit Butyrat und Palmitat isolierten vibrioiden Stämme oxidierten ihre Substrate wie die bekannten Desulfovibrio-Arten unvollständig. Der bereits eingehender untersuchte Stamm 1pa3 erhält die Bezeichnung Desulfovibrio sapovorans.

Stamm 1st1. Dieser mit Stearat isolierte Sulfatreduzierer ist der erste in Reinkultur vorhandene vibrioide Stamm mit der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation sowie auch zu autotrophem Wachstum (s. C.5.). Eine taxonomische Beschreibung als Desulfovibrio würde daher in ernährungsphysiologischer Hinsicht eine entscheidende Erweiterung der Gattungsbeschreibung bedeuten. Für den Fall, daß der noch zu bestimmende GC-Gehalt diese Klassifizierung erlaubt, wird der Name Desulfovibrio baarsii vorgeschlagen.

Coccoide Sulfatreduzierer

Stamm 1be1. Der mit Benzoat isolierte Stamm stellt einen neuen morphologischen Typ unter den Sulfat-reduzierenden Bakterien dar (s. Abb. 29). Zwar hatten BUTLIN et al. (1949 b) schon einmal coccoide Sulfatreduzierer beobachtet; solche Zellformen waren jedoch nur in frühen Stadien aufgetreten und entwickelten sich in Folgepassagen zu den bekannten vibrioiden Typen. In den Kulturen von Stamm 1be1 wurden dagegen nie andere als coccoide Zellen gefunden; die Coccenform war auch in den Teilungsstadien zu erkennen. Stamm 1be1, der außer Benzoat noch eine große Zahl verschiedenartiger organischer Verbindungen zu verwerten und

vollständig zu oxidieren vermochte, stellt somit eine neue Art einer neuen Gattung dar und wird als Desulfococcus multivorans beschrieben.

Sarcinen-ähnliche Sulfatreduzierer

Stamm 3be13. Die freischwebenden Einzelzellen dieses Sulfatreduzierers waren oval und somit den Stämmen 2ac9 und 4ac11 ähnlich. Die Fähigkeit dieses Stammes, auch in Form kompakter, Sarcinen-ähnlicher Zellaggregate zu wachsen (s. Abb. 31), muß dagegen als eine neue morphologische Eigenschaft unter Sulfatreduzierenden Bakterien gelten. In marinen Anreicherungen für Sulfatreduzierer mit Acetat wurden schon einmal Sarcinen-ähnliche Zellanhäufungen beobachtet (S. C. RITTENBERG, persönliche Mitteilung); Reinkulturen mit dieser morphologischen Eigenschaft waren jedoch bislang nicht bekannt. Stamm 3be13 wird daher als neue Art einer neuen Gattung beschrieben und erhält die taxonomische Bezeichnung Desulfosarcina variabilis.

Filament-bildende, gleitend bewegliche Sulfatreduzierer

Stämme 5ac10 und 4be13. Diese fädigen, gleitenden Stämme sind zweifellos diejenigen Sulfatreduzierer, die im Vergleich zu allen anderen die größten morphologischen Unterschiede aufweisen (s. Abb. 13, 14, 32 - 34). Der GC-Gehalt wurde bei Stamm 5ac10 zu 34,5 mol% und bei Stamm 4be13 zu 41,6 mol% bestimmt; daher ist es vertretbar, wenn beide Stämme in dieselbe Gattung eingeordnet werden. Fädige, gleitende Bakterien ähnlicher Morphologie wurden zuvor von SKUJA (1956; 1974) als Schlammbewohner in Binnengewässern beobachtet und unter der Gattung Achroonema zusammengefaßt. SKUJAs Beschreibungen und Handzeichnungen der Arten Achroonema splendens und Achroonema macromeres treffen in vielen Punkten auch auf Stamm 5ac10 bzw. Stamm 4be13 zu. Die Physiologie der Achroonema-Arten blieb jedoch gänzlich unbekannt, und auch Reinkulturen wurden nie isoliert. Somit ist auch nicht festzustellen, ob es sich bei den vormals beobach-

teten Achroonema-Arten um Sulfatreduzierer gehandelt hat. Um nun die neu isolierten Stämme 5ac10 und 4be13 in der taxonomischen Bezeichnung als Sulfatreduzierer zu kennzeichnen, wird die neue Gattung Desulfonema eingeführt; Stamm 5ac10 wird als Desulfonema limicola beschrieben und Stamm 4be13 als Desulfonema magnum.

Zusammenfassende Darstellung der taxonomischen Einordnung

Abschließend sei noch einmal in einer kurzen Übersicht zusammengefaßt, welche der mit Fettsäuren bzw. Benzoat isolierten Sulfatreduzierer als neue Arten neuer Gattungen benannt wurden, und welche als neue Arten in die bekannten Gattungen aufgenommen wurden. Aufgeführt sind auch die Stämme, die noch keine taxonomischen Namen erhalten haben. Diese Stämme können wahrscheinlich bis auf den Gram-positiven Stamm 2be1 ebenfalls den neuen bzw. bekannten Gattungen zugeordnet werden; eine endgültige Entscheidung darüber wäre allerdings erst nach der Ermittlung der GC-Werte möglich.

Benennung neuer Gattungen und neuer Arten:

- Desulfobacter: Desulfobacter postgatei, Stamm 2ac9;
zu der Gattung gehören möglicherweise auch die Stämme 3ac10 und 4ac11.
- Desulfobulbus: Desulfobulbus propionicus, Stamm 1pr3;
zu der Gattung gehören möglicherweise auch die Stämme 2pr4 und 3pr10
- Desulfococcus: Desulfococcus multivorans, Stamm 1be1
- Desulfonema: Desulfonema limicola, Stamm 5ac10;
Desulfonema magnum, Stamm 4be13.

Desulfosarcina: Desulfosarcina variabilis, Stamm 3be13

unbenannte Art: Stamm 2be1

Erweiterung bekannter Gattungen und Benennung neuer Arten:

Desulfotomaculum: Desulfotomaculum acetoxidans, Stamm 1ac2

Desulfovibrio: Desulfovibrio sapovorans, Stamm 1pa3;
zu der Gattung gehören möglicherweise auch "Desulfovibrio baarsii", Stamm 1st1,
sowie die Stämme 1bu8, 2bu10, 3bu10,
4bu10, 2pa3, 3pa8, 4pa10 und 5pa13.

Im späteren Teil F. dieser Arbeit, "DESCRIPTION OF SPECIES", werden die neuen bzw. erweiterten Gattungen mit den neuen Arten in der Weise beschrieben, die für "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" üblich ist. Die bekannten Gattungen Desulfovibrio und Desulfotomaculum wurden in diesem Handbuch bisher nicht zusammenhängend dargestellt; Desulfovibrio war unter "Gram-negative anaerobic bacteria (rods)" und Desulfotomaculum unter "Endospore-forming rods and cocci" zu finden. Würde man ein entsprechendes Ordnungsprinzip auch auf die neu benannten Gattungen anwenden, so käme es infolge der morphologischen Vielfalt der nunmehr bekannten Sulfatreduzierer zu einer weiteren Aufsplitterung dieser Bakteriengruppe. Bei einer solchen Aufteilung bliebe aber unberücksichtigt, daß die Fähigkeit, unter streng anaeroben Bedingungen Sulfat als Elektronenakzeptor zu verwerten, ein sehr wesentliches Merkmal ist; denn allein aufgrund dieser physiologischen Eigenart werden Sulfatreduzierer erkannt und identifiziert. In der Fähigkeit zur dissimilatorischen Reduktion von Sulfat zu Schwefelwasserstoff liegen sowohl das rein wissenschaftliche Interesse an diesen Bakterien als auch deren ökologische Bedeutung begründet. Daher ist zu empfehlen, die Gattungen im Zusammenhang und aufeinanderfolgend

in der physiologischen Gruppe "Sulfate-reducing bacteria" darzustellen; in analoger Weise wurde bereits mit den phototrophen Bakterien und den Methanbakterien verfahren.

3. Die dissimilatorische Sulfatreduktion mit Acetat als Elektronendonator - Versuch einer Deutung aus bioenergetischer Sicht

Die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur Verwertung von Acetat und höheren Fettsäuren als Elektronendonatoren wurde bisher nicht nur aus dem Grunde angezweifelt, weil es an positiv verlaufenen Anreicherungsversuchen gefehlt hat; auch aus biochemischen und energetischen Überlegungen stellte man eine derartige Stoffwechselleistung bei Sulfat-reduzierenden Bakterien häufig in Frage (s. A.2.4.). Nunmehr wurden aber mit Acetat und höheren Fettsäuren sogar etliche Sulfatreduzierer in Reinkultur isoliert. Somit ist die Frage von Interesse, durch welche Reaktionsmechanismen in diesen Sulfatreduzierern ATP gewonnen wurde, und wie der Widerspruch zu den bisherigen biochemischen Hypothesen zu erklären ist.

Direkte Experimente zur Aufklärung der Stoffwechselwege wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Eine indirekte Möglichkeit, Hinweise auf Mechanismen der ATP-Gewinnung zu erhalten, besteht in der Auswertung von Ertragsmessungen. Aber auch solche Berechnungen wären hier nur in recht begrenztem Umfange möglich, denn aus den stöchiometrischen Versuchen wurden ausschließlich Ertragskoeffizienten für endliche, d. h. reale Wachstumsraten ermittelt. Ein Zusammenhang zwischen der ATP-Gewinnung und dem Ertragskoeffizienten kann aber erst dann erwartet werden, wenn dieser durch Extrapolation auf unendlich hohe Wachstumsraten als sogenannter y^{\max} -Wert bestimmt wird; erst in diesem (theoretischen) Grenzfall fällt der sogenannte Erhaltungsstoffwechsel nicht mehr ins Gewicht, sodaß man y^{\max} als direkt proportional zur gewonnenen Menge ATP betrachten darf. Nach dieser Vorgehensweise bestimmten BADZIONG und THAUER (1978) die ATP-liefernden Schritte in Desulfovibrio vulgaris

mit molekularem Wasserstoff als Elektronendonator und Acetat als Kohlenstoffquelle. Bioenergetische Untersuchungen mit Hilfe von y^{\max} -Werten waren bisher deshalb möglich, weil der Proportionalitätsfaktor zwischen y^{\max} und der allein für die Zellsynthese benötigten Menge ATP, d. h. der gegen den Erhaltungsstoffwechsel korrigierten Menge ATP, berechnet wurde; diesen Proportionalitätsfaktor bezeichnet man als y_{ATP}^{\max} . Für ein gegebenes Substrat, z. B. Glucose + Ammonium, wurde y_{ATP}^{\max} häufig als eine Art "mikrobielle Konstante" angesehen. STOUTHAMER (1979) zeigte jedoch in neueren Untersuchungen, daß es bei ein und demselben Bakterium unter verschiedenen Umweltbedingungen zu größeren Unterschieden im Ertragskoeffizienten kommen kann, und daß man auch für verschiedene Bakterien bei denselben Umweltbedingungen bisweilen stark abweichende Ertragskoeffizienten erhält; ferner wurde von erheblichen Differenzen zwischen berechneten und gemessenen Ertragskoeffizienten berichtet. Nicht zuletzt auch aus diesem Grunde soll hier davon abgesehen werden, aus den erhaltenen Erträgen auf die Phosphorylierungsschritte bei der Oxidation der einzelnen Substrate durch die isolierten Sulfatreduzierer zu schließen. Stattdessen wird im folgenden zunächst versucht, die Thermodynamik derjenigen Einzelreaktionen darzustellen, die heute als Grundprinzip der dissimilatorischen Sulfatreduktion gelten, und den Bezug zur Gesamtreaktion aufzuzeigen. Aus thermodynamischen Daten kann zwar grundsätzlich nicht auf den Mechanismus, also den Weg der Reaktion geschlossen werden; ist dieser jedoch aus anderen Untersuchungen bekannt geworden, so lassen sich energetische Betrachtungen zu den Teilreaktionen innerhalb der Gesamtreaktion anstellen. Die Gesamtreaktion ist als Übergang von einem makroskopischen Anfangszustand in einen Endzustand thermodynamisch erfaßbar. Bisherige Zweifel an einer Oxidation von Fettsäuren durch Sulfatreduzierer könnten gerade dadurch aufgekommen sein, daß die Energiebilanzen von Teilreaktionen während der Sulfatreduktion falsch aufgefaßt wurden.

Für die Berechnungen wird als Elektronendonator Acetat eingesetzt, denn dieses stellt unter anaeroben Bedingungen bereits

ein recht "energiearmes", stabiles Ausscheidungsprodukt dar, dessen Verwertung als Elektronendonator für die Sulfatreduktion energetisch noch ungünstiger ist als die Oxidation höherer Fettsäuren (vgl. WAKE et al., 1977). Wenn nun gezeigt werden kann, daß die beobachtete Sulfatreduktion mit Acetat bioenergetisch durchaus verständlich ist, so dürfte im Falle der höheren Fettsäuren um so weniger ein Widerspruch zwischen Beobachtung und Theorie bestehen. Nach der Aufstellung der Energiebilanzen zur Sulfatreduktion soll dann geprüft werden, inwieweit die aufgestellten Hypothesen bereits durch die Ertragskoeffizienten bestätigt werden können, die in dieser Arbeit nur für endliche Wachstumsraten ermittelt wurden. Bei den Ertragsmessungen mit Acetat (s. C.4.1.) wurde nämlich nicht nur Sulfat als Elektronenakzeptor eingesetzt, sondern auch Sulfit, welches das erste Intermediärprodukt der Sulfatreduktion nach der Aktivierung zu APS ist.

3.1. Irreversible und reversible Stoffwechselschritte

Als den ersten Schritt der dissimilatorischen Sulfatreduktion erkannte PECK (1959; 1962 a) die Bildung von APS (s. A.2.3.) aus Sulfat unter Abspaltung von Pyrophosphat. Man nimmt heute an, daß jedes Sulfat-reduzierende Bakterium den Reduktionsvorgang auf diese Weise einleitet. Das weitere Schicksal des Pyrophosphats wurde vielfach in einer Hydrolyse zu Orthophosphat gesehen; THAUER et al. (1977) sowie BADZIONG und THAUER (1978) wiesen jedoch darauf hin, daß Pyrophosphat ganz oder zumindest zum Teil noch für weitere Phosphorylierungsreaktionen genutzt werden könnte. APS wird unter Aufnahme von zwei Reduktionsäquivalenten zu Sulfit reduziert, wobei AMP freigesetzt wird. Die Bildung von APS wird auch Sulfataktivierung genannt; weil dabei ATP verbraucht wird und dieses nach dem ersten Reduktionsschritt als AMP und Pyrophosphat oder gar Orthophosphat vorzufinden ist, wurde die Sulfataktivierung häufig mit dem Attribut "energieaufwendig" versehen. Bereits in der Wahl dieser Bezeichnung kommt zum Ausdruck, wie der erste Schritt der Sulfatreduktion energetisch verstanden wurde: Die Sulfataktivierung

wurde leicht in die Klasse biochemischer Reaktionen gestellt, für welche die Bezeichnung "energieaufwendig" ganz offensichtlich zutrifft. So ist zum Beispiel die Stickstofffixierung ohne Frage ein "energieaufwendiger" Prozeß. Die Reduktion von N_2 zu NH_3 ist mit etlichen Elektronendonatoren, wie auch mit H_2 von 1 atm Druck, ein exergonischer Vorgang; dennoch werden für die Reduktion von 1 mol N_2 fast immer mehr als 10 mol ATP verbraucht. Ein weiteres Beispiel für einen energetisch kostspieligen Prozeß ist der Calvin-Cyclus. Andere Mechanismen für eine autotrophe CO_2 -Fixierung zeigen nämlich (s. 4.2.), daß eine vollständige Synthese organischer Zellbestandteile aus CO_2 auch mit einem geringeren Verbrauch von ATP möglich ist.

In "energieaufwendigen" Reaktionen wird die freie Enthalpie aus dem Übermaß an ATP nicht in den Produkten als weiterhin nutzbar konserviert, sondern irreversibel als Entropie entwertet. Nun ist in diesem Sinne der gesamte biochemische Prozeß eines jeden Lebewesens thermodynamisch irreversibel. Eine Reaktion, die nicht insgesamt zur Erhöhung der Entropie des Systems und seiner Umgebung führt, hat nämlich von sich aus keinerlei Anlaß, abzulaufen; Reaktanten und Produkte stehen dann miteinander im Gleichgewicht. Chemisches Gleichgewicht bedeutet also, daß makroskopisch kein Bruttoumsatz stattfindet, der über irgendeinen Kopplungsmechanismus auch nur die geringste Nutzarbeit zu leisten vermöchte: Die freie Enthalpie eines solchen Systems ist gleich Null. In lebenden Systemen wird durch die Zellsynthese ein Ordnungszustand geschaffen, dem eine geringere Entropie zukommt als dem Substrat vor der Assimilation; die Synthesereaktionen sind jedoch möglich, weil die damit einhergehende Verminderung der Entropie überkompensiert wird durch den Anteil an Entropie, welche der Energiestoffwechsel in die Umgebung trägt. Allerdings sind auch einige biochemische Einzelreaktionen bekannt, die zu keiner oder nur einer minimalen Erhöhung der Entropie von System und Umgebung führen und für sich einen Gleichgewichtszustand darstellen (s. THAUER et al., 1977). Dennoch können auch solche Reaktionen ständig in derselben Richtung ablaufen, weil deren Produkte innerhalb eines irrever-

siblen Gesamtprozesses weiter umgesetzt werden; aus dem Bestreben der betreffenden Reaktion, das Gleichgewicht wieder zu erreichen, werden die Produkte laufend neu gebildet. Durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse zwischen Reaktanten und Produkten einer im Gleichgewicht befindlichen Reaktion kommt es also zu einem Bruttoumsatz, sodaß man bei den veränderten Konzentrationen einen von Null verschiedenen Wert für die freie Enthalpie angeben kann. Weil die Richtung von Gleichgewichtsreaktionen jederzeit durch geringfügige Änderungen der Konzentrationsverhältnisse bestimmt werden kann, spricht man auch von reversiblen Reaktionen. Über reversible Reaktionen als Teilreaktionen wird keine freie Enthalpie des Gesamtprozesses als Entropie entwertet.

In lebenden Systemen sind also sowohl ausgesprochen irreversible als auch reversible Einzelreaktionen möglich; extreme Beispiele für erstere sind die genannte Stickstofffixierung und der Calvin-Cyclus. Stickstofffixierung und Calvin-Cyclus gehören beide zum Anabolismus, d. h. zu der Gruppe von biochemischen Prozessen, die der Synthese von Zellmaterial dienen. Je mehr ATP ein Syntheseweg in einem Bakterium verbraucht, desto weniger Zellmasse kann beim Umsatz einer gegebenen Substratmenge gebildet werden. Eine obere Grenze für den Energieaufwand für eine Reaktion des Anabolismus existiert jedoch nicht, das Verhältnis des bei der ATP-Gewinnung umgesetzten Substrats zur gebildeten Zellmasse kann, zumindest theoretisch, beliebig groß werden. Dagegen sind dem Energieaufwand für Reaktionsschritte des Katabolismus, des Energiestoffwechsels, enge Grenzen gesetzt. Um eine Nettosynthese von ATP zu ermöglichen, muß der in einer Teilreaktion des Katabolismus als Entropie entwertete Energiebetrag stets kleiner sein als die freie Enthalpie der Gesamtreaktion. Die Forderung trifft selbstverständlich auch für die dissimilatorische Sulfatreduktion zu.

3.2. Annahmen und Voraussetzungen für die thermodynamischen Betrachtungen

Inwieweit sind nun die ersten Reaktionsschritte der Sulfatreduktion "energieaufwendig", also mit einer irreversiblen Umwandlung von freier Enthalpie der Gesamtreaktion in Entropie verbunden? Zur Beantwortung dieser Frage werden die Änderungen der freien Enthalpie bei der Gesamtreaktion und den Teilreaktionen berechnet, d. h. bei der Sulfatreduktion zu Sulfid bzw. der APS-Bildung, der APS-Reduktion und der Sulfitreduktion. Als Elektronendonator soll Acetat eingesetzt werden (s. o.); weil dieses insgesamt 8 Reduktionsäquivalente (4 Elektronenpaare) pro Molekül abzugeben vermag, muß die Acetat-Einheit für die Einzelreaktionen der Sulfatreduktion "aufgeteilt" werden. Dieser Formalismus ist thermodynamisch zulässig, obwohl die Reduktionsäquivalente aus dem Acetat-Abbau in der Zelle sicherlich auf physiologische Akzeptoren mit unterschiedlichem Redoxpotential übertragen werden. So könnten einige der Reduktionsäquivalente aus dem Acetatmolekül als Elektronendonatoren mit besonders negativem Redoxpotential zur Verfügung stehen, welches für eine Energiekonservierung durch Elektronentransport entsprechend günstig wäre; eine solche Erniedrigung des Redoxpotentials ist aber nur auf Kosten des Redoxpotentials der restlichen Reduktionsäquivalente aus dem Acetat möglich, das im gleichen Maße positiver werden muß. Wenn also die 4 Elektronenpaare aus einem Acetatmolekül auf unterschiedlichem Niveau in der Redoxskala stehen, so ist deren Transport insgesamt mit derselben Änderung an freier Enthalpie verbunden, die man für einen Elektronentransport der 4 Elektronenpaare aus Acetat vom gleichen Niveau berechnet.

Die Änderung der freien Enthalpie bei einer Reaktion wurde aus den von THAUER et al. (1977) gegebenen freien Standard-Bildungsenthalpien nach der im Anhang gegebenen Formel berechnet. Somit gelten die erhaltenen Werte für eine Temperatur von 25 °C und einen Druck von 1 atm. Die freie Enthalpie einer Reaktion ist aber auch von der Aktivität der Reaktanten und Produkte abhängig. Für Standardbedingungen wurde in wäßrigen Systemen eine

ktivität von 1 mol/kg festgelegt. Nährlösungen sind demgegenüber stark verdünnt, was bei der Berechnung von freien Reaktionsenthalpien berücksichtigt werden muß. Verdünnte Lösungen bieten aber gleichzeitig den Vorteil, daß man die Aktivitäten der Einfachheit halber näherungsweise durch die Konzentrationen in mol/l ersetzen darf. Insbesondere, wenn H^+ - oder OH^- -Ionen Reaktionsteilnehmer sind, ist die freie Reaktionsenthalpie unter physiologischen Bedingungen von der unter Standardbedingungen sehr verschieden: H^+ - und OH^- -Ionen haben bei neutralem pH-Wert bei 25 °C eine Konzentration von 10^{-7} mol/l. Auch der Konzentrationseinfluß der übrigen Reaktionsteilnehmer kann sich als Abweichung von der freien Standard-Reaktionsenthalpie bemerkbar machen und insbesondere bei schwächer exergonischen Reaktionen deutlich ins Gewicht fallen. In der Formel zur Berechnung der freien Reaktionsenthalpie bei beliebigen Konzentrationen aus der freien Standard-Reaktionsenthalpie werden nämlich die Konzentrationen der Reaktanten bzw. der Produkte miteinander multipliziert, und die Konzentration eines Reaktanten oder eines Produkts wird mit dem stöchiometrischen Koeffizienten potenziert. Ist die Anzahl der Reaktanten ungleich der Anzahl der Produkte, und haben alle Reaktionsteilnehmer eine gleich hohe Konzentration unterhalb der Standardkonzentration, so weicht die freie Reaktionsenthalpie unter den gegebenen Bedingungen stets um einen bestimmten Betrag von der freien Standard-Reaktionsenthalpie ab (s. Anhang).

Jetzt könnte der Einwand erhoben werden, daß die Konzentrationsverhältnisse in der Bakterienzelle größtenteils nicht bekannt sind und somit auch nicht die genauen Werte für die freie Enthalpie der Substratumsetzung unter den tatsächlichen physiologischen Bedingungen. Nun gibt es aber auch für die Größenordnung von Bakterienzellen keinerlei Hinweise dafür, daß die thermischen Konzentrationsschwankungen in Lösungen im molekularen Bereich im Sinne von "Maxwells Dämon" zu einer Entmischung (Entropieabnahme) addiert werden könnten, sodaß das entstandene Konzentrationsgefälle zur Verrichtung von Nutzarbeit beitrüge. Somit gilt der zweite Hauptsatz der Thermo-

dynamik für eine Bakterienzelle ebenso wie für das gesamte Kulturvolumen. Selbstverständlich kann ein Bakterium in der Zelle Konzentrationsverhältnisse schaffen, die für eine ATP-Gewinnung günstiger sind als die in der Nährlösung; der damit verbundene Transport gegen ein Konzentrationsgefälle benötigt jedoch mindestens den Betrag an freier Enthalpie, um welchen die anschließende Reaktion unter den veränderten Konzentrationsverhältnissen exergonischer geworden ist. Die maximal für die ATP-Synthese zur Verfügung stehende freie Enthalpie ist daher durch den makroskopisch erfaßbaren Anfangszustand und den Endzustand des Kulturvolumens bestimmt.

In statischen Kulturen ändern sich die Konzentrationsverhältnisse zwischen Substraten und Produkten während des Wachstums. Die folgenden Berechnungen sollen nun dadurch vereinfacht werden, daß für Acetat, Sulfat, Sulfit, Bicarbonat und Sulfid eine stets gleich hohe, z. B. durch einen Chemostaten konstant gehaltene Konzentration von jeweils 10^{-2} mol/l (10 mmol/l) angenommen wird. Dabei handelt es sich zwar um eine Näherung, doch ist dieser Konzentrationsbereich für Bakterienkulturen immerhin realistischer als Standardkonzentrationen bzw. Standardaktivitäten. Auch für ATP, APS, Pyrophosphat, Orthophosphat und AMP soll eine Konzentration von jeweils 10^{-2} mol/l angenommen werden. Die freie Reaktionsenthalpie wird dann nicht mehr mit ΔG° , sondern mit dem allgemeineren Symbol $\Delta G'$ bezeichnet.

3.3. Wie energieaufwendig ist die Sulfataktivierung?

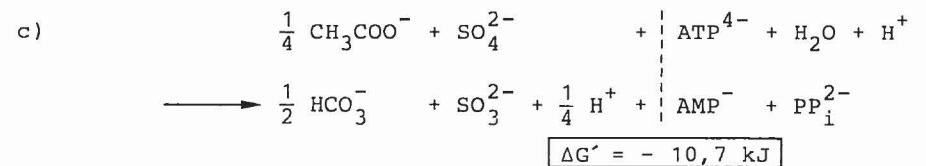
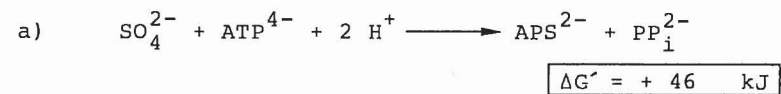
Für die freie Reaktionsenthalpie der Oxidation von 1 mol Acetat durch 1 mol Sulfat berechnet man unter den oben angegebenen Bedingungen $\Delta G' = -83,1$ kJ (s. auch Gleichung f). Nun hat die Erfahrung gelehrt, daß der Wirkungsgrad der ATP-Synthese fast nie 50 % übersteigt (THAUER et al., 1977); als Wirkungsgrad bezeichnet man das Verhältnis der als ATP konservierten freien Enthalpie zur Änderung der freien Enthalpie der katabolischen Gesamtreaktion, multipliziert mit dem Faktor 100. In jedem Lebewesen wird also bereits bei der ATP-Synthese ein gewisser

Betrag an freier Enthalpie irreversibel umgewandelt. Im Falle der Sulfatreduktion mit Acetat wäre demnach zu erwarten, daß pro mol reduzierten Sulfats bis ca. 42 kJ in Form von ATP konserviert werden können. Dieser Energiebetrag ermöglicht aber gerade die Synthese von 1 mol ATP; THAUER et al. (1977) geben nämlich für die ATP-Hydrolyse zu ADP und Orthophosphat bei einem pH-Wert von 7.0 unter den Bedingungen in der Zelle eine Änderung der freien Enthalpie von $\Delta G' = -43,9$ kJ/mol an. Weil bei der Aktivierung von 1 mol Sulfat auch 1 mol Pyrophosphat anfällt, darf dieses nicht vollständig hydrolysiert werden, wenn Acetat der Elektronendonator ist; denn die irreversible Hydrolyse von 1 mol Pyrophosphat ist biochemisch gleichbedeutend mit einem Verlust von 1 mol ATP. Weil aber die Reduktion von 1 mol Sulfat mit 1 mol Acetat maximal nur 1 mol ATP liefern dürfte, wäre somit kein Nettogewinn an ATP für die Zellsynthese mehr möglich; die Sulfatreduktion mit Acetat wäre dann ein entkoppelter, selbständig ablaufender und gänzlich irreversibler Prozeß. Eine vollständige Hydrolyse des gebildeten Pyrophosphats können sich daher nur solche Sulfatreduzierer leisten, die "energiereichere" Substrate als Acetat verwerten, wie z. B. Lactat oder Wasserstoff. Wenn also ein Acetat-verwertender Sulfatreduzierer ebenfalls das als Elektronenakzeptor verwendete Sulfat vor der Reduktion in der bekannten Weise zunächst in APS überführt, so muß das gebildete Pyrophosphat zumindest zum Teil energetisch genutzt werden.

Die Hydrolyse von Pyrophosphat wurde häufig so verstanden, daß dadurch die Sulfataktivierung und der erste Schritt der Sulfatreduktion zugunsten des Produkts Sulfit beeinflusst werden (vgl. WARE und POSTGATE, 1971). Ob solch ein irreversibler, für eine katabolische Reaktion doch recht ungünstiger Schritt thermodynamisch tatsächlich notwendig ist, soll nunmehr untersucht werden.

Die freie Enthalpie für die Aktivierung von Sulfat beträgt nach THAUER et al. (1977) $\Delta G^{\circ'} = +46$ kJ/mol; bei den angenommenen Konzentrationen von 10 mmol/l erhält man den gleichen Wert, also $\Delta G' = +46$ kJ/mol. Der Aktivierungsschritt ist demnach

ausgesprochen endergonisch und würde allein nicht ablaufen. Für die Reduktion von APS mit H_2 (1 atm) als Elektronendonator und Bisulfit (HSO_3^-) als Reduktionsprodukt wurde in derselben Arbeit eine freie Enthalpie von $\Delta G^{\circ'} = -68,8$ kJ/mol angegeben, von der man für Konzentrationen von 10 mmol/l zu $\Delta G' = -80,0$ kJ/mol gelangt. Bei einem pH-Wert von 7.0 stehen Bisulfit und Sulfit in fast gleichen Konzentrationen miteinander im Gleichgewicht: Für das System SO_3^{2-}/HSO_3^- findet man in der Literatur einen pK_a -Wert von 6.91 bei 18 °C. Daher kann die APS-Reduktion bei gleicher Änderung der freien Enthalpie ebenso auch mit Sulfit formuliert werden. Weil hier Acetat als Elektronendonator dienen soll, muß die freie Enthalpie der Bildung von 1 mol H_2 aus genau 0,25 mol Acetat bei einer Acetat-Konzentration und einer Bicarbonat-Konzentration von jeweils 10 mmol/l berechnet werden: Man erhält $\Delta G' = +23,3$ kJ pro mol gebildeten Wasserstoffs (H_2 , 1 atm). Kombiniert man die Gleichung für die APS-Reduktion mit H_2 mit der Gleichung für die H_2 -Bildung aus Acetat, so erhält man die Gleichung für die APS-Reduktion mit Acetat mit einer Änderung der freien Enthalpie von $\Delta G' = -56,7$ kJ/mol ($-80,0 + 23,3 = -56,7$). Addiert man nunmehr die Gleichung für die APS-Bildung (a) und die für die APS-Reduktion mit Acetat (b), so erhält man die Summenreaktion bis zur Stufe von Sulfit (c):

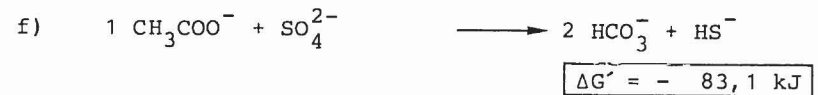
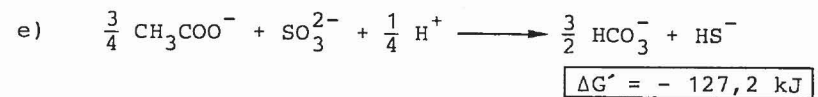


T = 298 °K; p = 1 atm; pH = 7.0; Konzentration von Sulfat, ATP, APS, Pyrophosphat, Acetat, Sulfit, Bicarbonat und AMP: 0,01 mol/l

Die Summenreaktion c ist mit $\Delta G' = - 10,7$ kJ pro mol reduzierten Sulfats schwach exergonisch, das reagierende System liegt also bereits weitgehend auf der Seite des Produkts Sulfit. Eine Hydrolyse von Pyrophosphat zur Begünstigung der Reaktion wäre in diesem Falle gar nicht mehr erforderlich. Allerdings dürfen die berechneten Beträge der freien Enthalpie von Reaktionen nicht als absolut zuverlässig aufgefaßt werden. Oft handelt es sich um kleine Differenzen großer Werte, der freien Standard-Bildungsenthalpien; diese werden außerdem in der Literatur keineswegs einheitlich angegeben. Somit können die Differenzen mit größeren relativen Fehlern behaftet sein. Weitere Ungenauigkeiten ergeben sich aus Näherungen und Vereinfachungen während der Berechnungen. Eine schwach exergonische Reaktion könnte also auch durchaus schwach endergonisch sein. Sollte sich die Summenreaktion c bei Anwendung anderer Näherungsverfahren als schwach endergonisch erweisen, so könnte diese tatsächlich durch eine direkte Hydrolyse von Pyrophosphat zugunsten der Produkte beeinflusst werden: Die freie Enthalpie der Pyrophosphat-Hydrolyse beträgt nach THAUER et al. (1977) $\Delta G^{\circ'} = - 21,9$ kJ/mol und somit bei den hier gewählten Konzentrationen $\Delta G' = - 33,3$ kJ/mol; dieser Schritt wäre also verhältnismäßig stark exergonisch. Die dann resultierende Reaktion zu Bicarbonat, Sulfit, AMP und Orthophosphat hätte stark irreversiblen Charakter. Mit Acetat als Elektronendonator kann jedoch, wie oben gezeigt wurde, bei einer vollständigen Hydrolyse von Pyrophosphat keine Nettosynthese von ATP mehr erwartet werden. Nun muß aber die Reduktion von Sulfat zu Sulfit über APS nicht unbedingt dadurch "angetrieben" werden, daß das Produkt Pyrophosphat durch eine unökonomische Hydrolyse entfernt wird; eine Verwertung von Pyrophosphat in Phosphorylierungsreaktionen würde die Bildung von Sulfit in ähnlicher Weise günstig beeinflussen. Ferner wird das entstandene Sulfit ständig durch den weiteren Reduktionsprozeß verbraucht. Für die Reduktion des Intermediärprodukts Sulfit mit Acetat berechnet man unter den hier gewählten Bedingungen $\Delta G' = - 127,2$ kJ/mol. Dieser scheinbar paradoxe Sachverhalt leuchtet ein, wenn man die Summenreaktion c durch die gestrichelte Linie formal in zwei andere Einzelreaktionen teilt. Man erhält dabei eine direkte Reduktion von Sulfat mit Acetat zu

Sulfit (links) und eine Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat (rechts). Für die direkte Reduktion von Sulfat mit Acetat zu Sulfit berechnet man eine freie Reaktionsenthalpie von $\Delta G' = + 44,1$ kJ pro mol Sulfat, die Reaktion ist also ausgesprochen endergonisch. Aus der freien Enthalpie der Summenreaktion c folgt für die Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat unter den Reaktionsbedingungen somit eine Änderung der freien Enthalpie von $\Delta G' = - 54,8$ kJ/mol ($+ 44,1 - 54,8 = - 10,7$). Diese Hydrolyse, die als einzelner Reaktionsschritt freilich irreversibel wäre, findet jedoch nur indirekt statt. Als Reaktionsmechanismus ist die exergonische ATP-Hydrolyse zu AMP und Pyrophosphat über die ATP-Sulfonylase und die APS-Reduktase mit der endergonischen Reduktion von Sulfat mit Acetat zu Sulfit zu einer schwach exergonischen Summenreaktion gekoppelt.

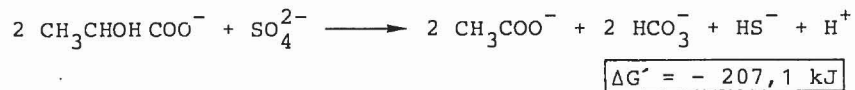
Addiert man die Gleichung für die Sulfatreduktion zu Sulfit (d) zu der Gleichung für die Sulfitreduktion zu Sulfid (e), so erhält man auf einem zweiten Wege die Gleichung für die vollständige Reduktion von Sulfat zu Sulfid mit Acetat als Elektronendonator (f) und ebenso den schon zuvor berechneten Wert für $\Delta G'$:



T = 298 °K; p = 1 atm; pH = 7.0; Konzentration von Acetat, Sulfat, Bicarbonat, Sulfit und Sulfid: 0,01 mol/l

Die gesamte Sulfatreduktion könnte in einem Energieschema dargestellt und folgendermaßen beschrieben werden: Die Aktivierung von Sulfat verbraucht zwar ATP; die nutzbare Energie von ATP wird dabei jedoch konserviert, indem das System "Elektronendonator + Elektronenakzeptor" auf einem "Umweg" zunächst auf eine energetisch noch höhere Stufe gehoben wird. Der Betrag an freier Enthalpie, um welchen sich der dann resultierende Reduktionsvorgang von der Gesamtreaktion unterscheidet, kann wiederum dazu beitragen, das für die Aktivierung verbrauchte ATP zu regenerieren. Die Grundaussage einer solchen Darstellungsweise trifft für alle ATP-verbrauchenden Schritte zu, bei denen die freie Enthalpie von ATP größtenteils in neuen energiereichen Produkten konserviert wird; solche Reaktionen haben reversiblen Charakter und sind nicht "energieaufwendig" im Sinne einer irreversiblen Entwertung der freien Enthalpie von ATP. Am Beispiel von Sulfat wurde hier ein häufiges energetisches Prinzip bei Aktivierungen aufgezeigt.

Mit "energiereichereren" Elektronendonatoren als Acetat, wie z. B. Lactat oder H_2 , wäre die Summenreaktion c, die unter ATP-Verbrauch zu Sulfit führt, noch stärker exergonisch. Eine Begünstigung der Reaktion in Richtung der Produkte wäre in diesem Falle umso weniger erforderlich als mit Acetat als Elektronendonator. Damit ist aber noch längst nicht gesagt, daß in Lactat- oder H_2 -verwertenden Sulfatreduzierern keine vollständige Hydrolyse des Pyrophosphats stattfindet. Für die Sulfatreduktion mit Lactat als Elektronendonator und Acetat als Endprodukt gilt eine Reaktion mit folgendem $\Delta G'$ -Wert:



T = 298 °K; p = 1 atm; pH = 7.0; Konzentration von Lactat, Sulfat, Acetat, Bicarbonat und Sulfid: 0,01 mol/l

Die Reaktion ist so stark exergonisch, daß eine Nettosynthese von ATP auch noch bei einer irreversiblen Hydrolyse von Pyro-

phosphat möglich wäre; in Lactat-verwertenden Sulfatreduzierern besteht also andererseits auch keine Notwendigkeit für die Nutzung des Pyrophosphats.

3.4. Die Aktivierung von Acetat

Nicht nur der Elektronenakzeptor, das Sulfat, muß vor der Einbeziehung in den Stoffwechsel aktiviert werden, sondern sehr wahrscheinlich auch der Elektronendonator Acetat. Nun ist dem Energieaufwand für die Aktivierung von Acetat ebenso eine Grenze gesetzt wie dem für die Aktivierung von Sulfat: Wenn bei der Aktivierung von 1 mol Acetat die freie Enthalpie von 1 mol ATP irreversibel umgewandelt würde, so dürfte kein Nettogewinn von ATP und somit auch kein Wachstum mehr möglich sein.

Acetat wird wahrscheinlich vor der Oxidation in Acetyl-Coenzym A umgewandelt. Die Bereitstellung von Acetyl-Coenzym A braucht jedoch ebensowenig "energieaufwendig" zu sein wie die von Sulfit aus Sulfat über APS: Die durch Acetat-Kinase und Phospho-Transacetylase katalysierte Bildung von Acetyl-Coenzym A aus Acetat und Coenzym A ist nahezu reversibel (THAUER et al., 1977); pro mol Acetat wird zwar 1 mol ATP zu ADP und Orthophosphat umgesetzt, doch bleibt dabei die freie Enthalpie von ATP in weiterhin nutzbarer Form in dem entstehenden Thioester und teilweise auch in der daraus im nächsten Reaktionsschritt geknüpften Bindung erhalten. Fände die Endoxidation wie in Aerobiern über den Tricarbonsäure-Cyclus statt, so könnte das für die Aktivierung von Acetat verbrauchte ATP bei der Bildung von Succinat aus Succinyl-Coenzym A regeneriert werden. Die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente aus Acetat und dessen vollständige Oxidation zu CO_2 wäre im Hinblick auf den ATP-Umsatz ein selbsterhaltender Prozeß.

Bei der Bildung von Acetyl-Coenzym A durch Thiokinase werden hingegen AMP und Pyrophosphat gebildet; letzteres wird anschließend irreversibel zu Orthophosphat hydrolysiert (DECKER et al., 1970). Durch eine Aktivierung von Acetat auf diese

Weise wäre der Energiekonservierung eines Acetat-verwertenden Sulfatreduzierers ebenso ein Ende gesetzt wie durch eine vollständige Hydrolyse des Pyrophosphats aus der Aktivierung von Sulfat.

3.5. Ertragsvergleiche

Je höher der Anteil ist, der von dem Pyrophosphat aus der APS-Bildung irreversibel hydrolysiert wird, desto geringer muß der Wirkungsgrad der ATP-Synthese während der Gesamtreaktion ausfallen; im Grenzfall, bei einer vollständigen Hydrolyse, ist aufgrund der Betrachtungen zu Beginn von Kapitel 3.3. ein Wirkungsgrad der Sulfatreduktion mit Acetat von Null zu erwarten. Wenn umgekehrt das Pyrophosphat in bestimmten notwendigen Phosphorylierungsreaktionen vollständig genutzt werden kann, so wäre die Sulfatreduktion bis zur Stufe von Sulfit mit keiner wesentlichen Umwandlung freier Enthalpie in Entropie verbunden. Die Folge einer vollständigen Nutzung von Pyrophosphat wäre somit, daß die Energiekonservierung beim Wachstum mit Acetat und Sulfat einen kaum geringeren Wirkungsgrad hätte als beim Wachstum mit Acetat und Sulfit. Der absolute ATP-Gewinn pro mol Akzeptor kann mit Sulfit im Kulturmedium allerdings höher sein als mit Sulfat. Die Reduktion von Sulfit ist nämlich stärker exergonisch als die von Sulfat (s. Gleichungen e und f). Wird den Bakterien Sulfit angeboten, so ist der Elektronenakzeptor, der bei der Verwertung von Sulfat nur unter Verbrauch von ATP entstehen kann, bereits von vornherein zugegen.

Unter C.4.1. wurden Ertragskoeffizienten Acetat-verwertender Sulfatreduzierer bestimmt; dabei handelt es sich jedoch nicht um Y^{max} -Werte. Somit besteht auch keine Möglichkeit, die während der Reduktion insgesamt gebildete Menge ATP und daraus den Wirkungsgrad zu berechnen. Man darf aber annehmen, daß die als zahlenmäßiger Betrag umstrittene Größe Y_{ATP} wenigstens für ein und dasselbe Bakterium konstant ist, wenn dieses bei unveränderten Kulturbedingungen auf stets demselben organischen Substrat wächst. Daher dürfte auch ein Sulfatreduzierer bei der

Verwertung von Acetat mit Sulfat als Elektronenakzeptor ungefähr den gleichen Y_{ATP} -Wert haben wie mit Sulfit als Elektronenakzeptor. Geht in beiden Fällen ferner der gleiche prozentuale Anteil vom gebildeten ATP in den Erhaltungsstoffwechsel ein, so sollten die Ertragskoeffizienten auch bei endlichen, realen Wachstumsraten proportional zum Nettogewinn an ATP sein. Bezieht man daher die Ertragskoeffizienten auf die freie Enthalpie der betreffenden Reaktion (Sulfatreduktion bzw. Sulfitreduktion), so erhält man eine Größe, die dem Wirkungsgrad proportional ist; diese neue Größe würde man analog zu den übrigen, durch die Bezugsgrößen verschieden definierten Ertragskoeffizienten als $Y_{\Delta G}$ bezeichnen und in g Trockenmasse pro kJ angeben (für unendlich hohe Wachstumsraten erhielte man $Y_{\Delta G}^{max}$).

Der Acetat-verwertende Sulfatreduzierer 2ac9 wuchs mit Sulfat kaum langsamer als mit Sulfit; daher dürfte in beiden Fällen der prozentuale Anteil vom synthetisierten ATP, der in den Erhaltungsstoffwechsel einging, ungefähr gleich gewesen sein. Bei Stamm 2ac9 waren ferner die Erträge stets sehr genau proportional zu der verbrauchten Menge an Substrat. Wegen dieses linearen Zusammenhangs wurden die Ertragskoeffizienten unter C.4.1. direkt von den Geraden in Abb. 38 abgelesen. Weil die Abszisse in der Auftragung einheitlich ist, wurden die Erträge zunächst auf Acetat bezogen, was durch die Symbole $Y_{Ac.}$ (Sulfat) bzw. $Y_{Ac.}$ (Sulfit) ausgedrückt wurde. Für die hier verwendeten Reaktionsgleichungen ist der Elektronenakzeptor als Bezugsgröße geeigneter, sodaß man die entsprechenden Ertragskoeffizienten $Y_{Sulfat}^{(Ac.)}$ bzw. $Y_{Sulfit}^{(Ac.)}$ verwenden sollte. $Y_{Sulfat}^{(Ac.)}$ ist mit $Y_{Ac.}$ (Sulfat) identisch, während $Y_{Sulfit}^{(Ac.)}$ um den Faktor 0,75 kleiner ist als $Y_{Ac.}$ (Sulfit); dieser Zusammenhang ist leicht aus den Dissimilationsgleichungen ersichtlich. Anstelle der nicht bekannten Wirkungsgrade können nun die $Y_{\Delta G}$ -Werte für das Wachstum mit den zwei verschiedenen Elektronenakzeptoren (Kennzeichnung als Ac./Sulfat bzw. Ac./Sulfit) miteinander verglichen werden:

Stamm 2ac9:

$$Y_{Ac.}(\text{Sulfat}) = 4,77 \text{ g/mol} \quad Y_{\text{Sulfat}}(\text{Ac.}) = 4,77 \text{ g/mol}$$

$$Y_{Ac.}(\text{Sulfit}) = 10,75 \text{ g/mol} \quad Y_{\text{Sulfit}}(\text{Ac.}) = 8,06 \text{ g/mol}$$

Aus den Beträgen der freien Enthalpie der betreffenden Reaktionen (s. Gleichungen f und e) folgt:

$$Y_{\Delta G}(\text{Ac./Sulfat}) = 0,057 \text{ g/kJ}$$

$$Y_{\Delta G}(\text{Ac./Sulfit}) = 0,063 \text{ g/kJ}$$

Die nur wenig voneinander abweichenden $Y_{\Delta G}$ -Werte lassen vermuten, daß die ATP-Bildung während des Wachstums von Stamm 2ac9 auf Acetat und Sulfat mit fast dem gleichen Wirkungsgrad erfolgte wie beim Wachstum mit Acetat und Sulfit; die Sulfatreduktion war demnach kaum "energieaufwendiger" als die Sulfitreduktion. Daraus würde weiter folgen, daß Stamm 2ac9 imstande war, das Pyrophosphat aus der Aktivierung von Sulfat energetisch weitgehend zu nutzen.

Bei Stamm 1ac2 wurde der Ertragskoeffizient mit steigendem Umsatz von Acetat und Sulfat geringer (s. Abb. 38). Vermutlich reagierte dieser Sulfatreduzierer empfindlich auf die Erhöhung der Sulfid-Konzentration, die mit steigendem Substratumsatz einherging. Eine Erklärung für den Rückgang des Ertragskoeffizienten wäre, daß unter den ungünstiger werdenden Bedingungen der Wirkungsgrad der ATP-Synthese geringer wurde, weil Elektronentransport und Phosphorylierung teilweise entkoppelt wurden. Ebenso ist aber auch in Übereinstimmung mit BADZIONG und THAUER (1978) denkbar, daß die Wachstumsrate mit zunehmender Sulfid-Konzentration abnahm; dabei wäre der Erhaltungsstoffwechsel stärker ins Gewicht gefallen, sodaß der Anteil vom gebildeten ATP für die Zellsynthese geringer geworden wäre. Erträge mit Sulfit als Elektronenakzeptor konnten nicht ermittelt werden, weil Stamm 1ac2 nicht mit Sulfit zu wachsen vermochte.

Die Ertragskoeffizienten von Stamm 1st1 mit Acetat und Sulfat sowie mit Acetat und Sulfit waren stets viel niedriger als die entsprechenden von Stamm 2ac9 (s. Abb. 38). Ferner wuchs Stamm 1st1 mit Acetat sehr viel langsamer als Stamm 2ac9, insbesondere, wenn Sulfat der Elektronenakzeptor war: Kulturen mit Acetat und Sulfat waren erst nach mehreren Wochen ausgewachsen und kamen in einer zweiten Passage gar nicht mehr zur Entwicklung. Mit Formiat, Butyrat und den höheren Fettsäuren waren die Wachstumsraten hingegen wesentlich höher. Mit Formiat als Elektronenakzeptor lieferte Stamm 1st1 selbst unter autotrophen Bedingungen höhere Erträge (s. Tab. 24 und 4.2.) als Desulfovibrio vulgaris (BADZIONG und THAUER, 1978) mit H_2 und der Kohlenstoffquelle Acetat. Weiterhin wurden mit Palmitat, welches ohne Ausscheidung von Acetat vollständig oxidiert wurde, bedeutend höhere Erträge erhalten als bei der unvollständigen Oxidation von Palmitat durch Stamm 1pa3 (s. Tab. 21). Die niedrigen Erträge von Stamm 1st1 mit Acetat können daher kaum ihre Ursache in einem ineffektiven, weitgehend entkoppelten Elektronentransport gehabt haben; auch die vollständige Oxidation, die wahrscheinlich über Acetyl-Coenzym A erfolgte, verlief sicherlich problemlos. Die Ergebnisse sprechen vielmehr dafür, daß Stamm 1st1 im Gegensatz zu den Stämmen 2ac9, 1ac2 und auch den übrigen mit Acetat isolierten Sulfatreduzierern über keinen sehr wirkungsvollen Mechanismus zur Aufnahme oder Aktivierung von Acetat verfügte. So könnten die Aufnahme oder die Aktivierung von Acetat einen übermäßig hohen Einsatz von ATP erfordern haben, also "energieaufwendig" in der vorher aufgezeigten Bedeutung gewesen sein. Weiterhin könnten die Aufnahme von Acetat oder die Synthese von Acetyl-Coenzym A der wachstumsbegrenzende Schritt gewesen sein und somit die Ursache für die beobachteten sehr niedrigen Wachstumsraten von Stamm 1st1 mit Acetat; der dadurch anteilmäßig erhöhte Erhaltungsstoffwechsel hätte ebenfalls zur Verminderung der Erträge beigetragen.

3.6. Fragestellungen für künftige biochemische Untersuchungen an Acetat-verwertenden Sulfatreduzierern

Auf die weiteren Reaktionsschritte, die der Bildung von Sulfit bzw. Acetyl-Coenzym A folgten, kann aus den thermodynamischen Berechnungen und den Ertragsmessungen nicht geschlossen werden; daß überhaupt Vermutungen über molekulare Vorgänge bei der Sulfatreduktion mit Acetat möglich waren, hatte seinen Grund in der Vorwegnahme von Erfahrungen aus der Biochemie. Über molekulare Vorgänge vermögen nämlich thermodynamische und wachstumsphysiologische Untersuchungen grundsätzlich nichts auszusagen, da diese nur makroskopische Eigenschaften erfassen. Die Sulfataktivierung zu APS, die APS-Reduktion zu Sulfit und auch die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-Coenzym A wurden als bereits bekannte Reaktionsschritte in anderen Organismen auch bei den Betrachtungen zur Sulfatreduktion mit Acetat zugrunde gelegt. Diese Annahmen dürften jedoch haltbar sein, denn andere Aktivierungsmechanismen für Sulfat bzw. Acetat sind bisher nicht bekannt geworden; auch bei der assimilatorischen Sulfatreduktion geht der Bildung von PAPS eine von APS voraus (s. A.2.3.). Die Folgerungen waren, daß das Pyrophosphat aus der APS-Bildung wahrscheinlich zumindest teilweise genutzt werden muß, und daß die Aktivierung von 1 mol Acetat nicht mehr als eine energiereiche Phosphatbindung von ATP kosten darf. Ein direkter Nachweis wäre durch biochemische Untersuchungen zu erbringen.

Weiterhin wäre zu erkunden, welche Reaktionen sich an die Bildung von Sulfit und die von Acetyl-Coenzym A anschließen, und wie diese schließlich zur Bildung von ATP führen. Die Frage, ob während der Sulfitreduktion intermediär Schwefelverbindungen verschiedener Oxidationsstufen gebildet werden, konnte bisher nicht einmal für die schon länger bekannten Sulfatreduzierer eindeutig beantwortet werden (SIEGEL, 1975; CHAMBERS und TRUDINGER, 1975). Von großem Interesse wäre auch, ob Acetat über den Tricarbonsäure-Cyclus oder zumindest eine Variante davon oxidiert wird, oder ob eine gänzlich andersartige, bisher noch unbekannte Reaktionsfolge stattfindet. Vielleicht ist auch

ein linearer, also nicht cyclischer Prozeß möglich, wie zum Beispiel eine Umkehrung des Prinzips der direkten Synthese von Acetat aus Kohlendioxid in Acetobacterium woodii (TANNER et al., 1978). Aufgrund thermodynamischer Betrachtungen können hier wiederum nur die äußeren Grenzen für die zur Diskussion stehenden Reaktionen abgesteckt werden: Wenn die dissimilatorische Sulfatreduktion mit Acetat zur Unterhaltung des Lebensprozesses einer Zelle dienen soll, so macht der verhältnismäßig geringe Betrag an freier Enthalpie dieser Reaktion ein hohes Maß an Ökonomie im Katabolismus erforderlich. Stark irreversible Einzelreaktionen machen sich bei Organismen mit sehr energiereichen Substraten im gesamten Katabolismus häufig kaum bemerkbar; bei der Sulfatreduktion mit Acetat hingegen würden die gleichen Reaktionsschritte bereits zu einer erheblichen Verminderung der Nettosynthese von ATP führen oder gar aus Gründen der Energiebilanz von vornherein nicht möglich sein.

Die Ertragsmessungen lassen vermuten, daß von allen isolierten Acetat-verwertenden Sulfatreduzierern in Stamm 2ac9 die besten Voraussetzungen gegeben waren für eine möglichst effektive Nutzung des Substratumsatzes für die ATP-Synthese. Dieses Maß an Ökonomie erreichte Stamm 2ac9 offensichtlich durch weitgehende Spezialisierung, wie die ernährungsphysiologischen Merkmale zeigen (s. Tab. 7): Stamm 2ac9 wuchs zwar von allen Acetat-verwertenden Sulfatreduzierern am besten, vermochte aber außer Acetat keine anderen Elektronendonatoren zu verwerten. Für eine enzymatische Untersuchung der Sulfatreduktion mit Acetat dürfte Stamm 2ac9 besonders geeignet sein, weil hier ein verhältnismäßig hoher Gehalt der spezifischen Enzyme erwartet werden kann.

4. Das Wachstum Sulfat-reduzierender Bakterien mit Kohlendioxid oder Formiat als einziger Kohlenstoffquelle

Mit der Anreicherung und Isolierung Sulfat-reduzierender Bakterien mit Fettsäuren bzw. Benzoat ist noch eine weitere, bei dieser Bakteriengruppe bisher unbekannte Stoffwechselleistung zutage getreten, ohne daß für diese selektive Bedingungen vorgegeben wurden: Der mit Acetat isolierte, Filament-bildende Stamm 5ac10 und der mit Benzoat isolierte Sarcinen-bildende Stamm 3be13 vermochten mit H_2 und CO_2 ebenso wie mit Formiat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen, also autotroph. Der vibrioide Stamm 1st1 und der coccoide Stamm 1be1, die mit Stearat bzw. Benzoat isoliert worden waren, vermochten keinen Wasserstoff zu verwerten, wuchsen aber mit Formiat ohne Zusatz einer weiteren organischen Kohlenstoffquelle. Dagegen hatten die übrigen isolierten Sulfatreduzierer, die H_2 oder Formiat verwerten konnten, eindeutig ein Bedürfnis für eine zusätzliche organische Kohlenstoffquelle gezeigt, die in Form von Acetat zugesetzt wurde.

Das Wachstum der Stämme 5ac10, 1st1, 1be1 und 3be13 mit H_2 und CO_2 bzw. mit Formiat ist vor allem deshalb von Interesse, weil bis heute nur wenige chemotrophe, obligat anaerobe Bakterien bekannt sind, die zu autotrophen Wachstum fähig sind; zu diesen zählten bisher einige Methanbakterien, nämlich Methanobacterium formicicum (MYLROIE und HUNGATE, 1955), Methanosarcina (s. C.7.1.) und Methanobacterium thermoautotrophicum (ZEIKUS und WOLFE, 1972), sowie ferner Clostridium aceticum (WIRINGA, 1940; BRAUN, 1979) und Acetobacterium woodii (BALCH et al., 1977; BRAUN, 1979).

In der Vergangenheit wurde allerdings auch schon einige Male von Sulfatreduzierern berichtet, die mit H_2 und CO_2 autotroph zu wachsen vermochten (BUTLIN und ADAMS, 1947; SISLER und ZOBELL, 1950, 1951); die Stämme blieben jedoch nicht erhalten. Seit den genaueren Untersuchungen von POSTGATE (1960) sowie MECHALAS und RITTENBERG (1960) wurde die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zu autotrophen Wachstum wieder in Frage

gestellt. SOROKIN (1966 a,b,c) zeigte, daß Sulfat-reduzierende Bakterien nicht nur für das Wachstum mit H_2 und CO_2 , sondern auch für das mit Formiat eine zusätzliche organische Kohlenstoffquelle benötigten, wie z. B. Acetat; nur ein Drittel des Zell-Kohlenstoffs entstammte einer CO_2 -Fixierung.

Aufgrund der neu isolierten Sulfatreduzierer darf nun wieder angenommen werden, daß die vormals von BUTLIN und ADAMS sowie SISLER und ZOBELL untersuchten Stämme tatsächlich autotroph wuchsen. Andererseits kann es sich aber auch um nicht autotrophe Sulfatreduzierer gehandelt haben, deren Kulturen noch andere Bakterien enthielten. Weil Acetat eine häufig verwertete Kohlenstoffquelle ist, wäre als Kontaminante ein Bakterium wie Acetobacterium woodii denkbar, das aus H_2 und CO_2 Acetat gebildet hätte. Eine solche Mischkultur müßte stabil sein, denn Sulfatreduzierer wachsen mit H_2 schneller (Verdopplungszeit 4 bis bis 5 h, s. BADZIONG und THAUER, 1978) als Acetobacterium woodii (Verdopplungszeit 14 bis 15 h, s. BRAUN, 1979): Der Sulfatreduzierer wäre auf das durch Acetobacterium gebildete Acetat angewiesen, sodaß das Acetat-bildende Bakterium die Wachstumsrate der Mischkultur bestimmen würde.

Bevor nun auf die in den autotrophen Sulfatreduzierern eventuell möglichen Fixierungsmechanismen für CO_2 eingegangen wird, sollen die verschiedenen bekannten Wege der Assimilation von C_1 -Verbindungen kurz dargestellt werden.

4.1. Bekanntes Assimilationswege für CO_2 und reduziertere C_1 -Verbindungen

Als autotroph (C-autotroph) bezeichnet man solche Lebewesen, die ihre gesamte oder zumindest den größten Teil ihrer Zellmasse aus CO_2 synthetisieren können; dabei wird die Besonderheit der Autotrophie häufig darin gesehen, daß eine rein anorganische Verbindung zum Aufbau organischer Zellbestandteile verwertet werden kann. Wird dagegen die Zellmasse vollständig oder größtenteils aus organischen Verbindungen gebildet, so

spricht man von heterotrophen Organismen. Demnach wären auch die neuen Sulfatreduzierer mit den Stammbezeichnungen 5ac10 und 3be13 als autotroph zu bezeichnen.

Häufig ähnelt aber auch das Wachstum mit Formiat sehr dem mit H_2 und CO_2 , obwohl Formiat eine organische Verbindung ist. Diese Ähnlichkeit zeigt sich ernährungsphysiologisch anhand zahlreicher Bakterien, die sowohl H_2 als auch Formiat verwerten können: Benötigt ein derartiges Bakterium für das Wachstum mit H_2 eine organische Kohlenstoffquelle, so muß diese auch zugesetzt werden, wenn das Bakterium mit Formiat wächst; Beispiele sind die von SOROKIN (1966 a,b,c) untersuchten Sulfatreduzierer, die neu isolierten Stämme 3pr10 und 2be1 (s. Tab. 7 und 9) und das unter C.7.1. erhaltene Methanospirillum. Kann hingegen ein Bakterium mit H_2 und CO_2 autotroph wachsen, so wird auch für das Wachstum mit Formiat keine weitere organische Kohlenstoffquelle benötigt; als Beispiele hierfür wären das Knallgasbakterium Alcaligenes eutrophus (FRIEDRICH et al., 1979), phototrophe Purpurbakterien (SIEFERT und PFENNIG, 1979), Acetobacterium woodii (BALCH et al., 1977), Methanobacterium formicicum (MYLROIE und HUNGATE, 1955) und schließlich auch die neu isolierten Sulfatreduzierer 5ac10 und 3be13 zu nennen. Offenbar verlangt eine Zellsynthese allein aus Formiat dieselben Stoffwechselfähigkeiten wie ein autotrophes Wachstum mit H_2 und CO_2 .

Biochemisch ist der enge Zusammenhang einer Verwertung von Formiat mit der von H_2 und CO_2 durchaus verständlich. Bei einem Wachstum mit Formiat wird dieses nämlich in vielen Fällen zuerst zu CO_2 dehydrogeniert, wie zum Beispiel in Knallgasbakterien (FRIEDRICH et al., 1979) oder phototrophen Purpurbakterien (STOKES und HOARE, 1969; SIEFERT und PFENNIG, 1979). Sogar Methanol wird von einigen Bakterien, wie Micrococcus denitrificans (COX und QUAYLE, 1975) oder Rhodopseudomonas acidophila (SIEFERT und PFENNIG, 1979) vor der Assimilation zunächst zu CO_2 oxidiert. Wenn keine weiteren organischen Verbindungen zugegen sind, stehen die genannten Bakterien somit vor dem gleichen Problem wie bei einem Wachstum mit H_2 und CO_2 : Die Zell-

substanz muß ausschließlich aus dem anorganischen CO_2 synthetisiert werden. In Rhodopseudomonas palustris ist das dehydrogenierende Enzym, die Formiat-Dehydrogenase, Bestandteil eines Multienzym-Komplexes, der sogenannten Formiat-Hydrogenlyase (STOKES und HOARE, 1969); dieser Komplex enthält auch Hydrogenase, sodaß intermediär aus Formiat wahrscheinlich sogar molekularer Wasserstoff entsteht. Aus thermodynamischen Daten (s. THAUER et al., 1977) berechnet man, daß die Reaktion von Formiat zu H_2 (1 atm) und CO_2 (gelöst) bei einem pH-Wert von 7.0 schwach endergonisch ist, bei einem pH-Wert von 6.0 aber bereits schwach exergonisch. Man erkennt daraus, daß die Umsetzung unter physiologischen Bedingungen nahe dem Gleichgewichtszustand erfolgt: Nur geringfügige Änderungen der Konzentrationsverhältnisse oder des pH-Werts entscheiden darüber, in welcher Richtung die Bruttoreaktion abläuft. So vermag die Formiat-Dehydrogenase auch umgekehrt die Reduktion von CO_2 zu Formiat zu katalysieren und so als CO_2 -Reduktase zu fungieren (THAUER et al., 1976). Formiat kann man also als ein Äquivalent für H_2 und CO_2 auffassen und ein Wachstum mit Formiat als der einzigen organischen Kohlenstoffquelle durchaus als autotroph bezeichnen.

Ein möglicher Einwand gegen eine derartige Ausweitung des Begriffs "autotroph" wäre, daß methylotrophe Bakterien Formiat durch direkte Reduktion über die Stufe von Formaldehyd assimilieren (RIBBONS et al., 1970; ANTHONY, 1978), sodaß intermediär kein anorganisches CO_2 auftritt. Andererseits wird aber auch beim Wachstum von Acetobacterium woodii mit H_2 das vorhandene CO_2 durch direkte Reduktion assimiliert, wobei Formiat als erstes Intermediärprodukt gebildet wird (TANNER et al., 1978); niemand würde jedoch das Wachstum von Acetobacterium woodii mit Formiat anstelle von H_2 und CO_2 nur deshalb als heterotroph bezeichnen, weil der Zelle nunmehr ein einziger und zudem noch thermodynamisch reversibler Schritt erspart bleibt, nämlich die Reduktion von CO_2 zu Formiat.

Die Definition des autotrophen Wachstums als das mit anorganischem CO_2 als Kohlenstoffquelle ermöglicht also nicht immer eine eindeutige Abgrenzung gegenüber dem heterotrophen Wachstum. Man könnte daher fragen, ob denn nun "Autotrophie" in der genannten Weise wirklich sinnvoll definiert ist; denn schließlich soll mit der Definition die Besonderheit einer Syntheseleistung ausgedrückt werden, zu welcher heterotrophe Organismen nicht fähig sind.

Beim Wachstum mit CO_2 als alleiniger Kohlenstoffquelle, aber auch bei der Verwertung von Formiat, Methanol oder Methan, müssen C-C-Bindungen aus C_1 -Verbindungen synthetisiert werden. Am längsten und genauesten bekannt sind Assimilationswege, bei welchen die C_1 -Verbindungen direkt an höhere organische Verbindungen addiert werden, die bereits mindestens eine C-C-Bindung enthalten. Aus dem entstandenen Produkt wird schließlich eine intermediäre Ausgangsverbindung für die zahlreichen Synthesereaktionen gebildet. Wenn ausschließlich C_1 -Verbindungen zur Verfügung stehen, so muß pro assimiliertes C_1 -Molekül auch wieder ein neues Akzeptormolekül bereitgestellt werden. Das Resultat sind cyclische Prozesse, welche C_1 -Verbindungen aufnehmen und in Form höherer organischer Produkte wieder abgeben. Für die autotrophe Fixierung von CO_2 ist der Calvin-Cyclus zweifellos der am weitesten verbreitete und zugleich bedeutendste Weg. So assimilieren grüne Pflanzen und Cyanobakterien sowie die chemotrophen Knallgasbakterien, Thiobacilli und Nitrifizierer CO_2 über den Calvin-Cyclus. Auch in den anoxygenen phototrophen Purpurbakterien, den Rhodospirillaceae und Chromatiaceae, wird der größte Teil von CO_2 über den Calvin-Cyclus fixiert (PFENNIG, 1967); ob auch die phototrophen grünen Schwefelbakterien, die Chlorobiaceae, CO_2 auf die gleiche Weise fixieren, ist aufgrund widersprüchlicher Beobachtungen (SMILLIE et al., 1962; BUCHANAN und SIREVÅG, 1976) ungewiß. Als wesentlicher Weg für die Fixierung von CO_2 in den Chlorobiaceae wurde ein rückläufiger, reduktiver Tricarbonsäure-Cyclus vorgeschlagen (EVANS et al., 1966; SIREVÅG, 1974), der vielleicht auch noch in Purpurbakterien neben dem Calvin-Cyclus eine gewisse Rolle spielt (BUCHANAN et al., 1967). Die Existenz eines solchen reduktiven

Tricarbonsäure-Cyclus muß jedoch zur Zeit noch als nicht endgültig bewiesen gelten, wie Ergebnisse von BEUSCHER und GOTTSCHALK (1972) zeigen. Methylotrrophe Bakterien assimilieren C_1 -Verbindungen nicht als CO_2 , sondern als Formaldehyd. Als Mechanismen sind zwei cyclische Prozesse bekannt, der Serin-Weg und der Ribulosemonophosphat-Weg (QUAYLE, 1972; STRØM et al., 1974); vom Ribulosemonophosphat-Weg sind zwei Varianten denkbar, nämlich eine Nettosynthese von Dihydroxyacetonphosphat und eine von Pyruvat.

Ein gänzlich anderes Prinzip der Fixierung von C_1 -Verbindungen stellt die in Acetobacterium woodii dar (TANNER et al., 1978), wobei wahrscheinlich zwei C_1 -Körper direkt zu einer C_2 -Einheit kondensiert werden. Der Mechanismus dient sowohl der ATP-Gewinnung als auch der Assimilation. CO_2 wird zu Formiat und dieses an Tetrahydrofolsäure weiter bis zur Methylgruppe reduziert; die Methylgruppe wird auf ein Corrinoid übertragen und in einer Transcarboxylase-Reaktion mit CO_2 aus Pyruvat zu Acetat carboxyliert. Durch eine solche direkte Carboxylierung einer Methylgruppe können auch Clostridium formicoaceticum und Clostridium thermoaceticum (LJUNGDAHL und ANDREESEN, 1976) sowie Clostridium acidiurici und Clostridium cylindrosporum (WAGNER und ANDREESEN, 1977) Acetat synthetisieren; doch wachsen diese Clostridien heterotroph mit Kohlenhydraten bzw. mit Purinen, und die Bildung von Acetat aus CO_2 findet neben den Gärungsreaktionen statt.

Angesichts des enzymatischen Aufwands, den das Wachstum mit einer der C_1 -Verbindungen als der alleinigen Kohlenstoffquelle erfordert, erscheint es unwesentlich, ob dabei von CO_2 oder von Formiat ausgegangen wird. Anorganisches CO_2 wird immerhin auch in heterotrophen Organismen durch zahlreiche Carboxylierungsreaktionen eingebaut; in den von SOROKIN (1966 a,b,c) untersuchten heterotrophen Sulfatreduzierern trug CO_2 sogar erheblich zur Bildung organischer Zellbestandteile bei. Daher soll hier das Wachstum der neu isolierten Sulfatreduzierer auch dann als autotroph bezeichnet werden, wenn Formiat alleinige organische Kohlenstoffquelle ist.

1.2. Einige Betrachtungen über mögliche Assimilationswege in den autotrophen Sulfatreduzierern

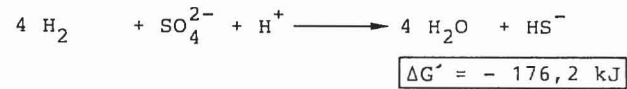
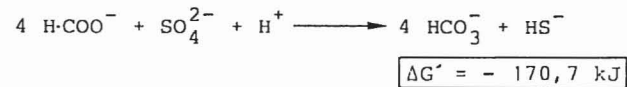
Die direkte Synthese von Acetat aus H_2 und CO_2 in Acetobacterium woodii (s. o.) ist bisher der einzige genauer bekannte Weg für eine autotrophe Fixierung von CO_2 in chemotrophen obligaten anaerobiern. Ob derselbe Mechanismus auch in den autotrophen Methanbakterien stattfindet, ist ungewiß (s. ZEIKUS, 1977).

Eine CO_2 -Fixierung über den Calvin-Cyclus gilt sowohl in Methanbakterien als auch in Acetobacterium woodii als sehr unwahrscheinlich. In den neuen Sulfatreduzierern 1st1 und 3be13 konnte ebenfalls nicht das entscheidende Enzym des Calvin-Cyclus, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, nachgewiesen werden (B. BOWIEN, persönliche Mitteilung). Das Fehlen eines Calvin-Cyclus in chemotrophen anaeroben Bakterien könnte aus bioenergetischer Sicht erklärt werden: In diesen Lebewesen stellt nämlich die Umsetzung eines bestimmten Substrats weit weniger Energie für die ATP-Synthese zur Verfügung als eine Oxidation des gleichen Substrats mit Sauerstoff oder gar die Photosynthese. Ein Calvin-Cyclus wäre für chemotrophe Anaerobier somit ein sehr kostspieliger Assimilationsweg, denn die Bildung von 1 mol Glycerinaldehyd-3-phosphat aus 3 mol CO_2 verbraucht 9 mol ATP. Wesentlich ökonomischer wäre dagegen die CO_2 -Fixierung durch direkte Synthese von Acetat; diese Reaktion findet in Acetobacterium woodii sogar der Energiekonservierung. Man kann sich daher vorstellen, daß für die Zellsynthese in solchen Acetat-bildenden Bakterien sogar Acetyl-Coenzym A aus H_2 und CO_2 bzw. Formiat gebildet werden kann, ohne daß ein Nettoverbrauch von ATP notwendig wäre. Um von 1 mol Acetyl-Coenzym A zu 1 mol Triosephosphat zu gelangen, z. B. über die Reaktion der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pyruvat-Synthase) als den nächsten Schritt, wären nur noch 3 mol ATP erforderlich. Energetisch ebenfalls sehr günstig für das autotrophe Wachstum wäre vielleicht der Ribulosemonophosphat-Weg, und zwar die Variante über die Reaktion der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase: Für die Bildung von 1 mol Dihydroxyacetonphosphat aus 3 mol Formaldehyd wird nur 1 mol ATP verbraucht; beim Wachstum mit H_2 und CO_2 bzw. mit Formiat wäre allerdings der endergoni-

sche Schritt von Formiat zu Formaldehyd zu berücksichtigen: Diese Reaktion würde über die Bildung von Formyltetrahydrofol-säure 1 mol ATP pro mol Formiat verbrauchen (s. THAUER et al., 1977). Somit wären für die Synthese von 1 mol Triosephosphat aus 3 mol CO_2 oder 3 mol Formiat über den Ribulosemonophosphat-Weg 4 mol ATP erforderlich. Die Bildung von 1 mol Acetyl-Coenzym A aus 2 mol CO_2 über den reduktiven Tricarbonsäure-Cyclus würde 2 mol ATP verbrauchen, die von 1 mol Triosephosphat demnach 5 mol ATP. Bereits weniger ökonomisch, wenn auch immer noch etwas günstiger als der Calvin-Cyclus, wäre der Serin-Weg: Die Synthese von 1 mol Acetyl-Coenzym A aus 2 mol Formaldehyd kostet 2 mol ATP, die von 1 mol Triosephosphat also 5 mol ATP; wenn nicht Formaldehyd das Substrat ist, sondern CO_2 oder Formiat, so wären 7 mol ATP für die Synthese von 1 mol Triosephosphat erforderlich.

Welcher der aufgezeigten Fixierungsmechanismen in den neu isolierten Sulfatreduzierern stattfand, kann aufgrund der Experimente zur Autotrophie, die im Rahmen dieser Arbeit möglich waren, nicht gesagt werden; schließlich muß auch damit gerechnet werden, daß es noch weitere, bisher unbekannte Wege für eine Synthese von Zellbestandteilen aus C_1 -Verbindungen gibt. Die erhaltenen Daten lassen lediglich einige Spekulationen über das Prinzip der Assimilation von CO_2 bzw. Formiat in den autotrophen Sulfatreduzierern zu:

Unter C.5. wurden die Erträge des Sulfatreduzierers 1st1 mit Formiat als dem einzigen organischen Substrat bestimmt. Die Sulfatreduktion mit Formiat gleicht energetisch der mit Wasserstoff als Elektronendonator. Für die folgenden Reaktionsgleichungen wurden wiederum die gleichen Konzentrationen wie unter 3.2. und 3.3. zugrunde gelegt:



T = 298 °K; p = 1 atm; pH = 7.0; Partialdruck von Wasserstoff: 1 atm;
Konzentration von Formiat, Sulfat, Bicarbonat und Sulfid: 0,01 mol/l

Die bei der Reduktion von Sulfat mit Formiat zur Verfügung stehende freie Enthalpie ist nur um ca. 3 bis 4 % niedriger als die einer Sulfatreduktion mit molekularem Wasserstoff. Daher liegt es nahe, für einen Vergleich die von BADZIONG und THAUER (1978) mit Desulfovibrio vulgaris bestimmten Ertragskoeffizienten hinzuzuziehen, wobei H₂ als Elektronendonator und Acetat als Kohlenstoffquelle gedient hatten; Desulfovibrio vulgaris vermochte nämlich nicht autotroph zu wachsen. Weil für Stamm 1st1 nur Ertragskoeffizienten für reale, endliche Wachstumsraten bestimmt wurden, können hier leider nicht die maximalen Ertragskoeffizienten gegenübergestellt werden, welche man durch Extrapolation auf unendlich hohe Wachstumsraten ermittelt. Für den Vergleich sollen hier die Erträge auf die molare Menge an reduziertem Sulfat bezogen werden (Fo. steht hier für Formiat; Gebrauch der Symbole s. auch 3.5.):

Desulfovibrio vulgaris (BADZIONG und THAUER, 1978):

$$Y_{\text{Sulfat}}(\text{H}_2) \leq 8,3 \text{ g/mol (reale Wachstumsraten)}$$

$$Y_{\text{Sulfat}}^{\text{max}}(\text{H}_2) = 12,2 \text{ g/mol (unendl. hohe Wachstumsrate)}$$

Stamm 1st1 (s. Tab. 24):

$$Y_{\text{Sulfat}}(\text{Fo.}) \leq 12,1 \text{ g/mol (reale Wachstumsraten)}$$

$$Y_{\text{Sulfat}}^{\text{max}}(\text{Fo.}) = ? \quad (\text{unendl. hohe Wachstumsrate})$$

Der Ertragskoeffizient von Stamm 1st1 war unter autotrophen Bedingungen bereits bei realen Wachstumsraten fast ebensohoch wie der von Desulfovibrio vulgaris mit Acetat als Kohlenstoffquelle bei der hypothetischen unendlich hohen Wachstumsrate. $Y_{\text{Sulfat}}^{\text{max}}$ (Fo.) von Stamm 1st1 unter autotrophen Bedingungen dürfte daher noch etwas höher liegen als $Y_{\text{Sulfat}}^{\text{max}}(\text{H}_2)$ von Desulfovibrio vulgaris mit Wasserstoff und Acetat. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß Stamm 1st1 ohne einen Nettoaufwand von ATP aus dem Formiat ein Produkt für die Zellsynthese bildete, das energetisch noch günstiger war als Acetat. Andererseits wäre es auch möglich, daß Stamm 1st1 den Elektronentransport zum Sulfat mit einem noch höheren Wirkungsgrad zu nutzen verstand oder einen höheren Y_{ATP} -Wert (Zellmasse pro ATP) hatte als Desulfovibrio vulgaris. Aber selbst dann dürfte die Assimilation von Formiat zumindest bis zu einem angenommenen Intermediärprodukt Acetat kein ATP verbrauchen.

Zum Schluß des Kapitels über Autotrophie sei noch auf einen möglichen Zusammenhang hingewiesen, der zwischen der Fähigkeit zum autotrophen Wachstum und der zur vollständigen Oxidation organischer Substrate bestand: Alle Stämme, die autotroph zu wachsen vermochten, waren nämlich auch imstande, Acetat und andere organische Verbindungen vollständig zu CO₂ zu oxidieren; das Umgekehrte galt allerdings nicht immer, denn nicht alle zur vollständigen Oxidation fähigen Sulfatreduzierer vermochten autotroph zu wachsen (s. Tab. 7 - 9). Dennoch liegt es nahe, daß einige Stoffwechselwege für die vollständige Oxidation unter autotrophen Bedingungen auch umgekehrt wieder für eine vollständige Synthese organischer Zellbestandteile allein aus CO₂ genutzt werden können.

5. Die Verwertung aromatischer Verbindungen durch Sulfat-reduzierende Bakterien und die Bedeutung besonderer Spurenelemente

Mit Benzoat wurden vier morphologisch sehr unterschiedliche Arten Sulfat-reduzierender Bakterien isoliert, nämlich coccoide, ovale, Sarcinen-bildende und Filament-bildende Zelltypen. Diese Stämme, 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13, vermochten außer Benzoat auch nahezu alle organischen Substrate der übrigen, mit Fettsäuren isolierten Sulfatreduzierer zu verwerten. Dagegen wuchs keiner der mit Fettsäuren isolierten Sulfatreduzierer mit Benzoat. Daher muß die besondere biochemische Leistung der Stämme 1be1, 2be1, 3be13 und 4be13 darin gesehen werden, daß Verbindungen mit dem aromatischen C₆-Ringsystem abgebaut werden konnten. Benzoat wurde ebenso wie die anderen verwertbaren Verbindungen vollständig zu Kohlendioxid oxidiert.

Schon seit langem sind viele aerobe Bakterien bekannt, die mit homocyclischen aromatischen Verbindungen gut zu wachsen vermögen. Berichte über den anaeroben Abbau dieser Substanzen sind dagegen seltener. Reinkulturen, die aromatische Verbindungen anaerob verwerteten, waren bisher nur denitrifizierende Bakterien und phototrophe Purpurbakterien: Arten von Pseudomonas (TAYLOR und HEEB, 1972) und Moraxella (WILLIAMS und EVANS, 1975) bauten Benzoat in Gegenwart von Nitrat ab. Rhodopseudomonas palustris (DUTTON und EVANS, 1967), Rhodospirillum fulvum (PFENNIG et al., 1965) und Rhodocyclus purpureus (PFENNIG, 1978) assimilierten Benzoat mit Hilfe der Lichtenergie. Die einzige, darüber hinaus noch bekannte Möglichkeit für eine anaerobe Verwertung aromatischer Verbindungen war bislang die Umsetzung zu Methan durch Mischpopulationen (TARVIN und BUSWELL, 1934; FINA und FISKIN, 1960; NOTTINGHAM und HUNGATE, 1969; MERRY und WOLFE, 1976; FINA et al., 1978; KEITH et al., 1978; HEALY und YOUNG, 1978, 1979). Die aromatischen Verbindungen können von Methanbakterien nicht direkt abgebaut werden, denn diese Gruppe von Mikroorganismen verwertet nur Wasserstoff, Kohlendioxid und wenige einfache organische Verbindungen wie Formiat, Acetat oder Methanol (WOLFE, 1971; ZEIKUS, 1977).

Eine Umsetzung aromatischer Verbindungen zu Methan ist nur in syntrophen Mischkulturen mit anderen, sogenannten H₂-bildenden acetogenen Bakterien möglich, die im Falle von Benzoat bisher noch nicht isoliert werden konnten; diese Bakterien bilden aus den aromatischen Verbindungen die Substrate für die Methanbakterien. Berichte über die Verwertung aromatischer Verbindungen durch Sulfatreduzierer sind bislang nicht bekannt geworden.

5.1. Vermutungen über den Abbauweg von Benzoat unter Beteiligung der Spurenelemente Selen und Molybdän

Aerobe Bakterien leiten den Abbau aromatischer Verbindungen ein, indem Sauerstoff aus der Luft über Mono- oder Dioxigenasen in das aromatische System direkt eingeführt wird. Unter anaeroben Bedingungen sind jedoch andere Mechanismen für die Ringspaltung erforderlich. Man nimmt heute an, daß der Abbau aromatischer Verbindungen, wie zum Beispiel der von Benzoat, in anaeroben Bakterien immer mit einer Reduktion (Hydrogenierung) des Benzolrings beginnt (EVANS, 1977; KEITH et al., 1978). Aus Benzoat entsteht somit zunächst Cyclohexancarboxylat (Cyclohexancarbonsäure). Erst dann wird der Ring auf eine noch nicht ganz geklärte Weise gespalten. Als weitere Intermediärprodukte werden sowohl Dicarbonsäuren, wie Adipat oder Pimelat, als auch Fettsäuren, wie Capronat oder Heptanat, diskutiert.

Experimente zur Biochemie des Abbauwegs von Benzoat in den neu isolierten Sulfatreduzierern wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Aus wachstumsphysiologischen Untersuchungen ging jedoch hervor, daß in mehreren Fällen ein eindeutiger Zusammenhang bestand zwischen der Verwertung aromatischer Substrate und einem Bedürfnis für die Spurenelemente Selen und Molybdän (s. C.6.1.). Vergleicht man nun diese Beobachtungen mit anderen Berichten über die wahrscheinlichen biochemischen Funktionen von Selen und Molybdän, so sind einige Spekulationen über den Abbau der aromatischen Verbindungen in den Sulfatreduzierern möglich.

Der Stamm 1be1 benötigte für die Verwertung von Benzoat und der Homologen Phenylacetat und 3-Phenylpropionat als Spurenelemente Selen und Molybdän, die als Selenit bzw. Molybdat angeboten wurden. Für das Wachstum mit Alkoholen, Formiat, Acetat, höheren Fettsäuren und Lactat brauchten dagegen weder Selen noch Molybdän zugesetzt zu werden, ebensowenig für das Wachstum mit Cyclohexancarboxylat. Offenbar waren Selen und Molybdän speziell für Reaktionen am aromatischen Ring erforderlich. Man kann nun aufgrund dieser Beobachtungen zwei Hypothesen über den ersten Schritt beim Abbau von Benzoat entwickeln:

1) Beispiele für eine gleichzeitige Beteiligung von Selen und Molybdän im Stoffwechsel von Bakterien sind die Formiat-Dehydrogenase und Nitrat-Reduktase in Escherichia coli (PINSENT, 1954; ENOCH und LESTER, 1972) und die Formiat-Dehydrogenase in Clostridium cylindrosporum (WAGNER und ANDREESEN, 1977); die Aktivität dieser Enzyme wurde durch Gegenwart von Selen und Molybdän während des Wachstums stark gesteigert. Zwischen der Dehydrogenierung von Formiat bzw. der Hydrogenierung von CO_2 und dem Abbau eines aromatischen C_6 -Ringes sind jedoch kaum Gemeinsamkeiten zu erkennen. Wesentlich mehr Ähnlichkeit hat der Abbau von Benzoat dagegen mit dem von Nicotinat oder Xanthin, denn diese Verbindungen sind ebenfalls Ringsysteme (Pyridin- bzw. Purin-Ring) mit aromatischem Charakter: Die optimale Aktivität der Nicotinsäure-Hydroxylase in Clostridium barkeri (IMHOFF und ANDREESEN, 1979) und die der Xanthin-Dehydrogenase in Clostridium acidurici und Clostridium cylindrosporum (WAGNER und ANDREESEN, 1979) wurde erst durch Zusatz von Selen zum Kulturmedium erreicht; eine Wirkung von Molybdän auf die Aktivität dieser Enzyme wurde nicht beobachtet, darf aber angenommen werden. In der Xanthin-Dehydrogenase von Neurospora crassa (LYON und GARRET, 1978) wurde Molybdän direkt als Bestandteil des Moleküls nachgewiesen; Selen wurde allerdings nicht erwähnt. Nach ANDREESEN (1978) sowie WAGNER und ANDREESEN (1979) ist Selen als dissoziierte Se^- -Gruppe eines Selenol-Enzyms wirksam und katalysiert die Einführung einer OH-Gruppe, also eine Hydroxylierung des Ringsystems; an dieser Oxidation könnte Molybdän als der primäre Elektronenakzeptor beteiligt

sein und dabei einen vorübergehenden Valenzwechsel von +6 nach +4 erfahren. Nimmt man eine ähnliche Funktion von Selen und Molybdän auch bei der Verwertung von Benzoat durch Stamm 1be1 an, so wäre der erste Schritt beim Abbau keine Reduktion zu Cyclohexancarboxylat gewesen, sondern eine Hydroxylierung des aromatischen Ringes. Wäre nämlich das erste Produkt Cyclohexancarboxylat gewesen, so hätte die OH-Gruppe noch in einer der folgenden Reaktionen eingeführt werden müssen; dann wären Selen und Molybdän auch für den Abbau von Cyclohexancarboxylat erforderlich gewesen, was aber nicht nachgewiesen werden konnte. Wenn der aromatische Ring zuerst hydroxyliert wurde, so konnte Cyclohexancarboxylat schwerlich ein weiteres Folgeprodukt gewesen sein; demnach müßte Cyclohexancarboxylat durch Stamm 1be1 über einen anderen Abbauweg verwertet worden sein als Benzoat, zumindest bis zur Spaltung des Ringes. 3-Hydroxybenzoat und 4-Hydroxybenzoat wurden von Stamm 1be1 nicht oxidiert; dagegen war ein Wachstum mit 2-Hydroxybenzoat (Salicylat) möglich. Für die Verwertung von 2-Hydroxybenzoat wurde nur Molybdän, jedoch kein Selen benötigt. Man könnte aus diesen Ergebnissen in Übereinstimmung mit ANDREESEN und WAGNER (s. o.) schließen, daß die Funktion von Selen tatsächlich darin bestand, die OH-Gruppe in das Ringsystem einzuführen, und zwar in 2-Stellung. 2-Hydroxybenzoat wäre somit das erste Intermediärprodukt gewesen, für dessen weiteren Abbau kein Selen mehr nötig war. Auf eine Beteiligung von Molybdän an der Hydroxylierung von Benzoat kann aufgrund der wachstumsphysiologischen Beobachtungen nicht geschlossen werden, denn Molybdän war offensichtlich auch am Abbau von 2-Hydroxybenzoat beteiligt. Wenn nun der Abbau als erstes Intermediärprodukt 2-Hydroxybenzoat lieferte, so hätte dieses mindestens ebensoschnell wie Benzoat umgesetzt werden müssen. Beobachtet wurde jedoch das Gegenteil, nämlich, daß Stamm 1be1 mit 2-Hydroxybenzoat viel langsamer wuchs als mit Benzoat. Um die dargestellte Hypothese aufrecht erhalten zu können, müßte man annehmen, daß die Aufnahme von 2-Hydroxybenzoat in die Zelle dem Bakterium Schwierigkeiten bereitete und der wachstumsbegrenzende Schritt war.

2) Eine zweite Hypothese wäre, daß der erste Schritt der Umsetzung von Benzoat durch Stamm 1be1 die Reduktion zu Cyclohexancarboxylat war. Nun wurde aber für ein Wachstum mit Cyclohexancarboxylat kein Bedürfnis für Selen und Molybdän nachgewiesen. Aus dieser Beobachtung würde dann folgen, daß Selen und Molybdän nur an der Hydrogenierung des aromatischen Ringes mitwirkten. Für eine biochemische Reduktion eines aromatischen Ringesystems unter Beteiligung von Selen oder Molybdän sind jedoch in der Literatur bisher keine Beispiele bekannt geworden.

Stamm 3bc13 benötigte für die Verwertung von Benzoat nur Molybdän, jedoch kein Selen; für das Wachstum mit Heptanat oder Lactat war auch kein Zusatz von Molybdän erforderlich. Bei der Prüfung von Stamm 2be1 gaben nur einige Versuchsansätze einen Hinweis auf ein eventuelles Bedürfnis für Selen und Molybdän; das Wachstum dieses Sulfatreduzierers mit Heptanat oder Lactat war stets eindeutig unabhängig von einem Zusatz der Spurenelemente. Der fädige Sulfatreduzierer 4be13 schließlich benötigte Selen oder Molybdän ebensowenig für das Wachstum mit Benzoat wie für das mit nicht aromatischen Substraten. Aufgrund dieser Beobachtungen kann man nun einerseits vermuten, daß den Stämmen 3be13, 2be1 und 4be13 bereits geringste Verunreinigungen in den Kulturgefäßen oder den Chemikalien genügten, den Bedarf an Selen bzw. Selen und Molybdän zu decken; dafür sprechen insbesondere die von Mal zu Mal unterschiedlich ausgefallenen Wachstumsergebnisse mit Stamm 2be1, wenn kein Selen und kein Molybdän zugesetzt worden waren. Andererseits sind in diesen Bakterien aber auch Abbauwege für Benzoat denkbar, an denen kein Selen bzw. weder Selen noch Molybdän beteiligt waren. Ein Hinweis auf verschiedene Abbauwege könnte auch bereits darin gesehen werden, daß sich die Stämme 1bc1, 2be1, 3be13 und 4be13 in der Fähigkeit zur Verwertung der drei Hydroxybenzoate und von Cyclohexancarboxylat unterschieden (s. Tab. 9); diese ernährungsphysiologischen Differenzen könnten allerdings ebensogut mit verschiedenen Aufnahmemechanismen erklärt werden.

Die mit Benzoat isolierten Sulfatreduzierer verwerteten alle Capronat oder Heptanat, jedoch kein Adipat und kein Pimelat. Dennoch ist der Schluß unzulässig, daß die Dicarbonsäuren deshalb keine Intermediärprodukte beim Abbau von Benzoat gewesen sein konnten. Die negativen Wachstumsergebnisse mit Adipat und Pimelat konnten nämlich wiederum darauf beruhen, daß die Bakterien nicht zur Aufnahme dieser Verbindungen fähig waren.

5.2. Wirkung von Molybdän, Selen und chemisch ähnlichen Elementen in verschiedenen Konzentrationsbereichen

Mit Stamm 1be1 wurde die Wirkung von Selen und Molybdän in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstum mit Benzoat ermittelt. Parallel dazu wurde in analoger Weise untersucht, wie Elemente, die im chemischen Verhalten eine gewisse Ähnlichkeit mit Selen oder Molybdän zeigen, das Wachstum auf Benzoat beeinflussen (s. C.6.2.). Dabei stellte sich heraus, daß Tellur in etlichen Fällen anstelle von Selen eine ebensogute positive Wirkung auf das Wachstum mit Benzoat hatte. Molybdän konnte sogar stets durch Wolfram ersetzt werden. Obwohl Wolfram bereits in einer geringeren Konzentration wirksam war als Molybdän, war das Wachstum von Stamm 1be1 auf Benzoat bei einer ausreichenden Molybdän-Konzentration immer noch etwas besser als bei irgendeiner Konzentration an Wolfram. Andere Elemente, die in einigen chemischen Eigenschaften dem Molybdän ähneln, wie Vanadin, Chrom, Rhenium oder Uran, waren ohne Wirkung. Tellur erwies sich als das giftigste der eingesetzten Elemente, denn das Wachstum von Stamm 1be1 wurde schon häufig durch eine Tellur-Konzentration von 10^{-7} mol/l gehemmt. Die wachstumshemmende Wirkung von Selen machte sich ab etwa 10^{-6} mol/l bemerkbar; somit muß auch Selen als ein verhältnismäßig starkes Gift für Stamm 1be1 angesehen werden, obwohl es andererseits wieder ein essentielles Spurenelement war. Molybdän und Wolfram wurden dagegen noch in höheren Konzentrationen ertragen. Die wachstumshemmende Konzentration von Molybdän wie auch die von Wolfram lag mit etwa 10^{-4} mol/l in der Größenordnung, die auch HUISINGH und MATRONE (1972) bestimmt hatten; in der Arbeit

dieser Autoren war die antagonistische Wirkung von Molybdän auf die Sulfatreduktion im Pansen untersucht worden.

Das Erstaunlichste der hier aufgezeigten Ergebnisse ist sicherlich, daß verwandte Elemente sich in ihrer Wirkung gegenseitig vertreten konnten. Dabei kann es sich nicht um Verunreinigungen im verwendeten Tellurit und Wolframat mit Selen bzw. Molybdän gehandelt haben; Tellur und Wolfram waren nämlich sogar in noch niedrigeren Konzentrationen wirksam als Selen bzw. Molybdän. PINSENT (1954) hatte gezeigt, daß das Selenit im Medium von Escherichia coli, welches für die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase erforderlich war, nicht durch Tellurit oder Tellurat ersetzt werden konnte. Im Falle der Formiat-Dehydrogenase von Clostridium cylindrosporum hatte Wolfram einen antagonistischen Effekt zum Molybdän (WAGNER und ANDREESSEN, 1977). Daß Wolfram aber auch ein essentielles Spurenelement sein kann, haben Untersuchungen aus jüngerer Zeit erbracht: Das Wachstum von Methanococcus vanniellii mit Formiat (JONES und STADTMAN, 1977) und die Aktivität der Formiat-Dehydrogenasen von Clostridium formicoaceticum, Clostridium thermoaceticum und Clostridium acidurici (LEONHARDT und ANDREESSEN, 1977; WAGNER und ANDREESSEN, 1977; ANDREESSEN, 1978) wurde durch einen Zusatz von Wolfram zusammen mit Selen zum Medium erheblich gesteigert; Wolfram konnte in diesen Fällen nicht durch Molybdän ersetzt werden. Bei genauerem Betrachten der Wachstumsresultate von Stamm 1be1 in Gegenwart von Tellur oder Wolfram erhebt sich jedoch die Frage, ob diese Elemente wirklich eine größere Bedeutung für den Sulfatreduzierer hatten. Ein Zusatz von Tellur zu parallelen Ansätzen in gleicher Konzentration hatte nämlich nicht immer die wachstumsfördernde Wirkung wie Selen. Wolfram wirkte zwar stets eindeutig wachstumsfördernd und bereits in niedrigerer Konzentration als Molybdän, doch mit Wolfram wurden die Zelldichten wie in Gegenwart von Molybdän nicht ganz erreicht. Daher waren wahrscheinlich nicht Tellur und Wolfram, sondern Selen und Molybdän die eigentlichen, von Stamm 1be1 unter natürlichen Bedingungen benötigten Spurenelemente. Ferner ist ungewiß, ob Tellur und Wolfram von Stamm 1be1 direkt anstelle von Selen bzw. Molybdän in die vermuteten Enzyme einge-

baut wurden und dort die gleiche Aktivität wie ihre leichteren Verwandten entfalten konnten. Es wäre nämlich auch möglich, daß Tellur oder Wolfram aufgrund chemischer Ähnlichkeiten die Aufnahmemechanismen für die eigentlich benötigten Spurenelemente stark stimulierten; dann hätten geringste Verunreinigungen mit Selen oder Molybdän, die jeweils in den Kulturgefäßen vorhanden waren, die positiven Wachstumsergebnisse auf Benzoat verursacht. Somit könnte auch erklärt werden, weshalb Tellur anstelle von Selen bisweilen eine ebensogute wachstumsfördernde Wirkung zeigte, bisweilen aber auch eine viel geringere. Von einer Stimulation der Aufnahme in einem umgekehrten Falle, der von Wolfram durch Molybdän, berichteten LJUNGDAHL und ANDREESSEN (1976).

5.3. Verbliebene Fragen zur Bedeutung von Selen, Molybdän und Wolfram für weitere Stoffwechsellleistungen der Sulfatreduzierer

Die in den vorangegangenen Kapiteln zitierte Literatur hat gezeigt, daß die Spurenelemente Selen, Molybdän oder Wolfram bei der Verwertung von Formiat häufiger eine Rolle spielen. Inwieweit auch die neuen Sulfatreduzierer beim Wachstum mit Formiat von einem Zusatz dieser Elemente abhängig waren, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. Mit Stamm 1be1 war lediglich gezeigt worden, daß das heterotrophe Wachstum dieses Sulfatreduzierers mit Formiat als Elektronendonator und Acetat als Kohlenstoffquelle von einem Zusatz von Selen oder Molybdän unabhängig war. Im Übrigen wurden Selen, Molybdän und auch Wolfram immer vorsorglich angeboten, wenn Formiat oder auch H₂ als Elektronendonatoren eingesetzt wurden. Somit bleibt die Frage offen, ob die betreffenden Sulfatreduzierer die genannte Spurenelemente für das Wachstum mit Formiat (s. Tab. 7 - 9) tatsächlich benötigten.

Die Reduktion von Nitrat durch den Sulfatreduzierer 1pr3 (s. C.3.3.2. und C.4.2.) wurde ebenfalls nicht auf eine Abhängigkeit von Selen oder Molybdän geprüft; auch hier wurden diese Elemente aufgrund der Beobachtung von ENOCH und LESTER (1972) stets vorsorglich zugesetzt.

6. Ökologische Bedeutung der neu isolierten Sulfatreduzierer

In Untersuchungen zum Schwefelkreislauf in marinen Sedimenten wiesen JØRGENSEN und FENCHEL (1974) sowie JØRGENSEN (1977 a) nach, daß mehr als die Hälfte des anfallenden organischen Materials (Detritus) über die dissimilatorische Sulfatreduktion mineralisiert wurde. Dieser beachtliche Beitrag Sulfat-reduzierender Bakterien zum anaeroben Abbau war mit der Stoffwechsellistung der bekannten Arten nicht zu erklären, die ihre organischen Substrate nur unvollständig zu Acetat als Endprodukt oxidierten. FENCHEL und JØRGENSEN (1977) machten auf den Widerspruch zwischen den ökologischen und den mikrobiologischen Erfahrungen aufmerksam: Mit der Tätigkeit der bekannten Sulfatreduzierer könnte maximal ein Drittel der organischen Substanz mineralisiert werden. Nun wurden aber ferner auch nie Hinweise dafür erhalten, daß mit der dissimilatorischen Sulfatreduktion an natürlichen Standorten gleichzeitig eine Anreicherung von Acetat einherging; gerade das Gegenteil war der Fall: Wurde der natürlichen anaeroben Bakterienpopulation in marinen Sedimenten Acetat angeboten, so wurde dieses schnell unter Reduktion von Sulfat zu Schwefelwasserstoff verbraucht (CAHET, 1975).

Bereits viel früher hatte HOPPE-SEYLER (1886) gezeigt, daß Cellulose, eine biologisch sehr bedeutende Verbindung, unter anaeroben Bedingungen mit Sulfat vollständig oxidiert werden konnte. Nachdem die Verursacher der Sulfatreduktion durch BEIJERINCK (1895) bekannt geworden waren, wurde in den ersten Jahrzehnten darauf die Fähigkeit dieser Bakterien zur vollständigen Oxidation wiederholt bestätigt (VAN DELDEN, 1903; RUBENTSCHIK, 1928; BAARS, 1930). Die dabei untersuchten Bakterienstämme blieben jedoch nicht erhalten. Alle dann später

isolierten und klassifizierten Sulfatreduzierer oxidierten ihre Substrate nur unvollständig bis zur Stufe von Acetat (SENEZ, 1954; GROSSMAN und POSTGATE, 1955; CAMPBELL und POSTGATE, 1965; POSTGATE und CAMPBELL, 1966; LeGALL und POSTGATE, 1973). Die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur Verwertung von Acetat wurde nicht nur aufgrund negativ verlaufener Anreicherungsversuche in Frage gestellt (SELWYN und POSTGATE, 1959; POSTGATE, 1959 a), sondern auch bioenergetisch für nicht möglich gehalten (WAKE et al., 1977). Nunmehr konnten jedoch verschiedene Sulfatreduzierer in Reinkultur isoliert werden, die Acetat als Elektronendonator zu verwerten vermochten. Stöchiometrische Messungen (s. C.4.) ergaben, daß eine Verwertung von Acetat immer eine vollständige Oxidation zu Kohlendioxid bedeutete, und daß die dazu fähigen Stämme auch andere verwertbare organische Verbindungen vollständig oxidieren konnten (s. auch 1.1.2.). Welche Bedeutung die neuen Arten für das mikrobiologische Verständnis der dissimilatorischen Sulfatreduktion an natürlichen Standorten haben, soll im folgenden erörtert werden.

6.1. Möglichkeiten für eine anaerobe Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat

Bei den organischen Substraten der bisher bekannten Sulfatreduzierer und auch denen der neu isolierten Arten handelt es sich stets um verhältnismäßig einfach aufgebaute, niedermolekulare Verbindungen; etliche von diesen sind als Gärungsprodukte bekannt. Die in der Natur primär anfallende Biomasse besteht hingegen aus komplizierter aufgebauten, größtenteils polymeren Verbindungen. Demnach sind Sulfatreduzierer auf die Tätigkeit der Bakterien angewiesen, welche die Polymere abbauen und vergären.

Anhand der Vergärung einer Hexose und der Verwertung der Produkte durch Sulfatreduzierer kann exemplarisch gezeigt werden, welche Bedeutung die dissimilatorische Sulfatreduktion für den anaeroben Abbau haben könnte. Hexosen, wie z. B. Glucose, dürften in der belebten Natur die mengenmäßig vorherrschenden

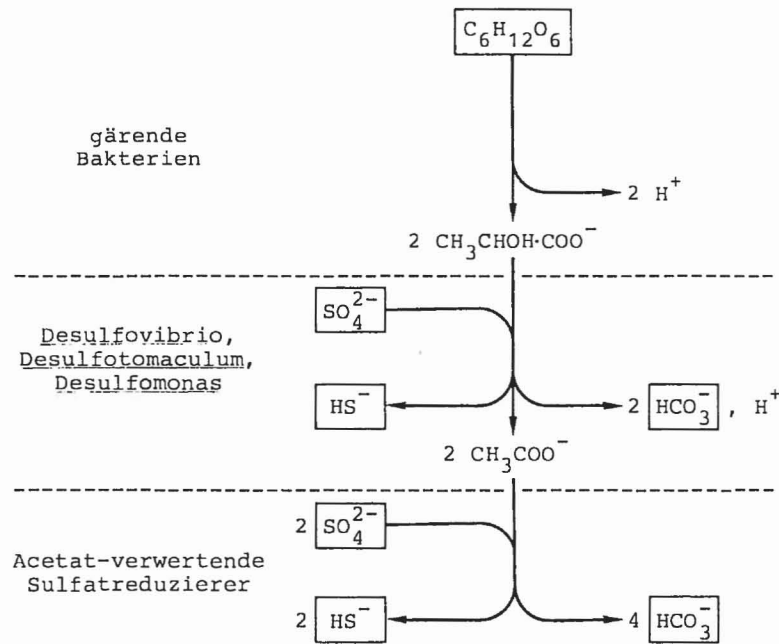


Abb. 40: Möglicher Abbauweg einer organischen Verbindung über gärende und Sulfat-reduzierende Bakterien am Beispiel von Glucose. Bei einer unvollständigen Oxidation des Gärungsprodukts Lactat durch die bisher bekannten Sulfatreduzierer wird 1 mol Schwefelwasserstoff pro mol Glucose gebildet. Die vollständige Oxidation des Gärungsprodukts und somit auch die der Glucose über Acetat-verwertende Sulfatreduzierer liefert insgesamt 3 mol Schwefelwasserstoff pro mol Glucose.

organischen Verbindungen sein, die gebunden als Bausteine von Polymeren (Cellulose, Stärke) und frei als Ausgangssubstrate für den Energiestoffwechsel der verschiedensten Lebewesen große Bedeutung haben. Wenn 1 mol Glucose zu 2 mol Lactat vergoren wird, etwa durch homofermentative Milchsäurebakterien, so ist mit den bisher bekannten Sulfatreduzierern der Gattungen Desulfovibrio, Desulfotomaculum (Ausnahme: Desulfotomaculum acetoxidans) und Desulfomonas eine Bildung von 1 mol Schwefelwasserstoff pro mol Glucose möglich; dabei entstehen ferner

2 mol Acetat und 2 mol Kohlendioxid. Eine noch weitergehende Oxidation der Glucose, d. h. eine noch höhere Ausbeute an Schwefelwasserstoff, ist in Mischkulturen von gärenden Bakterien mit den genannten Sulfatreduzierern nicht möglich, selbst wenn andere Gärungswege beschriftet werden. Erst durch die neu isolierten Arten mit der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation kann auch das entstandene Acetat oxidiert werden, sodaß man am Ende des Prozesses insgesamt 3 mol anstelle von 1 mol Schwefelwasserstoff pro mol Glucose vorfindet, während diese dabei vollständig oxidiert als Kohlendioxid erscheint (s. Abb. 40). Wenn der Acetat-verwertende Sulfatreduzierer ferner Lactat zu verwerten vermag, wie z. B. die Stämme 3ac10, 4ac11, 5ac10, 1be1, 2be1 und 3be13 (s. Tab. 7 und 9), so ist die vollständige Oxidation auch ohne die Sulfatreduzierer möglich, die zunächst Acetat bilden.

Eine vollständige Oxidation der Glucose ist nunmehr auch ohne weiteres über eine Vergärung durch Propionibakterien oder saccharolytische Clostridien vorstellbar. Die Gärungsprodukte wären in diesen Fällen Propionat, Acetat und Kohlendioxid bzw. Butyrat, Acetat, Kohlendioxid und Wasserstoff. Die Verwertung von Propionat oder Butyrat wäre einerseits durch die neu isolierten Sulfatreduzierer möglich, die nur zu einer unvollständigen Oxidation fähig waren, sodaß zunächst noch weiteres Acetat entstünde. Andererseits könnten Propionat und Butyrat aber auch von den Sulfatreduzierern direkt verwertet werden, die diese Fettsäuren wie Acetat vollständig zu oxidieren vermochten (s. Tab. 7 - 9).

Die Verwertung von Acetat, Propionat und Butyrat durch Sulfatreduzierer erlaubt bereits eine vollständige anaerobe Oxidation der Mehrzahl aller in der Natur vorkommenden biologischen Substanzen: Im Kuhpannen, in welchem vor allem Kohlenhydrate durch eine komplexe Mischpopulation vergoren werden, entsteht überwiegend Acetat; die nächst häufigeren Gärungsprodukte sind Propionat und Butyrat (HUNGATE, 1966, S. 245 - 280). In anaeroben, Sulfat-armen Sedimenten und in Faulbehältern von Kläranlagen

werden zersetzliche organische Verbindungen vollständig in Methan und Kohlendioxid überführt. JERIS und McCARTY (1965) sowie SMITH und MAH (1966) zeigten, daß dabei mehr als 70 % des entstandenen Methans über Acetat als Zwischenprodukt gebildet werden; auch Propionat und Butyrat haben wahrscheinlich in derartigen Schlämmen eine Bedeutung als Zwischenstufen beim anaeroben Abbau (TOERIEN und HATTINGH, 1969).

Weshalb gerade niedere Fettsäuren als die häufigsten Gärungsprodukte gefunden werden, kann auch bereits anhand der bekannten Stoffwechselleistungen gärender Bakterien gezeigt werden: Acetat, Propionat und Butyrat entstehen nicht nur häufig bei der Vergärung von Kohlenhydraten, sondern auch der von Aminosäuren (BARKER, 1956, S. 57 - 90). Zudem werden etliche andere Gärungsprodukte schnell in die niederen, löslichen Fettsäuren überführt. So wird z. B. Lactat durch Propionibakterien oder Clostridium propionicum leicht zu Propionat und Acetat umgesetzt (BARKER, 1956, S. 73); zusammen mit Acetat kann Lactat von bestimmten Clostridien zu Butyrat vergoren werden (AZOVA, 1959; KUTZNER, 1963/64). Äthanol wird zusammen mit Acetat durch Clostridium kluyveri in Butyrat oder Capronat überführt (s. THAUER et al., 1977). Propionat entsteht auch häufig durch Decarboxylierung von Succinat; zu dieser Reaktion ist z. B. Selenomonas ruminantium fähig (SCHEIFINGER und WOLIN, 1973). Beim anaeroben Abbau von Purinen und Pyrimidinen durch verschiedene Clostridien (VOGELS und VAN DER DRIFT, 1976; CAMPBELL, 1957; CATO et al., 1968) oder durch Micrococcus aerogenes (WHITELEY, 1952) entstehen als Produkte Acetat und Verbindungen, die von anderen Bakterien wiederum zu löslichen Fettsäuren umgesetzt werden können. Acetat, Propionat und Butyrat sind somit charakteristische Gärungsprodukte beim natürlichen anaeroben Abbau der Polysaccharide, der Proteine und der Nucleinsäuren.

Die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der neu isolierten Sulfatreduzierer erlauben ferner, noch weitere Verbindungen unter anaeroben Bedingungen letztlich vollständig zu oxidieren:

Einige Stämme vermochten iso-Butyrat, 2-Methylbutyrat oder 3-Methylbutyrat zu verwerten (s. Tab. 7 - 9); diese verzweigt-kettigen Fettsäuren entstehen beim anaeroben Abbau der Aminosäuren Valin, iso-Leucin bzw. Leucin (ALLISON, 1978; ELSDEN und HILTON, 1978). Die vier mit Benzoat isolierten Stämme vermochten auch Phenylacetat und 3-Phenylpropionat zu oxidieren; solche Carbonsäuren mit aromatischen Substituenten werden bei der Vergärung der Aminosäure Phenylalanin gebildet (SCOTT et al., 1964; ELSDEN et al., 1976). Eine wichtige ökologische Rolle könnten die neuen Stämme spielen, die langkettige Fettsäuren zu verwerten vermochten; diese verhältnismäßig wasserunlöslichen Verbindungen werden beim Abbau von Lipiden freigesetzt. CHYNOWETH und MAH (1971) zeigten, daß langkettige Fettsäuren bei der anaeroben Schlammfäulung wesentlich zur Bildung von Methan beitragen. Für die neu isolierten Sulfatreduzierer wurden nur gesättigte Fettsäuren eingesetzt. Etliche Lipide enthalten aber auch ungesättigte Fettsäuren. Die in Schlämmen und Sedimenten anfallenden ungesättigten Fettsäuren werden jedoch mikrobiell leicht zu gesättigten hydrogeniert (HEUKELIKIAN und MUELLER, 1958; RHEAD et al., 1971).

Mit der Stoffwechselleistung gärender Bakterien und der der neu isolierten Sulfatreduzierer sollte es grundsätzlich möglich sein, biologisches Material unter streng anaeroben Bedingungen weitgehend zu mineralisieren, also in anorganische Verbindungen zu überführen: Für jedes bedeutende Gärungsprodukt ist mindestens ein Abbauweg vorstellbar, der letztlich zu Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid führt. Ferner ist zu erwarten, daß in Anreicherungen mit weiteren Abbauprodukten aus biologischen Substraten noch andere Sulfatreduzierer mit bisher unbekanntem ernährungsphysiologischen Fähigkeiten zutage treten. Nunmehr kann abgeschätzt werden, wieviel H_2S die in der Natur primär produzierte Biomasse, das Pflanzenmaterial, bei einer vollständigen Mineralisierung unter anaeroben Bedingungen mit ausreichend Sulfat als Elektronenakzeptor liefern würde: Wenn man für pflanzliche Trockenmasse näherungsweise die Summenformel von Glucose, $C_6H_{12}O_6$ (= Cellulose bzw. Stärke + H_2O), annimmt, so

könnten bei einer vollständigen anaeroben Oxidation bis zu 570 g H₂S pro 1000 g pflanzlicher Trockenmasse gebildet werden (s. Abb. 40). Demgegenüber ist die Menge des assimilatorisch reduzierten Sulfats gering. Zu der assimilatorischen Sulfatreduktion sind Pflanzen und die Mehrzahl der Bakterien fähig; in der Natur dürfte der weitaus größte Teil der reduzierten Schwefelverbindungen für die Zelle während der Photosynthese der grünen Pflanzen gebildet werden. Nach BAUMEISTER (1958 a) ist für eine Pflanze ein Gehalt der Trockenmasse an Gesamt-Schwefel von 0,5 % bereits verhältnismäßig hoch. Ein großer Anteil des Gesamt-Schwefels wird in der Pflanze als Sulfat vorrätig gehalten; auf den reduzierten Schwefel, den von Proteinen und anderen Schwefelverbindungen, dürften bis ca. 30 % vom Gesamt-Schwefel entfallen (BAUMEISTER, 1958 b). Demnach enthielte pflanzliche Trockenmasse bis ca. 0,15 % reduzierten Schwefel. Wird das Pflanzenmaterial abgebaut, so entstünden bei der Freisetzung des reduzierten Schwefels, bei der sogenannten Desulfuration, aus 1000 g Trockenmasse mit dem angenommenen Schwefelgehalt ca. 1,6 g H₂S.

1000 g pflanzliche Trockensubstanz liefern:

bei der Desulfuration der über die assimilatorische Sulfatreduktion gebildeten Schwefelverbindungen

1,6 g H₂S

bei einer vollständigen anaeroben Mineralisierung der Pflanzenmasse über die dissimilatorische Sulfatreduktion

570 g H₂S

Die im Falle einer dissimilatorischen Sulfatreduktion mit einer gegebenen Menge an Pflanzenmaterial gebildete Menge an H₂S kann somit um das 300 bis 400fache, also um gut zwei Zehnerpotenzen, größer sein als die Menge an H₂S, die bei der Fäulnis allein durch Desulfuration entsteht.

Die in diesem Kapitel aufgezeigten mikrobiologisch denkbaren Wege für eine anaerobe Oxidation organischer Verbindungen mit Sulfat als Elektronenakzeptor lassen sich nunmehr mit den tatsächlich beobachteten Abbauvorgängen an natürlichen Standorten verbinden.

6.2. Endabbau von Biomasse an natürlichen Standorten unter verschiedenen Bedingungen

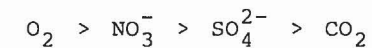
Gelangen zersetzliche organische Verbindungen biologischer Herkunft in eine Umgebung ohne Sauerstoff, in welcher auch andere externe Elektronenakzeptoren fehlen, wie zum Beispiel Sulfat oder Nitrat, so endet der mikrobielle Abbau schließlich bei Methan und Kohlendioxid. Im Methan hat der Kohlenstoff seine niedrigste Oxidationsstufe, nämlich -4, im Kohlendioxid seine höchste, +4; dem Kohlenstoff in den verschiedenen Verbindungen des Ausgangsmaterials können formal Oxidationsstufen zugeordnet werden, die höher als -4, aber niedriger als +4 sind. Die Umsetzung von Biomasse zu Methan und Kohlendioxid ist also eine Disproportionierung. Ein noch weitergehender Umsatz von Methan und Kohlendioxid in Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren wurde noch nie beobachtet. Unter diesen Bedingungen kennzeichnen also die beiden extremen Oxidationsstufen des Kohlenstoffs, CH₄ und CO₂, einen Endzustand des ursprünglichen biologischen Materials.

CAPPENBERG (1974 a,b), CAPPENBERG und PRINS (1974), MARTENS und BERNER (1974) sowie WINFREY und ZEIKUS (1977) zeigten in Untersuchungen an anaeroben Sedimenten von Gewässern, daß in Gegenwart von Sulfat kein Methan gebildet wurde bzw. dessen Bildung durch Zusatz von Sulfat unterdrückt wurde. Die Produktion von Methan begann erst dann, als alles Sulfat zu Schwefelwasserstoff reduziert worden war. Auch in den Anreicherungen unter C.1. mit Fettsäuren bzw. Benzoesäure und Sulfat setzten sich letztlich keine Methanbakterien durch, sondern Sulfatreduzierer. Lediglich in Ansätzen, deren Beimpfungsmaterial einen natürlichen hohen Gehalt an Methanbakterien hatte, wurde während

der ersten Passagen noch Methan gebildet; nach weiteren Überimpfungen wurde jedoch auch in diesen Anreicherungen die dissimilatorische Sulfatreduktion zu dem vorherrschenden Abbauprozess. Die Unterdrückung der Methanbildung in Schlämmen durch Sulfat wird heute als Konkurrenz zweier Bakteriengruppen verstanden: Die Oxidation der organischen Substrate mit Sulfat ist gegenüber der Umsetzung zu Methan die begünstigte Reaktion, die Sulfatreduzierer sind als Konkurrenten den Methanbakterien überlegen. Wenn ein Überschuß an Sulfat vorhanden ist, bleibt die Methanbildung ganz aus. Unter den Bedingungen der Sulfatreduktion muß somit mindestens ein ebenso weitgehender Abbau der verschiedenen biologischen Substanzen möglich sein wie bei der Methanbildung. Auf welchen Wegen anaerob abbaubare organische Substanzen durch die Tätigkeit gärender und Sulfat-reduzierender Bakterien vollständig oxidiert werden können, wurde im vorangehenden Kapitel gezeigt. Alle Reduktionsäquivalente, die aus dem ursprünglich vorhandenen Substrat gewonnen werden konnten, liegen schließlich in Form von H_2S vor. Eine weitere Umsetzung von H_2S und CO_2 unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln wurde noch nie beobachtet. Daher kann man wiederum vermuten, daß H_2S und CO_2 den Endzustand des Abbaus organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen bei einem Überschuß an Sulfat kennzeichnen. Erst mit Licht als Energiequelle ist eine Verwertung von Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid möglich, und zwar durch die phototrophen roten und grünen Schwefelbakterien für die Neusynthese von Zellsubstanz.

Unter aeroben Bedingungen findet weder eine Methanbildung noch eine dissimilatorische Sulfatreduktion statt, die gesamte Biomasse wird zu Wasser und Kohlendioxid oxidiert. H_2O und CO_2 stellen den Endzustand des aeroben Abbaus organischer Verbindungen dar, wenn Sauerstoff im Überschuß vorhanden ist. Grüne Pflanzen und Cyanobakterien überführen diesen Endzustand unter Ausnutzung von Licht als Energiequelle unter Freisetzung von Sauerstoff wieder in organische Substanzen, in Biomasse.

Eine weitere Möglichkeit, organische Verbindungen biologisch zu oxidieren, ist durch die Denitrifikation gegeben. Die sogenannten echten Denitrifizierer oxidieren ihre organischen Substrate vollständig zu CO_2 und reduzieren dabei Nitrat maximal bis zu molekularem Stickstoff. Die Nitratreduktion findet nur in Abwesenheit von Sauerstoff statt. BALDERSTONE und PAYNE (1976) zeigten, daß Nitrat wiederum die Methanbildung zu hemmen vermochte. Die gleiche Wirkung von Nitrat hatten zuvor TAKAI und KAMURA (1966) in Reisfeldern beobachtet; darüber hinaus zeigten diese Autoren, daß auch die dissimilatorische Sulfatreduktion ausblieb, solange Nitrat zugegen war. Atmung, dissimilatorische Nitratreduktion, dissimilatorische Sulfatreduktion und Methanbildung sind also verschiedene Wege für den Abbau von Biomasse, die sich an natürlichen Standorten gegenseitig ausschließen, und zwar nach einem Prinzip der Dominanz: Man könnte die verschiedenen Elektronenakzeptoren in einer Hierarchie anordnen, sodaß bei deren Anwesenheit immer derjenige mit der höchsten Rangordnung darüber entscheidet, welche Reaktion stattfindet. Die Methanbildung kann man als "dissimilatorische CO_2 -Reduktion" auffassen; eine solche Darstellungsweise ist nicht nur ein Formalismus, denn beim Wachstum von Methanbakterien mit Wasserstoff wird tatsächlich CO_2 als Elektronenakzeptor reduziert. Die Hierarchie der Elektronenakzeptoren wäre dann wie folgt darzustellen:



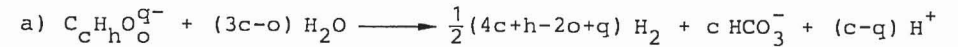
Zu einer solchen Aufstellung der verschiedenen Elektronenakzeptoren gelangten auch CLAYPOOL und KAPLAN (1974). Ist O_2 zugegen, so ist die Atmung der bevorzugte Prozess, die dissimilatorische Nitratreduktion, die dissimilatorische Sulfatreduktion und die Methanbildung werden unterdrückt. Ganz analog wäre dieser Satz für NO_3^- in Abwesenheit von O_2 und für SO_4^{2-} in Abwesenheit von O_2 und NO_3^- zu formulieren; sind weder O_2 noch NO_3^- noch SO_4^{2-} zugegen, so ist die Methanbildung der einzige noch mögliche Abbauprozess.

6.3. Energetische Betrachtungen zu den Abbauwegen organischer Verbindungen

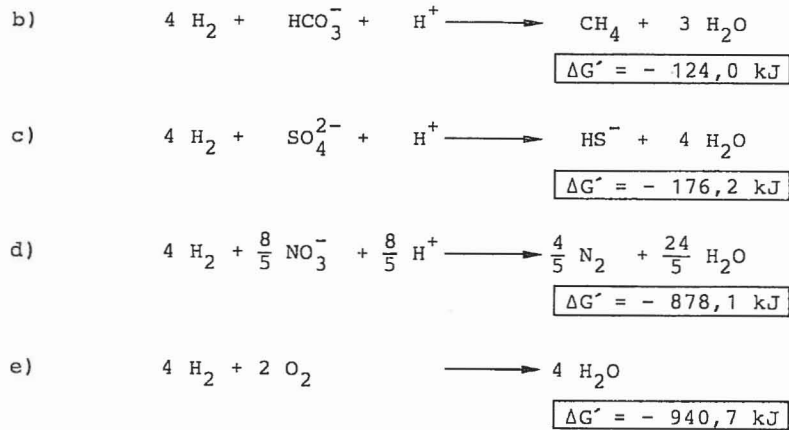
Die Unterscheidung zwischen Atmung, dissimilatorischer Nitratreduktion, dissimilatorischer Sulfatreduktion und Methanbildung erweist sich für das Verständnis der wesentlichen Abbauwege in der Natur als sehr nützlich; denn offensichtlich wird mit den Produkten dieser Abbauvorgänge auch gleichzeitig ein Endzustand erreicht. Im Dunkeln wird nämlich unter den gegebenen Bedingungen nie eine weitere Umsetzung der jeweiligen Produkte beobachtet. Stellen nun diese Produkte auch im thermodynamischen Sinne die Endzustände der genannten Abbauwege dar, also energetische Minima?

Die Fragestellung veranlaßt, die Änderungen der freien Enthalpie bei der Methanbildung, der Sulfatreduktion, der Denitrifikation und der Atmung mit Sauerstoff zu betrachten. Die freie Enthalpie der Reaktionen wurde nach der im Anhang gegebenen Formel berechnet. Für nicht gasförmige, gelöste Verbindungen wurde eine Konzentration von 10^{-2} mol/l angenommen (vgl. 3.2. und 3.3.) und für Sauerstoff ein Druck von 0,2 atm (Partialdruck von O_2 in der Luft). Die Gase CH_4 und N_2 werden, anders als O_2 , nicht verbraucht, sondern gebildet. Wegen der geringen Löslichkeit dieser Gase ist das wäßrige Milieu der Bakterien bei der Methanbildung oder der Denitrifikation bereits nach geringen Substratumsätzen übersättigt, sodaß CH_4 bzw. N_2 als Gasblasen entweichen. Weil diese Gasblasen aus nahezu reinem CH_4 bzw. N_2 bestehen und ein Standarddruck von 1 atm zugrunde gelegt wird, beträgt der Druck von CH_4 bzw. N_2 ebenfalls 1 atm. Als Elektronendonator soll H_2 mit einem Partialdruck von 1 atm dienen. Die resultierenden Reaktionsgleichungen (b bis e) haben auch eine reale Bedeutung, denn fast alle Methanbakterien und etliche Sulfatreduzierer, Denitrifizierer und atmende Bakterien können H_2 als Elektronendonator verwerten. Die Reaktionsgleichungen sind mit H_2 nicht nur verhältnismäßig übersichtlich, sondern bieten zudem den Vorteil, daß man auf einfache Weise auch zu Reaktionsgleichungen mit organischen Verbindungen als

Elektronendonatoren gelangen kann. Für jede organische Verbindung läßt sich nämlich die Gleichung einer Reaktion aufstellen, durch welche die Verbindung in H_2 und CO_2 bzw. HCO_3^- überführt werden kann. Die allgemeine Form einer solchen Reaktion soll hier für eine organische Verbindung gegeben werden, deren Molekül aus c C-Atomen, h H-Atomen und o O-Atomen besteht und ferner q negative Ladungen trägt:



Bei einem H_2 -Partialdruck von 1 atm ist diese Reaktion für nahezu alle organischen Verbindungen in natürlichen Systemen endergonisch; exergonisch wäre die Reaktion z. B. für Formiat (c = 1; h = 1; o = 2; q = 1) unter bestimmten Bedingungen (s. 4.1.). Weil der H_2 -Partialdruck in den folgenden Betrachtungen 1 atm betragen soll, handelt es sich bei Reaktion a für die Mehrzahl organischer Verbindungen also nur um einen Formalismus; dieser ist jedoch für thermodynamische Untersuchungen voll berechtigt. Hat man Gleichung a für den speziellen Fall formuliert, so erhält man durch Addition zu einer der folgenden Reaktionsgleichungen mit H_2 die gesamte Reaktionsgleichung für die Umsetzung der betreffenden organischen Verbindung. Die Werte für die freien Reaktionsenthalpien sind (unter Beachtung der Vorzeichen) ebenfalls zu addieren. Unter 3.3. wurde auf diese Weise bereits die freie Enthalpie der APS-Reduktion mit Acetat als Elektronendonator berechnet. Die Methanbildung, die dissimilatorische Sulfatreduktion, die dissimilatorische Nitratreduktion und die Atmung sind mit H_2 als Elektronendonator wie folgt darzustellen:



T = 298 °K; p = 1 atm; pH = 7.0; Partialdruck von Wasserstoff, Methan und Stickstoff: 1 atm; Partialdruck von Sauerstoff: 0,2 atm; Konzentration von Bicarbonat, Sulfat, Sulfid und Nitrat: 0,01 mol/l

Die Reaktionen werden in der Reihenfolge von der Methanbildung (b) über die Sulfatreduktion (c) und die Denitrifikation (d) bis zur "Knallgasreaktion" (e) zunehmend exergonischer. Weil bei allen Umsetzungen stets die gleiche Menge H₂ reagiert, muß diese Reihenfolge auch dann gelten, wenn an die Stelle von H₂ ein beliebiges, aber für die vier Reaktionen jeweils gleiches Substrat tritt. Somit kann man die aus den Reaktionsgleichungen b bis e gewonnene Erkenntnis verallgemeinern: Unter den angegebenen Bedingungen (s. o.) ist bei einem gegebenen Substrat die Atmung stets stärker exergonisch als die Denitrifikation, diese wiederum immer stärker exergonisch als die dissimilatorische Sulfatreduktion und diese schließlich stets stärker exergonisch als die Methanbildung.

In der gleichen Reihenfolge entscheiden die Elektronenakzeptoren der Reaktionen b bis e nach dem im vorangehenden Kapitel aufgezeigten Dominanzprinzip darüber, welcher der vier Abbauwege an einem natürlichen Standort stattfindet. Dennoch können und dürfen die Unterdrückung der Nitratreduktion, der Sulfatreduktion und der Methanbildung durch O₂, die Unterdrückung der

Sulfatreduktion und der Methanbildung durch NO₃⁻ und die Unterdrückung der Methanbildung durch SO₄²⁻ nicht thermodynamisch begründet werden! In diesen Fällen steht zwar die Thermodynamik im Einklang mit den tatsächlichen Beobachtungen; es lassen sich aber auch Gegenbeispiele finden, von denen hier zwei genannt seien: Unter C.2. wurden Medien mit Methanol und Sulfat mit anaeroben Schlämmen beimpft. Obwohl die Sulfatreduktion stärker exergonisch als die Methanbildung ist und eine schwache Produktion von H₂S auf vorhandene Methanol-verwertende Sulfatreduzierer hinwies, wurde der weitaus größte Teil des Methanols stets zu Methan umgesetzt. Ein weiteres Gegenbeispiel ist das Wachstum von Stamm 1pr3 mit Propionat und Nitrat bzw. Propionat und Sulfat (s. C.3.3.2. und C.4.2.). Nitrat wurde von diesem Sulfatreduzierer zwar nicht zu N₂, sondern zu NH₄⁺ reduziert; aber auch diese Art einer dissimilatorischen Nitratreduktion ist immer noch wesentlich stärker exergonisch als die Sulfatreduktion (s. THAUER et al., 1977). Waren jedoch Nitrat und Sulfat gleichzeitig zugegen, so wurde dennoch bevorzugt Sulfat reduziert; Stamm 1pr3 wuchs mit Nitrat etwas langsamer als mit Sulfat.

Welche von mehreren möglichen Reaktionen ein Substrat eingehen wird, kann aufgrund thermodynamischer Kriterien grundsätzlich nicht vorausgesagt werden. Zunächst wird nämlich die Reaktion stattfinden oder überwiegen, die am schnellsten verläuft. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aber nicht Gegenstand der Thermodynamik, sondern der Kinetik, und hängt mit dem Reaktionsmechanismus zusammen. In lebenden Systemen, wie Bakterienzellen, bestimmen die Charakteristika der am Transport und den Reaktionsschritten beteiligten Enzyme die Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats und die Wachstumsrate. Wenn ausreichend Substrat vorhanden ist, sodaß alle Bakterientypen ("Enzymsysteme") in einem Medium unter Substratsättigung arbeiten, und wenn es ferner zu keiner Substrathemmung durch zu hohe Konzentrationen kommt, so setzt sich der Stoffwechsellyp mit dem höchsten Wert für die maximale Wachstumsrate, μ_{max} (Wachstumsrate bei Substratsättigung), durch; die Reaktion mit der höchsten maximalen Umset-

zungsgeschwindigkeit wird zu der dominierenden. An natürlichen Standorten, wie z. B. in Sedimenten, werden die mikrobiellen Reaktionen jedoch in der Regel durch die löslichen organischen Substrate begrenzt, deren Konzentrationen dann weit unterhalb der Sättigungskonzentrationen liegen. Unter diesen Bedingungen entscheiden nicht mehr allein die μ_{\max} -Werte der Bakterientypen darüber, welcher Umsetzungsweg des Substrats zu dem dominierenden wird. So kann ein Bakterium eine verhältnismäßig niedrige maximale Wachstumsrate haben, in der Auftragung der Wachstumsrate μ gegen die Substratkonzentration s jedoch im unteren Konzentrationsbereich durch einen steilen Kurvenverlauf und somit durch eine niedrige Sättigungskonstante, K_S , charakterisiert sein; ein solches Bakterium kann bei niedrigen Substratkonzentrationen einem anderen überlegen sein, welches zwar einen höheren μ_{\max} -Wert hat, aber auch einen höheren K_S -Wert (geringere Steilheit in der Auftragung von μ gegen s). In der Auftragung von μ gegen s überschneiden sich die Substratsättigungskurven beider Bakterientypen. Das erstgenannte Bakterium hätte eine höhere Affinität zum Substrat. MATIN und VELDKAMP (1978) studierten die Selektion eines Bakteriums mit niedrigem μ_{\max} -Wert und niedrigem K_S -Wert gegenüber einem anderen Bakterium mit höherem μ_{\max} -Wert und höherem K_S -Wert durch Substratbegrenzung im Chemostaten. Beim natürlichen Abbaugeschehen in Mischpopulationen kann also die Affinität eines Stoffwechselftyps zum Substrat zu einem entscheidenden Faktor werden. Schließlich kann die Umsetzung eines Substrats auch durch einen spezifischen Hemmstoff stark verlangsamt oder gänzlich unterbunden werden, der auf irgendeine Weise gezielt in den Reaktionsmechanismus eingreift. Dabei wirkt ein solcher Hemmstoff häufig bereits in einer Konzentration, die bei einer Betrachtung der freien Enthalpie und des angestrebten Gleichgewichtszustandes der Gesamtumsetzung völlig zu vernachlässigen ist. Die Änderung der freien Enthalpie einer aufgestellten Reaktionsgleichung gibt hingegen Auskunft, ob diese Reaktion in der angegebenen Richtung grundsätzlich möglich ist, ob sie sich im Gleichgewicht befindet oder ob die Rückreaktion zu erwarten ist. Allerdings ist denkbar, daß im Verlauf der Evolution die Umsetzungsge-

schwindigkeit über einen Stoffwechselweg durch Weiterentwicklung der Enzyme umso mehr gesteigert werden konnte, je größer die Änderung der freien Enthalpie der betreffenden Reaktion ist.

Die Umsetzungen eines organischen Substrats in den Reaktionen, die sich aus den Gleichungen a und b bis e ergeben, können zu folgenden Produkten führen:

Methanbildung, Gl. a und b:	H_2O, HCO_3^-, CH_4
dissimil. Sulfatreduktion, Gl. a und c:	H_2O, HCO_3^-, HS^-
dissimil. Nitratreduktion, Gl. a und d:	H_2O, HCO_3^-, N_2
Atmung, Gl. a und e:	H_2O, HCO_3^-

Das Verhältnis der Produkte untereinander hängt von der Zusammensetzung des Substrats ab; bei der Umsetzung bestimmter Substrate kommt H_2O in der Bilanz nicht vor. Versucht man nun, mit den aufgeführten Produkten jeweils untereinander rein stöchiometrisch verschiedene Reaktionen zu formulieren, die zu neuen Verbindungen führen, so wird man feststellen, daß diese Reaktionen unter den Bedingungen der lebenden Welt stets endergonisch sind. Umgekehrt wird man berechnen, daß alle Umsetzungen organischer Substrate, die über die Reaktionen a und b bis e zu den jeweiligen Produkten führen, exergonisch sind. Die genannten Produkte stellen also jeweils untereinander bei den gegebenen Bedingungen einen Endzustand im thermodynamischen Sinne dar, den man auch als den Gleichgewichtszustand bezeichnen könnte; dieser Endzustand war bereits im vorangegangenen Kapitel aufgrund von Beobachtungen an natürlichen Systemen vermutet worden. Jedes biologische System ist nun bestrebt, in den jeweiligen Endzustand überzugehen, der durch das Vorhandensein des Elektronenakzeptors bestimmt wird. Wie schnell dieser Übergang geschieht, kann aufgrund der Werte für die freie Reaktionsenthalpie nicht gesagt werden; je länger jedoch das System

Reaktionen zugänglich sind. Eine anaerobe biologische Oxidation von Methan oder höheren Kohlenwasserstoffen sollte jedoch nicht grundsätzlich verneint werden; eventuell machen extreme Bedingungen, wie höhere Temperaturen und hoher Druck, diese Reaktionen möglich. Solche Bedingungen wären in der Tiefsee in der Nähe heißer Quellen gegeben (JANNASCH und WIRSEN, 1979). Daß Sulfatreduzierer in dieser Umwelt leben könnten, zeigt der Rekord unter Lebewesen im Tolerieren extremer Bedingungen: ZOBELL (1958) berichtete von Sulfatreduzierern, die Sulfat noch bei 104 °C und 1000 atm zu H₂S reduzierten. Vielleicht können bei hohen Temperaturen und hohem Druck, zum Beispiel über die Reaktivität bestimmter Spurenelemente in Enzymen, auch Methan und andere Kohlenwasserstoffe als Elektronendonatoren für die dissimilatorische Sulfatreduktion verwertet werden.

Das Reaktionsprodukt von Gleichung d, der molekulare Stickstoff, könnte zwar allein aufgrund thermodynamischer Kriterien mit Sauerstoff zu Nitrat reagieren; diese Oxidation wird in der Natur jedoch nur unter dem Einfluß elektrischer Entladungen beobachtet, denn N₂ ist ein ausgesprochen reaktionsträges Gas. Die Reduktion von Stickstoff zu Ammonium kommt dagegen in Lebewesen vor, nämlich in N₂-fixierenden Bakterien; dabei muß die Reaktionsträgheit von Stickstoff mit einem hohen Aufwand an ATP überwunden werden.

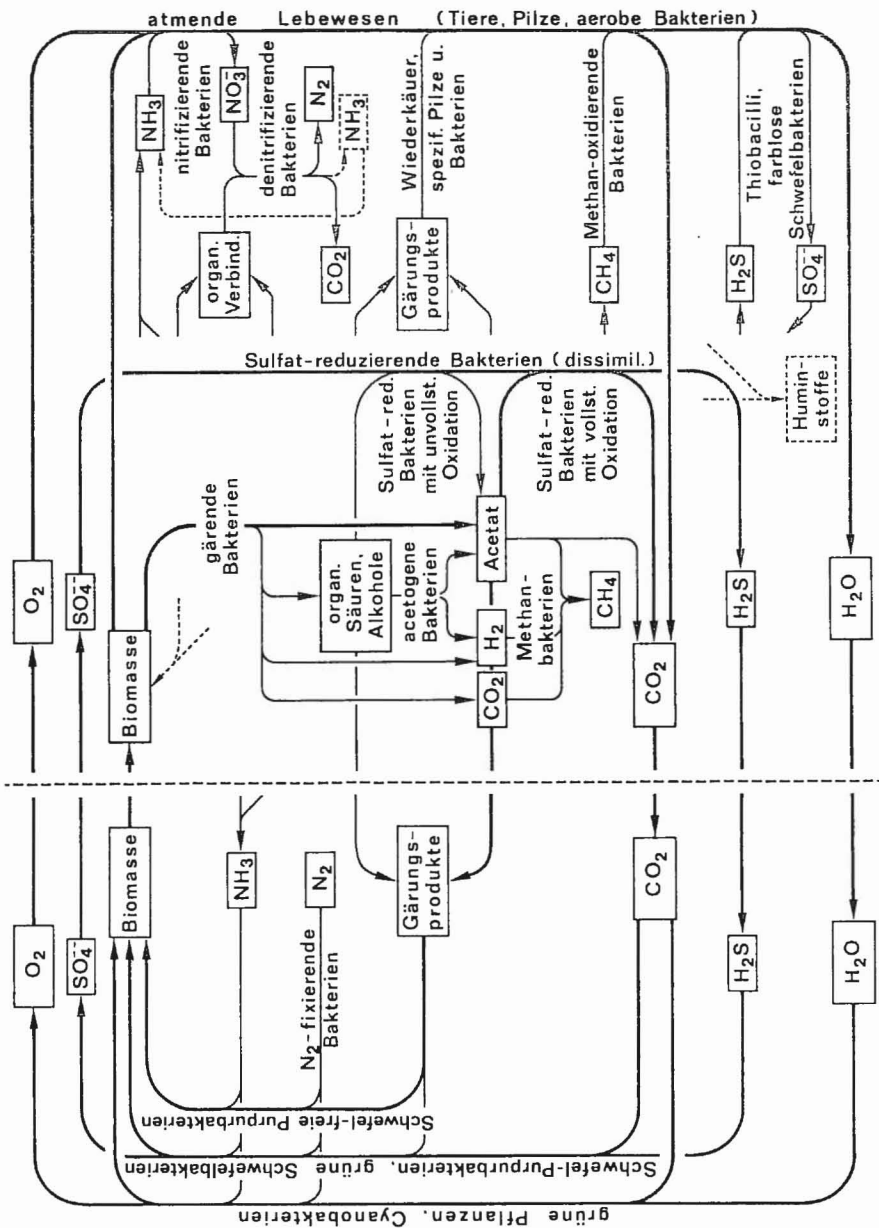
6.4. Die dissimilatorische Sulfatreduktion und der natürliche Stoffkreislauf

Die vollständige Oxidation von organischen Verbindungen biologischer Herkunft mit Sulfat als Elektronenakzeptor kann als ein der Atmung mit Sauerstoff analoger Prozeß im streng anaeroben Bereich aufgefaßt werden. So wie die Atmung im aeroben Milieu letztlich zu einer vollständigen Mineralisierung führt, so die Sulfatreduktion im anaeroben. Für beide Abbauprozesse gibt es ferner eine Umkehrung durch Photosynthese: Grüne Pflanzen und Cyanobakterien synthetisieren ihre Zellsubstanz aus H₂O und CO₂ unter Freisetzung von O₂; die Neusynthese biologischer Substanz

aus H₂S und CO₂ ist die Leistung der Schwefel-Purpurbakterien und der grünen Schwefelbakterien, wobei Sulfid schließlich zu Sulfat oxidiert wird. Sonnenenergie wird also konserviert, indem die im Gleichgewichtszustand befindlichen Systeme "H₂O + CO₂" bzw. "H₂S + CO₂" in die energiereicheren Zustände "Biomasse + O₂" bzw. "Biomasse + SO₄²⁻" überführt werden. Die konservierte Sonnenenergie dient aeroben bzw. anaeroben chemotrophen Lebewesen zur Unterhaltung ihrer gesamten Lebensfunktionen. Bleiben Sauerstoff bzw. Sulfat zugegen, so wird die synthetisierte Biomasse schließlich wieder in Wasser und Kohlendioxid bzw. Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid überführt; dabei wird die konservierte Sonnenenergie als Entropie frei. Während der chemotrophen Lebensprozesse wird zwar auch stets Zellmasse neu synthetisiert; doch kann dafür immer nur ein Teil der aufgenommenen Substrate verwertet werden. Ein weiterer Teil muß durch den Energiestoffwechsel allein für die Bereitstellung von ATP umgesetzt werden. Jedes Lebewesen, auch ein Bakterium, wird jedoch auch selbst einmal das Substrat für Folgeorganismen. Auf diese Weise wird die gesamte photosynthetisch gebildete Biomasse letztlich über eine aerobe bzw. eine anaerobe Nahrungskette vollständig abgebaut ("Selbstverzehr" der Biomasse). Somit bilden Atmung und Sulfatreduktion zusammen mit den entsprechenden photosynthetischen Reaktionen einen aeroben bzw. anaeroben Kreislauf. Diese Kreisläufe sind in Abb. 41 dargestellt. Links von der gestrichelten Linie wird Biomasse im Licht photosynthetisch gebildet und rechts von der gestrichelten Linie durch chemotrophe Lebewesen über Dunkelreaktionen wieder abgebaut.

6.4.1. Abbaustufen und Synthesewege in der anaeroben Lebewelt

Zwischen dem aeroben und dem anaeroben Abbau besteht bezüglich der Reaktionsfolge ein wesentlicher Unterschied: Fast alle aeroben Lebewesen, wie Tiere, Pilze und aerobe Bakterien, oxidieren ihre Substrate vollständig zu den Endprodukten H₂O und CO₂. Die anaeroben Lebewesen, bei denen es sich fast immer um Bakterien handelt, sind hingegen häufig auf nur wenige Stoff-



schritte spezialisiert; die Ausscheidungsprodukte des einen Anaerobiers sind wiederum die Substrate für einen weiteren mit einer anderen Stoffwechsellistung. Unter anaeroben Bedingungen werden also nicht nur Zellbausteine, sondern auch die Substrate des Energiestoffwechsels über eine Nahrungskette umgesetzt.

Kein anaerobes Bakterium ist bekannt, das eine anfallende polymere Verbindung zu den anaeroben Endprodukten CH_4 und CO_2 oder H_2S und CO_2 umzusetzen vermag. Vor allem Methanbakterien sind weitgehend spezialisiert und können nur wenige einfache Verbindungen verwerten, wie H_2 , CO_2 , Formiat, Acetat oder Methanol (WOLFE, 1971; ZEIKUS, 1977). Beim Abbau von Biomasse zu Methan können nach BRYANT (1976; 1979) drei Reaktionsstufen unterschieden werden, nämlich der primäre Abbau durch gärende Bakterien, die Umsetzungen durch die H_2 -bildenden acetogenen Bakterien und schließlich die Methanbildung: Gärende Bakterien greifen die anfallenden Polymere der Biomasse an und bilden aus den Hydrolyseprodukten organische Säuren, wie z. B. Acetat, sowie Alkohole, H_2 und CO_2 . Die Produkte Acetat, H_2 und CO_2 werden von den Methanbakterien verwertet. Die sogenannten H_2 -bildenden acetogenen Bakterien setzen dann auch die übrigen organischen Säuren, insbesondere höhere Fettsäuren, und die Alkohole zu Acetat, H_2 und teilweise auch CO_2 um, bilden also weitere Substrate für Methanbakterien. Die H_2 -bildenden acetogenen Bakterien sind obligat syntroph, d. h. auf die Anwesenheit von Methanbakterien angewiesen. Eine Bildung von H_2 von 1 atm Druck aus den Substraten der H_2 -bildenden acetogenen Bakterien wäre endergonisch, also thermodynamisch nicht möglich. Weil Methan-

Abb. 41, S. 354: Aerober und anaerober Stoffkreislauf. Links von der gestrichelten Linie ist die Synthese von Biomasse im Licht schematisch dargestellt und rechts deren Abbau durch chemotrophe Lebewesen unter anaeroben Bedingungen (Mitte) und aeroben Bedingungen (rechts außen). Die nicht durchgehend gezeichneten Pfeile in der rechten Hälfte symbolisieren die mögliche Weiterverwertung anaerober Abbauprodukte durch aerobe Lebewesen. (Weitere Erläuterungen s. Text)

bakterien eine hohe Affinität zu Wasserstoff haben, wird dessen Partialdruck niedrig gehalten; die Bildungsreaktion ist dann exergonisch und ermöglicht den H₂-bildenden acetogenen Bakterien eine Energiekonservierung. Selbstverständlich ist umgekehrt die Bildung von Methan umso schwächer exergonisch, je niedriger der Partialdruck von H₂ ist; es gibt bei einer gegebenen CO₂-Konzentration einen Partialdruck von H₂, unterhalb dessen die Umsetzung zu Methan von einem bestimmten Druck endergonisch ist und somit nicht mehr stattfinden kann. Alles leicht abbaubare biologische Material kann in der dargestellten Weise nahezu vollständig in CH₄ und CO₂ überführt werden. H₂-bildende acetogene Bakterien müssen daher in der Natur eine größere Rolle spielen. So ermöglicht diese Art von Bakterien z. B. auch den Abbau aromatischer Verbindungen zu CH₄ und CO₂ (s. Kapitel 5.). Allerdings sind heute erst zwei Fälle von H₂-bildenden acetogenen Bakterien in definierten Mischkulturen mit Methanbakterien bekannt geworden (BRYANT et al., 1967; McINERNEY et al., 1979).

Die Stoffwechselphysiologie der bekannten und der neue isolierten Sulfatreduzierer zeigt, daß diese an natürlichen Standorten nicht auf H₂-bildende acetogene Bakterien angewiesen sind, obwohl derartige Mischkulturen im Prinzip ebenfalls möglich wären. Die Sulfatreduzierer vermögen nämlich die verschiedensten Gärungsprodukte direkt zu verwerten: Für die Mineralisierung von Biomasse ist ein zweistufiger Abbauweg ausreichend, so wie er an Beispielen unter 6.1. erläutert wurde. Sulfatreduzierer können aber bisweilen selbst als H₂-bildende acetogene Bakterien fungieren: Unter C.7.2. wurde durch eine Mischkultur eines vibrioiden Sulfatreduzierers mit Methanospirillum aus Lactat Methan gebildet; von einem ganz ähnlichen Fall berichteten BRYANT et al. (1977).

Über die Produkte der gärenden Bakterien ist ein weiterer anaerober Kreislauf möglich: Organische Säuren, Alkohole, H₂ und CO₂ werden nämlich im Licht von phototrophen Schwefel-freien Purpurbakterien in zelleigene Verbindungen überführt (PFENNIG,

1967). Ferner vermögen Schwefel-Purpurbakterien Acetat sowie H₂ zusammen mit CO₂ zu assimilieren; auch die überwiegend lithotroph lebenden grünen Schwefelbakterien können einen Teil ihrer Zellbestandteile aus Acetat bilden. Durch die hier genannten Syntheseleistungen phototropher Bakterien kann der anaerobe Kreislauf, der sonst über eine vollständige Oxidation zu CO₂ führt, zu einem kleineren Kreislauf "kurzgeschlossen" werden. Eine Mittelstellung zwischen diesen zwei Wegen nimmt der Kreislauf ein, der über die Sulfatreduzierer mit unvollständiger Oxidation zu H₂S, Acetat und einem gewissen Anteil CO₂ führt; ein solcher unvollständiger Abbau organischer Verbindungen stellt sowohl Substrate für organotroph als auch lithotroph wachsende Purpurbakterien bzw. grüne Schwefelbakterien bereit. Bezüglich des Schwefels ist durch "Kurzschluß" noch ein weiterer kleinerer Kreislauf möglich, der allerdings in Abb. 41 nicht aufgeführt ist: Grüne Schwefelbakterien oxidieren H₂S unter bestimmten Bedingungen bevorzugt zu elementarem Schwefel. Dieser kann dann mit Acetat oder Äthanol als Elektronendonator von Desulfuromonas acetoxidans (PFENNIG und BIEBL, 1976) wieder zu H₂S reduziert werden, während die organischen Verbindungen vollständig oxidiert werden. Desulfuromonas acetoxidans bildet mit grünen Schwefelbakterien sehr gut wachsende, syntrophe Mischkulturen. Allerdings vermag dieser Schwefelreduzierer nur wenige organische Substrate und keine oxidierteren Schwefelverbindungen zu verwerten. Deshalb haben Schwefel-reduzierende Bakterien für das anaerobe Abbaugeschehen wahrscheinlich eine geringere Bedeutung als Sulfatreduzierer.

Ein rein anaerober Kreislauf über CH₄ und CO₂ muß als unwahrscheinlich gelten. Bis heute ist kein phototrophes Lebewesen bekannt geworden, das für die Synthese seiner Zellsubstanz CH₄ als Elektronendonator zu verwerten vermag. Könnte CH₄ von Sulfatreduzierern oxidiert werden, so wäre ein Kreislauf durch die Bildung von H₂S und CO₂ möglich; in dieser Arbeit konnten jedoch in den verwendeten anaeroben Schlämmen keine Methan-verwertenden Sulfatreduzierer nachgewiesen werden (s. C.2.), und die Ergebnisse in der Literatur sind widersprüchlich (s. 6.3.).

Die Methanbildung wäre demnach unter dauernd anaeroben Bedingungen eine "Sackgasse" des Abbaus organischer Verbindungen und ist auch als solche in Abb. 41 dargestellt.

6.4.2. Wechselbeziehungen zwischen aerober und anaerober Lebewelt

Die Umsetzung von Biomasse über gärende und Sulfat-reduzierende Bakterien und die anoxygene Photosynthese ermöglichen einen in sich geschlossenen, selbständigen anaeroben Kreislauf: Weil in Gegenwart von Sulfat kein Methan entsteht, dürfte der Abbau unter diesen Bedingungen letztlich nur Produkte liefern, die von Purpurbakterien und grünen Schwefelbakterien im Licht für die Synthese von Zellmasse verwertet werden können. Dennoch sind die Substratumsetzungen der chemotrophen anaeroben Bakterien an natürlichen Standorten sicherlich in größerem Maße mit der aeroben Lebewelt verbunden als mit den anoxygenen phototrophen Bakterien. Den Hauptanteil der organischen Substrate gärender, Sulfat-reduzierender und Methan-bildender Bakterien stellen organische Substanzen bzw. Folgeprodukte organischer Substanzen, die aus dem aeroben Bereich in die reduzierten Sedimente und Schlämme gelangt sind. Umgekehrt kommen Produkte der anaeroben Bakterien auch wiederum mit dem aeroben Bereich in Berührung und werden dort mit Sauerstoff oxidiert. Die Verwertung verschiedener anaerob gebildeter Verbindungen durch aerobe Lebewesen ist im rechten Drittel von Abb. 41 dargestellt; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die betreffenden Pfeile nicht durchgehend eingezeichnet.

Das unter anaeroben Bedingungen wahrscheinlich nicht abbaubare Methan wird in Gegenwart von Sauerstoff von spezifischen Bakterien vollständig oxidiert und mündet so in den umfassenden, aeroben Kreislauf ein. Das gleich gilt für Gärungsprodukte, die an die Luft gelangen. Für Wiederkäuer stellen die im anaeroben Pansen gebildeten Gärungsprodukte, vor allem lösliche Fettsäuren, die hauptsächliche Energie- und Kohlenstoffquelle dar

(vgl. HUNGATE, 1966). Gärungsprodukte werden ferner von spezialisierten Pilzen oder Bakterien mit Luftsauerstoff vollständig oxidiert und so dem aeroben Kreislauf zugeführt.

Die aerobe Oxidation von Schwefelwasserstoff hat vor allem in marinen Sedimenten eine große ökologische Bedeutung. Weil Meerwasser nahezu 30 mmol Sulfat pro l enthält, ist dieses als Elektronenakzeptor beim anaeroben Abbau fast immer im Überschuss vorhanden. Die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur vollständigen Oxidation erklärt nunmehr auch, weshalb mehr als die Hälfte des anfallenden organischen Materials in marinen Sedimenten durch die dissimilatorische Sulfatreduktion mineralisiert werden kann (JØRGENSEN und FENCHEL, 1974; JØRGENSEN, 1977 a,b). Das gebildete Sulfid diffundiert in den aeroben Bereich und wird dort chemisch oder vor allem durch Thiobacilli und farblose Schwefelbakterien oxidiert; dabei entsteht über Schwefel oder Thiosulfat letztlich wieder Sulfat. Zwischen der aeroben und der anaeroben Zone der Sedimente findet ein Schwefelkreislauf statt, der allein durch Substrate aus der aeroben Lebewelt unterhalten werden könnte; daher ist dieser Schwefelkreislauf auch in Sedimenten möglich, in welche kein Tageslicht gelangen und die Photosynthese roter und grüner Schwefelbakterien unterhalten kann. Der Vorgang wäre als eine indirekte Oxidation von Biomasse mit Sauerstoff zu beschreiben, wobei die Oxidationsstufen des Schwefels zwischen dem aeroben und dem anaeroben Milieu vermitteln (vgl. auch Abb. 39).

Ammoniak bzw. Ammonium, welches in der Natur primär nur beim Abbau von Zellsubstanz entsteht, wird von nitrifizierenden Bakterien zu Nitrat oxidiert. Nitrat wird von den echten Denitrifizierern als Elektronenakzeptor für die vollständige Oxidation organischer Verbindungen verwertet. Weil dabei schließlich N_2 entsteht, ist ein Kreislauf des Stickstoffs in diesem Falle nur über N_2 -fixierende Bakterien möglich. Einige Bakterien, wie zum Beispiel auch der mit Propionat isolierte Sulfatreduzierer 1pr3, vermögen Nitrat dissimilatorisch bis zur Stufe von NH_4^+ zu reduzieren (s. Tab. 20 und Kapitel 1.2.3.). Untersuchungen von

KOIKE und HATTORI (1978) und SØRENSEN (1978) lassen vermuten, daß die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium sogar ein wesentlicher Reaktionsweg im Stickstoffkreislauf mariner Sedimente ist. Stamm 1pr3 war mit NO_3^- ebenso wie mit SO_4^{2-} als Elektronenakzeptor nur zu einer unvollständigen Oxidation mit Acetat als Endprodukt fähig; ob andere Bakterien bei der dissimilatorischen Reduktion von Nitrat zu Ammonium ihre organischen Substrate vollständig oxidieren können, geht aus der Literatur nicht hervor. Aber selbst dann, wenn es dissimilatorische NH_4^+ -bildende Nitratreduzierer mit der Fähigkeit zur vollständigen Oxidation gäbe, wäre der resultierende Stickstoffkreislauf kein dem anaeroben Schwefelkreislauf vergleichbarer selbständiger Prozeß. Bis heute ist nämlich keine Photosynthese bekannt, die NH_4^+ oder gar N_2 als Elektronendonator verwerten und in NO_3^- überführen könnte. Die Neubildung von NO_3^- ist nur mit O_2 als Oxidationsmittel und biologisch auch nur aus Ammonium möglich. Die dissimilatorische Nitratreduktion ist bei einem gegebenen Substrat fast so stark exergonisch wie die Atmung (s. 6.3., Reaktionen d und e), unterscheidet sich also auch energetisch erheblich von den rein anaeroben Abbauvorgängen. Nitrat könnte man daher als ein Äquivalent für Sauerstoff auffassen.

Den bisher dargestellten Abbau- und Synthesereaktionen des natürlichen Stoffkreislaufs wird ständig ein gewisser Anteil organischer Substanz in Form hochpolymerer Verbindungen entzogen; zu diesen gehören die sogenannten Huminstoffe. Derartige Polymere werden nur extrem langsam oxidiert, gelangen also erst über einen parallelen Abbauweg mit sehr niedriger Umsatzrate wieder in den normalen Stoffkreislauf. Insbesondere in Abwesenheit von Sauerstoff bereitet der Abbau bestimmter Polymere aus der aeroben Lebewelt der anaeroben Bakterienflora Schwierigkeiten: Messungen von HACKETT et al. (1977) zeigten, daß die Gerüstsubstanz Lignin anaerob wahrscheinlich gar nicht abgebaut werden kann. Organische Verbindungen dieser Art können über geologische Zeiträume festgelegt werden.

6.5. Schlußbetrachtung

Sulfat-reduzierende Bakterien vermögen die verschiedensten Produkte zu oxidieren, die bei dem primären anaeroben Abbau von Biomasse durch die Tätigkeit gärender Bakterien anfallen: Fettsäuren, die wohl wichtigsten Gärungsprodukte, zählen ebenso zu den Substraten Sulfat-reduzierender Bakterien wie Wasserstoff, Alkohole, Lactat und Dicarbonsäuren. Selbst aromatische Verbindungen können als Elektronendonatoren für die dissimilatorische Reduktion von Sulfat dienen. Die Verwertung des häufigsten Gärungsprodukts, des Acetats, bedeutet gleichzeitig die Fähigkeit zur vollständigen Oxidation. Mikrobiologisch wird nunmehr ein Weg sichtbar, Biomasse über Gärungsprozesse direkt der dissimilatorischen Sulfatreduktion zuzuführen und anaerob zu mineralisieren. Daß Sulfatreduzierer diese Abbauleistung an natürlichen Standorten tatsächlich vollbringen können, geht aus Untersuchungen zu den Umsetzungen in Sedimenten und Schlämmen hervor: Der wesentliche Beitrag der Sulfatreduktion zur Mineralisierung in marinen Sedimenten und die Unterdrückung der Methanbildung durch Sulfat können nur mit vollständig oxidierenden Sulfatreduzierern hinreichend erklärt werden. Desgleichen sind auch die gelegentliche Massenproduktion von Schwefelwasserstoff in Gewässern mit einer höheren Sulfatkonzentration sowie die vermutete Bildung der sedimentären Lagerstätten von Schwefel und sulfidischen Erzen durch biologisch gebildeten Schwefelwasserstoff (s. A.2.5.) jetzt verständlich: Die H_2S -Produktion kann bzw. konnte dieses Ausmaß wahrscheinlich nur deshalb erreichen, weil das organische Material weitgehend als Elektronendonator für die dissimilatorische Reduktion von Sulfat genutzt werden kann.

Aus der Stoffwechselleistung der neu isolierten Sulfatreduzierer sollte allerdings nicht gefolgert werden, daß mit diesen bereits die wesentlichen Vertreter gefunden wurden, die auch unter den natürlichen Bedingungen die betreffenden Verbindungen abbauen. So muß zum Beispiel damit gerechnet werden, daß in den Sedimenten und Schlämmen auch noch weitere Arten mit ganz ähn-

lichen Fähigkeiten vorkommen, die jedoch gegen die hier verwendeten Medien empfindlich sind: In einer Anreicherung mit Schlamm und Wasser vom natürlichen Standort hatten sich unter starker H_2S -Produktion fädige, gleitend bewegliche Bakterien entwickelt, bei denen es sich wahrscheinlich um Sulfatreduzierer gehandelt hat (s. C.1.2.1.); in den synthetischen Medien hingegen vermehrten sich diese nicht mehr weiter. Ferner wurden in den Anreicherungen diejenigen Bakterien selektioniert, die bei den verwendeten hohen Substratkonzentrationen am schnellsten wuchsen. An natürlichen Standorten begrenzen dagegen die löslichen organischen Substrate im Normalfalle das Wachstum und kommen daher nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor, obwohl die Umsatzraten bisweilen beachtlich sind. Unter diesen Bedingungen können an den Reaktionen auch solche Bakterien entscheidend beteiligt sein, die zwar bei hohen Substratkonzentrationen langsamer wachsen als die isolierten Arten, bei Substratbegrenzung aber aufgrund einer höheren Affinität zu den betreffenden Verbindungen im Vorteil sind (vgl. 6.3.).

Anhand der isolierten Arten wird jedoch immerhin deutlich, daß die Sulfat-reduzierenden Bakterien eine morphologisch sehr vielgestaltige Gruppe sind. Coccoide, ovale, stäbchenförmige und vibrioide Zelltypen sind ebenso vertreten wie Sarcinen-ähnliche, kompakte Zellverbände; die auffälligsten Formen sind aber zweifellos die Filament-bildenden, gleitend beweglichen Sulfatreduzierer, die einen der höchsten Organisationsgrade in der prokaryotischen streng anaeroben Lebewelt darstellen dürften. Die morphologischen Unterschiede lassen erkennen, daß viele Sulfat-reduzierende Bakterien phylogenetisch weit voneinander entfernt sind, trotz der gemeinsamen physiologischen Fähigkeit zur Verwertung von Sulfat als externen Elektronenakzeptor. Man könnte vermuten, daß die heute lebenden Arten das Ergebnis einer langen divergenten Evolution aus einem "Ur-Sulfatreduzierer" darstellen. Andererseits lassen jedoch wesentliche Komponenten des Schwefelstoffwechsels völlig unerwartete Querverbindungen zwischen den verschiedensten Zelltypen sichtbar werden: Die Sulfit-Reduktase Desulfovirdin wurde bisher nicht nur in

vielen vibrioiden Arten gefunden, sondern ebenso in einem coccoiden und sogar in einem fädigen, gleitenden Sulfatreduzierer. Andere vibrioide Formen hatten hingegen kein Desulfovirdin (s. C.3.4. und Tab. 14). Auch ein zweiter fädiger, gleitender Stamm enthielt kein Desulfovirdin, sondern die Sulfit-Reduktase P-582; dieses Pigment war zuvor nur in Arten der Gattung Desulfotomaculum nachgewiesen worden. Solche Parallelen auf biochemischem Sektor werfen die Frage auf, ob im Verlaufe der Evolution vielleicht Gene für die Sulfatreduktion auf Bakterien verschiedener phylogenetischer Zweige übertragen worden sind. Die Abstammung der heute lebenden Sulfatreduzierer erscheint also vorerst noch rätselhaft. Die Vergleiche zeigen jedoch soviel, daß die Sulfatreduzierer eine Bakteriengruppe mit einer langen Entwicklungsgeschichte sind; wahrscheinlich ist die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion bereits in einem frühen Stadium des Lebens auf diesem Planeten entstanden.

Der Abbau biologischen Materials durch gärende und Sulfat-reduzierende Bakterien und die Neusynthese durch phototrophe rote und grüne Schwefelbakterien ermöglichen einen rein anaeroben Kreislauf über die verschiedenen Oxidationsstufen des Schwefels und des Kohlenstoffs. In der heutigen Biosphäre steht jedoch die Abbauleistung der Gärer und der Sulfatreduzierer in vielfachen Wechselbeziehungen mit der aeroben Lebewelt, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde. Dagegen mag der rein anaerobe Schwefelkreislauf eine dominierende Rolle gespielt haben, als in der frühen Entwicklungsphase des Lebens auf der Erde noch kein freier Sauerstoff vorhanden war. Unter diesen vermuteten reduzierenden Bedingungen muß Schwefel in der Hauptsache als Sulfid bzw. Schwefelwasserstoff vorgelegen haben. Die ersten Lebewesen, die auftraten, stellt man sich als gärende Bakterien vor, welche in den reichlich vorhandenen organischen Syntheseprodukten aus der chemischen Evolution ihre Energiequelle fanden und diese zu einfacheren organischen Verbindungen umsetzten (BRODA, 1975). Eine biologische Neusynthese höherer organischer Verbindungen war mit dem Aufkommen der Bakterien möglich, die das Licht als Energiequelle zu nutzen verstanden;

diese Bakterien mögen den heutigen organotrophen Schwefel-freien Purpurbakterien vergleichbar gewesen sein. Weiterhin wäre vorstellbar, daß sich in den reduzierten Ozeanen Methanbakterien als die chemotrophen Endabbauer immer stärker entwickelten; diese könnten schließlich schneller CH_4 produziert haben, als unter den anaeroben Verhältnissen durch chemische Reaktionen infolge elektrischer Entladungen und energiereicher Strahlung wieder in biologisch verwertbare organische Substanzen überführt werden konnte. Dadurch wurde der Anteil organischer Verbindungen, die für die organotrophe Photosynthese zur Verfügung standen, immer geringer. Irgendwann mag sich unter diesen Bedingungen eine neuer Stoffwechselltyp phototropher Bakterien durchgesetzt haben, der das reichlich vorhandene Sulfid als Elektronendonator zu nutzen verstand, nämlich die roten und grünen Schwefelbakterien. Mit dem Auftreten von Sulfat als dem Produkt der lichtgetriebenen Oxidation von H_2S zusätzlich zur synthetisierten Biomasse wurde ein Zustand geschaffen, der energiereicher war als die organischen Verbindungen untereinander (s. 6.3., Reaktionen b und c). Die aus Zellsubstanz gebildeten Gärungsprodukte und das gebildete Sulfat wurden dann als neue Quelle chemischer Energie erschlossen und führten zur Entfaltung der Sulfat-reduzierenden Bakterien. Überträgt man die heutigen Erfahrungen auf jene angenommene Entwicklungsstufe, so wurde mit dem Aufkommen der Sulfatreduzierer erstmals der Methanbildung ein gewisser Einhalt geboten. Nunmehr existierte ein neuer umfassender Stoffkreislauf, in welchen viele organische Gärungsprodukte miteinbezogen werden konnten, und der über die rein anorganische Stufe von H_2S und CO_2 führte.

Die frühesten Lebewesen, die Wasser als Elektronendonator für die Photosynthese ihrer Zellsubstanz verwerteten und somit den ersten Sauerstoff freisetzten, waren wahrscheinlich Cyanobakterien (STANIER, 1974); die oxygene Photosynthese wäre demnach eine "Erfindung" der Prokaryonten. Der Zustand, der durch die Synthese organischer Verbindungen unter gleichzeitiger Freisetzung von Sauerstoff geschaffen wurde, lag energetisch wesentlich höher als irgendeines der anaeroben ATP-liefernden Systeme.

me. Reduktionsäquivalente aus organischen Verbindungen und freier Sauerstoff wurden dann zur Energiequelle der aufkommenden atmenden Bakterien. Das sehr positive Redoxpotential der Reaktion von Sauerstoff zu Wasser ermöglichte nicht nur, die verschiedensten organischen Verbindungen mit einem hohen ATP-Gewinn zu oxidieren; darüber hinaus konnten auch anorganische Substanzen, wie H_2S , NH_4^+ oder selbst Fe(II)-Verbindungen oxidiert und für eine Energiekonservierung genutzt werden. Ferner stand mit dem Sauerstoff nunmehr auch ein reaktives Element zur Verfügung, um das reaktionsträge Methan einer biologischen Verwertung als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle zugänglich zu machen.

Oxygene Photosynthese und Atmung wurden schließlich zu den grundlegenden biochemischen Prozessen eines neuen Reichs von Organismen, der Eukaryonten; auf welche Weise diese entstanden sein könnten, ist ein ungelöstes Problem der Evolutionsforschung. Die Entwicklung der Eukaryonten, die der Pflanzen und der Tiere, führte zu ungleich höheren Organisationsstufen, als jemals unter Prokaryonten vorkamen. Vielleicht war auch diese Evolution der Eukaryonten gerade erst deshalb möglich, weil das überall und reichlich vorhandene Wasser als Elektronendonator genutzt werden konnte, und weil umgekehrt die Atmung einen sehr leistungsfähigen Prozeß für eine Gewinnung von ATP darstellt (PFENNIG, 1979). Der Lebensraum wurde durch die eukaryotischen Organismen entscheidend geprägt. Der ständig ansteigende O_2 -Gehalt der Atmosphäre schränkte den Bereich der anaeroben Lebewesen mehr und mehr ein, die sich in tieferliegende Zonen von Sedimenten und Verdauungssysteme von Tieren zurückzogen. Die Stoffwechselfähigkeiten der Anaerobier blieben jedoch in diesen Nischen erhalten oder wurden vielleicht auch noch weiterentwickelt. Bei reichlicher Gegenwart von Sulfat, wie zum Beispiel in marinen Sedimenten, leistet die dissimilatorische Sulfatreduktion auch noch heute einen wesentlichen Beitrag zum Abbau anfallender Biomasse. Kommt es an diesen Standorten zu einem Überangebot an zersetzlichem organischen Material, so kann sich der anaerobe Bereich bei gleichzeitiger

Produktion des reaktiven und giftigen Schwefelwasserstoffs schnell ausweiten und das höhere Leben im Wasser bedrohen. Als Folge der H_2S -Bildung treten dann nicht selten vermehrt phototrophe Schwefel-Purpurbakterien auf, die das Wasser rot färben. Eine solche Entwicklung in einem Gewässer gleicht einem Rückschritt in den archaischen anaeroben Zustand.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aus anaeroben Schlämmen von verschiedenen Standorten wurden mit Acetat, Propionat, Butyrat, Palmitat, Stearat bzw. Benzoat als jeweils einzigem organischen Substrat Sulfat-reduzierende Bakterien angereichert; 22 Stämme wurden insgesamt in Reinkultur isoliert. Bisher waren keine Sulfat-reduzierenden Bakterien bekannt, welche die genannten organischen Säuren zu verwerten vermochten.

Einige der neu isolierten Stämme zeigten morphologische Ähnlichkeit mit Arten der Gattungen Desulfovibrio und Desulfotomaculum. Darüber hinaus wurden etliche neue Zelltypen Sulfat-reduzierender Bakterien isoliert, nämlich coccoide, ovale, zitronenförmige, Sarcinen-bildende und Filament-bildende, gleitend bewegliche Arten.

Die isolierten Sulfatreduzierer vermochten mit der jeweils verwendeten Fettsäure bzw. mit Benzoat in rein synthetischen, mineralischen Nährlösungen zu wachsen. Als Reduktionsmittel wurden Sulfid und bisweilen zusätzlich geringe Mengen Dithionit vorgegeben. Mehrere Stämme benötigten Vitamine, wie 4-Aminobenzoessäure, Biotin, Thiamin oder B_{12} . In einigen Fällen konnte das Wachstum durch kleinere Gaben von Gemischen organischer Säuren oder von Extrakten aus vergorenen komplexen Substraten stimuliert werden. Marine Stämme und Stämme von Brackwasser-Standorten benötigten häufig höhere Konzentrationen an $NaCl$ und $MgCl_2$. Ein Filament-bildender Sulfatreduzierer zeigte ein Bedürfnis für ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Ca^{2+} -Ionen. pH- und Temperatur-Optima wurden bestimmt.

Die isolierten Sulfatreduzierer wurden auf ihre Fähigkeit zur Verwertung verschiedener Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren sowie zum Wachstum durch Gärung geprüft:

a) Acetat wurde nicht nur von den Sulfatreduzierern verwertet, die damit direkt isoliert worden waren; auch ein mit Stearat isolierter Stamm und alle vier mit Benzoat isolierten Stämme oxidierten Acetat und ebenso andere verwertbare Substrate vollständig zu CO_2 . Die vollständige Oxidation organischer Substrate wurde in stöchiometrischen Messungen mit sechs morphologisch verschiedenen Sulfatreduzierern an Acetat, an einer langkettigen Fettsäure und an Benzoat nachgewiesen. Die Sulfatreduzierer, die mit Propionat, Butyrat oder Palmitat isoliert worden waren, vermochten kein Acetat zu verwerten, sondern bildeten dieses als Endprodukt. Die mit Butyrat und die mit Palmitat isolierten Stämme oxidierten Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen pro Molekül ausschließlich zu Acetat, Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen zu Acetat und Propionat. Die physiologische Gruppe der Sulfatreduzierer läßt sich aufgrund der beobachteten Substratumsetzungen in zwei wichtige Untergruppen einteilen:

I. Sulfat-reduzierende Bakterien
mit unvollständiger Oxidation

II. Sulfat-reduzierende Bakterien
mit vollständiger Oxidation

Weitere, von beiden Untergruppen häufig verwertete Elektronendonatoren waren H_2 , einwertige Alkohole, Formiat, verzweigtkettige Fettsäuren, Lactat, Pyruvat, Succinat und Fumarat. Kohlenhydrate wurden nie verwertet.

b) Anstelle von Sulfat wurden häufig Sulfit oder Thiosulfat als Elektronenakzeptoren verwertet, nicht dagegen elementarer Schwefel oder Fumarat. Ein mit Propionat isolierter Sulfatreduzierer vermochte in Abwesenheit von Sulfat mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu wachsen, welches stöchiometrisch

zu Ammonium reduziert wurde. Bei einigen Stämmen wurde in Sulfat-freiem Medium ein Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen beobachtet; dieses beruhte aber wahrscheinlich nicht auf einer direkten Verwertung von O_2 , sondern auf einer möglichen intermediären Bildung von verwertbarem Thiosulfat aus Sulfid und O_2 auf chemischem Wege.

c) In Abwesenheit externer Elektronenakzeptoren vermochten viele Stämme Pyruvat zu vergären. Einige der Stämme, die in Gegenwart von Sulfat zur Verwertung von Propionat fähig waren, konnten beim Fehlen eines Elektronenakzeptors durch Vergärung von Lactat zu Acetat und Propionat wachsen. In einem Falle wurde eine Vergärung von Fumarat zu Acetat, Propionat und Succinat beobachtet. Fettsäuren und Benzoat konnten stets nur in Gegenwart externer Elektronenakzeptoren umgesetzt werden.

Eine Verwertung von Methan oder höheren Alkanen durch Sulfatreduzierende Bakterien konnte in Anreicherungsversuchen mit verschiedenen anaeroben Schlämmen nicht nachgewiesen werden. Reinkulturen von Sulfatreduzierern, die mit höheren Fettsäuren zu wachsen vermochten, waren nicht in der Lage, die entsprechenden Alkane zu verwerten.

Von allen isolierten Sulfatreduzierern enthielten nur drei Stämme die Sulfit-Reduktase Desulfovibrin, und zwar ein vibrioider, ein coccoider und ein Filament-bildender Stamm. Die Sulfit-Reduktase P-582 kam ebenfalls in morphologisch sehr verschiedenen Typen Sulfat-reduzierender Bakterien vor, nämlich in einem stäbchenförmigen, zur Bildung von Sporen befähigten, in einem weiteren Filament-bildenden und wahrscheinlich auch in einem vibrioiden Stamm. Sieben Stämme wurden ferner auf Cytochrome geprüft: Nur einer von diesen enthielt ausschließlich b-Typ-Cytochrom; in den übrigen Stämmen wurden sowohl b- als auch c-Typ-Cytochrome zusammen nachgewiesen.

Ernährungsphysiologische Fähigkeiten und das Vorkommen von Pigmenten waren als Kriterien für eine taxonomische Einordnung der Sulfatreduzierer ungeeignet. Neun der neu isolierten Arten wurden aufgrund der Morphologie, des Verhaltens bei der Gram-Färbung und - soweit ermittelt - des GC-Gehalts der DNS entweder als neue Arten neuer Gattungen beschrieben oder als neue Arten den bisher bekannten Gattungen zugeordnet (s. auch Teil F.):

Neue Arten neuer Gattungen:

Desulfobacter postgatei. Ovale Zellen; isoliert mit Acetat; vollständige Oxidation.

Desulfobulbus propionicus. Zitronenförmige Zellen; isoliert mit Propionat; unvollständige Oxidation.

Desulfococcus multivorans. Coccoide Zellen; isoliert mit Benzoat; vollständige Oxidation.

Desulfonema limicola. Zellfilamente; isoliert mit Acetat; vollständige Oxidation.

Desulfonema magnum. Zellfilamente; isoliert mit Benzoat; vollständige Oxidation.

Desulfosarcina variabilis. Sarcinen-bildende Zellen oder freischwebende ovale Zellen; isoliert mit Benzoat; vollständige Oxidation.

Neue Arten bekannter Gattungen:

Desulfotomaculum acetoxidans. Stäbchenförmige, Sporen-bildende Zellen; isoliert mit Acetat; vollständige Oxidation.

Desulfovibrio sapovorans. Große, vibrioide Zellen; isoliert mit Palmitat; unvollständige Oxidation.

Desulfovibrio baarsii. Kleine, vibrioide Zellen; isoliert mit Stearat; vollständige Oxidation.

Für energetische Betrachtungen zur Oxidation von Acetat durch Sulfat-reduzierende Bakterien wurde die bekannte Aktivierung von Sulfat zu APS zugrunde gelegt: Um bei der verhältnismäßig schwach exergonischen Oxidation von Acetat mit Sulfat einen Nettogewinn von ATP zu ermöglichen, muß wahrscheinlich das bei der Sulfataktivierung gebildete Pyrophosphat mindestens zum Teil energetisch genutzt werden; vergleichende Ertragsmessungen mit einem besonders gut wachsenden Acetat-verwertenden Sulfatreduzierer, Desulfobacter postgatei, in Gegenwart von Sulfat bzw. Sulfit ließen eine weitgehende energetische Nutzung des Pyrophosphats vermuten.

Einige der Sulfatreduzierer, die zu einer vollständigen Oxidation ihrer Substrate fähig waren, vermochten mit H_2 und CO_2 bzw. mit Formiat ohne Zusatz einer weiteren organischen C-Quelle zu wachsen. Bislang waren keine Reinkulturen von Sulfatreduzierern bekannt, die autotroph zu wachsen vermochten. Eine CO_2 -Fixierung über den Calvin-Cyclus konnte nicht nachgewiesen werden; wahrscheinlich lagen dem autotrophen Wachstum der Sulfatreduzierer andere, energetisch günstigere Assimilationswege zugrunde.

Vier morphologisch unterschiedliche Sulfatreduzierer vermochten Benzoat zu verwerten. Ein coccoider Stamm, Desulfococcus multivorans, benötigte für das Wachstum mit Benzoat die Spurenelemente Selen und Molybdän. Für das Wachstum eines Sarcinen-ähnlichen Sulfatreduzierers, Desulfosarcina variabilis, mit Benzoat mußte den Medien nur Molybdän, jedoch kein Selen zugesetzt werden. Ein weiterer Benzoat-verwertender Sulfatreduzierer (unbenannte Art), der ovale Zellen bildete, ließ kein eindeutiges Bedürfnis für diese Spurenelemente erkennen. Ein Filament-bildender Sulfatreduzierer, Desulfonema magnum, vermochte mit Benzoat stets ohne jeglichen Zusatz von Selen oder Molybdän zu wachsen. Vergleichende Wachstumsmessungen auf verschiedenen Substraten zeigten, daß Selen bzw. Molybdän von den betreffen-

den Stämmen nur für die Verwertung von Benzoat bzw. verwandten aromatischen Verbindungen benötigt wurden. Die Wirkung von Selen, Molybdän und chemisch ähnlichen Elementen wurde in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen untersucht.

Mehrere Stämme wurden auf die Fähigkeit geprüft, in Abwesenheit von Sulfat zusammen mit Methanbakterien syntrophe Mischkulturen zu bilden. Eine Umsetzung von Fettsäuren oder Benzoat zu Methan wurde jedoch bei diesen Versuchen nicht beobachtet. Mit Lactat war dagegen in einem Falle ein Wachstum in Mischkultur unter Bildung von Methan möglich.

Die Fähigkeit Sulfat-reduzierender Bakterien zur Verwertung der häufigsten Gärungsprodukte sowie zur vollständigen Oxidation führt zu einem neuen mikrobiologischen Verständnis anaerober Abbauvorgänge: Durch die Tätigkeit gärender und Sulfat-reduzierender Bakterien ist eine weitgehende Mineralisierung organischen Materials biologischer Herkunft auch unter streng anaeroben Bedingungen grundsätzlich möglich; daß ein solcher Endabbau über die dissimilatorische Sulfatreduktion an natürlichen Standorten verbreitet ist, kann durch Ergebnisse zahlreicher ökologischer Untersuchungen aus der Literatur bestätigt werden. Insbesondere in marinen Sedimenten haben Sulfat-reduzierende Bakterien wegen der hohen Sulfatkonzentration des Meerwassers (ca. 30 mmol/l) eine größere Bedeutung für die Mineralisierung des anfallenden organischen Materials.

F. DESCRIPTION OF SPECIES

1. Genus Desulfobacter

De.sul.fo.bac'ter. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; M. L. n. bacter masc. equivalent of Gr. fem. n. bacteria rod or staff; M. L. masc. n. Desulfobacter a rod-shaped sulfate reducer.

Rod-shaped to ellipsoidal cells, 1 - 2 by 1.7 - 3.5 μm , with rounded ends, single or in pairs. Motile forms with single polar flagella have been observed. Tendency to stick together in clumps forming a sediment. Gram negative.

Chemoorganotroph; metabolism respiratory. Acetate is used as electron donor and completely oxidized to CO_2 . Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H_2S .

Strict anaerobes. Media containing a reductant, higher concentrations of NaCl and MgCl_2 and vitamins are required for growth.

Temperature optimum: 28 - 32 $^{\circ}\text{C}$; growth may occur already at 10 $^{\circ}\text{C}$.

Cells contain b- and c-type cytochromes.

Habitats: anaerobic sludge of brackish water and marine environments.

Desulfobacter postgatei

Post.ga'te.i. M. L. gen. n. postgatei of J. R. Postgate, an English microbiologist who has made the sulfate-reducing bacteria well-known by many studies.

Rod-shaped to ellipsoidal cells, 1 - 1.5 by 1.7 - 2.5 μm , with rounded ends, single or in pairs. Not motile. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph. Acetate, the only electron donor used, is completely oxidized to CO_2 . Sulfate, sulfite, or thiosulfate serve as electron acceptors and are reduced to H_2S ; not utilized: elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide as reductant and not less than 120 mmol NaCl/l and 6 mmol MgCl_2 /l. 4-Aminobenzoate and biotin are needed as vitamins.

pH-range: 6.2 - 8.5, optimum at 7.3. Temperature range: 10 - 37 $^\circ\text{C}$, optimum at 32 $^\circ\text{C}$.

Cell membrane and cytoplasmatic fraction contain b- and c-type cytochromes the former of which are extractable with acetone + HCl. Desulfovibrin not present.

DNA base ratio: 45.9 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of brackish water or marine environments. Specific enrichment with acetate and sulfate.

Type strain: "Dangast", 2ac9.

2. Genus Desulfobulbus

De.sul.fo.bul'bus. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; L. n. bulbus onion; M. L. masc. n. Desulfobulbus onion-shaped sulfate reducer.

Cells ellipsoidal, 1 - 1.3 by 1.5 - 2 μm , with tendency to form pointed ends causing lemon or onion shape; single, in pairs or in chains. Motile forms with single polar flagella have been observed. Gram negative.

Chemoorganotroph; metabolism respiratory and/or fermentative. Compounds of low molecular weight are used as substrates and incompletely oxidized to acetate as an end product. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H_2S .

Strict anaerobes. Media containing a reductant and vitamins are required for growth. Marine forms sometimes require higher concentrations of NaCl and MgCl_2 .

Temperature optimum: 28 - 39 $^\circ\text{C}$, but growth may occur already at 10 $^\circ\text{C}$.

Cells contain b- and c-type cytochromes.

Habitats: anaerobic sludge of fresh and brackish water and marine environments.

Desulfobulbus propionicus

Pro.pi.o'ni.cus. M. L. n. acidum propionicum propionic acid; M. L. adj. propionicus pertaining to propionic acid.

Cells lemon or onion-shaped (pointed ends), sometimes ellipsoidal, 1 - 1.3 by 1.8 - 2 μm , single, in pairs or in chains. Not motile. Electron microscopy exhibits cells surrounded by pili. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph. H_2 , ethanol, propanol, propionate, lactate and pyruvate are utilized as electron donors; organic compounds are incompletely oxidized to acetate as an end product. Growth on H_2 requires acetate as carbon source. Not utilized as electron donors: formate, acetate, butyrate and higher fatty acids, succinate, fumarate, malate, benzoate, sugars. Sulfate, sulfite and thiosulfate serve as electron acceptors and are reduced to H_2S ; nitrate can also serve as electron acceptor and is stoichiometrically reduced to ammonium; not utilized:

elemental sulfur, fumarate and oxygen. In the absence of an electron acceptor growth is also possible by fermentation of lactate or pyruvate, but not fumarate.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide as reductant and 4-aminobenzoate as vitamin.

pH-range: 6.0 - 8.6, optimum at 7.2. Temperature range: 10 - 43 °C, optimum at 39 °C.

Cell membrane and cytoplasmatic fraction contain b- and c-type cytochromes the former of which are extractable with acetone + HCl. Desulfovibrin not present.

DNA base ratio: 59.9 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of fresh water environments. Specific enrichment with propionate.

Type strain: "Lindhorst", 1pr3.

3. Genus Desulfococcus

De.sul.fo.coc'cus. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; M. L. n. coccus masc. equivalent of Gr. masc. n. coccus grain, berry; M. L. masc. n. Desulfococcus a berry-shaped (spherical) sulfate reducer.

Spherical cells, 1.5 - 2.2 µm in diameter, single or in pairs. Storage of granules of poly-β-hydroxybutyric acid. Motile forms have been observed. Gram negative.

Chemoorganotroph or chemoautotroph; metabolism respiratory and/or fermentative. Organic substrates are completely oxidized to CO₂. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H₂S.

Strict anaerobes. Media containing a reductant and vitamins are required for growth.

Temperature optimum: 28 - 35 °C; growth may occur already below 20 °C.

Cells contain b- and c-type cytochromes.

Habitats: anaerobic sludge of fresh and brackish water and marine environments.

Desulfococcus multivorans

L. adj. multus many, numerous; L. v. voro devour, swallow; M. L. part. adj. multivorans devouring numerous kinds of substrates.

Spherical cells, 1.5 - 2.2 µm in diameter, single or in pairs. Storage of granules of poly-β-hydroxybutyric acid. Not motile. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph or chemoautotroph. Ethanol, propanol, butanol, formate, acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, 2-methylbutyrate, 3-methylbutyrate, higher fatty acids up to 14 carbon atoms, lactate, pyruvate, benzoate, cyclohexanecarboxylate, phenylacetate, 3-phenylpropionate and 2-hydroxybenzoate are utilized as electron donors; growth on formate does not require further organic carbon sources. Organic substrates are completely oxidized to CO₂. Not utilized as electron donors: H₂, succinate, malate, fumarate, adipate, pimelate, hippurate, 3-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, sugars. Sulfate, sulfite or thiosulfate serve as electron donors and are reduced to H₂S; not utilized: elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. In the absence of electron acceptors growth is possible by fermentation of lactate or pyruvate.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide as reductant and 4-aminobenzoate, biotin and thiamine as vitamins. Growth on benzoate and homologues requires selenite and molybdate as trace elements and is stimulated by small amounts of higher fatty acids, especially by those with an odd number of carbon atoms. Best growth occurs with 120 - 350 mmol NaCl/l and 6 - 15 mmol MgCl₂/l, but lower concentrations do not affect growth significantly.

pH-range: 6.7 - 7.9, optimum at 7.3. Temperature-range: 15 - 40 °C, optimum at 35 °C.

Cell membrane fraction contains b- and c-type cytochromes, the former of which are extractable with acetone + HCl; b- and c-type cytochrome content of cytoplasmatic fraction rather low. The cytoplasmatic fraction exhibits an absorption peak at 630 nm indicating the sulfite reductase desulfoviridin; with alkali the cytoplasmatic fraction shows red fluorescence when exposed to light of 365 nm.

DNA base ratio: 57.4 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of fresh and brackish water and marine environments. Specific enrichment with benzoate.

Type strain: "Göttingen", 1be1.

4. Genus Desulfonema

De.sul.fo.ne'ma. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; Gr. n. nema thread; M. L. neut. n. Desulfonema thread-forming sulfate reducer.

Long filaments of sometimes more than 1 mm length, formed by rod-shaped cells, 2.5 - 8 by 2.5 - 13 µm. Cells contain granules of poly-β-hydroxybutyric acid. Filaments are always

with simultaneous rotation; in sediments channels or tubes are left. Multiplication by cross division and breakage of longer filaments. Gram positive (unequally stained).

Chemoorganotroph or chemoautotroph; metabolism respiratory. Organic substrates are completely oxidized to CO₂. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H₂S.

Strict anaerobes. Media containing a reductant and vitamins are required for growth. Artificial sediments (0.2 % agar or inorganic precipitates) should be added to support gliding movement.

Temperature optimum: 28 - 32 °C, growth may occur already below 20 °C.

Cells contain b- and c-type cytochromes.

The G + C content of the DNA ranges from 34.5 - 41.6 mol%.

Habitats: anaerobic mud of brackish water and marine environments; filaments have been observed also in fresh water habitats.

Desulfonema limicola

Li.mi'co.la. L. n. limus mud; L. suff., verbal n. cola dweller
M. L. masc. n. limicola mud dweller.

Filaments sometimes a few mm long, formed by rod-shaped cells 2.5 - 3 by 2.5 - 3.5 µm. Cells contain granules of poly-β-hydroxybutyric acid. Filaments are always attached to surface or sediments; when cells are numerous, sediments and glass walls may be covered by iridescent, spider web-like layers. Gliding movement; in sediments channels or tubes are left.

filaments. No spore formation. Gram positive (unequally stained).

Chemoorganotroph or chemoautotroph. H_2 , formate, acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, 2-methylbutyrate, 3-methylbutyrate, higher fatty acids up to 14 carbon atoms, lactate, pyruvate, succinate, and fumarate are used as electron donors and completely oxidized to CO_2 ; growth on $H_2 + CO_2$ or on formate does not require additional carbon sources. Growth on acetate is slow but it can be stimulated by small amounts of succinate, higher fatty acids or extracts of anaerobically decomposed organic matter. Not utilized as electron donors: alcohols, malate, benzoate, cyclohexanecarboxylate, sugars. Sulfate, sulfite and thiosulfate serve as electron acceptors and are reduced to H_2S , not utilized: elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. Unable to ferment organic substances.

Strictly anaerobic. Media containing a reductant and not less than 200 mmol NaCl/l and 10 mmol $MgCl_2$ /l are required for growth; biotin is needed as vitamin. Artificial sediments (0.2 % agar or inorganic precipitates) favour growth significantly by supporting gliding movement.

pH-range: 6.5 - 8.8, optimum at 7.6. Temperature range: 15 - 36 °C, optimum at 30 °C.

Cell membrane fraction contains c-type cytochromes and small amounts of b-type cytochromes, the latter of which are extractable with acetone + HCl; cytoplasmatic fraction contains only c-type cytochromes. The cytoplasmatic fraction exhibits an absorption peak at 630 nm indicating the sulfite reductase desulfoviridin; with alkali the cytoplasmatic fraction shows red fluorescence when exposed to light of 365 nm.

DNA base ratio: 34.5 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of brackish water and marine environments. Enrichment favoured by fatty acids.

Type strain: "Jadebusen", 5ac10.

Desulfonema magnum

Mag'num. L. adj. magnus large, big.

Filaments sometimes several mm long, formed by rod-shaped cells, 6 - 8 by 9 - 13 μm . Cells contain granules of poly- β -hydroxybutyric acid. Filaments are always attached to surfaces or sediments; when cells are numerous, sediments and glass walls may be covered by iridescent spider web-like layers. Gliding movement often with simultaneous rotation; in sediments channels or tubes are left. Multiplication by cross division and breakage of longer filaments. No spore formation. Gram positive (unequally stained).

Chemoorganotroph. Formate, acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, 2-methylbutyrate, 3-methylbutyrate, higher fatty acids up to 10 carbon atoms, succinate, fumarate, malate, benzoate, hippurate, phenylacetate, 3-phenylpropionate, 4-hydroxybenzoate are used as electron donors and completely oxidized to CO_2 ; growth on formate requires some acetate as carbon source. Growth on acetate is slow but it can be stimulated by small amounts of succinate, higher fatty acids or extracts of anaerobically decomposed organic matter. Not utilized as electron donors: H_2 , alcohols, lactate, pyruvate, adipate, pimelate, cyclohexanecarboxylate, 2-hydroxybenzoate, 3-hydroxybenzoate, sugars. Sulfate serves as electron donor and is reduced to H_2S ; not utilized: sulfite, thiosulfate, elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. Unable to ferment organic substances.

Strictly anaerobic. Media containing a reductant, 350 mmol NaCl/l, 25 mmol $MgCl_2$ /l, 9 mmol $CaCl_2$ /l and not more than 1.5 mmol phosphate/l are required for growth; demand for calcium ions is unusually high and no growth occurs below 4 - 5 mmol $CaCl_2$ /l. 4-Aminobenzoate, biotin and B_{12} are

required as vitamins. Artificial sediments (0.2 % agar or inorganic precipitates) favour growth considerably by supporting gliding movement.

pH-range: 6.6 - 7.5, optimum at 7.0. Temperature range: 15 - 37 °C, optimum at 32 °C.

Cell membrane fraction contains b- and c-type cytochromes, the former of which can be extracted with acetone + HCl; cytochrome content of cytoplasmatic fraction very low. CO-difference spectrum of cytoplasmatic fraction exhibits absorption peaks at 413, 547 and 593 nm; spectrum resembles those of cytoplasmatic fractions of Desulfotomaculum species containing the sulfite reductase P 582.

DNA base ratio: 41.6 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of marine environments. Enrichment favoured especially by benzoate.

Type strain: "Montpellier", 4be13.

5. Genus Desulfosarcina

De.sul.fo.sar.ci'na. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; L. n. sarcina package, bundle; M. L. fem. n. Desulfosarcina a sulfate reducer forming cell packages.

Cells form packages causing sediments or live free in the culture medium. Cells liberated from packages may be irregularly shaped, while free-living forms are rod-shaped to ellipsoidal, 1 - 1.5 by 1.5 - 2.5 µm. Storage of granules of poly-β-hydroxybutyric acid. Motile forms with single polar flagella have been observed. Gram negative.

Chemoorganotroph or chemoautotroph; metabolism respiratory or fermentative. Organic substrates are completely oxidized to CO₂. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron

acceptors and are reduced to H₂S.

Strict anaerobes. Specialized media containing a reductant and higher concentrations of NaCl and MgCl₂ are required for growth.

Temperature optimum: 28 - 33 °C; growth may occur already below 20 °C.

Habitats: anaerobic sludge of brackish water and marine environments.

Desulfosarcina variabilis

Va.ri.a'bi.lis. L. adj. variabilis changeable, variable.

In sediments and in agar media cells form packages; cells liberated from packages are irregularly shaped. Subsequent transfer to liquid media leads mostly to free living rod-shaped to ellipsoidal cells, 1 - 1.5 by 1.5 - 2.5 µm. Storage of granules of poly-β-hydroxybutyric acid. In pure cultures not motile, but enrichments showed motile cells; single polar flagella are detectable in a few cases. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph or chemoautotroph. H₂, ethanol, propanol, butanol, formate, acetate, propionate, butyrate, 2-methylbutyrate, 3-methylbutyrate, higher fatty acids up to 14 carbon atoms, lactate, pyruvate, succinate, fumarate, benzoate, cyclohexanecarboxylate, hippurate, phenylacetate, 3-phenylpropionate, 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate are utilized as electron donors; growth on H₂ + CO₂ or on formate does not require further organic carbon sources. Growth on acetate is rather slow. Organic substrates are completely oxidized to CO₂. Not utilized as electron donors: iso-butyrate, malate, adipate, pimelate, 2-hydroxybenzoate, sugars. Sulfate, sulfite and thiosulfate serve as electron acceptors and are

reduced to H₂S; not utilized: elemental sulfur, nitrate, oxygen. In the absence of electron acceptors growth is possible by fermentation of lactate, pyruvate or fumarate.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide as reductant. 230 mmol NaCl/l and 10 mmol MgCl₂/l are optimal salt concentrations; at lower concentrations growth decreases significantly. Growth on benzoate and homologues requires molybdate as trace elements (requirement for selenium has not yet been established).

Cells are sensitive to light; growth is already inhibited completely by the diffuse daylight in rooms.

pH-range: 6.7 - 8.0, optimum at 7.4. Temperature-range: 15 - 38 °C, optimum at 33 °C.

Cells do not contain desulfovibrin.

Habitats: anaerobic mud of marine environments. Specific enrichment with benzoate and sulfate.

Type strain: "Montpellier", 3be13.

6. Genus Desulfotomaculum

De.sul.fo.to.ma'cu.lum. L. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; L. n. tomaculum a kind of sausage; M. L. neut. n. Desulfotomaculum a sausage-shaped sulfate reducer.

Straight or curved rods; 0.3 - 1.5 by 3 - 9 µm, with rounded or pointed ends, usually single, but sometimes in pairs or in chains. Motile with peritrichous or polar flagella. Spores oval to round, terminal to paracentral, causing slight swelling of the cells. Gram negative. Produce black colonies in agar containing a suitable carbon source, sulfate and ferrous salts.

Chemoorganotroph; metabolism respiratory. Species carrying out incomplete oxidation of organic substrates excrete acetate which cannot be oxidized further; when acetate is used as electron donor it is as well as the other substrates completely oxidized to CO₂. Limited range of substrates used, rarely includes carbohydrates. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H₂S.

Strict anaerobes. Specialized media containing a reductant and organic growth factors are required for growth.

Temperature optimum: 35 - 55 °C, maximum: 70 °C. Some strains grow at 20 - 30 °C.

Cells contain b-type cytochromes and sometimes also c-type cytochromes.

The G + C content of the DNA ranges from 37.5 - 45.5 mol%.

Habitats: anaerobic sludge of fresh water habitats, thermal regions, certain spoiled foods, intestines of animals, manure, faeces and rumen content.

Desulfotomaculum acetoxidans

a.cet.o'xi.dans. L. n. acetum vinegar; M. L. n. acidum aceticum acetic acid; M. L. v. oxido oxidize of Gr. adj. oxys sour, acid; M. L. part. adj. acetoxidans oxidizing acetic acid.

Straight or slightly curved rods, 1 - 1.5 by 3.5 - 9 µm, with pointed ends. Motile by means of single, polar flagella, 27 nm in diameter. Spores spherical, 1.5 µm in diameter, subterminal, causing swelling of the cells. Next to the spore a refractile gas vacuole. Spore-forming cells typically spindle-shaped. Gram negative.

Chemoorganotroph. Ethanol, butanol, acetate, butyrate and

iso-butyrate are completely oxidized to CO₂; valerate is oxidized to CO₂ and propionate; formate is poorly utilized and requires the presence of some acetate as carbon source. Not utilized: H₂, propanol, higher fatty acids than valerate, lactate, pyruvate, succinate, fumarate, malate, benzoate, sugars. Sulfate is reduced to H₂S. Not utilized as electron acceptors: sulfite, thiosulfate, elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. Unable to ferment organic substances.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide and dithionite as reductants. Biotin is needed as vitamin. Higher concentrations than 150 mmol NaCl/l inhibit growth.

pH-range: 6.6 - 7.6, optimum at 7.1. Temperature-range: 20 - 40 °C, optimum at 36 °C.

Pigments: cell membrane fractions contain b-type cytochromes, which are extractable with acetone + HCl. CO-difference spectrum of cytoplasmatic fraction exhibits absorption peaks at 412, 550 and 596 nm, indicating presence of the sulfite reductase P 582.

DNA base ratio: 37.5 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: manure and faeces of higher animals, rumen content, and anaerobic mud of fresh water especially if polluted with faeces. Specific enrichment with acetate and sulfate, from faeces and rumen also with butyrate.

Type strain: "Göttingen", 1ac2 (5575), DSM 771, deposited in: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen.

7. Genus Desulfovibrio

De.sul.fo.vi'bri.o. I. pref. de from; L. n. sulfur sulfur; L. v. vibro vibrate; M. L. masc. n. Vibrio that which vibrates, a generic name; M. L. masc. n. Desulfovibrio a vibrio that reduces sulfur compounds.

Curved rods, sometimes sigmoid or spirilloid, 0.5 - 1.5 by 2.5 - 10 µm. Morphology influenced by age and environment. Motile by means of single or lophotrichous polar flagella. Do not form endospores. Gram negative.

Chemoorganotrophs; metabolism respiratory and/or fermentative. Most species oxidize organic compounds incompletely to acetate, which cannot be utilized further; in a few cases acetate and further substrates are oxidized completely to CO₂. Carbohydrates rarely utilized, gas never formed from carbohydrates. Sulfate and other sulfur compounds serve as electron acceptors and are reduced to H₂S.

Hydrogenase usually present. Gelatin not liquified. Nitrogen sometimes fixed.

Strict anaerobes. Media containing a reductant are required for growth. Only in a few cases a vitamin requirement has been reported. Some species and subspecies moderately halophilic.

Upper temperature limit for growth of mesophilic species: 44 °C; optimum influenced by origin and previous history, usually 25 - 35 °C. Some strains can grow at temperatures at or below 0 °C. Optimal and maximum temperature for thermophilic species at 65 °C and 85 °C respectively.

Species generally show some degree of antigenic cross-reaction. Pathogenicity not recorded.

Cells contain c-type cytochromes (c₃) and often also b-type cytochromes. Many species contain desulfovibrin, absorption band at 630 nm; it is responsible for the characteristic red fluorescence of cells if inspected in light of 365 nm immediately after the addition of a few drops of NaOH, 2 mol/l; this reaction releases the chromophore of the pigment.

The G + C content of the DNA ranges from 46.1 - 61.2 mol%.

Habitats: anaerobic mud of fresh and brackish water and marine environments, intestines of animals, manure and faeces.

Desulfovibrio sapovorans

Sa.po.vo'rans. L. n. sapo soap; L. v. voro devour, swallow;
M. L. part. adj. sapovorans devouring soap (higher fatty acids).

Curved rods, sometimes sigmoid or spirilloid, 1.5 by 3 - 5.5 μm . Storage of granules of poly- β -hydroxybutyric acid. Motile by means of single sheathed polar flagella. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph. Butyrate, 2-methylbutyrate, higher fatty acids up to 18 carbon atoms, lactate and pyruvate serve as electron donors and are incompletely oxidized to acetate; fatty acids with odd numbers of carbon atoms are oxidized to acetate and propionate. Growth on palmitate still very good, but on stearate already rather slow. Not utilized: H_2 , alcohols, formate, acetate, propionate, iso-butyrate, 3-methylbutyrate, succinate, fumarate, malate, benzoate, cyclohexancarboxylate, sugars. Sulfate and sulfite serve as electron acceptors and are reduced to H_2S . Not utilized: thiosulfate, elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. In the absence of electron acceptors growth is possible by fermentation of pyruvate, but not lactate or fumarate.

Strictly anaerobic. Growth requires mineral media with sulfide as reductant. Vitamins not required.

pH-range: 6.5 - 9.3, optimum at 7.7. Temperature range: 15 - 39 $^{\circ}\text{C}$, optimum at 34 $^{\circ}\text{C}$.

Cell membrane and cytoplasmatic fraction contain b- and c-type cytochromes, the former of which are extractable with acetone + HCl. Desulfovibridin not present.

DNA base ratio: 52.7 mol% G + C (thermal denaturation).

Habitats: anaerobic mud of fresh water habitats. Specific enrichment with palmitate.

Type strain: "Lindhorst", 1pa3.

Desulfovibrio baarsii

Baar'si.i. M. L. gen. n. baarsii of J. K. Baars, a Dutch microbiologist, who has done the first more comprehensive studies on nutrition of sulfate reducing bacteria.

Curved rods, sometimes sigmoid or spirilloid, 0.5 - 0.7 by 1.5 - 4 μm ; morphologically resembling Desulfovibrio desulfuricans. Motile by means of a single polar flagellum. No spore formation. Gram negative.

Chemoorganotroph. Formate, acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, 2-methylbutyrate, and higher fatty acids up to 18 carbon atoms are utilized as electron donors and completely oxidized to CO_2 ; growth on formate without further carbon sources. Growth on acetate or propionate rather slow. Not utilized: H_2 , alcohols, 3-methylbutyrate, lactate, pyruvate, succinate, fumarate, malate, benzoate, cyclohexancarboxylate, sugars. Sulfate, sulfite and thiosulfate serve as electron acceptors and are reduced to H_2S . Not reduced: elemental sulfur, fumarate, nitrate, oxygen. No fermentation of organic substances.

Growth requires mineral media with sulfide as reductant. Optimal growth with 120 - 350 mmol NaCl/l and 6 - 15 mmol MgCl_2 /l, but lower concentrations do not affect growth significantly. Vitamins not required.

pH-range: 6.5 - 8.2, optimum at 7.3. Temperature range: 20 - 39 $^{\circ}\text{C}$, optimum at 35 $^{\circ}\text{C}$.

Cells do not contain desulfoviridin.

Habitats: anaerobic mud of fresh and brackish water environments. Specific enrichment with stearate.

Type strain: "Göttingen", 1st1.

G. ANHANG

1. Bestandteile des natürlichen Meerwassers

Hauptbestandteile und häufigste Nebenbestandteile des natürlichen Meerwassers, geordnet nach der molaren Konzentration (berechnet nach GOLDBERG, 1965, und "Handbook of Chemistry and Physics", 1972, S. F-165). Die Elemente H und O sowie gelöste Gase sind nicht mit aufgeführt.

Element	vorkommende Form	Konzentration [mmol/l]
Cl	Cl ⁻	536
Na	Na ⁺	457
Mg	Mg ²⁺	55,5
S	SO ₄ ²⁻	27,6
Ca	Ca ²⁺	10,0
K	K ⁺	9,7
C	HCO ₃ ⁻ , CO ₂	2,3
	organische Verbindungen	0,1 - 0,3
Br	Br ⁻	0,81
B	H ₃ BO ₃ , H ₂ BO ₃ ⁻	0,43
Si	H ₄ SiO ₄ , H ₃ SiO ₄ ⁻	0,11

Element	vorkommende Form	Konzentration [mmol/l]
Sr	Sr^{2+}	0,091
F	F^-	0,068
N	NO_3^-	0,0001 - 0,05
	organische Verbindungen	0,002 - 0,014
	NH_4^+	0,004 - 0,004
	NO_2^-	- 0,004
Li	Li^+	0,025
P	HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-	0,0023
Rb	Rb^+	0,0014
J	J^-	0,00047
Al	Al (III)-Verbindungen	0,00037
Ba	Ba^{2+}	0,00022
Fe	Fe (III)-Verbindungen	0,00018

2. Physikalisch-chemische Daten und Formeln

Vorbemerkungen:

Bei den verwendeten Nährmedien handelte es sich stets um verhältnismäßig verdünnte Lösungen. Deshalb wurden bei den Berechnungen anstelle von Aktivitäten in mol pro kg H_2O näherungsweise die Konzentrationen in mol pro l Lösung eingesetzt. Die Konzentration einer Substanz in mol pro l wird durch das chemische Symbol in eckigen Klammern, z. B. $[\text{HCO}_3^-]$, dargestellt.

Weitere Symbole: (aq) = in wässriger Lösung

(g) = im gasförmigen Zustand

(l) = im flüssigen Zustand

2.1. Löslichkeit von Gasen

Bunsenscher Absorptionskoeffizient α

Der Bunsensche Absorptionskoeffizient (Löslichkeitskoeffizient) α ist das Volumen eines Gases, reduziert auf 0 °C und 1 atm, das bei der betreffenden Temperatur von der Volumeneinheit einer Flüssigkeit gelöst wird, wenn der Partialdruck des Gases 1 atm beträgt. Die gelöste Menge Gas wird in Nl (Normal-l) und das Volumen der Flüssigkeit in l gemessen. Bei dem sogenannten technischen Löslichkeitskoeffizienten λ wird die gelöste Menge Gas auf die Masse des Lösungsmittels bezogen. α erhält man aus λ durch Multiplikation mit der Dichte des Lösungsmittels. Der Bunsensche Absorptionskoeffizient für Wasser als Lösungsmittel stimmt, insbesondere bei Temperaturen wenig oberhalb von 0 °C, recht genau mit dem technischen Löslichkeitskoeffizienten überein.

Bunsenscher Absorptionskoeffizient α von H_2 , CH_4 , CO_2 , N_2 , N_2O , O_2 bzw. H_2S in reinem Wasser bei verschiedenen Temperaturen (D'ANS-LAX, Band I, 1967, S. 602 und 1205; GMELINS Handbuch, C 3, 1973, S. 45 - 46).

Temperatur [°C]	$\alpha \left[\frac{Nl}{l \cdot atm} \right]$						
	H_2	CH_4	CO_2	N_2	N_2O	O_2	H_2S
0	0,021	0,054	1,66	0,022	1,26	0,047	4,52
5	0,020	0,046	1,38	0,020	1,02	0,042	3,80
10	0,019	0,040	1,16	0,018	0,85	0,037	3,28
15	0,018	0,036	0,99	0,016	0,71	0,033	2,85
20	0,018	0,032	0,85	0,015	0,60	0,030	2,51
25	0,017	0,029	0,74	0,014	0,52	0,027	2,21
30	0,017	0,027	0,64	0,013	0,45	0,025	1,99
35			0,58				
40	0,016	0,023	0,51	0,012	0,35	0,022	1,62
50	0,016	0,021	0,42	0,011	0,28	0,020	1,34
60	0,015	0,019	0,35	0,010		0,019	1,15
70	0,015	0,018	0,29	0,010		0,018	0,99
90	0,015	0,016		0,010		0,017	0,81

2.2. Dissoziation von Säuren

Dissoziationskonstante K_a und pK_a -Wert einer Säure HA



$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \qquad pK_a = - \log K_a$$

Der K_a -Wert bzw. der pK_a -Wert einer Säure kann als Maß für die Säurestärke aufgefaßt werden; je größer der K_a -Wert bzw. je kleiner der pK_a -Wert ist, desto stärker ist die Säure, d. h. desto größer ist deren Bestreben, zu dissoziieren. Wird der pH-Wert einer Lösung der betreffenden Säure bzw. einer Lösung ihres Salzes dem Zahlenwert nach auf den pK_a -Wert der Säure eingestellt, so liegen die undissoziierte Säure und das Anion der Säure (die konjugate Base) in äquimolarer Konzentration vor.

K_a - und pK_a -Werte einiger anorganischer und organischer Säuren (GMELINS Handbuch, C 3, 1973, S. 118; Handbook of Chemistry and Physics, 1972, S. D-120 - D-121; GMELINS Handbuch, S [B], 1960, S. 87 - 88; D'ANS-LAX, Band I, 1967, S. 865).

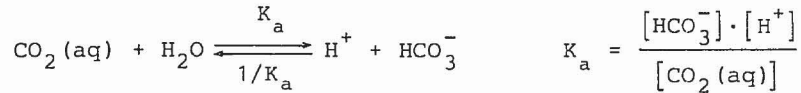
Säure	Temperatur [°C]	K_a	pK_a
	10	$3,43 \cdot 10^{-7}$	6.46
	20	$4,15 \cdot 10^{-7}$	6.38
$CO_2(aq) + H_2O \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$	25	$4,45 \cdot 10^{-7}$	6.36
	30	$4,71 \cdot 10^{-7}$	6.33
	35	$4,91 \cdot 10^{-7}$	6.31

Säure	Temperatur [°C]	K _a	pK _a
CO ₂ (aq) + H ₂ O → H ⁺ + HCO ₃ ⁻	40	5,06 · 10 ⁻⁷	6.30
	50	5,16 · 10 ⁻⁷	6.29
HCO ₃ ⁻ → H ⁺ + CO ₃ ²⁻	25	5,61 · 10 ⁻¹¹	10.25
H ₃ PO ₄ → H ⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻	25	7,52 · 10 ⁻³	2.12
H ₂ PO ₄ ⁻ → H ⁺ + HPO ₄ ²⁻	25	6,23 · 10 ⁻⁸	7.21
HPO ₄ ²⁻ → H ⁺ + PO ₄ ³⁻	18	2,2 · 10 ⁻¹³	12.67
	10	5,74 · 10 ⁻⁸	7.24
	20	8,73 · 10 ⁻⁸	7.06
	25	1,08 · 10 ⁻⁷	6.97
	30	1,26 · 10 ⁻⁷	6.90
	40	1,64 · 10 ⁻⁷	6.79
H ₂ S → H ⁺ + HS ⁻	50	2,03 · 10 ⁻⁷	6.69
	18	1,1 · 10 ⁻¹²	11.96
SO ₂ (aq) + H ₂ O → H ⁺ + HSO ₃ ⁻	18	1,54 · 10 ⁻²	1.81
HSO ₃ ⁻ → H ⁺ + SO ₃ ²⁻	18	1,02 · 10 ⁻⁷	6.91
HSO ₄ ⁻ → H ⁺ + SO ₄ ²⁻	25	1,20 · 10 ⁻²	1.92

Säure	Temperatur [°C]	K _a	pK _a
Ameisensäure → H ⁺ + Formiat ⁻	20	1,77 · 10 ⁻⁴	3.75
Essigsäure → H ⁺ + Acetat ⁻	25	1,76 · 10 ⁻⁵	4.75
Propionsäure → H ⁺ + Propionat ⁻	25	1,34 · 10 ⁻⁵	4.87
n-Buttersäure → H ⁺ + n-Butyrat ⁻	20	1,54 · 10 ⁻⁵	4.81
n-Valeriansäure → H ⁺ + n-Valerianat ⁻	18	1,51 · 10 ⁻⁵	4.82
n-Caprionsäure → H ⁺ + n-Capronat ⁻	18	1,43 · 10 ⁻⁵	4.83
n-Heptansäure → H ⁺ + n-Heptanat ⁻	25	1,28 · 10 ⁻⁵	4.89
n-Caprylsäure → H ⁺ + n-Caprylat ⁻	25	1,28 · 10 ⁻⁵	4.89
Milchsäure → H ⁺ + Lactat ⁻	25	1,37 · 10 ⁻⁴	3.86
Bernsteinsäure → H ⁺ + Succinat ⁻	25	6,89 · 10 ⁻⁵	4.16
Succinat ⁻ → H ⁺ + Succinat ²⁻	25	2,47 · 10 ⁻⁶	5.61
Fumarsäure → H ⁺ + Fumarat ⁻	18	9,30 · 10 ⁻⁴	3.03
Fumarat ⁻ → H ⁺ + Fumarat ²⁻	18	3,62 · 10 ⁻⁵	4.44
Benzoessäure → H ⁺ + Benzoat ⁻	25	6,46 · 10 ⁻⁵	4.19

2.3. Zusammenhang zwischen NaHCO₃-Konzentration, pH-Wert und CO₂-Partialdruck

Gelöstes CO₂ als Säure:



Weil die H₂O-Konzentration, [H₂O], als konstant zu betrachten ist, wurde diese bereits in den K_a-Wert mit einbezogen.

Die NaHCO₃-Konzentration, [NaHCO₃], wird durch die Einwaage vorgegeben. NaHCO₃ dissoziiert vollständig in Na⁺- und HCO₃⁻-Ionen. Die HCO₃⁻-Ionen reagieren zum Teil mit H₂O unter Freisetzung von OH⁻-Ionen (schwach alkalische Reaktion der NaHCO₃-Lösung) zu gelöstem CO₂.

$$[\text{NaHCO}_3] = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_2(\text{aq})]$$

Für K_a folgt somit:

$$K_a = \frac{([\text{NaHCO}_3] - [\text{CO}_2(\text{aq})]) \cdot [\text{H}^+]}{[\text{CO}_2(\text{aq})]}$$

$$[\text{CO}_2(\text{aq})] = \frac{[\text{NaHCO}_3] \cdot [\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]}$$

Das gelöste CO₂ soll mit dem CO₂ der Gasphase im Gleichgewicht stehen. Dieses Gleichgewicht wird nach dem Bunsenschen Absorptionskoeffizienten berechnet.

$$\alpha = \frac{c_{\text{CO}_2}}{p_{\text{CO}_2}} \quad \begin{array}{l} c_{\text{CO}_2} = \text{Konzentration von CO}_2 \text{ in Nl/l} \\ p_{\text{CO}_2} = \text{Partialdruck von CO}_2 \text{ in atm} \end{array}$$

Vereinfachung: 1 mol = 22,4 Nl (gilt genau nur für ein ideales Gas)

Ist anstelle der CO₂-Konzentration in Nl/l die molare Konzentration von CO₂ angegeben, so folgt für α:

$$\alpha = 22,4 \frac{[\text{CO}_2(\text{aq})]}{p_{\text{CO}_2}}$$

$$p_{\text{CO}_2} = 22,4 \frac{[\text{CO}_2(\text{aq})]}{\alpha}$$

Für den CO₂-Partialdruck in der Gasphase, der bei einer vorgegebenen NaHCO₃-Konzentration einen bestimmten pH-Wert aufrecht erhält, folgt:

$$p_{\text{CO}_2} = 22,4 \frac{[\text{NaHCO}_3] \cdot [\text{H}^+]}{\alpha \cdot (K_a + [\text{H}^+])}$$

[H⁺] berechnet man aus dem pH-Wert: [H⁺] = 10^{-pH}

Beispiel

[NaHCO₃] = 0,030 mol/l; pH = 7.2; Temperatur: 30 °C

$$[\text{H}^+] = 0,631 \cdot 10^{-7}$$

$$p_{\text{CO}_2} = 22,4 \frac{0,030 \cdot 0,631 \cdot 10^{-7}}{0,64 \cdot (4,71 \cdot 10^{-7} + 0,631 \cdot 10^{-7})}$$

$$p_{\text{CO}_2} = 0,12 \text{ atm}$$

2.4. Freie Reaktionsenthalpie

ΔG_f° = freie Bildungsenthalpie unter Standardbedingungen (freie Standard-Bildungsenthalpie): $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$),
 $p = 1 \text{ atm}$, alle Komponenten in ihren Standardzuständen;
 für gelöste Substanzen wurde eine Aktivität von 1 mol/kg festgelegt.

Freie Standard-Bildungsenthalpien einiger Substanzen (THAUER et al., 1977)

Substanz	ΔG_f° [kJ]	Substanz	ΔG_f° [kJ]
H ₂ (g)	0,000	HCO ₃ ⁻ (aq)	- 586,85
H ⁺ (aq)	0,000	NO ₃ ⁻ (aq)	- 111,34
N ₂ (g)	0,000	HS ⁻ (aq)	- 12,05
O ₂ (g)	0,000	SO ₃ ²⁻ (aq)	- 486,6
CH ₄ (g)	- 50,75	SO ₄ ²⁻ (aq)	- 744,63
NH ₄ ⁺ (aq)	- 79,37	Formiat ⁻ (aq)	- 351,04
H ₂ O (l)	- 237,178	Acetat ⁻ (aq)	- 369,41
CO ₂ (aq)	- 386,02	Lactat ⁻ (aq)	- 517,81

ΔG° = freie Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen (s. o.)

$$\Delta G^\circ = \sum \Delta G_f^\circ (\text{Produkte}) - \sum \Delta G_f^\circ (\text{Reaktanten})$$

Beispiel



$$\Delta G^\circ = 2 (- 586,85) + (- 12,05) - (- 369,41) - (- 744,63)$$

$$\Delta G^\circ = - 71,71 \text{ kJ pro mol reduzierten Sulfats}$$

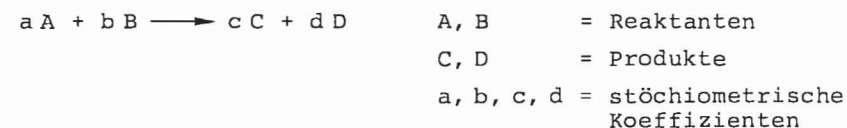
$\Delta G^{\circ\prime}$ = freie Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen (s. o.), aber bei $\text{pH} = 7.0$: $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ mol/l}$

$\Delta G'$ = freie Reaktionsenthalpie bei beliebigen, aber bekannten Bedingungen und bei $\text{pH} = 7.0$

ΔG = freie Reaktionsenthalpie bei beliebigen, aber bekannten Bedingungen, auch bei beliebigem pH-Wert

Berechnung von ΔG bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 atm aus ΔG°

Reaktion:



$$\Delta G = \Delta G^\circ + R \cdot T \cdot \ln \frac{[\text{C}]^c \cdot [\text{D}]^d}{[\text{A}]^a \cdot [\text{B}]^b}$$

$$R = 8,314 \text{ J/}^\circ\text{K} \cdot \text{mol} \quad (1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}; R = 1,987 \text{ cal/}^\circ\text{K} \cdot \text{mol})$$

Mit $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$, mit der Umrechnung $\ln x = 2,303 \cdot \log x$ und mit kJ als Maßeinheit für Energie erhält man:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 5,71 \cdot \log \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b}$$

Genau erfüllt ist diese Gleichung nur dann, wenn mit Aktivitäten gerechnet wird. In den verhältnismäßig verdünnten Kulturmedien ist jedoch die Aktivität einer gelösten Substanz nahezu gleich ihrer Konzentration in mol/l.

Achtung! Für T darf nur die Temperatur eingesetzt werden, für welche die ΔG° -Werte bzw. ΔG_f° -Werte gelten, also $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$; daher kann ΔG mit der angegebenen Formel nur bei dieser einen Temperatur aus ΔG° berechnet werden. Um ΔG -Werte für andere Temperaturen berechnen zu können, muß ΔG als Funktion der Temperatur bekannt sein. Dieser Zusammenhang ist durch die sogenannte Gibbs-Helmholtz-Gleichung gegeben, wobei auch die Enthalpie ΔH (Reaktionswärme) in die Berechnung mit eingeht.

Die Konzentration von H_2O als Lösungsmittel ist, insbesondere in verdünnten Lösungen, für weite Konzentrationsbereiche gelöster Substanzen als nahezu konstant zu betrachten. Für die Aktivität von H_2O wird üblicherweise der Wert 1 festgelegt; bei dieser Konvention kann man in der Berechnung der freien Enthalpie einer Reaktion in verdünnter Lösung mit H_2O als Reaktionsteilnehmer für $[\text{H}_2\text{O}]$ gleich 1 setzen.

Liegen Reaktionsteilnehmer in der Gasphase vor, so wird anstelle der Konzentration der jeweilige Zahlenwert für die Fugazität eingesetzt. Anstelle der Fugazität kann näherungsweise auch der Druck in atm eingesetzt werden; liegt der Siedepunkt eines Gases weit unterhalb der Reaktionstemperatur (hier stets $25 \text{ }^\circ\text{C}$), so weicht der Druck verhältnismäßig wenig von der Fugazität ab.

Wird $\Delta G'$ nicht aus ΔG° , sondern aus $\Delta G^{\circ'}$ berechnet, so ist zu beachten, daß im Falle von H^+ - bzw. OH^- -Ionen als Reaktionsteilnehmern $[\text{H}^+]$ oder $[\text{OH}^-]$ bereits berücksichtigt wurden.

Beispiel

Berechnung der freien Reaktionsenthalpie der oben genannten dissimilatorischen Sulfatreduktion mit Acetat als Elektronendonator bei einer Konzentration der Reaktionsteilnehmer von $0,010 \text{ mol/l}$ (10 mmol/l):

$$\Delta G = -71,71 + 5,71 \cdot \log \frac{(10^{-2})^2 \cdot 10^{-2}}{10^{-2} \cdot 10^{-2}}$$

$$\Delta G = -71,71 + 5,71 \cdot \log 10^{-2} = -71,71 - 11,42$$

$$\underline{\Delta G = -83,13 \text{ kJ pro mol reduzierten Sulfats}}$$

2.5. Redoxpotential

E° = wahres Redoxpotential unter Standardbedingungen (wahres Standard-Redoxpotential): $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), $p = 1 \text{ atm}$, alle Komponenten in ihren Standardzuständen; für gelöste Substanzen wurde eine Aktivität von 1 mol/kg festgelegt.

E_o = praktisches Standard-Redoxpotential: $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$, $p = 1 \text{ atm}$, Konzentrationen von 1 mol/l . E_o kann unterhalb der Standardkonzentration ermittelt werden, wenn bei $\text{pH} = 0$ die oxidierte und die reduzierte Form in gleicher Konzentration vorgegeben werden, sodaß der Quotient $[\text{Ox}]/[\text{Red}]$ in der sogenannten Nernstschen Gleichung den Wert 1 annimmt.

E_o' = praktisches Standard-Redoxpotential bei $\text{pH} = 7,0$, d. h. $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ mol/l}$, und bei Konzentrationen der übrigen Reaktionsteilnehmer von 1 mol/l ; $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$, $p = 1 \text{ atm}$.

E° - bzw. E'_\circ -Werte einiger Reaktionen (Handbook of Chemistry and Physics, 1972, S. D-112 - D-113; MAHLER und CORDES, 1971; THAUER et al., 1977).

Ox	Red	E° [V]
$2 \text{SO}_3^{2-} + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{S}_2\text{O}_4^{2-} + 4 \text{OH}^-$	- 1,12
$\text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{SO}_3^{2-} + 2 \text{OH}^-$	- 0,92
$\text{S} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{HS}^- + \text{OH}^-$	- 0,478
$\text{S} + \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{H}_2\text{S (aq)}$	+ 0,141
$2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{H}_2$	0,000
$\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 1,229

Ox	Red	E'_\circ [V]
$\text{Acetat}^- + \text{HCO}_3^- + 3 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{Pyruvat}^- + 2 \text{H}_2\text{O}$	- 0,70
$2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{H}_2$	- 0,414
$\text{Pyruvat}^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{Lactat}^-$	- 0,190
$\text{Fumarat}^{2-} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons \text{Succinat}^{2-}$	+ 0,033
$\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	$\rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 0,818

E_h = Redoxpotential unter beliebigen, aber bekannten Bedingungen

Berechnung von E_h aus E°

Bei $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$, $p = 1 \text{ atm}$ und mit V als Maßeinheit der Spannung gilt:

$$E_h = E^\circ + \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad (\text{Nernstsche Gleichung})$$

n = Zahl der in der Reaktion übertragenen Elektronen

Ox = oxidierte Form

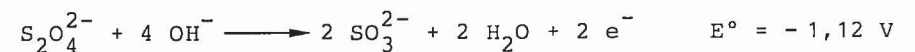
Red = reduzierte Form

Genau gilt die Gleichung nur dann, wenn in diese die Aktivitäten der betreffenden Substanzen eingesetzt werden. In verdünnten wäßrigen Lösungen ist jedoch das Verhältnis der Aktivitäten zueinander nahezu gleich dem Verhältnis der Konzentrationen zueinander. Daher kann man im Falle von Nährlösungen auch häufig mit Konzentrationen anstelle von Aktivitäten rechnen. Wenn E'_\circ als "Midpoint"-Redoxpotential bei höherer Verdünnung ermittelt wurde, so kann anstelle von E° in guter Näherung auch E'_\circ eingesetzt werden.

Wird E_h für $\text{pH} = 7.0$ nicht aus E° bzw. E_\circ , sondern aus E'_\circ berechnet, so ist zu beachten, daß $[\text{H}^+]$ oder $[\text{OH}^-]$ bereits berücksichtigt wurden.

Beispiel

Dithionit als Reduktionsmittel:



S₂O₄²⁻-Ionen und SO₃²⁻-Ionen sollen bei pH = 7.0, d. h. [OH⁻] = 10⁻⁷ mol/l, in gleich hoher Konzentration von 0,1 mmol/l vorliegen,

$$E_h = -1,12 + \frac{0,059}{2} \log \frac{(10^{-4})^2 \cdot 1^2}{10^{-4} \cdot (10^{-7})^4}$$

$$E_h = -1,12 + \frac{0,059}{2} \log 10^{24} = -1,12 + 0,71$$

$$\underline{E_h = -0,41 \text{ V}}$$

Literatur zu den Kapiteln 1. und 2.

D'ANS-LAX. 1967. Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Band I (E. LAX, Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

GMELINS Handbuch der anorganischen Chemie. 1960. 8. Aufl., Schwefel (S), Teil B. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

GMELINS Handbuch der anorganischen Chemie. 1973. 8. Aufl., Kohlenstoff, Teil C 3. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

GOLDBERG, E. D. 1965. Minor elements in sea water. In: Chemical Oceanography, vol. 1 (J. P. RILEY, G. SKIRROW, eds.), S. 163 - 196. Academic Press, London, New York.

Handbook of Chemistry and Physics. 1972. 52nd edition (R. C. WEAST, ed.). The Chemical Rubber Co., Cleveland/Ohio.

MAHLER, H. R.; CORDES, E. H. 1971. Equilibria and thermodynamics in biochemical transformations. In: Biological chemistry, 2nd edition, S. 11 - 41. Harper & Row, New York, Evanston, San Francisco, London.

THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 100 - 180.

3. Zentrifugieren: Radialbeschleunigung

Zusammenhang zwischen der Radialbeschleunigung a_r, der Winkelgeschwindigkeit ω und dem Radius r:

$$a_r = \omega^2 \cdot r$$

Werden ω in rad·s⁻¹ und r in m gemessen, so hat a_r die Einheit m·s⁻².

Umrechnung von rad·s⁻¹ in Upm (Umdrehungen pro min):

$$1 \text{ Umdrehung} = 2 \pi \text{ rad}$$

$$1 \text{ min}^{-1} = \frac{1}{60} \text{ s}^{-1}$$

$$1 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} = \frac{\pi}{30} \text{ Upm}$$

Sollen a_r in m·s⁻², ω in Upm und r in m gemessen werden, so gilt:

$$a_r = \frac{(\text{Upm})^2 \cdot \pi^2 \cdot r}{900}$$

$$\boxed{a_r = 0,011 \cdot (\text{Upm})^2 \cdot r}$$

(Erdbeschleunigung: g = 9,81 m·s⁻²)

H. LITERATUR

- ADAMS, M. E. 1959 A new sulphate-reducing *Vibrio*.
POSTGATE, J. R. J. Gen. Microbiol. 20, 252 - 257
- AKAGI, J. M. 1962 Studies on thermophilic sulfate-reducing bacteria. III. Adenosine triphosphate-sulfurylase of *Clostridium nigrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans*.
CAMPBELL, L. L. J. Bacteriol. 84, 1194 - 1201
- AKAGI, J. M. 1965 The participation of a ferredoxin of *Clostridium nigrificans* in sulfite reduction.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 72 - 77
- AKAGI, J. M. 1967 Electron carriers for the phosphoroclastic reaction of *Desulfovibrio desulfuricans*.
ADAMS, V. J. Biol. Chem. 242, 2478 - 2483
- AKAGI, J. M. 1967 Degradation of glucose by proliferating cells of *Desulfotomaculum nigrificans*.
JACKSON, G. Appl. Microbiol. 15, 1427 - 1430
- AKAGI, J. M. 1973 Isolation of a bisulfite reductase activity from *Desulfotomaculum nigrificans* and its identification as the carbon monoxide-binding pigment P 582.
ADAMS, V. J. Bacteriol. 116, 392 - 396
- ALLISON, M. J. 1978 Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. 35, 872 - 877
- ANDREESSEN, J. R. 1978 Wolfram und Selen, wesentliche Metallkomponenten der Formiat-Dehydrogenasen von Clostridien, die CO₂ als Elektronenakzeptor benutzen. Habilitationsschrift, Universität Göttingen
- ANTHONY, C. 1978 The prediction of growth yields in methylotrophs.
J. Gen. Microbiol. 104, 91 - 104
- AULT, W. U. 1959 Isotopic geochemistry of sulfur.
KULP, J. L. Geochim. Cosmochim. Acta 16, 201 - 235
- AZOVA, L. G. 1959 Butyric acid fermentation in lactate-containing medium.
Doklady Biol. Sciences Section (Translation of Dokl. Akad. Nauk SSSR) 127, 673 - 675
- BAARS, J. K. 1930 Over sulfaatreductie door bacteriën.
Proefschrift, Hoogeschool Delft. Meinema, Delft/Holland
- BADZIONG, W. 1978 Isolation and characterization of *Desulfovibrio* growing on hydrogen plus sulfate as the sole energy source.
THAUER, R. K. ZEIKUS, J. G. Arch. Microbiol. 116, 41 - 49
- BADZIONG, W. 1978 Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources.
THAUER, R. K. Arch. Microbiol. 117, 209 - 214
- BAKER, F. D. 1962 Choline fermentation by *Desulfovibrio desulfuricans*.
PAPISKA, H. R. CAMPBELL, L. L. J. Bacteriol. 84, 973 - 978
- BALCH, W. E. 1977 *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria.
SCHOBERTH, S. TANNER, R. S. WOLFE, R. S. Int. J. Syst. Bacteriol. 27, 355 - 361
- BALDERSTON, W. L. 1976 Inhibition of methanogenesis in salt marsh sediments and whole-cell suspensions of methanogenic bacteria by nitrogen oxides.
PAYNE, W. J. Appl. Environ. Microbiol. 32, 264 - 269

- BARESI, L. 1978 Methanogenesis from acetate: enrichment studies. Appl. Environ. Microbiol. 36, 186 - 197
- MAH, R. A.
WARD, D. M.
KAPLAN, I. R.
- BARKER, H. A. 1956 Bacterial fermentations. John Wiley & Sons, New York
- BARNETT, A. J. G. 1961 Reactions in the rumen. REID, R. L. Arnold, London
- BARTON, L. L. 1970 Phosphorylation coupled to oxidation of hydrogen with fumarate in extracts of the sulfate reducing bacterium, Desulfovibrio gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1036 - 1042
- LeGALL, J.
PECK, H. D., Jr.
- BARTSCH, R. G. 1968 Bacterial cytochromes. Ann. Rev. Microbiol. 22, 181 - 200
- BAUMEISTER, W. 1958 a Die Aschenstoffe. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (W. RUHLAND, Hrsq.), Band IV: Die mineralische Ernährung der Pflanze, S. 5 - 36. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- BAUMEISTER, W. 1958 b Hauptnährstoffe. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (W. RUHLAND, Hrsq.), Band IV: Die mineralische Ernährung der Pflanze, S. 482 - 557. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- BEIJERINCK, M. W. 1895 Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduction. Centralbl. Bakteriol., II. Abt., 1, 1 - 9, 49 - 59, 104 - 114
- BEIJERINCK, M. W. 1904 Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Centralbl. Bakteriol., II. Abt., 11, 593 - 599

- BEIJERINCK, M. W. 1910 Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Zentralbl. Bakteriol., II. Abt., 25, 30 - 63
- MINKMAN, D. C. J.
- BEUSCHER, N. 1972 Lack of citrate lyase - the key enzyme of the reductive carboxylic acid cycle - in Chlorobium thio-sulfatophilum and Rhodospirillum rubrum. Z. Naturforsch. 27 b, 967 - 973
- GOTTSCHALK, G.
- BIEBL, H. 1977 Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. Arch. Microbiol. 112, 115 - 117
- PFENNIG, N.
- BOK, S. H. 1977 New microbial growth factor. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1085 - 1091
- CASIDA, L. E., Jr.
- BOWEN, T. J. 1966 Studies on adenosine-5'-phospho-sulphate reductase from Thio-bacillus denitrificans. Biochim. Biophys. Acta 118, 566 - 576
- HAPPOLD, F. C.
TAYLOR, B. F.
- BRAUN, K. 1979 Untersuchungen zum autotrophen und mixotrophen Wachstum von Acetobacterium woodii und Clostridium aceticum. Dissertation, Universität Göttingen
- BRODA, E. 1975 The evolution of the bioenergetic process. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig
- BRUSCHI, M. 1971 Purification et propriétés d'une rubrédoxine isolée à partir de Desulfovibrio vulgaris (souche NCIB 8303) Biochim. Biophys. Acta 263, 279 - 282
- LeGALL, J.

- BRYANT, M. P. 1967 Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch. Mikrobiol. 59, 20 - 31
- WOLIN, E. A.
WOLIN, M. J.
WOLFE, R. S.
- BRYANT, M. P. 1972 Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. American J. Clinical Nutr. 25, 1324 - 1328
- BRYANT, M. P. 1973 Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. Fed. Proc. Fed. American Soc. exp. Biol. 32, 1809 - 1813
- BRYANT, M. P. 1974 Methane-producing bacteria. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition (R. E. BUCHANAN, N. E. GIBBONS, eds.), S. 472 - 477. Williams & Wilkins, Baltimore
- BRYANT, M. P. 1976 The microbiology of anaerobic degradation and methanogenesis with special reference to sewage. In: Microbial energy conversion (H. G. SCHLEGEL, J. BARNEA, eds.), S. 107 - 117. Goltze, Göttingen
- BRYANT, M. P. 1977 Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162 - 1169
- CAMPBELL, L. L.
REDDY, C. A.
CRABILL, M. R.
- BRYANT, M. P. 1979 Microbial methane production - theoretical aspects. J. Animal Science 48, 193 - 201
- BUCHANAN, B. B. 1967 Ferredoxin-dependent carbon assimilation in Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. 59, 32 - 40
- EVANS, M. C. W.
ARNON, D. I.

- BUCHANAN, B. B. 1976 Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and Chlorobium thiosulfatophilum. Arch. Microbiol. 109, 15 - 19
- SIREVÁG, R.
- BUTLIN, K. R. 1947 Autotrophic growth of sulphate-reducing bacteria. Nature 160, 154 - 155
- ADAMS, M. E.
- BUTLIN, K. R. 1949 a The isolation and cultivation of sulphate-reducing bacteria. J. Gen. Microbiol. 3, 46 - 59
- ADAMS, M. E.
THOMAS, M.
- BUTLIN, K. R. 1949 b The morphology of sulphate-reducing bacteria. J. Gen. Microbiol. 3, iii - iv
- ADAMS, M. E.
THOMAS, M.
- BUTLIN, K. R. 1956 Sulphide production from sulphate-enriched sewage sludges. J. Appl. Bacteriol. 19, 3 - 15
- SELWYN, S. C.
WAKERLEY, D. S.
- CAHET, G. 1975 Transfert d'énergie en milieu sédimentaire. Cas de sulfato-réducteurs. II. Relations syntrophiques avec diverses micro-flores. Vie Milieu, sér. B., 25, 49 - 66
- CAMPBELL, L. L., Jr. 1957 Reductive degradation of pyrimidines. I. The isolation and characterization of a uracil fermenting bacterium Clostridium uracilicum nov. spec. J. Bacteriol. 73, 220 - 224
- CAMPBELL, L. L., Jr. 1965 Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. Bact. Rev. 29, 359 - 363
- POSTGATE, J. R.
- CAPPENBERG, Th. E. 1974 a Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. I. Field observations. Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 40, 285 - 295

- CAPPENBERG, Th. E. 1974 b Interrelation between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. II. Inhibition experiments. *Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 40, 297 - 306
- CAPPENBERG, Th. E. 1974 Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. III. Experiments with ¹⁴C-labeled substrates. *Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 40, 457 - 469
- CASTENHOLZ, R. W. 1973 Movements. In: *The biology of blue-green algae* (N. G. CARR, B. A. WHITTON, eds.), Botanical monographs, vol. 9, S. 320 - 339. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne
- CATO, E. P. 1968 *Clostridium oroticum* comb. nov., amended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 17, 9 - 13
- MOORE, W. E. C.
HOLDEMAN, L. V.
- CAUMETTE, P. 1978 Participation des bactéries phototrophes sulfo-oxidantes dans le métabolisme du soufre en milieu lagunaire méditerranéen (Etang du Prévost). Etude des crises dystrophiques (Malaigues). Thèse, Université Languedoc, Académie Montpellier
- CHAMBERS, L. A. 1975 Are thiosulfate and trithionate intermediates in dissimilatory sulfate reduction? *J. Bacteriol.* 123, 36 - 40. Erratum: *J. Bacteriol.* 125, 387 (1976)
- TRUDINGER, P. A.
- CHEN, K. Y. 1972 Oxidation of sulfide by O₂: Catalysis and inhibition. *J. Sanitary Engineering Division, Proceedings American Soc. Civil Engineers*, 98, 215 - 227
- ASCE, A. M.
MORRIS, J. C.

- CHYNOWETH, D. P. 1971 Volatile acid formation in sludge digestion. In: *Anaerobic biological treatment processes, advances in chemistry series 105* (R. F. GOULD, ed.). American Chem. Soc., Washington
- MAH, R. A.
- CLAYPOOL, G. E. 1974 The origin and distribution of methane in marine sediments. In: *Natural gases in marine sediments* (I. R. KAPLAN, ed.), S. 99 - 139. Plenum Publishing Corporation, New York
- KAPLAN, I. R.
- CLINE, J. D. 1969 Oxygenation of hydrogen sulfide in sea water at constant salinity, temperature, and pH. *Environ. Sci. Technol.* 3, 838 - 843
- RICHARDS, F. A.
- COHN, F. 1867 Beiträge zur Physiologie der Phycochromaceen und Florideen. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 3, 1 - 60
- COX, R. B. 1975 The autotrophic growth of *Micrococcus denitrificans* on methanol. *Biochem. J.* 150, 569 - 571
- QUAYLE, J. R.
- DECKER, K. 1970 Wege der Energiegewinnung in Anaerobiern. *Angew. Chemie* 82, 153 - 173. Translation: Energy production in anaerobic bacteria. *Angew. Chemie Internat. Edit.* 9, 138 - 158
- JUNGERMANN, K.
THAUER, R. K.
- VAN DELDEN, A. 1903 Beitrag zur Kenntnis der Sulfat-reduktion durch Bakterien. *Centralbl. Bakteriologie, II. Abt.*, 11, 81 - 94, 113 - 119
- DerVARTANIAN, D. V. 1974 A monomolecular electron transfer chain: structure and function of cytochrome c₃. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 79 - 99
- LeGALL, J.

- DRAKE, H. L. 1976 Purification of a unique bisulfite-reducing enzyme from Desulfovibrio vulgaris. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1214 - 1219
- AKAGI, J. M.
- DUDA, V. I. 1977 Morphogenesis and function of gas caps on spores of anaerobic bacteria of the genus Clostridium. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 46, 563 - 569
- MAKAR'EVA, E. D.
- DUTTON, P. L. 1967 Dissimilation of aromatic substrates by Rhodopseudomonas palustris. Biochem. J. 104, 30 P - 31 P
- EVANS, W. C.
- ELION, L. 1925 A thermophilic sulphate-reducing bacterium. Centralbl. Bakteriologie, II. Abt., 63, 58 - 67
- ELSDEN, S. R. 1976 The end products of the metabolism of aromatic amino acids by Clostridia. Arch. Microbiol. 107, 283 - 288
- HILTON; M. G.
- WALLER, J. M.
- ELSDEN, S. R. 1978 Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by Clostridia. Arch. Microbiol. 117, 165 - 172
- HILTON, M. G.
- ENOCH, H. G. 1972 Effects of molybdate, tungstate, and selenium compounds on formate dehydrogenase and other enzyme systems in Escherichia coli. J. Bacteriol. 110, 1032 - 1040
- LESTER, R. L.
- EVANS, M. C. W. 1966 A new ferredoxin dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 928 - 934
- BUCHANAN, B. B.
- ARNON, D. I.
- EVANS, W. C. 1977 Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environment. Nature 270, 17 - 22

- FALK, J. E. 1964 Porphyrins and metalloporphyrins. B. B. A. Library, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam, London, New York
- FENCHEL, T. M. 1977 Detritus food chains of aquatic ecosystems: the role of bacteria. Adv. Microbial Ecol. 1, 1 - 58
- JØRGENSEN, B. B.
- FERRY, J. G. 1974 Methanospirillum, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of Methanospirillum hungatei sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 465 - 469
- SMITH, P. H.
- WOLFE, R. S.
- FERRY, J. G. 1976 Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. Arch. Microbiol. 107, 33 - 40
- WOLFE, R. S.
- FINA, L. R. 1960 The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. II. Fate of carbons one and seven. Arch. Biochem. Biophys. 91, 163 - 165
- FISKIN, A. M.
- FINA, L. R. 1978 The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. III. The fate of carbon four and the identification of propanoic acid. Arch. Microbiol. 118, 169 - 172
- BRIDGES, R. L.
- COBLENTZ, T. H.
- ROBERTS, F. F.
- FINDLEY, J. E. 1969 Evidence for thiosulfate formation during sulfite reduction by Desulfovibrio vulgaris. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 266 - 271
- AKAGI, J. M.
- FRIEDRICH, C. G. 1979 Formate and oxalate metabolism in Alcaligenes eutrophus. J. Gen. Microbiol. 115, 185 - 192
- BOWIEN, B.
- FRIEDRICH, B.

- FUJIMOTO, D.
ISHIMOTO, M. 1961 Sulfate reduction in Escherichia coli.
J. Biochem. 50, 533 - 537
- GMEIINS Handbuch 1960 GMEIINS Handbuch der anorganischen
Chemie, 8. Aufl., Schwefel (S),
Teil B.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- GROSSMAN, J. P.
POSTGATE, J. R. 1955 The metabolism of malate and
certain other compounds by
Desulphovibrio desulphuricans.
J. Gen. Microbiol. 12, 429 - 445
- GUYNES, G. J.
BENNETT, E. O. 1959 Bacterial deterioration of emul-
sion oils. I. Relationship between
aerobes and sulfate-reducing bac-
teria in deterioration.
Appl. Microbiol. 7, 117 - 121
- HACKETT, W. F.
CONNORS, W. J.
KIRK, T. K.
ZEIKUS, J. G. 1977 Microbial decomposition of synthe-
tic ¹⁴C-labeled lignins in nature:
lignin biodegradation in a variety
of natural materials.
Appl. Environ. Microbiol. 33, 43 -
51
- HADJIPETROU, L. P.
STOUTHAMER, A. H. 1965 Energy production during nitrate
respiration by Aerobacter aero-
genes.
J. Gen. Microbiol. 38, 29 - 34
- HALFEN, L. N.
CASTENHOLZ, R. W. 1970 Gliding in a blue-green alga:
a possible mechanism.
Nature 225, 1163 - 1165
- HALL, L. M.
MacVICAR, R. 1955 Ammonia as an intermediate in
nitrate reduction by Bacillus
subtilis.
J. Biol. Chem. 213, 305 - 310

- HARDER, W.
VAN DIJKEN, J. P. 1976 Theoretical considerations on the
relation between energy production
and growth of methane-utilizing
bacteria.
In: Microbial production and utili-
zation of gases (H. G. SCHLEGEL,
G. GOTTSCHALK, N. PFENNIG, eds.),
S. 403 - 418. Goltze, Göttingen
- HASAN, S. M.
HALL, J. B. 1975 The physiological function of
nitrate reduction in Clostridium
perfringens.
J. Gen. Microbiol. 87, 120 - 128
- HASCHKE, R. H.
CAMPBELL, L. L. 1971 Thiosulfate reductase of Desulfo-
vibrio vulgaris.
J. Bacteriol. 106, 603 - 607
- HATCHIKIAN, E. C.
LeGALL, J.
BRUSCHI, M.
DUBOURDIEU, M. 1972 a Regulation of the reduction of sul-
fite and thiosulfate by ferredoxin,
flavodoxin and cytochrome cc₃ in
extracts of the sulfate reducer
Desulfovibrio gigas.
Biochim. Biophys. Acta 258, 701 -
708
- HATCHIKIAN, E. C.
LeGALL, J.
FORGET, N. 1972 b Evidence for the presence of a
b-type cytochrome in the sulfate-
reducing bacterium Desulfovibrio
gigas, and its role in the reduc-
tion of fumarate.
Biochim. Biophys. Acta 267, 479 -
484
- HATCHIKIAN, E. C. 1975 Purification and properties of
thiosulfate reductase from Desulfo-
vibrio gigas.
Arch. Microbiol. 105, 249 - 256
- HEALY, J. B., Jr.
YOUNG, L. Y. 1978 Catechol and phenol degradation by
a methanogenic population of bac-
teria.
Appl. Environ. Microbiol. 35,
216 - 218
- HEALY, J. B., Jr.
YOUNG, L. Y. 1979 Anaerobic biodegradation of eleven
aromatic compounds to methane.
Appl. Environ. Microbiol. 38,
84 - 89

- HEUKELIKIAN, H. 1958 Transformation of some lipids in anaerobic sludge digestion. Sewage Ind. Wastes 30, 1108 - 1120
- MUELLER, P.
- HOBSON, P. N. 1969 Rumen bacteria. In: Methods in Microbiology, vol. 3B (J. R. NORRIS, D. W. RIBBONS, eds.), S. 133 - 149. Academic Press, London, New York
- HOEKSTRA, W. G. 1974 Trace element metabolism in animals-2. University Park Press, Baltimore
- SUTTIE, J. W.
- GANTHER, H. E.
- MERTZ, W.
- HOPPE-SEYLER, F. 1886 Ueber die Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. II. Der Zerfall der Cellulose durch Gährung unter Bildung von Methan und Kohlensäure und die Erscheinungen, welche dieser Process veranlasst. Zeitschr. f. physiol. Chemie 10, 401 - 440
- HUISINGH, J. 1972 Copper-molybdenum interactions with the sulfate-reducing system in rumen microorganisms. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 518 - 521
- MATRONE, G.
- HUNGATE, R. E. 1966 The rumen and its microbes. Academic Press, New York, London
- HUNGATE, R. E. 1969 A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, vol. 3B (J. R. NORRIS, D. W. RIBBONS, eds.), S. 117 - 132. Academic Press, London, New York
- HUNGER, W. 1978 Phanotypische und genotypische Untersuchungen an Bacillus megaterium und agarolytischen Bacillus-Stämmen. Dissertation, Universität Göttingen

- HVID-HANSEN, N. 1951 Sulphate-reducing and hydrocarbon-producing bacteria in ground-water. Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica 29, 266 - 289
- IMHOFF, D. 1979 Nicotinic acid hydroxylase from Clostridium barkeri: selenium dependent formation of active enzyme. FEMS Microbiology Letters 5, 155 - 158
- ANDREESEN, J. R.
- IRIE, K. 1973 Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. XII. Some properties of flavodoxin from Desulfovibrio vulgaris. J. Biochem. 73, 353 - 366
- KOBAYASHI, K.
- KOBAYASHI, M.
- ISHIMOTO, M.
- ISENBERG, D. L. 1959 Bacterial deterioration of emulsion oils. II. Nature of the relationship between aerobes and sulfate-reducing bacteria. Appl. Microbiol. 7, 121 - 125
- ISHIMOTO, M. 1954 a Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. III. Sulfate reduction by cell suspension. J. Biochem. 41, 537 - 546
- KOYAMA, J.
- OMURA, T.
- NAGAI, Y.
- ISHIMOTO, M. 1954 b Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. IV. The cytochrome system of sulfate-reducing bacteria. J. Biochem. 41, 763 - 770
- KOYAMA, J.
- NAGAI, Y.
- VAN ITERSON, C., Jr. 1904 Die Zersetzung der Cellulose durch aerobe Mikroorganismen. Centralbl. Bakteriol., II. Abt., 11, 689 - 698
- IVANOV, M. V. 1968 Microbiological processes in the formation of sulfur deposits (S. I. KUZNETSOV, ed.). Israel Program for Scientific Translations

- JANNASCH, H. W.
WIRSEN, C. O. 1979 Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bio Science* 29, 592 - 598
- JERIS, J. S.
McCARTY, P. L. 1965 The biochemistry of methane fermentation using ¹⁴C tracers. *J. Water Poll. Control Fed.* 37, 178 - 192
- JONES, H. E. 1971 Sulfate-reducing bacterium with unusual morphology and pigment content. *J. Bacteriol.* 106, 339 - 346
- JONES, H. E. 1972 Cytochromes and other pigments of dissimilatory sulphate-reducing bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 84, 207 - 224
- JONES, J. B.
STADTMAN, T. C. 1977 *Methanococcus vannielii*: culture and effects of selenium and tungsten on growth. *J. Bacteriol.* 130, 1404 - 1406
- JØRGENSEN, B. B.
FENCHEL, T. M. 1974 The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biol.* 24, 189 - 201
- JØRGENSEN, B. B. 1977 a The sulfur cycle of a coastal marine sediment. *Limnol. Oceanogr.* 22, 814 - 832
- JØRGENSEN, B. B. 1977 b Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. *Marine Biol.* 41, 7 - 17
- KAMEN, M. D.
HORIO, T. 1970 Bacterial cytochromes: I. Structural aspects. *Ann. Rev. Biochem.* 39, 673 - 700

- KEITH, C. L.
BRIDGES, R. L.
FINA, L. R.
IVERSON, K. L.
CLORAN, J. A. 1978 The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. IV. Dearomatization of the ring and volatile fatty acids formed on ring rupture. *Arch. Microbiol.* 118, 173 - 176
- KLAESER, M. 1914 Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten und Ammoniak durch Bakterien. *Centralbl. Bakteriol., II. Abt.*, 41, 365 - 430
- KOBAYASHI, K.
TACHIBANA, S.
ISHIMOTO, M. 1969 Intermediary formation of trithionate in sulfite reduction by a sulfate-reducing bacterium. *J. Biochem.* 65, 155 - 157
- KOBAYASHI, K.
SEKI, Y.
ISHIMOTO, M. 1974 Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria. XIII. Sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* - mechanism of trithionate, thiosulfate, and sulfide formation and enzymatic properties. *J. Biochem.* 75, 519 - 529
- KOIKE, I.
HATTORI, A. 1978 Denitrification and ammonia formation in anaerobic coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 278 - 282
- KOSER, S. A. 1968 Vitamin requirements of bacteria and yeasts. Charles C Thomas, Springfield, Illinois
- KRÖGER, A. 1975 The electron transport-coupled phosphorylation of the anaerobic bacterium *Vibrio succinogenes*. In: Electron transfer chains and oxidative phosphorylation (E. QUAGLIARELLO, S. PAPA, F. PALMIERI; E. SLATER, N. SILIPRANDI, eds.), S. 265 - 270. North-Holland Publishing Co., Amsterdam

- KUTZNER, H. J. 1963/64 Untersuchungen an Clostridien mit besonderer Berücksichtigung der für die Milchwirtschaft wichtigen Arten. Zentralbl. Bakteriologie, I. Abt., Orig., 191, 441 - 450
- KUZNETSOV, S. I. 1963 The role of microorganisms in the formation and destruction of sulfur deposits. In: Introduction to geological microbiology (S. I. KUZNETSOV, M. V. IVANOV, N. N. LYALIKOVA, eds.; C. H. OPPENHEIMER, ed. of English edition), international series in the earth sciences. McGraw-Hill, New York, San Francisco, Toronto, London
- KUZNETSOVA, V. A. 1965 Effect of temperature on the development of microorganisms from flooded strata of the Romashkino oil field. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 34, 274 - 278
- GORLENKO, V. M.
- LAANBROEK, H. J. 1977 Isolation of an aspartate-fermenting, free-living Campylobacter species. FEMS Microbiology Letters 1, 99 - 102
- KINGMA, W.
VELDKAMP, H.
- LANG, E. 1972 Spezifische Farbreaktion zum direkten Nachweis der Ameisensäure. Z. Analyt. Chemie 260, 8 - 10
- LANG, H.
- LANG, K. 1974 Wasser, Mineralstoffe, Spurenelemente. Steinkopff, Darmstadt
- LEE, J. P. 1971 Purification of the enzyme reducing bisulfite to trithionate from Desulfovibrio gigas and its identification as desulfovibrin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 583 - 589
- PECK, H. D., Jr.

- LEE, J.-P. 1973 a Isolation of a new pigment, desulforubidin, from Desulfovibrio desulfuricans (Norway strain) and its role in sulfite reduction. J. Bacteriol. 115, 453 - 455
- YI, C.-S.
LEGALL, J.
PECK, H. D., Jr.
- LEE, J.-P. 1973 b Isolation of assimilatory- and dissimilatory-type sulfite reductases from Desulfovibrio vulgaris. J. Bacteriol. 115, 529 - 542
- LEGALL, J.
DRAGONI, N.
- 1966 Dependence of sulfite reduction on a crystallized ferredoxin from Desulfovibrio gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 145 - 149
- LEGALL, J. 1968 Purification and some properties of a new cytochrome from Desulfovibrio desulfuricans. In: Structure and function of cytochromes (K. OKUNUKI, M. D. KAMEN, I. SEKUZU, eds.), S. 467 - 470. University Tokyo Press, Tokyo, Baltimore, Manchester
- BRUSCHI-HERIAUD, M.
- LEGALL, J. 1973 The physiology of sulfate-reducing bacteria. In: Adv. Microbial Physiol., vol. 10 (A. H. ROSE, D. W. TEMPEST, eds.), S. 81 - 133. Academic Press, New York, London
- POSTGATE, J. R.
- LEONHARDT, U. 1977 Some properties of formate dehydrogenase, accumulation and incorporation of ¹⁸⁵W-Tungsten into proteins of Clostridium formicoaceticum. Arch. Microbiol. 115, 277 - 284
- ANDREESEN, J. R.
- LJUNGDAHL, L. G. 1976 Reduction of CO₂ to acetate in homoacetate fermenting Clostridia and the involvement of tungsten in formate dehydrogenase. In: Microbial production and utilization of gases (H. G. SCHLEGEL, G. GOTTSCHALK, N. PFENNIG, eds.), S. 163 - 172. Goltze, Göttingen
- ANDREESEN, J. R.

- LYALIKOVA, N. N.
SOKOLOVA, G. A. 1965 A microbiological characterization of some ore deposits in central Kazakhstan. *Microbiology* (translated from *Mikrobiologiya, SSSR*) 34, 279 - 285
- LYON, E. S.
GARRET, R. H. 1978 Regulation, purification, and properties of xanthine dehydrogenase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 253, 2604 - 2614
- MACY, J.
PROBST, I.
GOTTSCHALK, G. 1975 Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin. *J. Bacteriol.* 123, 436 - 442
- MACY, J.
KULLA, H.
GOTTSCHALK, G. 1976 H₂-dependent anaerobic growth of *Escherichia coli* on L-malate: succinate formation. *J. Bacteriol.* 125, 423 - 428
- MAGEE, C. M.
RODEHEAVER, G.
EDGERTON, M. T.
EDLICH, R. F. 1975 A more reliable Gram staining technic for diagnosis of surgical infections. *American J. Surgery* 130, 341 - 346
- MAH, R. A.
SMITH, M. R.
BARESI, L. 1978 Studies on an acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1174 - 1184
- MAHLER, H. R.
CORDES, E. H. 1971 Equilibria and thermodynamics in biochemical transformations. In: *Biological chemistry*, 2nd edition, S. 11 - 41. Harper & Row, New York, Evanston, San Francisco, London
- MAROC, J.
AZERAD, R.
KAMEN, M. D.
LEGALL, J. 1970 Menaquinone (MK-6) in the sulfate-reducing obligate anaerobe, *Desulfovibrio*. *Biochim. Biophys. Acta*, 197, 87 - 89

- MARTENS, C. S.
BERNER, R. A. 1974 Methane production in the interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science* 185, 1167 - 1169
- MATIN, A.
VELDKAMP, H. 1978 Physiological basis of the selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. *J. Gen. Microbiol.* 105, 187 - 197
- MAYER, F. 1969 Die Fimbrien von *Rhizobium lupini* 1/50, staⁿ. *Arch. Microbiol.* 68, 179 - 186
- MCINERNEY, M. J.
BRYANT, M. P.
PFENNIG, N. 1979 Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch. Microbiol.* 122, 129 - 135
- MCNALL, E. G.
ATKINSON, D. E. 1956 Nitrate reduction. I. Growth of *Escherichia coli* with nitrate as sole source of nitrogen. *J. Bacteriol.* 72, 226 - 229
- MECHALAS, B. J.
RITTENBERG, S. C. 1960 Energy coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.* 80, 501 - 507
- MERCK Index 1960 The MERCK Index of chemicals and drugs, 7th edition (P. G. STECHER, ed.). Merck, Rahway, N. J./USA
- MEYER, L. 1864 Chemische Untersuchungen der Thermen zu Landeck in der Grafschaft Glatz. *Journal f. Prakt. Chemie* 91, 1 - 15
- MILLER, J. D. A.
SALEH, A. M. 1964 A sulphate-reducing bacterium containing cytochrome c₃ but lacking desulfovibrin. *J. Gen. Microbiol.* 37, 419 - 423
- MILLER, J. D. A.
WAKERLEY, D. S. 1966 Growth of sulfate-reducing bacteria by fumarate dismutation. *J. Gen. Microbiol.* 43, 101 - 107

- MILLER, J. D. A. 1970 Malate dismutation by Desulfovibrio.
NEUMANN, P. M. Arch. Mikrobiol. 71, 214 - 219
ELFORD, L.
WAKERLEY, D. S.
- MOORE, W. E. C. 1976 Emendation of Bacteroidaceae and
JOHNSON, J. L. Butyrivibrio and descriptions of
HOLDEMAN, L. V. Desulfomonas gen. nov. and ten new
species in the genera Desulfomonas,
Butyrivibrio, Eubacterium,
Clostridium, and Ruminococcus.
Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 238 -
252
- MOURA, I. 1977 Isolation and characterization of
BRUSCHI, M. desulforedoxin, a new type of
LEGALL, J. non-heme iron protein from Desulfovibrio
MOURA, J. J. G. vibrio gigas.
XAVIER, A. V. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75,
1037 - 1044
- MURPHY, M. J. 1973 An iron tetrahydroporphyrin
SIEGEL, L. M. prosthetic group common to both
KAMIN, H. assimilatory and dissimilatory
DerVARTANIAN, D. V. sulfite reductases.
LEE, J.-P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54,
LEGALL, J. 82 - 88
PECK, H. D., Jr.
- MURPHY, M. J. 1973 Siroheme and sirohydrochlorin. The
SIEGEL, L. M. basis for a new type of porphyrin-
related prosthetic group common to
both assimilatory and dissimilatory
sulfite reductases.
J. Biol. Chem. 248, 6911 - 6919
- MURPHY, M. J. 1974 Siroheme: a new prosthetic group
SIEGEL, L. M. participating in six-electron
TOVE, S. R. reduction reactions catalyzed by
KAMIN, H. both sulfite and nitrite reductase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 612 -
616
- MYLROIE, R. L. 1955 Experiments on the methane bacteria
HUNGATE, R. E. in sludge.
Canadian J. Microbiol. 1, 55 - 64

- NAKATSUKASA, W. 1969 Thiosulfate reductase isolated from
AKAGI, J. M. Desulfotomaculum nigrificans.
J. Bacteriol. 98, 429 - 433
- NEWMAN, D. J. 1968 Rubredoxin from a nitrogen-fixing
POSTGATE, J. R. variety of Desulfovibrio desulfurificans.
Europ. J. Biochem. 7, 45 - 50
- NOTTINGHAM, P. M. 1969 Methanogenic fermentation of ben-
HUNGATE, R. E. zoate.
J. Bacteriol. 98, 1170 - 1172
- NOVELLI, G. D. 1944 Assimilation of petroleum hydro-
ZOBELL, C. E. carbons by sulfate-reducing bac-
teria.
J. Bacteriol. 47, 447 - 448
- ORR, W. 1978 Sulfur. Biogeochemistry.
In: Handbook of Geochemistry,
vol. II/2 (K. H. WEDEPOHL, ed.),
16-L, S. 1 - 19. Springer, Berlin,
Heidelberg, New York
- PACHMAYR, F. 1960 Vorkommen und Bestimmung von
Schwefelverbindungen in Mineral-
wasser.
Dissertation, Universität München
- PANGANIBAN, A. T., Jr. 1979 Oxidation of methane in the absence
PATT, T. E. of oxygen in lake water samples.
HART, W. Appl. Environ. Microbiol. 37, 303 -
HANSON, R. S. 309
- PANKHURST, E. S. 1971 The isolation and enumeration of
sulphate-reducing bacteria.
In: Isolation of anaerobes
(D. A. SHAPTON, R. G. BOARD, eds.)
S. 223 - 240. Academic Press,
London, New York
- PAYNE, W. J. 1973 Reduction of nitrogenous oxides by
microorganisms.
Bacteriol. Rev. 37, 409 - 452

- PECK, H. D., Jr. 1959 The ATP-dependent reduction of sulfate with hydrogen in extracts of Desulfovibrio desulfuricans. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 701 - 708
- PECK, H. D., Jr. 1960 a Evidence for oxidative phosphorylation during the reduction of sulfate with hydrogen by Desulfovibrio desulfuricans. J. Biol. Chem. 235, 2734 - 2738
- PECK, H. D., Jr. 1960 b Adenosine 5'-phosphosulfate as an intermediate in the oxidation of thiosulfate by Thiobacillus thio-parus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46, 1053 - 1057
- PECK, H. D., Jr. 1962 a The role of adenosine-5'-phosphosulfate in the reduction of sulfate to sulfite by Desulfovibrio desulfuricans. J. Biol. Chem. 237, 198 - 203
- PECK, H. D., Jr. 1962 b Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulfur compounds in microorganisms. Bacteriol. Rev. 26, 67 - 94
- PECK, H. D., Jr. 1965 DEACON, T. E. DAVIDSON, J. T. Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from Desulfovibrio desulfuricans and Thiobacillus thio-parus. I. The assay and purification. Biochim. Biophys. Acta 96, 429 - 446
- PECK, H. D., Jr. 1966 Phosphorylation coupled with electron transfer in extracts of the sulfate reducing bacterium Desulfovibrio gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 112 - 118

- PECK, H. D., Jr. 1974 The evolutionary significance of inorganic sulfur metabolism. In: Evolution in the microbial world, 24th Symposium Soc. Gen. Microbiol., S. 241 - 262. University Press, Cambridge
- PFENNIG, N. 1965 Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. In: Anreicherungskultur und Mutantenauslese (H. G. SCHLEGEL, E. KRÖGER, Hrsg.), Zentralbl. Bakteriol., I. Abt., Suppl. 1, 179 - 189
- PFENNIG, N. 1965 EIMHJELLEN, K. E. LIAAEN JENSEN, S. A new isolate of the Rhodospirillum fulvum group and its photosynthetic pigments. Arch. Mikrobiol. 51, 258 - 266
- PFENNIG, N. 1967 Photosynthetic bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 21, 285 - 324
- PFENNIG, N. 1976 BIEBL, H. Desulphuromonas acetoxidans gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. Arch. Microbiol. 110, 3 - 12
- PFENNIG, N. 1978 Rhodocyclus purpureus gen. nov. and sp. nov., a ring-shaped, vitamin B₁₂-requiring member of the family Rhodospirillaceae. Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 283 - 288
- PFENNIG, N. 1979 Formation of oxygen and microbial processes establishing and maintaining anaerobic environments. In: Dahlem Konferenzen, Berlin: Strategies of microbial life in extreme environments (M. SHILO, ed.), S. 137 - 148. Verlag Chemie, Weinheim, New York

- PINSENT, J. 1954 The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the Coli aerogenes group of bacteria. *Biochem. J.* 57, 10 - 16
- POSTGATE, J. R. 1951 The reduction of sulphur compounds by Desulphovibrio desulphuricans. *J. Gen. Microbiol.* 5, 725 - 738
- POSTGATE, J. R. 1952 Growth of sulphate-reducing bacteria in sulphate-free media. *Research* 5, 189 - 190
- POSTGATE, J. R. 1954 Presence of cytochrome in an obligate anaerobe. *Biochem. J.* 56, xi - xii
- POSTGATE, J. R. 1956 Cytochrome c₃ and desulphoviridin; pigments of the anaerobe Desulphovibrio desulphuricans. *J. Gen. Microbiol.* 14, 545 - 572
- POSTGATE, J. R. 1959 a Sulphate reduction by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 13, 505 - 520
- POSTGATE, J. R. 1959 b A diagnostic reaction of Desulphovibrio desulphuricans. *Nature* 183, 481 - 482
- POSTGATE, J. R. 1960 On the autotrophy of Desulphovibrio desulphuricans. *Z. Allg. Mikrobiol.* 1, 53 - 56
- POSTGATE, J. R. 1963 a A strain of Desulfovibrio able to use oxamate. *Arch. Mikrobiol.* 46, 287 - 295
- POSTGATE, J. R. 1963 b Sulfate-free growth of Clostridium nigrificans. *J. Bacteriol.* 85, 1450 - 1451

- POSTGATE, J. R. 1963 CAMPBELL, L. L. Identification of Coleman's sulfate-reducing bacterium as a mesophilic relative of Clostridium nigrificans. *J. Bacteriol.* 86, 274 - 279
- POSTGATE, J. R. 1965 a Enrichment and isolation of sulphate-reducing bacteria. In: Anreicherungskultur und Mutantenauslese (H. G. SCHLEGEL, E. KRÖGER, Hrsg.), Zentralbl. Bakteriol., I. Abt., Suppl. 1, S. 190 - 197
- POSTGATE, J. R. 1965 b Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29, 425 - 441
- POSTGATE, J. R. 1966 CAMPBELL, L. L. Classification of Desulfovibrio species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol. Rev.* 30, 732 - 738
- QUASTEL, J. H. 1925 STEPHENSON, M. WHETHAM, M. D. Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth. *Biochem. J.* 19, 304 - 317
- QUAYLE, J. R. 1972 The metabolism of one-carbon compounds by microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.* 7, 119 - 203
- REINEKE, W. 1976 Ursachen des verlangsamten biologischen Abbaus halogenierter aromatischer Kohlenwasserstoffe: Modelluntersuchungen an substituierten Benzoaten und 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren. *Dissertation, Universität Göttingen*
- RHEAD, M. M. 1971 EGLINTON, G. DRAFFAN, G. H. ENGLAND, P. J. Conversion of oleic acid to saturated fatty acids in Severn Estuary sediments. *Nature* 232, 327 - 330

- RIBBONS, D. W. 1970 Metabolism of single carbon compounds.
HARRISON, J. E. Ann. Rev. Microbiol. 24, 135 - 158
WADZINSKI, A. M.
- RITTER, G. 1908 Beiträge zur Physiologie der fakultativ anaeroben Bakterien.
Centralbl. Bakteriolog., II. Abt., 20, 21 - 38
- ROBBINS, P. W. 1958 a Separation of the two enzymatic phases in active sulfate synthesis.
LIPMANN, F. J. Biol. Chem. 233, 681 - 685
- ROBBINS, P. W. 1958 b Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate.
LIPMANN, F. J. Biol. Chem. 233, 686 - 690
- ROSENFELD, W. D. 1947 Anaerobic oxidation of hydrocarbons by sulfate-reducing bacteria.
J. Bacteriol. 54, 664 - 665
- ROZANOVA, E. P. 1974 A new nonspore-forming thermophilic sulfate-reducing organism, Desulfovibrio thermophilus nov. spec.
KHUDYAKOVA, A. I. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 43, 908 - 912
- ROZANOVA, E. P. 1976 A mesophilic, sulfate-reducing, rod-shaped, nonsporeforming bacterium.
NAZINA, T. N. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 45, 711 - 716
- RUBENTSCHIK, L. 1928 Über Sulfatreduktion durch Bakterien bei Zellulosegärungsprodukten als Energiequelle.
Centralbl. Bakteriolog., II. Abt., 73, 483 - 496
- SCHEIFINGER, C. C. 1973 Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of Bacteroides succinogenes and Selenomonas ruminantium.
WOLIN, M. J. Appl. Microbiol. 26, 789 - 795

- SCOTT, T. W. 1964 The formation and metabolism of phenyl-substituted fatty acids in the ruminant.
WARD, P. F. V. Biochem. J. 90, 12 - 24
DAWSON, R. M. C.
- SELWYN, S. C. 1959 A search for the rubentschikii group of Desulphovibrio.
POSTGATE, J. R. Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 25, 465 - 472
- SENEZ, J. C. 1954 Fermentation de l'acide pyruvique et des acides dicarboxyliques par les bactéries anaérobies sulfato-réductrices.
Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 541 - 552
- SENEZ, J. C. 1954 Note préliminaire sur la dégradation anaérobie de la cystéine et de la cystine par les bactéries sulfato-réductrices.
LEROUX-GILLERON, J. Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 553 - 559
- SENEZ, J. C. 1961 Dégradation de la choline par les bactéries sulfato-réductrices. Identification de Desulfovibrio desulfuricans et de Vibrio cholonicus.
PASCAL, M.-C. Z. Allg. Mikrobiol. 1, 142 - 149
- SENEZ, J. C. 1962 Some considerations on the energetics of bacterial growth.
Bacteriol. Rev. 26, 95 - 107
- SIEFERT, E. 1979 Chemoautotrophic growth of Rhodopseudomonas species with hydrogen and chemotrophic utilization of methanol and formate.
PFENNIG, N. Arch. Microbiol. 122, 177 - 182
- SIEGEL, L. M. 1975 Biochemistry of the sulfur cycle. In: Metabolic pathways 7 (D. M. GREENBERG, ed.), S. 217 - 286. Academic Press, New York

- SIREVÅG, R. 1974 Further studies on carbon dioxide fixation in Chlorobium. Arch. Microbiol. 98, 3 - 18
- SISLER, F. D. 1950 Hydrogen-utilizing sulfate-reducing bacteria in marine sediments. ZOBELL, C. E. J. Bacteriol. 60, 747 - 756
- SISLER, F. D. 1951 Hydrogen utilization by some marine sulfate-reducing bacteria. ZOBELL, C. E. J. Bacteriol. 62, 117 - 127
- SKUJA, H. 1956 Taxonomische und biologische Studien über das Phytoplankton schwedischer Binnengewässer. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis 16, N:o 3, 1 - 404
- SKUJA, H. 1974 Family Pelonemataceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition (R. E. BUCHANAN, N. E. GIBBONS, eds.), S. 122 - 127. Williams & Wilkins, Baltimore
- SMILLIE, A. M. 1962 Enzymes of the reductive pentose phosphate cycle in the purple and in the green photosynthetic sulfur bacteria. RIGOPOULOS, N. KELLY, H. Biochim. Biophys. Acta 56, 612 - 614
- SMITH, P. H. 1966 Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. MAH, R. A. Appl. Microbiol. 14, 368 - 371
- SMITH, M. R. 1978 Growth and methanogenesis by Methanosarcina strain 227 on acetate and methanol. MAH, R. A. Appl. Environ. Microbiol. 36, 870 - 879
- SØRENSEN, J. 1978 Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in a coastal marine sediment. Appl. Environ. Microbiol. 35, 301 - 305

- SOROKIN, Yu. I. 1957 On the ability of sulfate-reducing bacteria to utilize methane for the reduction of sulfates to hydrogen sulfide. Doklady Biol. Sciences Section (Translation of Dokl. Akad. Nauk SSSR) 115, 713 - 715
- SOROKIN, Yu. I. 1966 a Sources of energy and carbon for biosynthesis in sulfate-reducing bacteria. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 35, 643 - 647
- SOROKIN, Yu. I. 1966 b Investigation of the structural metabolism of sulfate-reducing bacteria with ¹⁴C. Microbiology (translated from Mikrobiologiya, SSSR) 35, 806 - 814
- SOROKIN, Yu. I. 1966 c Role of carbon dioxide and acetate in biosynthesis by sulphate-reducing bacteria. Nature 210, 551 - 552
- SOROKIN, Yu. I. 1970 Experimental investigation of the rate and mechanism of oxidation of hydrogen sulfide in the black sea using ³⁵S. Oceanology 10, 37 - 46
- STADTMAN, T. C. 1951 Studies on the methane fermentation. VIII. Tracer experiments on fatty acid oxidation by methane bacteria. BARKER, H. A. J. Bacteriol. 61, 67 - 80
- STANIER, R. Y. 1974 The origins of photosynthesis in eukaryotes. In: Evolution in the microbial world, 24th Symposium Soc. Gen. Microbiol., S. 219 - 240. University Press, Cambridge
- STOKES, J. E. 1969 Reductive pentose cycle and formate assimilation in Rhodospseudomonas palustris. HOARE, D. S. J. Bacteriol. 100, 890 - 894

- STOUTHAMER, A. H. 1979 The search for correlation between theoretical and experimental growth yields.
In: Int. Rev. Biochem., Microbial Biochem., vol. 21 (J. R. QUAYLE, ed.), S. 1 - 47. University Park Press, Baltimore
- STOUTHAMER, A. H. 1979 Microaerophily.
DE VRIES, W. Antonie von Leeuwenhoek,
NIEKUS, H. G. D. J. Microbiol. Serol. 45, 5 - 12
- STROHL, W. R. 1978 Cell division and trichome breakage
LARKIN, J. M. in Beggiatoa.
Current Microbiology 1, 151 - 155
- STRØM, T. 1974 The carbon assimilation pathways of
FERENCI, T. Methylococcus capsulatus, Pseudo-
QUAYLE, J. R. monas methanica and Methylosinus
trichosporium (OB3B) during growth
on methane.
Biochem. J. 144, 465 - 476
- SUH, B. 1969 Formation of thiosulfate from sul-
AKAGI, J. M. fite by Desulfovibrio vulgaris.
J. Bacteriol. 99, 210 - 215
- TAKAI, Y. 1966 The mechanism of reduction in
KAMURA, T. waterlogged paddy soil.
Folia Microbiol. 11, 304 - 313
- TANNER, R. S. 1978 Tetrahydrofolate enzyme levels in
WOLFE, R. S. Acetobacterium woodii and their
LJUNGDAHL, L. G. implication in the synthesis of
acetate from CO₂.
J. Bacteriol. 134, 668 - 670
- TARVIN, D. 1934 The methane fermentation of organic
BUSWELL, A. M. acids and carbohydrates.
J. American Chem. Soc. 56, 1751 -
1755
- TAYLOR, B. F. 1971 Thiobacillus denitrificans as an
HOARE, D. S. obligate chemolithotroph. Isolation
HOARE, S. L. and growth studies.
Arch. Mikrobiol. 78, 193 - 204

- TAYLOR, B. F. 1972 The anaerobic degradation of aroma-
HEEB, M. J. tic compounds by a denitrifying
bacterium.
Arch. Microbiol. 83, 165 - 171
- TEMPLE, K. L. 1964 Syngeneses of sulfide ores: an
evaluation of biochemical aspects.
Econ. Biol. 59, 1473 - 1491
- THAUER, R. K. 1976 The active species of "CO₂" utili-
FUCHS, G. zed by enzymes involved in "CO₂"
SCHERER, P. reduction to formate.
In: Microbial production and utili-
zation of gases (H. G. SCHLEGEL,
G. GOTTSCHALK, N. PFENNIG, eds.),
S. 157 - 162. Goltze, Göttingen
- THAUER, R. K. 1977 Energy conservation in chemotrophic
JUNGERMANN, K. anaerobic bacteria.
DECKER, K. Bacteriol. Rev. 41, 100 - 180
- TOERIEN, D. F. 1969 Anaerobic digestion. I. The micro-
HATTINGH, W. H. J. biology of anaerobic digestion.
Water Research 3, 385 - 416.
Pergamon Press, Oxford
- TRUDINGER, P. A. 1970 Carbon monoxide-reacting pigment
from Desulfotomaculum nigrificans
and its possible relevance to sul-
fite reduction.
J. Bacteriol. 104, 158 - 170
- TRUDINGER, P. A. 1976 Microbiological processes in rela-
tion to ore genesis.
In: Handbook of strata-bound and
stratiform ore deposits, geochemi-
cal studies, vol. 2 (K. H. WOLF,
ed.), S. 135 - 190. Elsevier,
Amsterdam, Oxford, New York
- TSANG, M. L.-S. 1976 Sulfate-reducing pathway in
SCHIFF, J. A. Escherichia coli involving bound
intermediates.
J. Bacteriol. 125, 923 - 933

- TWEEDY, J. M.
PARK, R. W. A.
HODGKISS, W. 1968 Evidence for the presence of fimbriae (pili) on vibrio species. *J. Gen. Microbiol.* 51, 235 - 244
- VERHOEVEN, W. 1956 Some remarks on nitrate and nitrite metabolism in microorganism. In: A symposium on inorganic nitrogen metabolism: function of metallo-flavoproteins (W. D. McELROY, B. GLASS, eds.), S. 61 - 86. John Hopkins Press, Baltimore
- VOGELS, G. D.
VAN DER DRIFT, C. 1976 Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 40, 403 - 468
- VOSJAHN, J. H. 1970 ATP generation by electron transport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 36, 585 - 587
- WAGNER, G. C.
KASSNER, R. J.
KAMEN, M. D. 1974 Redox potentials of certain vitamins K: implications for a role in sulfite reduction by obligately anaerobic bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 253 - 256
- WAGNER, R.
ANDREESSEN, J. R. 1977 Differentiation between *Clostridium acidiurici* and *Clostridium cylindrosporium* on the basis of specific metal requirements for formate dehydrogenase formation. *Arch. Microbiol.* 114, 219 - 229
- WAGNER, R.
ANDREESSEN, J. R. 1979 Selenium requirement for active xanthine dehydrogenase from *Clostridium acidiurici* and *Clostridium cylindrosporium*. *Arch. Microbiol.* 121, 255 - 260
- WAKE, L. V.
CHRISTOPHER, R. K.
RICKARD, P. A. D.
ANDERSEN, J. E.
RALPH, B. J. 1977 A thermodynamic assessment of possible substrates for sulphate-reducing bacteria. *Aust. J. Biol. Sci.* 30, 155 - 172

- WARE, D. A.
POSTGATE, J. R. 1971 Physiological and chemical properties of a reductant-activated inorganic pyrophosphatase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Gen. Microbiol.* 67, 145 - 160
- WATERBURY, J. B.
STANIER, R. Y. 1978 Patterns of growth and development in pleurocapsalean Cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 42, 2 - 44
- WEBER, M. M.
MATSCHINER, J. T.
PECK, H. D., Jr. 1970 Menaquinone-6 in the strict anaerobes *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 38, 197 - 204
- WESTON, J. A.
KNOWLES, C. J. 1973 A soluble CO-binding c-type cytochrome from the marine bacterium *Beneckea natriegens*. *Biochim. Biophys. Acta* 305, 11 - 18
- WHITELEY, H. R. 1952 The fermentation of purines by *Micrococcus aerogenes*. *J. Bacteriol.* 63, 163 - 175
- WIDDEL, F.
PFENNIG, N. 1977 A new anaerobic, sporing, acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum* (emend.) *acetoxidans*. *Arch. Microbiol.* 112, 119 - 122
- WIGHT, K. M.
STARKEY, R. L. 1945 Utilization of hydrogen by sulfate-reducing bacteria and its significance in anaerobic corrosion. *J. Bacteriol.* 50, 238
- WILLIAMS, R. J.
EVANS, W. C. 1975 The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. *Biochem. J.* 148, 1 - 10
- WINFREY, M. R.
ZEIKUS, J. G. 1977 Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 275 - 281

- WIRINGA, K. T. 1940 The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. Antonie von Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 6, 251 - 262
- WOLFE, R. S. 1971 Microbial formation of methane. In: Adv. Microbial Physiol., vol. 6 (A. H. ROSE, J. F. WILKINSON, eds.), S. 107 - 146. Academic Press, New York, London
- WOLIN, M. J. 1961 Cytochrome-producing anaerobic
WOLIN, E. A. Vibrio succinogenes, sp. n.
JACOBS, N. J. J. Bacteriol. 81, 911 - 917
- WOODS, D. D. 1938 The reduction of nitrate to ammonia by Clostridium welchii. Biochem. J. 32, 2000 - 2012
- YAGI, T. 1969 Formate:cytochrome oxidoreductase of Desulfovibrio vulgaris. J. Biochem. 66, 473 - 478
- ZAJIC, J. E. 1969 Sulfate reduction and sulfides. In: Microbial Biogeochemistry, S. 79 - 95. Academic Press, New York, London
- ZEHNDER, A. J. B. 1980 Characterization of an acetate-
HUSER, B. A. decarboxylating, non-hydrogen-
BROCK, T. D. oxidizing methane bacterium.
WUHRMANN, K. Arch. Microbiol. 124, 1 - 11
- ZEIKUS, J. G. 1972 Methanobacterium thermoauto-
WOLFE, R. S. trophicus sp. n., an anaerobic,
autotrophic, extreme thermophile.
J. Bacteriol. 109, 707 - 713
- ZEIKUS, J. G. 1977 The biology of methanogenic bac-
teria.
Bacteriol. Rev. 41, 514 - 541.
Erratum: Bacteriol. Rev. 42, 250
(1978)

- ZHILINA, T. N. 1976 Biotypes of Methanosarcina.
Microbiology (translated from
Mikrobiologiya, SSSR) 45, 414 - 421
- ZOBELL, C. E. 1958 Ecology of sulfate reducing bac-
teria.
Producers Monthly Penn. Oil Prod.
Ass. 22 (7), 12 - 29 (Bradford)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. N. Pfennig, danke ich für die Anregung zu dem gewählten Thema, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Dank sage ich auch Herrn Dr. H. Hippe für die Bestimmung des GC-Gehalts etlicher Bakterienstämme.

Herrn Prof. Dr. F. Mayer, Herrn Dr. R. Lurz und Herrn Dr. E. Spiess danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. B. Bowien für die Untersuchungen zum Calvin-Cyclus sowie Herrn Dr. E. Schmidt für die Analysen mit dem Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen.