

**Untersuchungen zum anaeroben Abbau von
Protocatechuat durch denitrifizierende und
durch eisenreduzierende Bakterien**

Diplomarbeit
von Dorothea Kemmler

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz
September 2000

Le jardin n'est jamais fini, comme la prose.

Jules

aus: Nouvelle vague, J.-L. Godard

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Schink im Zeitraum von November 1999 bis September 2000 am Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie der naturwissenschaftlichen Sektion, Fachbereich Biologie an der Universität Konstanz durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Bernhard Schink für die Überlassung des Themas, seinen Anregungen sowie seinem Interesse an der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Alasdair Cook danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jochen Müller für seine Betreuung, seine unendliche Diskussionsbereitschaft, die Antworten auf viele meiner Fragen und die vielen kleinen aber hilfreichen Tipps.

Herrn Dr. Bodo Philipp danke ich für seine Betreuung besonders für die ermutigenden Hinweise zum weiteren Vorgehen, wenn die Arbeit ins Stocken geraten war. Zudem danke ich ihm für die Überlassung der Benzoyl-CoA-Reduktase und dem Antiserum dagegen.

Gleichfalls danke ich auch allen anderen der Arbeitsgruppe, die mir immer wieder mit Rat zur Seite zu standen.

Der AG Cook danke ich nicht nur für ihre Kooperationsbereitschaft bei der Benutzung des *Diode Array*-Detektors, sondern auch für die Unterstützung bei meinen Unternehmungen zum Nachweis der Benzoyl-CoA-Reduktase.

Ebenso danke ich der AG Knippers für die Benutzung der Entwicklermaschine.

Für die angenehme Atmosphäre im Labor danke ich auch Jutta für ihre unerschütterlich gute Laune und Britta für ihre Anwesenheit zu späten, oft einsamen Stunden. Barbara danke ich für ihr offenes Ohr bei großem Frust.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungen, Symbole, Trivial- und Handelsnamen	Fehler!
definiert.	Textmarke nicht
1. Einleitung	1
1.1 Rolle und Herkunft aromatischer Verbindungen in der Natur	1
1.2 Der Abbau aromatischer Verbindungen	2
1.2.1 Der aerobe Aromatenabbau	2
1.2.2 Der anaerobe Aromatenabbau	2
1.3 Eisen in der mikrobiellen Welt	7
1.3.1 Vorkommen und chemische Eigenschaften von Eisen.....	7
1.3.2 Die biologische Funktion von Eisen.....	9
1.4 Zielsetzung der Diplomarbeit.....	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Mikrobiologische Methoden	12
2.1.1 Herkunft der Bakterienstämme.....	12
2.1.2 Nährmedien.....	12
2.1.3 Substrate	15
2.1.4 Kultivierung der Bakterien	16
2.1.5 Stammhaltung und Anzucht von <i>Thauera aromatica</i> AR-1.....	17
2.1.6 Anreicherung und Isolierung von Eisenreduzierern.....	17
2.1.7 Bestimmung von Wachstumsparametern und Zellerträgen.....	20
2.1.8 Experimente zum Wachstum auf einem Substratgemisch	22
2.2 Analytische Methoden	22
2.2.1 Eisenanalysen	22
2.2.2 Nasschemische Methoden	23
2.2.3 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	25
2.2.4 UV / VIS-Spektroskopie.....	26
2.3 Biochemische Methoden	26
2.3.1 Zellernte	26
2.3.2 Zellsuspensionsversuche	27
2.3.3 Herstellung von zellfreien Extrakten	27
2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28

2.3.5 Western-Blotting.....	29
2.4 Chemikalien und Gase	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch denitrifizierende Bakterien.....	31
3.1.1 Wachstum von <i>Thauera aromatica</i> AR-1 auf Protocatechuat.....	32
3.1.2 Abbau von Protocatechuat, α -Resorcyilat und Benzoat in dichten Zellsuspensionen	33
3.1.3 Untersuchungen zum Wachstum auf Substratgemischen	39
3.1.4 Biochemische Untersuchungen zur Induktion der verschiedenen Abbauwege	42
3.2 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch eisenreduzierende Bakterien.....	44
3.2.1 Kultivierungsversuche der bereits vorhandenen Stämme auf Protocatechuat, α -Resorcyilat und Gentisat	44
3.3 Anreicherung und Isolierung von eisenreduzierenden Bakterien auf Dihydroxybenzoaten	44
3.3.1 Beschreibung des Inokulums	44
3.3.2 Verlauf der Anreicherungen.....	45
3.3.3 Isolierung von Reinkulturen	47
4. Diskussion.....	50
4.1 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch denitrifizierende Bakterien.....	50
4.1.1 Induktion der verschiedenen Abbauwege.....	50
4.2 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch eisenreduzierende Bakterien.....	55
4.2.1 Anreicherung und Isolation von Protocatechuat-abbauenden Eisenreduzierern	55
4.2.2 Wachstum von Reinkulturen auf Protocatechuat.....	58
5. Zusammenfassung.....	59
6. Literaturverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abb.	Abbildung
Brenzcatechin	1,2-Dihydroxybenzol
CoA	Coenzym A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_o	Redoxpotential unter Standardbedingungen
E_o'	Redoxpotential unter Standardbedingungen bei pH 7
E_h	Apparentes Redoxpotential
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
g	Erdbeschleunigung = $9,81 \text{ m s}^{-2}$
Gentisat	2,5-Dihydroxybenzoesäure
HB	Hydroxybenzoesäure
HHQ	Hydroxyhydrochinon
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hydrochinon	1,4-Dihydroxybenzol
$K_3Fe(CN)_6$	Kaliumhexacyanoferrat, Ferricyanid
μ	Wachstumsrate
OD_λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
Phloroglucin	1,3,5-Trihydroxybenzol
Protocatechuat	3,4-Dihydroxybenzoesäure
Resorcin	1,3-Dihydroxybenzol
α -Resorcylat	3,5-Dihydroxybenzoesäure
β -Resorcylat	2,4-Dihydroxybenzoesäure
γ -Resorcylat	2,6-Dihydroxybenzoesäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Salizylsäure	2-Hydroxybenzoesäure
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
THB	Trihydroxybenzoesäure
t_d	Verdopplungszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

UV / VIS	Ultraviolett / sichtbares Licht
Y_s	molarer Wachstumsertrag
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1 Rolle und Herkunft aromatischer Verbindungen in der Natur

Aromatische Verbindungen kommen in der Umwelt in vielfältiger Weise vor. Neben aromatischen Aminosäuren, Hydrochinonen und Flavoniden sind verschiedene phenolische Substanzen in den Metabolismus sämtlicher Organismen eingebunden. Phenole und aromatische Aminosäuren werden in höheren Pflanzen hauptsächlich über den Shikimat-Weg (Richter 1988) gebildet. Diese Phenole spielen eine große Rolle als Abwehrstoffe vor mikrobiellem Befall in Pflanzen (Gerbstoffe, Phytoalexine) und haben somit eine biozide Wirkung (Aziz et al. 1998) aber auch als Phytohormone z.B. Salizylsäure (I. Maier, persönliche Mitteilung). Protocatechuat ist in Früchten veretherter und verestert enthalten und kann aus Lignin extrahiert werden; Gentisat liegt in Pflanzen ebenfalls in Form von Estern und Ethern vor (Falbe und Regiz 1997). Viele dieser phenolischen Verbindungen, wie Protocatechuat, die aus dem Sekundärmetabolismus der Pflanzen stammen, stehen derzeit in der Diskussion, günstige Auswirkungen auf die Gesundheit zu haben (Caccetta et al. 2000; Masella et al. 1999) oder werden sogar für die Krebstherapie vorgeschlagen (Lee und Yang 1994; Mori et al. 1999). Protocatechuat setzt durch seine komplexbildenden Eigenschaften die Toxizität von Aluminiumionen herab (Sauvant et al. 1999).

Die größte Quelle natürlicher aromatischer Substanzen ist Lignin. Wie Melanin besteht es aus polymerisierten Aromaten. Durch seine dreidimensionale Struktur gibt es Pflanzen die nötige Stabilität; mit einem Anteil von 15 bis 36 % an der gebildeten Biomasse der Landpflanzen (Haider 1996) ist Lignin das zweithäufigste Biopolymer nach Cellulose (Hackett et al. 1977).

Neben den Aromaten natürlichen Ursprungs werden auch synthetische Aromaten in die Umwelt eingetragen. Diese umfassen halogenierte Aromaten wie Lindan oder PCBs, Nitroaromaten wie Anilin. Obwohl diese synthetischen Aromaten oft außergewöhnliche Strukturen aufweisen, können sie ohne weiteres von Mikroorganismen abgebaut werden (Schink et al. 2000). Auch Erdölkomponenten, die durch Verunreinigung bei der Förderung wieder in den Stoffkreislauf eingebracht werden, stehen dem Abbau durch Mikroorganismen zur Verfügung.

Aromatische Verbindungen weisen sich durch einen planaren Ring sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome mit delokalisierten p -Elektronen aus. Dadurch besitzen Aromaten eine hohe Resonanzenergie, was sie zu sehr stabilen Verbindungen macht. Unterschiede, die durch die verschiedenen Substituenten (z.B. Alkyl-, Carbonyl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen) verursacht werden, beeinflussen das Verhalten der delokalisierten p -Elektronen. Sie bestimmen auch die biochemischen Reaktionen, die an den Aromaten stattfinden. Das Interesse an der Aufklärung des Aromatenabbaus liegt vor allem darin wie die hohe Resonanzenergie im System abgeschwächt und überwunden werden kann und der Ring dann gespalten wird.

1.2 Der Abbau aromatischer Verbindungen

Lignin kann nur in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff depolymerisiert werden. Der Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* z.B. produziert starke Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxyd (H_2O_2), das Superoxid Anion (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\bullet) und singulett Sauerstoff (1O_2), um Lignin zu depolymerisieren (Atlas und Bartha 1987; Tien und Kirk 1983). Die entstandenen Monomere können dann von vielen verschiedenen Bakterien weiterverwertet werden.

1.2.1 Der aerobe Aromatenabbau

Im aeroben Abbau von Aromaten ist Sauerstoff nicht nur als terminaler Elektronenakzeptor im Spiel, sondern auch als Cosubstrat für Mono- und Dioxygenasen (Dagley 1971). Dabei werden die Substanzen zu den Schlüsselintermediaten Brenzcatechin, Protocatechuat oder Gentisat hydroxyliert, die dann oxygenolytisch gespalten werden (Dagley 1971; Middelhoven 1993).

1.2.2 Der anaerobe Aromatenabbau

Die aromatischen Monomere können von einigen Mikroorganismen auch anaerob mineralisiert werden. Im anaeroben Abbau von monomeren Aromaten kann nicht auf Oxygenasen zurückgegriffen werden, da molekularer Sauerstoff als Cosubstrat nicht verfügbar ist. Deshalb werden im anaeroben Stoffwechsel die verschiedenen Aromaten über unterschiedliche, sauerstoffunabhängige Modifikationsreaktionen in die Schlüsselintermediate Benzoyl-CoA, Phloroglucin, Resorcin und

Hydroxyhydrochinon (HHQ) überführt (Heider und Fuchs 1997; Schink et al. 2000). Ziel dieser Modifikationen ist es, das aromatische Elektronensystem zu destabilisieren. Daran schließt eine Dearomatisierungsreaktion an, die die Intermediate in zentrale Stoffwechselwege einleitet.

1.2.2.1 Wege zu den Schlüsselintermediaten

Redox-neutrale Modifikationen des aromatischen Rings

Eine wichtige Modifikation ist die Bildung eines CoA-Esters. Einige Benzolderivate wie die Phenole: Brenzcatechin (Gorny und Schink 1994 B), Hydrochinon (Gorny und Schink 1994 A), Phenol (Tschech und Fuchs 1987) oder *o*-Kresol (Bisaillon et al. 1991), aber auch das Aminobenzol Anilin (Schnell und Schink 1991) müssen davor carboxyliert werden, damit eine Veresterung mit CoA möglich wird. Durch die Bindung des Aromaten an CoA wird die Elektronendichte im aromatischen Ring stark herabgesetzt, was einen nukleophilen Angriff erleichtert.

Die Addition von Fumarat an Toluol führt zu Benzylsuccinat, welches dann zu Benzoyl-CoA umgesetzt wird (Biegert et al. 1996; Beller und Spormann 1997). Der Abbau von *m*-Kresol in *Desulfobacterium cetonicum* (Müller et al. 1999; Müller 2000), sowie der von *m*-Xylol (Krieger et al. 1999) erfolgt ebenfalls über die Addition von Fumarat und der Bildung von 3-Hydroxybenzylsuccinat bzw. 3-Methylsuccinat.

Für andere Aromaten wie α -Resorcyolat (Gallus und Schink 1998) oder Gallat (Brune und Schink 1992; Haddock und Ferry 1993) ist eine Decarboxylierung beschrieben worden. Phthalate können nachdem sie mit CoA aktiviert wurden decarboxyliert werden und dann als Benzoyl-CoA in den weiteren Abbau eingeschleust werden (Nozawa und Maruyama 1988).

Trihydroxybenzole werden von Gärern zu Phloroglucin transhydroxyliert (Brune und Schink 1990; Krumholz und Bryant 1988). Pyrogallol wird in *Pelobacter acidigallici* mit 1,3,4,5-Tetrahydroxybenzol als Cosubstrat in eine Reaktion eingeschleust, bei der Phloroglucin freigesetzt wird. Dabei wird eine Hydroxylgruppe von 1,3,4,5-Tetrahydroxybenzol auf Pyrogallol übertragen, so dass dabei Phloroglucin und wiederum 1,3,4,5-Tetrahydroxybenzol entsteht.

Reduktive Modifikationen am aromatischen Ring

Reduktive Eliminierungen sind für die Umwandlung von einigen Aromaten in das Schlüsselintermediat Benzoyl-CoA essentiell. Phenolderivate, die nicht über Phloroglucin, Resorcin oder HHQ abgebaut werden, werden dehydroxyliert (Bonting und Fuchs 1996; Gibson et al. 1997; Göckler et al. 1989; Gorny und Schink 1994 A; Gorny und Schink 1994 B; Müller und Schink 2000). Dies geschieht schon in der Form des entsprechenden CoA-Esters. Der Abbau von Anilin führt über eine reduktive Desaminierung von 4-Aminobenzoyl-CoA (Schnell und Schink 1991), ebenso werden Arylverbindungen reduktiv dehalogeniert (Fetzner 1998; Mohn und Tiedje 1992; Wohlfahrt und Diekert 1997).

Oxidative Modifikationen am aromatischen Ring

Hydroxylierungen am aromatischen Ring wurden im Zusammenhang mit dem Abbau von α -Resorcylat (Gallus und Schink 1998) und Resorcin (Philipp und Schink 1998) erwähnt. Das bei der Hydroxylierung von α -Resorcylat entstehende 2,3,5-Trihydroxybenzoat wird im Anschluss decarboxyliert, und es entsteht wie bei der Hydroxylierung von Resorcin HHQ. In methanogenen Mischkulturen wurde bei Wachstum auf Benzol oder Toluol Phenol bzw. *p*-Kresol im Medium gefunden (Vogel und Grbic-Galic 1986), was auf die Einfügung einer Hydroxylgruppe schließen lässt. Die bereits erwähnte Transhydroxylierung von Pyrogallol (Brune und Schink 1990) ist im Grunde genommen eine Hydroxylierung von Pyrogallol, das dabei zu 1,3,4,5-Tetrahydroxybenzol wird, welches dann wieder als Cosubstrat rezykliert wird.

1.2.2.2 Abbau der Schlüsselintermediate: Ringspaltung

Die verschiedenen Wege des Aromatenabbaus führen über die besprochenen Intermediate. Dabei werden Benzoyl-CoA, Phloroglucin und Resorcin reduziert, HHQ wird auch oxidativ dearomatisiert (Abb. 1)

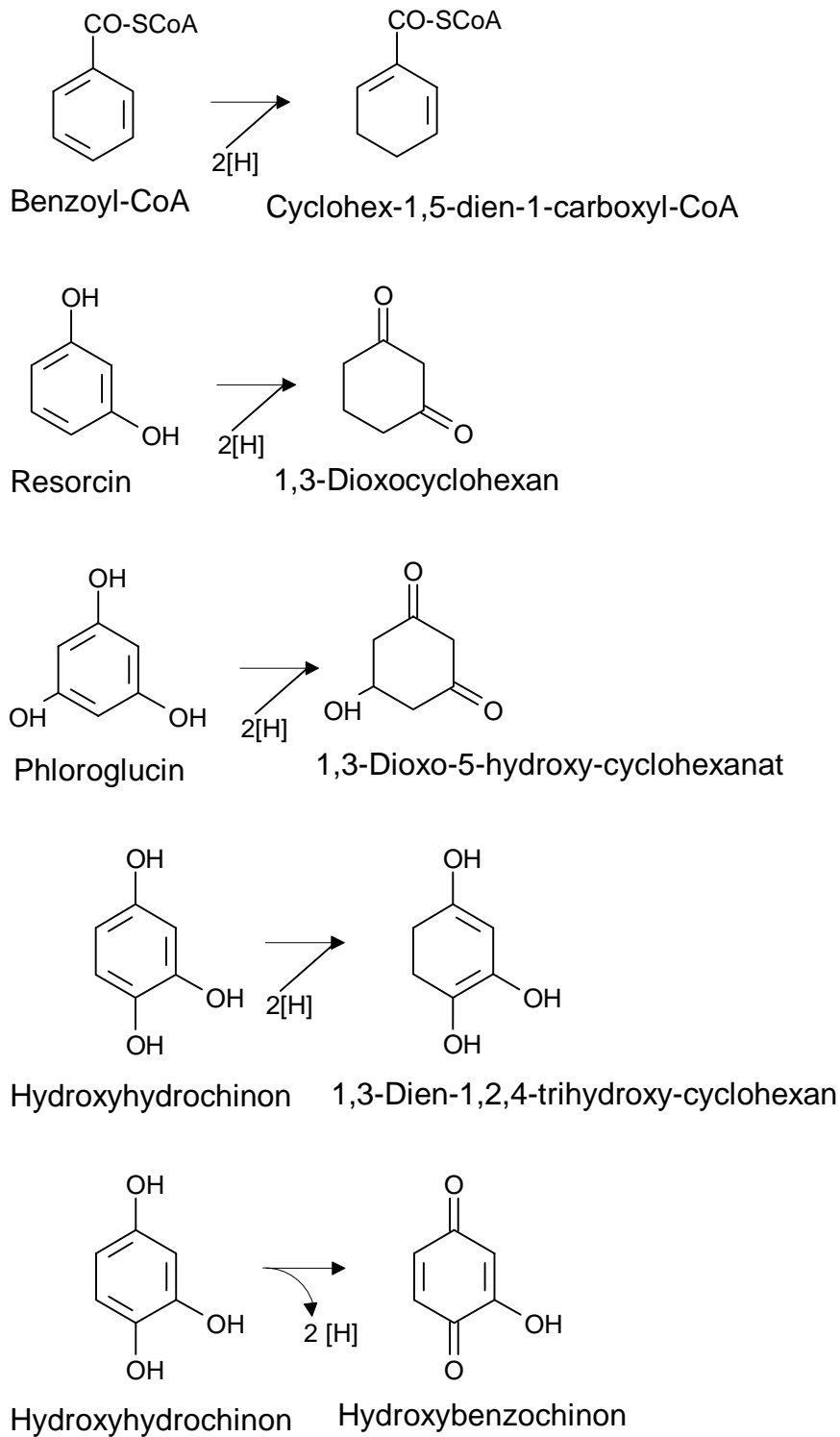


Abb. 1: Reaktionen an den Schlüsselintermediaten zum ersten nicht-aromatischen Produkt. Dargestellt sind die Dearomatisierungsreaktionen von Benzoyl-CoA, Resorcin, Phloroglucin, Hydroxyhydrochinon (reduktiv) durch Sulfatreduzierer und von Hydroxyhydrochinon (oxidativ) durch Denitrifizierer.

Der Benzoyl-CoA-Weg ist der am besten untersuchte Weg, der im anaeroben Aromatenabbau beschrrieben wird. Dabei werden die zuvor zu Benzoyl-CoA

umgewandelten Aromaten durch die Übertragung von zwei Elektronen in Cyclohex-1,5-dien-1-carboxyl-CoA umgesetzt. Diese Reaktion geht ähnlich wie die chemische *Birch-Reduktion* von Benzol durch eine schrittweise Einfügung von Elektronen und Protonen (Heider und Fuchs 1997). Aus *Thauera aromatica* wurde das Schlüsselenzym, die *Benzoyl-CoA-Reduktase*, isoliert und charakterisiert (Boll und Fuchs 1995). Die Reduktion von Benzoyl-CoA mit dem physiologischen Elektronendonator Ferredoxin ist endergon (Boll und Fuchs 1998) und benötigt die Hydrolyse von 2 mol ATP pro mol reduziertem Benzoyl-CoA (Boll und Fuchs 1995; Boll et al. 1997). Dieser Weg wurde schon früher in *Rhodopseudomonas palustris* gefunden (Gibson und Gibson 1992; Koch et al. 1993; Boll und Fuchs 1995).

Die Dearomatisierung von Phloroglucin und Resorcin erfolgt ebenfalls durch die Übertragung von zwei Elektronen. Durch die *meta*-ständigen Hydroxylgruppen ist das π -Elektronensystem destabilisiert, so dass eine Keto-Enol Tautomerie zu „isolierten“ Doppelbindungen führt. An diesen isolierten Doppelbindungen kann dann leicht reduktiv angegriffen werden. In *Pelobacter acidigallici* konnte der Abbau von Trihydroxybenzolen über Phloroglucin aufgeklärt werden (Brune und Schink 1990; Brune und Schink 1992). Ebenso wird Resorcin in einer Co-Kultur von einem gärenden *Clostridium* sp. und *Campylobacter* sp. über eine Reduktion in eine nicht-aromatische, zyklische Kohlenstoffverbindung überführt (Kluge et al. 1990). Ein Stamm von *Alcaligenes denitrificans* scheint Resorcin direkt zu hydrolysieren (Gorny et al. 1992).

Ein oxidativer Weg konnte bei Denitrifizierern (z. B. *Azoarcus anaerobius*, *Thauera aromatica* AR-1 und BoNHB) beobachtet werden, die Aromaten über HHQ abbauen (Gallus und Schink 1998; Philipp und Schink 1998; Philipp und Schink 2000; Müller 2000). Dabei wird Hydroxyhydrochinon durch die HHQ-Dehydrogenase zu 2-Hydroxybenzochinon oxidiert. Hierbei handelt es sich um eine neuartige Erkenntnis, da bisher davon ausgegangen wurde, dass Aromaten im anaeroben Metabolismus reduktiv angegriffen werden.

Der Sulfatreduzierer *Desulfovibrio inopinatus* hingegen bricht die Ringstruktur durch eine Reduktion von HHQ zu Dihydro-HHQ.

Die neuartige, oxidative Strategie beschränkt sich bisher nur auf Nitratreduzierer, was sich auf das verfügbare Redoxpotential ($E_o' = + 751$ mV für das Redoxpaar NO_3^-/N_2) zurückführen lässt, das für Denitrifizierer wesentlich höher liegt als beispielsweise für Sulfatreduzierer ($E_o' = - 218$ mV für das Redoxpaar $\text{SO}_4^{2-}/\text{S}^{2-}$).

1.3 Eisen in der mikrobiellen Welt

1.3.1 Vorkommen und chemische Eigenschaften von Eisen

Eisen ist das häufigste Element der Erde. In der Erdkruste ist es nach Sauerstoff, Silizium und Aluminium mit 5,1 % das vierthäufigste Element (Ehrlich 1995; Greenwood und Earnshaw 1984). Eisen ist ein Übergangselement und besitzt eine mit sechs Elektronen unvollständig besetzte d-Schale. Dadurch kann es in verschiedenen Oxidationsstufen (0, +2, +3) vorkommen und verschiedenste Komplexverbindungen eingehen (Greenwood und Earnshaw 1984; Wiberg 1985). In den bisher bekannten Eisenoxiden, -hydroxiden und -oxohydroxiden kommt meist dreiwertiges Eisen, aber auch zweiwertiges Eisen vor, in einigen sind auch beide Formen enthalten (Cornell und Schwertmann 1996). Die Eisenoxide weisen sich durch verschiedenste Farben und Kristallstrukturen aus; Magnetit (Fe_3O_4), δ - FeOOH und δ' - FeOOH besitzen zudem ferrimagnetische Eigenschaften. Amorphes Eisenhydroxid oder Ferrihydrit ist ein schwach kristallines Fe(III)-Oxid. Es entsteht durch schnelle Oxidation von Fe(II) und kommt häufig an der Oberfläche von Sedimenten vor. Im Gegensatz zu den meisten anderen Eisenoxiden steht die Strukturformel hier noch nicht fest (Schwertmann und Cornell 1991).

Fe(II) liegt in bikarbonatgepufferten Systemen hauptsächlich als Niederschlag in Form von Eisen(II)hydroxid ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), Siderit (FeCO_3) und Eisen(II)hydrogenkarbonat ($\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2$); ist Phosphat vorhanden, so liegt auch Vivianit ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$), vor. Durch mikrobielle Reduktion von Strengit ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kann Orthophosphat aus Sedimenten freigesetzt werden. Unter reduzierenden Bedingungen fällt in Anwesenheit von Sulfid Eisensulfid (FeS) aus (Wetzel 1983), auch hierbei kann vorher gebundenes Phosphat freigesetzt werden (Ehrlich 1995). Nur bei stark saurem pH ($\text{pH} < 3$) ist zweiwertiges Eisen auch unter Luft stabil. Unter oxidischen Bedingungen wird Fe(II) bei einem pH über 5 sehr schnell zu Fe(III) oxidiert. Ist H_2S unter stark reduzierenden Bedingungen vorhanden, wird Fe(III) in komplexen Reaktionen wiederum zu FeS reduziert (Peiffer 1994).

Das Redoxpotential von $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ liegt unter Standardbedingungen bei $E_0 = +772 \text{ mV}$. Das Redoxpotential ist formal pH-unabhängig, ist aber von der Löslichkeit der Ionen abhängig, die wiederum vom pH und anderen anwesenden Ionen abhängt (Abb. 2). So ergibt sich in bikarbonatgepufferten Systemen bei pH 7

für das Redoxpaar $\text{Fe(OH)}_3 + \text{HCO}_3^- / \text{FeCO}_3$ ein Redoxpotential von $E_0' = +200 \text{ mV}$ (Widdel et al. 1993).

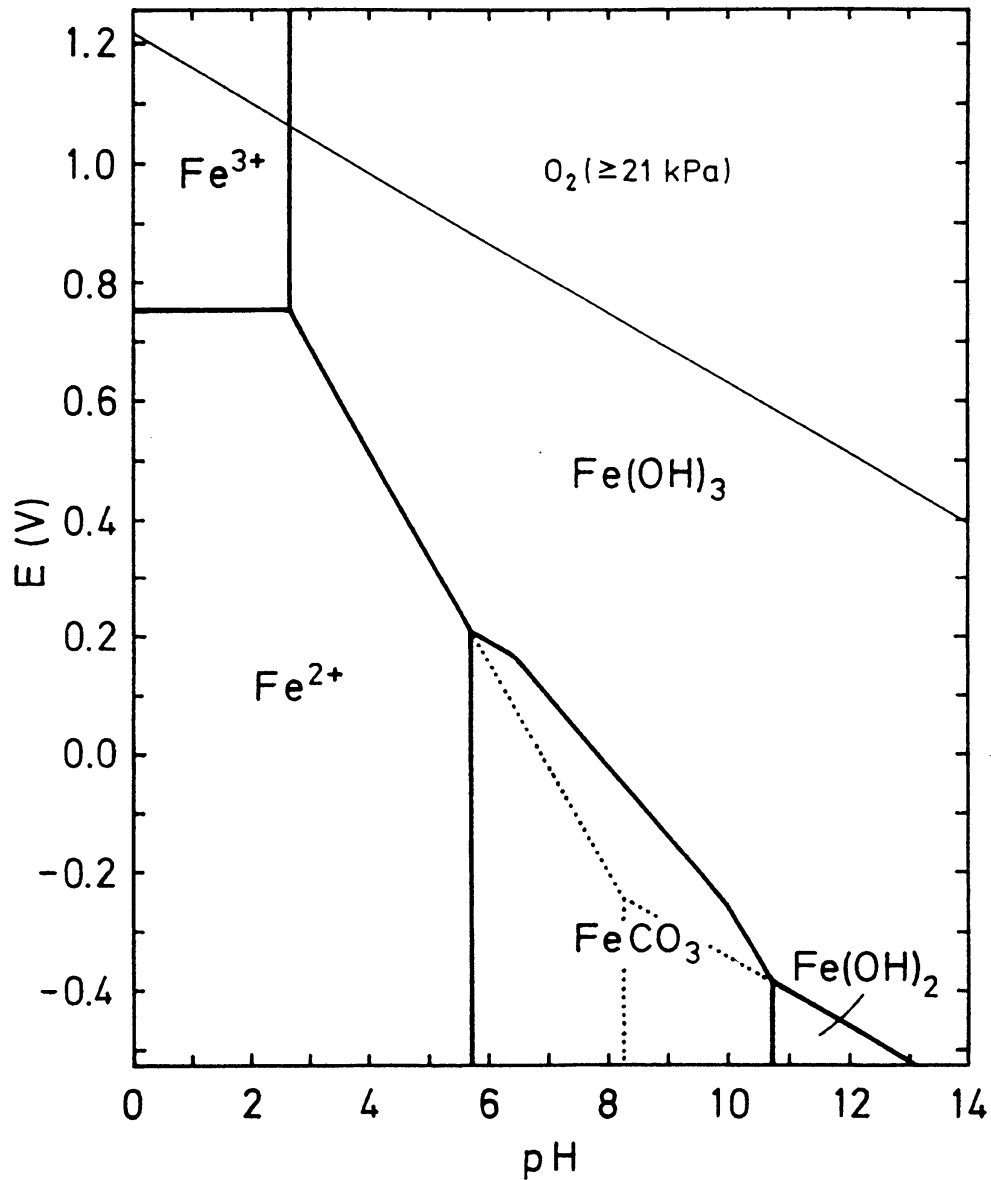


Abb. 2: E_h -pH-Diagramm für verschiedenen Eisenspezies und O_2 bei atmosphärischer Konzentration bei 25°C . Die Berechnungen beruhen auf Konzentrationen von 1 mM Gesamteisen, 20 mM gelöster, anorganischer Kohlenstoff ($\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$) und einer Ionenstärke von 0,05. Die Linien geben die Zustände an, bei denen die Konzentration von zweiwertigem Eisen der von dreiwertigem entspricht, die gestrichelte Linie gibt die Stabilitätsfelder für Fe^{2+} und Fe(OH)_2 in der Abwesenheit von anorganischem Kohlenstoff an (aus Widdel et al. 1993).

1.3.2 Die biologische Funktion von Eisen

Eisen ist ein essentielles Spurenelement für fast alle Lebewesen. Eine Ausnahme bildet eine Gruppe homofermentativer Milchsäurebakterien der Gattung *Streptococcus* (Ehrlich 1995). Alle anderen Organismen, Prokaryonten und Eukaryonten, benötigen Eisen als Bestandteil von Häm-Eisen- und Nicht-Häm-Eisen-Proteinen. Dabei ist Eisen in den funktionellen Gruppen von Proteinen zur Elektronenübertragung, wie Cytochrome oder [FeS]-Cluster, eingebunden, aber auch in Proteinen zum Sauerstofftransport (Hämoglobin, Myoglobin) oder in Enzymen, die Reaktionen mit Sauerstoffspezies katalysieren, wie Peroxidasen, Oxidasen oder Oxygenasen (Crichton 1991; Ehrlich 1995; Fraústo und Williams 1991). Zudem benützen magnetotaktische Bakterien in sogenannten Magnetosomen eingelagertes Magnetit zur Orientierung im Erdmagnetfeld (Blakemore 1982; Ehrlich 1995; Frankel et al. 1983).

Im dissimilatorischen Stoffwechsel spielt Eisen sowohl als Elektronendonator in zweiwertiger Form, als auch als Elektronenakzeptor in dreiwertiger Form eine Rolle. Autotrophe Organismen können zur Energiekonservierung Eisen(II) mit Hilfe von Sauerstoff oder Nitrat oxidieren (Straub et al. 1996; Benz et al. 1998; Emerson und Moyer 1997; Hallbeck und Pedersen 1991), darunter befinden sich auch phototrophe Purpurbakterien (Widdel et al. 1993).

1.3.2.1 Eisen als alternativer Elektronenakzeptor

In anoxischen Habitaten tritt Eisen(III) als Elektronenakzeptor auf. An vielen Standorten, die nicht mit Sauerstoff versorgt werden (z.B. Sedimente) werden alternative Elektronenakzeptoren für die Oxidation organischer Substanz genutzt. Dabei werden Elektronenakzeptoren mit dem positivsten Redoxpotential des entsprechenden Redoxpaares als erstes genutzt. In Sedimenten kann diese Reihenfolge auch als räumliche Abfolge in die Tiefe beobachtet werden. Vor allem in Profundalsedimenten, die wenig durch Turbulenzen gestört werden bildet sich eine Schichtung von Zonen aus, in denen zuerst Nitrat, dann Mangan(IV), Eisen(III), Sulfat und letztlich CO₂ reduziert wird (Stumm und Morgan 1981; Zehnder und Stumm 1988). Dabei spielt die Reduktion von Eisen eine bedeutende Rolle. In marinen Sedimenten deuten Messungen daraufhin, dass bis zu 50 % der Mineralisierung organischen Materials an die Reduktion von Eisen(III) gekoppelt zu sein scheint (Canfield et al. 1993 A; Canfield et al. 1993 B). *Geobacter*

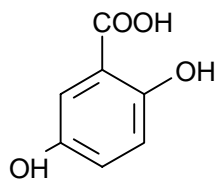
metallireducens ist ein Vertreter der Gruppe der eisenreduzierenden Bakterien. Er kann auch aromatische Kohlenwasserstoffe mit Hilfe von Eisen(III) zu CO₂ mineralisieren (Li und Goodwin 1994; Lovley et al. 1993). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, organische Substanz zu vergären und dabei entstehende Reduktionsäquivalente auf Eisen zu übertragen. Dabei wird die Energiebilanz günstiger und es wird ein höherer Zellertrag erreicht (Lovley 1991).

1.4 Zielsetzung der Diplomarbeit

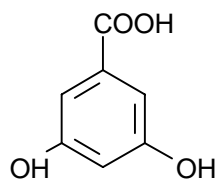
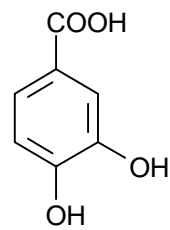
Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Abbau von Protocatechuat durch nitratreduzierende und durch eisenreduzierende Bakterien untersucht werden. In erster Linie sollte herausgefunden werden, ob der primäre Angriff zur Spaltung des aromatischen Rings ein reduktiver oder ein oxidativer Vorgang ist. Mit dem Denitrifizierer *Thauera aromatica* AR-1 stand ein geeigneter Organismus zur Verfügung, um Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat unter nitratreduzierenden Bedingungen durchzuführen. Vorhergehende Arbeiten zum anaeroben Aromatenabbau haben gezeigt, dass je nach Substrat und verfügbarem Elektronenakzeptor eine Oxidation (Müller 2000; Philipp 1999; Philipp und Schink 2000) oder eine Reduktion (Gorny und Schink 1994 A; Harwood et al. 1999; Heider und Fuchs 1997; Schink et al. 1992; Philipp und Schink 2000) den weiteren Abbau einleitet. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurde untersucht, auf welchem Weg Protocatechuat abgebaut wird: über eine oxidative, eine reduktive oder über eine redox-neutrale Initiationsreaktion. Da Protocatechuat bereits an *meta*- und *para*-Stellung hydroxyliert ist wurde ein oxidativer Angriff in einem Denitrifizierer vermutet.

In diesem Zusammenhang sollte auch der Abbau von Protocatechuat, α -Resorcylat und Gentisat durch eisenreduzierende Bakterien untersucht werden. Das Redoxpotential des Redoxpaares Fe(OH)₃/FeCO₃ liegt zwischen dem von NO₃⁻/N₂ und dem von SO₄²⁻/S²⁻. Dabei ist es interessant herauszufinden, ob eisenreduzierende Bakterien ein oxidative oder eine reduktive Strategie wählen. Dazu sollten aus verschiedenen Umweltproben Bakterien, die Protocatechuat, α -Resorcylat oder Gentisat unter Reduktion von amorphem Eisenhydroxid abbauen können, isoliert werden.

In Abb. 3 sind die Dihydroxybenzoate dargestellt, die in dieser Arbeit untersucht wurden.



Gentisat

 α -Resorcylat

Protocatechuat

Abb. 3: Gentisat (2,5-Dihydroxybenzoat), α -Resorcylat (3,5-Dihydroxybenzoat) und Protocatechuat (3,4-Dihydroxybenzoat).

2. Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Herkunft der Bakterienstämme

Denitrifizierende Bakterien

Der Protocatechuat abbauende Denitrifizierer *Thauera aromatica* Stamm AR-1 (DSM 11528; Gallus et al. 1997), *Azoarcus anaerobius* (DSM 12081; Gorny et al. 1992), sowie die Anreicherungen Phlow und Milva, deren Impfmateriale aus einem Graben im Belltower Park (Woods Hole, MA, USA) stammte, wurden mir von Bodo Philipp zur Verfügung gestellt. *Paracoccus pantotrophus* (DSM 65, Rainey et al. 1999; Davis et al. 1969), *Paracoccus pantotrophus* NKNCysa (Mikosch et al. 1999), *Alcaligenes sp.* NKNTau (DSM 11046, Denger et al. 1997) waren eine freundliche Gabe von Karin Denger aus der AG Cook. *Thauera aromatica* Stamm K172 (DSM 6984, Anders et al. 1995) wurde mir von Jochen Müller überlassen.

Eisenreduzierende Bakterien

Von Kristina Straub erhielt ich die eisenreduzierenden *Geobacter sulfurreducens* Stämme DFR 1 und DFR 2 (DSM 12179 und 12255; Straub et al. 1998), *Geobacter metallireducens* (DSM 7210; Lovley et al. 1993) wurde mir freundlicherweise von Rainer Meckenstock übergeben. Die eisenreduzierenden Anreicherungen FON II, H₂M II, AcMN II und die Kulturen 3-2-A und 3-3-D stammen von Andreas Kappler.

Die Herkunft der Sedimente, Schlämme und Bodenproben, die als Inokulum für die Anreicherungen von Eisenreduzierern benutzt wurden, ist jeweils angegeben.

2.1.2 Nährmedien

2.1.2.1 Bikarbonat-gepuffertes Anaerobiermedium

Die Zusammensetzung der Mineralsalzlösung ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Es wurde eine 50-fach konzentrierte Stammlösung in bidestilliertem Wasser angesetzt, die bei der Medienzubereitung entsprechend mit bidestilliertem Wasser verdünnt wurde.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mineralmediums (Widdel 1980)

Medienbestandteile	Konzentration [g/l]
NaCl	1,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,4
KH ₂ PO ₄	0,2
NH ₄ Cl	0,25
KCl	0,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15

Für nitratreduzierende Bakterien wurde 1 mM Na₂SO₄ zugegeben, für Eisenreduzierer 0,1 mM Na₂SO₄.

2.1.2.2 Zusatzlösungen für das Grundmedium

Natriumhydrogenkarbonat-Lösung

In einer verschlossenen 580 ml Müller-Krempel-Flasche wurde pro Liter Medium 30 ml bzw. 60 ml einer 1 M NaHCO₃-Lösung in CO₂-gesättigtem, destilliertem Wasser unter CO₂ autoklaviert. Das entspricht einer Endkonzentration von 30 mM für das Medium zur Kultivierung von *T. aromatica*, bzw. 60 mM für das Eisenreduzierermedium.

Spurenelementlösung SL10

Zur Herstellung der SL10 Lösung wurde Eisen(II)chlorid in Salzsäure gelöst, die in Tabelle 2 angegebenen Salze hinzugefügt, auf 1 l Endvolumen aufgefüllt und anschließend autoklaviert (Widdel et al. 1983).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL 10 (Widdel et al. 1983)

Substanz	Konzentration [mg/l]
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1500
ZnCl ₂	70
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36
H ₃ BO ₃	6
HCl 25 %-ig	10 ml
H ₂ O bidest. ad [ml]	1000

Selenit-Wolframat-Lösung

In Tabelle 3 angegebene Verbindungen wurden mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert (Widdel 1980).

Tabelle 3: Zusammensetzung der Selenit-Wolframat-Lösung (Widdel 1980)

Substanz	Konzentration [mg/l]
NaOH	500
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	3
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	4

7-Vitamine-Lösung

Die Substanzen aus Tabelle 4 wurden in destilliertem Wasser gelöst und in autoklavierte Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt (Widdel und Pfennig 1981).

Tabelle 4: Zusammensetzung der 7-Vitamine-Lösung (Widdel und Pfennig 1981)

Substanz	Konzentration [mg/200ml]
Cyanocobalamin	10
p-Aminobenzoesäure	10
D(+)-Biotin	2
Nicotinsäure	20
Ca-D(+)-Pantothenat	5
Pyridoxamin-Dihydrochlorid	50
Thiamin-Dihydrochlorid	10

2.1.2.3 Herstellung des bikarbonatgepufferten Mineralmediums

Die Mineralsalzlösung mit Sulfat wurde in einem speziellen Mediumkolben (Widdel 1980) autoklaviert. Der Gasraum des Kolbens wurde durch N₂/CO₂-Gas (80/20 v/v) ausgetauscht und das Medium unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Sobald die Bikarbonatlösung abgekühlt war, wurden die in Tabelle 5 angegebenen Zusätze in dieser Reihenfolge zugegeben.

Tabelle 5: Zusätze zum Mineralmedium

Zusatz	für Nitratreduzierer [ml/l]	für Eisenreduzierer [ml/l]
1 M NaHCO ₃ -Lösung	30	60
Spurenelementlösung	1,0	1,0
Selenit-Wolframat-Lösung	1,0	1,0
7-Vitamine-Lösung	0,5	0,5

Nach einigen Minuten Rühren wurde der pH-Wert kontrolliert und falls notwendig mit steriler 1 M Salzsäure bzw. 0,5 M Natriumhydrogenkarbonat-Lösung auf pH 7,2

bis 7,4 für die Denitrifizierer, das Medium für die Eisenreduzierer auf pH 6,7 bis 7,0 eingestellt. Zugaben und Entnahmen erfolgten über unterschiedliche Öffnungen des Mediumkolbens. Anschließend wurde das Medium mit Hilfe des Gasdrucks über eine Abfüllglocke in sterile Kulturflaschen (Müller-Krempel, Bülach, CH) abgefüllt. Der Gasraum der Kulturflaschen wurde während des Abfüllvorgangs ausgetauscht, große Flaschen wurden schon davor mit N_2/CO_2 durchströmt und die Flaschen anoxisch und gasdicht mittels Hungate-Technik mit Butylgummistopfen verschlossen (Hungate 1969). Die Septen der Müller-Krempel-Flaschen wurden mit Metallschraubkrempe gesichert.

2.1.3 Substrate

Alle Substrate wurden aus sterilen Stammlösungen mit sterilen Spritzen anoxisch durch das Septum oder den Stopfen des jeweiligen Kultivierungsgefäßes hindurch in das Medium gegeben.

2.1.3.1 Energie- und Kohlenstoffquellen

Die Bakterien wurden mit dihydroxylierten aromatischen Säuren, Benzoat oder Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Die dihydroxylierten Benzoate α -Resorcyolat, Protocatechuat und Gentisat wurden in Serumflaschen eingewogen, mit Butylgummistopfen verschlossen, der Gasraum wurde durch N_2 ausgetauscht. Abgekochtes, unter N_2 abgekühltes bidestilliertes Wasser wurde in dem entsprechenden Volumen zu einer Endkonzentration von 0,2 M Lösung mit einer Spritze durch den Stopfen zugegeben. Mit Hilfe von N_2 -Überdruck wurde die Lösung in eine sterile, anoxische, mit Butylgummistopfen verschlossene Serumflasche sterilfiltriert (0,2 μ m Porenweite, Schleicher & Schuell, Dassel). Die hitzeunempfindlichen Substrate Benzoat und Acetat (0,5 M) wurden wie oben beschrieben gelöst und unter N_2 verschlossen autoklaviert. Zur Neutralisation der aromatischen Säuren wurde Natriumkarbonat ($NaCO_3$) in der benötigten Menge zugegeben.

2.1.3.2 Elektronenakzeptoren

Als Elektronenakzeptoren wurden für die Denitrifizierer Nitrat, für die Eisenreduzierer amorphes Eisenhydroxid, Eisen(III)citrat, AQDS, $K_3Fe(CN)_6$ und Fumarat verwendet. Die sterilen Stammlösungen von Nitrat (1 M), AQDS (0,2 M),

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0,2 M) und Fumarat (0,5 M) wurden wie oben beschrieben anoxisch hergestellt, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ mit der bereits erwähnten Methode sterilfiltriert. Eisen(III)citrat (0,5 M) wurde durch Kochen gelöst und mit der nötigen Menge Natriumkarbonat (NaCO_3) neutralisiert, anschließend unter N_2 verschlossen autoklaviert.

2.1.3.3 Herstellung des amorphen Eisenhydroxids

Amorphes Eisenhydroxid wurde durch langsames Neutralisieren einer 0,4 M FeCl_3 -Lösung mit einer 0,5 M NaOH-Lösung hergestellt (Lovley & Phillips 1986). Die Natronlauge wurde über eine Bürette sehr langsam unter Rühren in die FeCl_3 -Lösung getropft; zu schnelles Tropfen führte zur Entstehung von großen $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -Klumpen. Das ausfallende, rotbraune Eisenhydroxid wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und zwischendurch abzentrifugiert (4500 g, 20 min), um das Chlorid zu entfernen. Am Ende wurde das Eisenhydroxid in destilliertem Wasser aufgenommen (Endkonzentration: 0,4 M), der pH und der Eisengehalt (Gewichtsbestimmung und Gesamteisenbestimmung nach Stookey 1970) überprüft. Die Suspension wurde entgast und unter Stickstoff in verschlossenen 60 ml Serumflaschen autoklaviert.

2.1.3.4 Reduktionsmittel

Für die Anreicherung von Eisenreduzierern wurde FeCl_2 zum Medium gegeben, um mögliche Sauerstoffreste zu entfernen. Dazu wurde eine 0,5 M Lösung entsprechend wie oben beschrieben, hergestellt und sterilfiltriert. Die sterile, anoxische Lösung wurde erneuert, sobald sich ein gelbes Präzipitat von Eisenhydroxiden gebildet hatte. Die Zugabe von FeCl_2 zum Medium in einer Endkonzentration von 1 mM führte zu einem weißlich-grauen Präzipitat, das aufgrund der Zusammensetzung des Mediums hauptsächlich aus Siderit (FeCO_3) bestand. Der pH des Mediums wurde überprüft, musste jedoch nicht nachkorrigiert werden, da durch die erhöhte Bikarbonatkonzentration ausreichend Pufferkapazität vorhanden war.

2.1.4 Kultivierung der Bakterien

Für die Kultivierung und Anreicherung der anaeroben Mikroorganismen wurde karbonatgepuffertes Süßwassermedium nach Widdel (1980) verwendet. Das

Medium wurde bezüglich des Sulfat- und Karbonatgehaltes den unterschiedlichen Kultivierungsansprüchen angepasst.

2.1.5 Stammhaltung und Anzucht von *Thauera aromatica* AR-1

Das Medium (Tabelle 1) (Widdel 1980) für *T. aromatica* war mit 30 mM Natriumkarbonat gepuffert, als Schwefelquelle enthielt es 1 mM Dinatriumsulfat. Zudem waren Spurenelementlösung SL10 (Tabelle 2) (Widdel et al. 1983), Selenit-Wolframat-Lösung (Tabelle 3) (Widdel 1980) und 7-Vitamine-Lösung (Tabelle 4) (Widdel und Pfennig 1981) beigefügt.

2.1.5.1 Stammhaltung von *T. aromatica* AR-1

Für die Stammhaltung wurden 100 ml Medium in einer 125 ml Infusionsflasche (Müller-Krempel) aus einer Flüssigkultur mit einer sterilen Spritze 1%-ig beimpft. Protocatechuat wurde in einer Konzentration von 1 mM, Nitrat in einer Konzentration von 5 mM vor dem Beimpfen anoxisch mit einer Spritze zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 30 °C. Nach 2 Tagen, bevor die Kultur ausgewachsen war, wurde sie im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Stammkultur konnte so mehrere Wochen aufbewahrt werden. Vorkulturen für Induktionsexperimente wurden mindestens zweimal auf dem entsprechenden Substrat, Benzoat oder α -Resorcyilat, übertragen und analog zu den Protocatechuat-Stammkulturen gezogen.

2.1.5.2 Arbeitskulturen von *T. aromatica*

Die Arbeitskulturen wurden 1%-ig aus einer Vorkultur in 500 ml Medium beimpft. Die Substrate Protocatechuat, Benzoat bzw. α -Resorcyilat (2 mM) und Nitrat (10 mM) wurden vor dem Beimpfen anoxisch mit einer sterilen Spritze zugegeben. Die Flaschen wurden im Dunkeln bei 30 °C inkubiert. Nach Bedarf wurde während der Kultivierung noch 1 mM des jeweiligen Substrates und 5 mM Nitrat nachgegeben.

2.1.6 Anreicherung und Isolierung von Eisenreduzierern

2.1.6.1 Herkunft, Probennahme, und Aufarbeitung des Inokulums

Die mesophilen Anreicherungen von eisenreduzierenden Bakterien, die mit Protocatechuat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen können,

wurden aus Ölfeldschlamm bei Lübeck, Waldboden vom Universitätswald (Konstanz), Sedimentkernen vom Bodenseepfundal nahe Göttingen aus ca. 100 m Tiefe und Sediment aus dem Litoralbereich in Konstanz-Egg gewonnen.

Das Inokulum aus Ölfeldschlamm von Lübeck wurde von Alexander Galoushko zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um Tonkügelchen, an deren porösen Oberfläche der Schlamm haftete. Zum Zeitpunkt des Animpfens lagerte der Schlamm schon einige Monate in Schraubdeckelgläsern bei 4 °C. Diese Tonkügelchen wurden mit einer Pinzette in die Kulturflaschen gegeben.

Zur Bereitung des Inokulums aus Waldboden wurden, nachdem die oberste Lage, die zum Großteil aus verrottendem Laub bestand, weggeschoben worden war, die obere Erdschicht abgenommen und in einem Becherglas ins Labor gebracht. Von der Erde wurde dann eine Spatelspitze in die Kulturgefäße gegeben. Um einzuschätzen, ob mit dem herkömmlichen Medium (2.1.2 Nährmedien) angereichert werden kann wurde der pH der Bodenprobe nach einem Standardverfahren der Bodenchemie (Öhlinger 1993) gemessen. Dazu wurde 0,01 M CaCl_2 -Lösung mit Erde im Verhältnis 1:2,5 (w/v) vermischt, nach 30 min konnte dann der pH gemessen werden.

Die Probennahmen von Sedimentkernen im Bodensee erfolgte Anfang Dezember von Bord des Forschungsschiffes „Robert Lauterborn“ aus. Die Probennahme selbst erfolgte mit Hilfe eines Multicorers, welcher mit vier gleichen Röhren (37 x 8 cm) bestückt werden konnte. Die Röhren mit den Sedimentkernen wurden an Bord sofort von unten mit einem Gummistopfen verschlossen, mit ca. 10 cm Überstandswasser gekühlt aufbewahrt und am gleichen Tag im Labor aufgearbeitet. Für die Anreicherungen wurde mit einem Spatel von der obersten, flockigen Schicht, von einer tieferen Schicht mit rötlich-grauer Färbung, ca. 5 cm unterhalb der Oberfläche und von einer Schicht mit grau-schwarzer Farbe aus ca. 10 cm Tiefe des Sedimentkerns Material entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Material nicht von der Oberfläche entnommen wurde sondern aus einer tieferen Schicht, die noch nicht mit viel Sauerstoff in Berührung gekommen war.

Die Anreicherung aus Litoralsediment wurde mir von Jochen Müller bereits in der ersten Anreicherungsstufe auf Benzoat übergeben.

2.1.6.2 Anreicherungstechnik

Für die Anreicherungen wurde das Mineralmedium (Tabelle 1) nach Widdel (1980) mit 60 mM Natriumhydrogenkarbonat gepuffert. Dinatriumsulfat wurde 0,1 mM eingesetzt, um sulfatreduzierende Organismen zu minimieren. Spurenelementlösung SL10 (Tabelle 2) (Widdel et al. 1983), Selenit-Wolframat-Lösung (Tabelle 3) (Widdel 1980) und 7-Vitamine-Lösung (Tabelle 4) (Widdel und Pfennig 1981) waren in den angegebenen Mengen enthalten.

Als Energie- und Kohlenstoffquelle waren für die Voranreicherung 1 mM Benzoat, bzw. 2 mM Acetat enthalten. Von der dritten Passage an wurde mit 1 mM Protocatechuat, α -Resorcylat bzw. Gentisat als Energie- und Kohlenstoffquelle kultiviert. Amorphes Eisenhydroxid wurde in Konzentrationen von 10 bis 20 mM eingesetzt. Als Reduktionsmittel wurde 1 bis 2 mM Eisen(II)chlorid zugegeben.

Alle Substrate, Elektronenakzeptoren und Reduktionsmittel wurden mit einer mit N₂ gespülten sterilen Spritze in die Kulturgefäße eingebracht.

Die Anreicherungen wurden in zur Hälfte mit Medium gefüllten 120 ml und 60 ml mit Butylgummistopfen verschlossenen Serumflaschen durchgeführt. Zum Animpfen wurde eine Spatelspitze des jeweiligen Inokulums zugegeben, mit N₂/CO₂ begast und wieder mit dem Stopfen verschlossen. Für die weiteren Übertragungen wurde immer mit einer Spritze 10%ig überimpft, wobei darauf geachtet wurde, immer auch partikuläres Material zu übertragen. Die Flaschen wurden stehend im Dunkeln bei 30°C inkubiert und gelegentlich geschüttelt.

2.1.6.3 Gewinnung von Reinkulturen aus Protocatechuatabbauenden Anreicherungen mit Agar-Shake-Verdünnungsreihen

(nach Pfennig und Trüper 1981)

3,3 g Agar (Bactoagar, Difco, Detroit, MI, USA) wurden in einem Erlenmeyerkolben mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und danach mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde auf einer Heizplatte unter Rühren geschmolzen und heiß zu je 3 ml in Shake-Röhrchen abgefüllt. Diese wurden mit Alukappen verschlossen autoklaviert, noch heiß in ein Wasserbad gestellt und bei 60 °C flüssig gehalten. 6 ml auf 40 °C vorgewärmtes Süßwassermedium mit Substrat, Elektronenakzeptor und Reduktionsmittel wurde zugegeben, die Alukappen durch Butylgummistopfen ersetzt und die Röhrchen in ein zweites Wasserbad (40 °C) gestellt. Das erste Röhrchen der Verdünnungsreihe

wurde mit ca. 1 ml einer Anreicherungskultur (Profundalsediment, 2. Passage auf Protocatechuat) versetzt und vorsichtig durchmischt. Ein Tropfen wurde in das nächste Röhrchen weitergeschüttet, mit welchem ebenso verfahren wurde, während das erste zum Erstarren in ein kaltes Wasserbad gestellt wurde. Die fertigen Röhrchen wurden mit einem N_2/CO_2 -Gemisch (80/20 v/v) begast, fest verschlossen und bei 30 °C auf dem Stopfen stehend inkubiert. Als Substrat wurde 1 mM Protocatechuat eingesetzt, als Elektronenakzeptoren dienten Fumarat, AQDS oder $K_3Fe(CN)_6$ (je 5 mM). Um Protocatechuatvergärer und Fumaratgärer quantitativ abzuschätzen, wurden entsprechende Kontrollen gemacht. Dazu wurde eine Reihe Röhrchen nur mit Protocatechuat ohne Elektronenakzeptor angesetzt, sowie eine Reihe mit Fumarat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle.

2.1.6.4 Isolierung von Kolonien

Bakterielles Wachstum in Shakeröhrchen wurde anhand der Koloniebildung mit der Stereolupe verfolgt. In den höheren Verdünnungsstufen traten Einzelkolonien nur noch in geringer Zahl auf, so dass ihre Isolierung möglich wurde. Hierzu wurden die Röhrchen neben der Flamme eines Bunsenbrenners geöffnet. Nach Trocknen des oberen Randes wurde mit Hilfe einer über der Flamme ausgezogenen, sterilen Pasteur-Pipette unter der Stereolupe Kolonien angesaugt. Diese wurden in sterilen Durham-Röhrchen in ca. 0,5 ml Medium suspendiert und mikroskopiert. Wenige Tropfen dieser Suspension dienten als Inokulum für eine nachfolgende, zweite Agar-Verdünnungsreihe. Die daraus isolierten Kolonien wurden direkt in Hungate-Röhrchen übertragen, welche 5 ml Medium enthielten und vor dem Verschließen mit Butylgummisepten mit N_2/CO_2 -Gemisch begast wurden. Die so erhaltenen Ansätze wurden im Dunkeln bei 30 °C bebrütet.

2.1.7 Bestimmung von Wachstumsparametern und Zellerträgen

Wachstumskurven wurden durch Messung der optischen Dichte mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (Hitachi, Model 100-40, Tokio, Japan) bei einer Wellenlänge von 578 nm als OD_{578} erstellt. Die Messung erfolgte in Küvetten aus optischem Spezialglas mit 1 cm Lichtweg gegen Luft.

Proben, wie z.B. Zellsuspensionen, die eine höhere OD_{578} als 0,5 hatten, wurden mit Kaliumphosphatpuffer verdünnt.

2.1.7.1 Wachstumsparameter

Bereits bestimmte Wachstumsparameter von *T. aromatica* AR-1 wurden einer Arbeit von C. Gallus übernommen (Gallus et al. 1997). Die OD₅₇₈-Trockenmassen Korrelation, exponentielle Wachstumsrate, Generationszeit, molarer Wachstumsertrag, *in vivo* Aktivität und Elektronenbilanz wurden für *T. aromatica* AR-1 bei Wachstum auf Protocatechuat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle bestimmt.

Die Wachstumsrate (μ) wurde aus der Steigung der Wachstumskurve in halblogarithmischer Auftragung der exponentiellen Phase ermittelt. Die Verdopplungszeit (t_d) ergibt sich aus $t_d = \ln 2 \mu^{-1}$.

Zur Erstellung der OD₅₇₈-Trockenmassen-Korrelation und zur Bestimmung des molaren Wachstumsertrags Y_s wurde eine 100 ml Kultur 1%-ig angeimpft. Nitrat-, Nitrit- und Protocatechuatkonzentration wurden zu Beginn und zum Ende mit der HPLC bestimmt. Die OD₅₇₈ wurde wie oben beschrieben gemessen. In der späten exponentiellen Phase des Wachstums wurde das Volumen der Kultur ermittelt und die Kultur durch einen Membranfilter mit 0,2 μm Porenweite (Schleicher & Schuell) filtriert. Die Filter wurden anschließend im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Als Kontrolle diente ein Membranfilter, durch den 100 ml steriles Medium hindurch filtriert wurde. Der ermittelte Eichfaktor wurde zur Berechnung der Wachstumserträge verwendet. Aus dem Anstieg der OD₅₇₈ während der exponentiellen Wachstumsphase, der entsprechenden Zunahme der Trockenmasse (ΔX) und dem Substratverbrauch (ΔS) in diesem Zeitintervall wurde der molare Zellertrag (Y_s) über die Beziehung: $Y_s = \Delta X \Delta S^{-1}$ berechnet.

Unter der Voraussetzung, dass Y_s während der exponentiellen Wachstumsphase konstant ist, wurde die *in vivo*-Umsatzrate für Protocatechuat, bezogen auf die Trockenmasse X , durch die folgende Gleichung berechnet: $dS / dt = \mu X Y_s^{-1}$.

Um die Elektronenbilanz zu erstellen, wurde angenommen, dass Protocatechuat vollständig zu CO₂ oxidiert wurde, bei vollständiger Reduktion von Nitrat zu N₂ (wobei das akkumulierte Nitrit berücksichtigt wurde).

Die Bestimmungen wurden in mindestens zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

2.1.8 Experimente zum Wachstum auf einem Substratgemisch

Für die Wachstumsexperimente auf verschiedenen Substraten, die gleichzeitig im Medium vorhanden waren, wurde 100 ml Medium mit einer auf Protocatechuat gewachsenen Vorkultur 1%-ig angeimpft. Die Substrate (Benzoat, α -Resorcylat, Protocatechuat) wurden in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt, Nitrat wurde entsprechend zugegeben, um eine vollständige Oxidation der Substrate zu ermöglichen. Um Wachstum und Substratverbrauch zu verfolgen, wurde unmittelbar nach dem Animpfen, sowie zu bestimmten Zeitpunkten danach mit einer sterilen Spritze 1 ml-Proben entnommen, von denen sofort die OD_{578} bestimmt wurde. Der Substratverbrauch wurde mit der HPLC verfolgt.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Eisenanalysen

2.2.1.1 Nasschemische Bestimmung von Eisen (Stookey 1970)

Die quantitative Bestimmung von Fe(II) beruht auf dessen Reaktion mit Ferrozin (Na_2 -3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure)-1,2,3-Triazin). Drei Ferrozinmoleküle bilden dabei bei einem pH von 4 bis 9 mit einem Fe^{2+} -Ion einen purpurfarbenen, wasserlöslichen Komplex (Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{562\text{nm}} = 27900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Absorption des gebildeten Komplexes bei 562 nm kann dann zur Quantifizierung des Eisens gemessen werden.

Reagenzien

- Reagenz A: 10% (w/v) Hydroxylamin-Hydrochlorid in HCl (1 M)
- Reagenz B: 50% (w/v) Ammoniumacetat und 0,1% (w/v) Ferrozin in dest. Wasser

Durchführung und Probennahme

Aus den Kulturflaschen bzw. den autoklavierten Ferrihydrit Stammlösungen wurde mit einer mit N_2 -gespülten 1-ml Spritze 0,5 ml entnommen, in ein 1-ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und sofort mit einer bereits vorbereiteten Pipette 50 μl in 450 μl HCl (1 M) gegeben. Die Probe wurde so weit verdünnt, dass die erwartete Konzentration im Messbereich (5 bis 35 μM) liegt.

Die Gesamteisenkonzentration wurde bestimmt, indem alles Fe(III) in 50 µl der verdünnten Probe mit 450 µl Reagenz A vollständig zu Fe²⁺ reduziert wurde. Die Probe wurde dann mit 500 µl Reagenz B versetzt und nach 10 bis 30 min im Photometer bei 562 nm bestimmt. Die Bestimmung der Fe²⁺-Konzentration erfolgte ebenso wie die der Gesamteisenkonzentration, nur dass der Probe kein Reagenz A zugegeben wurde.

Zur Auswertung wurde eine Eichkurve von 0 bis 30 µM mit Fe(II)SO₄ in HCl (1 M) erstellt. Die Ansätze für die Eichkurve für Gesamteisen wurden wie die Proben mit Reagenz A versetzt.

2.2.1.2 Konzentrationsermittlung über Gewichtsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration der hergestellten Eisenhydroxid-Lösung wurden mit einer automatischen 1 ml Pipette Aliquots entnommen, in Eppendorfcups abzentrifugiert und bei 30 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Berechnung der Konzentration wurde die Strukturformel Fe₅HO₈ · 4H₂O (Towe und Bradley 1967) und das daraus resultierende Molekulargewicht von 480 g/mol zugrunde gelegt.

2.2.2 Nasschemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Smith

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in zellfreien Extrakten wurde mit dem kommerziell erhältlichen BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Smith (1985) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Proteinstandard durchgeführt.

Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischem Milieu. Im Reaktionsansatz bildet sich ein violett gefärbter Komplex mit einem einwertigen Kupferkation (Cu¹⁺) und zwei Bicinchoninsäuremolekülen. Dieser wasserlösliche Komplex hat bei einer Wellenlänge von 562 nm ein Extinktionsmaximum. Die Absorption ist im Konzentrationsbereich von 20 bis 2000 µg Protein ml⁻¹ linear.

Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde BSA im Konzentrationsbereich von 0 bis 1000 µg ml⁻¹ eingesetzt. Die Proben wurden in drei verschiedenen Verdünnungen im Test eingesetzt. Alle Verdünnungsschritte wurden mit Kaliumphosphatpuffer durchgeführt.

Nach dem Standardprotokoll verfahren wurden Reagenz A (Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, BCA-Detektionsreagenz und Natriumtartrat in 0,1 M NaOH) und Reagenz B (4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) des BCA Protein Assay im Verhältnis 50 : 1 zum Arbeitsreagenz vermischt. 0,1 ml des Proteinstandards bzw. der zu analysierenden Probe wurden 2 ml des Arbeitsreagenzes zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in Halbmikro-Plastik-Küvetten mit 1 cm Lichtweg bei 562 nm gemessen.

2.2.2.2 Sulfidbestimmung nach Cline (1969)

Sulfid wird quantitativ als ZnS gebunden. In stark saurer Lösung bildet Sulfid in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen mit 4-Amino-N,N-Dimethylanilin Methylenblau dessen Absorptionsmaximum bei 664 nm liegt.

Reagenzien

ADMA-Lösung: 2 g 4-Amino-N,N-Dimethylanilin-Sulfat wurde in ca. 700 ml destilliertem Wasser gelöst und im Eisbad vorsichtig mit 200 ml Schwefelsäure (94-97%) versetzt. Die Lösung wurde auf 1 l aufgefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

Fe(III)-Lösung: 10 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ wurden mit destilliertem Wasser und 2 ml Schwefelsäure (94-97%) auf 100 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Zinkacetat-Lösung: 2 g Zinkacetat wurden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 2 ml Essigsäure (99%) versetzt.

Aufnahme einer Eichgeraden für die Sulfidbestimmung

Ein Natriumsulfid-Kristall wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, abgetrocknet und gewogen. Er wurde in abgekochtem, heißem Wasser aufgelöst und die Lösung in einem Messkolben, in welchem sich bereits 1 g Natriumhydroxidplättchen befanden, auf 250 ml aufgefüllt. Unter Berücksichtigung des Volumenrückgangs bei Abkühlung wurde bis über die Eichmarke mit abgekochtem destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Kolben wurde mit Stickstoff begast und mit einem Butylgummistopfen verschlossen. Für die Extinktionsmessung bei 670 nm wurden Konzentrationen zwischen 10 und 150 μM Sulfid eingesetzt.

Durchführung der Sulfidbestimmung

1 ml Zinkacetat-Lösung und 3 ml destilliertes Wasser wurden in Reagenzgläser gegeben, 50 bzw. 100 µl Kultur eingespritzt und anschließend geschüttelt. 1 ml ADMA-Lösung, 4 ml Wasser wurden zugegeben und gemischt. Die Reaktion wurde mit 1 ml Fe(III)-Lösung (1:20 verdünnt) gestartet. Nach 30 min wurde die Absorption in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg bei 670 nm im Photometer gegen Luft gemessen. Als Nullwert diente ein Ansatz ohne Sulfid. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.2.3 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die verwendete HPLC-Anlage System Gold[®] (Beckman Instruments, München, D) bestand aus zwei Hochdruck-Pumpen, Modell 126 oder Shimadzu LC10-AT (Shimadzu, Oberhaching, D) und einem UV/VIS-Detektor Modell 166, 167 bzw. dem 168 Photodiodendetektor. Die Proben wurden über einen automatischen Probengeber (Beckman Autosampler Modell 502 oder Abimed-Gilson Modell 234, Langenfeld, D) aufgegeben. Die Auswertung der Chromatogramme und UV/VIS-Absorptionsspektren erfolgte durch die Software des Systems Gold[®], Version 3.1. Eluierende Verbindungen wurden durch Vergleich mit externen Standards identifiziert und quantifiziert. Detektiert wurde jeweils bei einem UV-Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung, welches zuvor durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums ermittelt oder der Literatur entnommen wurde.

2.2.3.1 HPLC-Methoden zur Analyse von Standardtests

Alle phenolischen und carboxylierten aromatischen Verbindungen wurden isokratisch über eine reversed-phase Säule (GROM-SIL 120, ODS-5 ST, 5 µm, 150 x 5 mm, GROM, Herrenberg, D) getrennt. Der Anteil der mobilen organischen Phase (Methanol) variierte je nach Hydrophobizität der zu trennenden Substanzen zwischen 5 und 50 %. Als wässrige Phase wurden Ammoniumphosphatpuffer (100 mM, pH 2,6) oder Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 2,2) eingesetzt.

Wenn die Substanzen unter isokratischen Bedingungen nicht mehr getrennt werden konnten, wurden Gradientenmethoden angewendet. Dazu wurde ein linearer Gradient von 5 auf 50 % Methanol innerhalb von 20 bis 30 min gefahren.

Die Flussrate betrug meist 1 ml min⁻¹, wurde jedoch für spezielle Anwendungen auf 0,5 ml min⁻¹ reduziert.

2.2.3.2 Quantifizierung von Nitrat und Nitrit

Nitrat und Nitrit konnten mit der Standardmethode (20 % Methanol, 80 % Ammoniumphosphatpuffer 100 mM, pH 2,6) mittels reversed-phase HPLC getrennt und bei einer Wellenlänge von 206 nm quantitativ analysiert werden (B. Philipp, persönliche Mitteilung). Die Retentionszeit von Nitrat stimmte unter diesen Bedingungen mit dem Injektionspeak überein, Nitrit hatte eine Retentionszeit von 7 min. Es wurde eine Kalibration im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 10 mM mehrmals durchgeführt, in folgenden Analysen wurden externe Standards mit 1 mM bzw. 5 mM eingesetzt. Zur Grobabschätzung während des Wachstums der Kulturen wurden Nitrat/Nitrit Teststäbchen verwendet (Quantofix-Teststäbchen zur Nitrat-/Nitrit-Bestimmung, Macherey-Nagel, Düren).

2.2.4 UV / VIS-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV / VIS-Spektren diente zur Bestimmung von Absorptionsmaxima der eingesetzten Substrate, um die ideale Detektionswellenlänge für die HPLC-Analyse zu erhalten. Die Spektren wurden mit einem Uvikon 930 Zweistrahl-Spektrophotometer (Kontron Instruments, Zürich, CH) in Küvetten aus Quarzglas mit 1 cm Lichtweg vorgenommen. Ferner konnten mit dem Beckman 168 *Diode Array* Detektor *online* Spektren von einzelnen Peaks während der HPLC-Analyse aufgenommen werden.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Zellernte

Die Zellen für alle Experimente wurden in der späten exponentiellen Phase geerntet. Nach Überprüfen des Nitritgehalts (mit Teststäbchen), der mikroskopischen Überprüfung des Zustandes der Zellen und Bestimmung der OD_{578} , wurden die Kulturen in einer Anaeroben-Kammer (Coy, Ann Arbor, MI, USA) unter N_2/H_2 (95% N_2 , 5% H_2) Atmosphäre in gasdichte Polypropylen Zentrifugenbecher abgefüllt. Um im Bechermaterial gelösten Sauerstoff zu entfernen, wurden die Zentrifugenbecher mindestens einen Tag vorher in die Anaeroben-Kammer gebracht. Die Zellen wurden in GS-3 oder GSA Rotoren in einer Sorvall RC5-Zentriuge (Du Pont de Nemours, Bad Homburg, D) mit 10000 g bei 4 °C 20 min sedimentiert. Das Pellet wurde in der Anaeroben-Kammer in

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2, 50 mM resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in einem geringeren Puffervolumen aufgenommen. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen bis zum Gebrauch auf Eis wenige Stunden gelagert oder durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schnell eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.3.2 Zellsuspensionsversuche

Suspensionsversuche wurden mit frisch geernteten Zellen in 5-ml Hungate Röhren mit Butylgummisepten unter striktem Ausschluss von molekularem Sauerstoff durchgeführt. Die optische Dichte der Suspensionen wurde mit anoxischem Kaliumphosphatpuffer auf Werte zwischen 5 und 10 eingestellt. Als Bezugsgröße diente die Bakterientrockenmasse, die mit Hilfe des in 2.1.7.1 erstellten Eichfaktors berechnet wurde. Als Elektronenakzeptor wurde Nitrat (5 mM), Nitrit (5 mM) oder Distickstoffmonoxid (5 mM Ausgangskonzentration) eingesetzt. Durch Zugabe des Substrates (1 mM) (Benzoat, Protocatechuat, α -Resorcyilat) wurde das Experiment gestartet. Unmittelbar nach Start der Reaktion, sowie zu bestimmten Zeitpunkten danach, wurden je 100 μl Proben entnommen und in eiskalten Eppendorfcups mit 100 μl destilliertem Wasser überführt. In einer Eppendorftischzentrifuge wurden die Zellen 5 min bei 15000 g abzentrifugiert und der Überstand in HPLC-Probengefäße gegeben. Bis zur Analyse mit der HPLC wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Substratzugaben und Probeentnahmen erfolgten mit gasdichten Unimetrics-Spritzen (Macherey-Nagel, Düren). Distickstoffmonoxid wurde mit einer 1 ml Plastikspritze mit Stahlkanülen (0,4 mm Durchmesser) zugegeben.

Die Induktionsexperimente wurden innerhalb von 2 bis 3 h abgeschlossen, so dass eine Störung durch Neusynthese von Proteinen vermieden werden konnte. Außerdem wurden die Vorkulturen auf Benzoat und α -Resorcyilat mindestens zwei mal übertragen, bevor die Versuchskultur damit angeimpft wurde, um auszuschließen, dass noch im Medium verbliebene Reste von Protocatechuat zu einer Induktion beitragen.

2.3.3 Herstellung von zellfreien Extrakten

Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French-Press (Aminco, Silver Spring, MD, USA). Der Innenraum des Hungate-Röhrens, in dem sich die Zellsuspension

befand, war über eine Kanüle (Durchmesser 1,2 mm) mit der gekühlten, N₂ gespülten French-Press-Zelle verbunden. Nach bis zu 3 Passagen bei 136 MPa wurde der Erfolg des Aufschlusses mikroskopisch kontrolliert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in der Anaerobenkammer in Zentrifugenröhrchen überführt und zur Abtrennung von Zelltrümmern im gasdichten Rotor bei 20 000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Optima TL-Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, München). Der Überstand wurde in ein Hungate-Röhrchen übertragen, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt. Soweit möglich wurde die Herstellung des zellfreien Extrakts unter Eiskühlung durchgeführt.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden mit einem vertikalen Elektrophoresesystem (Mini-Protean II, BioRad, München, D) nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Gele bestanden aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 10 %-igen Trenngel. Es wurde mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (Sammelgel pH 6,8; Trenngel pH 8,8) gearbeitet. Die Proteinproben wurden mit einem SDS-haltigen Auftragspuffer versetzt, entsprechend verdünnt, um für alle Proben die gleiche Proteinmenge zu erhalten, und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Pro Gelspur wurden jeweils 20 bis 40 µg Protein aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente ein handelsübliches Proteingemisch (low molecular weight calibration kit) der Firma Pharmacia (Freiburg). Die Proben laufen bei einer Stromstärke von ca. 15 mA in das Sammelgel ein, bei Eintritt in das Trenngel wurde auf ca. 40 mA bei einer Spannung von ca. 200 mV hochreguliert. Die Gele wurden nach Auftrennung der Proteine entweder angefärbt oder geblottet. Zum Anfärben wurden die Gele für 1 bis 2 Tage in einer kolloidalen Serva-Blau Färbelösung geschwenkt, überflüssige Farblösung wurde vor dem Fotografieren mit destilliertem Wasser abgespült.

Reagenzien

- Sammelgel: 3 ml H₂O; 1,25 ml Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 50 µl SDS 10 % in H₂O; 0,65 ml Acrylamid 30 %; 25 µl APS (0,1 g ml⁻¹); mit 5 µl TEMED wird die Polymerisation gestartet.

- Trenngel: 1,9 ml H₂O; 1,25 ml Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8; 50 µl SDS 10 % in H₂O; 1,7 ml Acrylamid 30 %; 25 µl APS (0,1 g ml⁻¹); mit 5 µl TEMED wird die Polymerisation gestartet.
- Probenpuffer: 3,2 ml H₂O; 1 ml Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8; 1,6 ml Glycerin; 1,6 ml SDS 10 %; 0,2 ml Bromphenolblau 1 %; 0,4 ml β-Mercaptoethanol, vor Benutzung zugeben.
- Elektrodenpuffer 5-fach konzentriert: 15,1 g Tris; 94 g Glycin; 5 g SDS auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen. Der Puffer wird in einfacher Konzentration eingesetzt, pH 8,6.
- Färbelösung: 0,098 % Serva-Blau; 2 % Phosphorsäure; 10 % Ammoniumsulfat in destilliertem Wasser; 80 ml davon werden vor dem Einsatz mit 20 ml Methanol vermischt.

2.3.5 Western-Blotting

Diese Methode wurde zum Nachweis der Benzoyl-CoA-Reduktase in zellfreien Extrakten von *T. aromatica* AR-1 verwendet. Es wurden polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen die Benzoyl-CoA-Reduktase aus *T. aromatica* K 172 benutzt (Heider et al. 1998). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der zellfreien Extrakte wurden die Proteine mit dem Semiphor™ System (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) auf Nitrocellulose-Membranen (BioBlot-NC, Costar®, Cambridge, MA, USA) bei einer konstanten Stromstärke von 0,9 mA cm⁻² geblottet. Nach 60 min wurde der erfolgreiche Transfer mit einer Ponceau-S Färbung überprüft. Die Blotmembranen wurden über Nacht mit Milchpulver abgesättigt, bevor sie für 2 h mit dem spezifischen Antiserum inkubiert wurden. Nach weiteren Wasch- und Blockierungsschritten wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Es folgten weitere Blockier- und Waschschrte; anschließend wurde die Membran noch in CSPD Puffer äquibriert. Die immunologische Detektion der Proteine erfolgte durch die an die sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase mit dem CSPD®-System (Roche Diagnostics, Mannheim, D) (Bronstein et al. 1991). Die Membran wurde nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37 °C auf einen Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film; Fuji, Tokyo, J) aufgelegt, dieser wurde nach 1 bis 12 h Exposition entwickelt.

Gereinigte Benzoyl-CoA-Reduktase sowie das Antiserum gegen die Benzoyl-CoA-Reduktase aus *T. aromatica* K 172 wurden von Prof. Fuchs (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Blotapparatur, die sekundären Antikörper und die Filmkassette wurden von der AG Cook zur Verfügung gestellt. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einem vollautomatischen Entwickler (Sakura QX 130, Konica Europe, Lahr) am Lehrstuhl Knippers.

Reagenzien

- Anodenpuffer I, pH 10,4: 18,15 g Tris; 100 ml Methanol; auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.
- Anodenpuffer II, pH 10,4: 1,52 g Tris; 100 ml Methanol; auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.
- Kathodenpuffer, pH 7,3: 2,6 g 6-Aminocapronsäure; 100 ml Methanol; auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.
- Ponceau-S: 0,1 % (v/v) Ponceau-S; 1 % (v/v) Eisessig in destilliertem Wasser.
- TBS 10-fach konzentriert: 100 ml Tris/HCl, 100 mM, pH 7,4; 87,66 g NaCl; 5 ml Nonident P 40, auf 1000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen. Der Puffer wird in einfacher Konzentration eingesetzt (Tris/HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).
- Blockierlösung: TBS-Puffer mit 5 % Milchpulver (Rapilait, Migros, CH).
- Antiserum: 50 ml TBS-Puffer mit 3 % BSA (Albumin, Bovine, Fraction V, Sigma, St.Louis, MO, USA); 1 µl Antikörper.
- Sekundärer Antikörper: 50 ml TBS-Puffer mit 3 % BSA; 40 µl Anti-Rabbit IgG-AP (Boehringer, Mannheim, D).
- CSPD Puffer: 100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5.
- Detektionslösung: 20 µl CSPD[®] in 20 ml CSPD Puffer.

2.4 Chemikalien und Gase

Handelsübliche Chemikalien, Biochemikalien oder Enzyme in p.a.- und Chromatographie-Qualität wurden von den Firmen BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. N₂O wurde von der Firma Linde (Unterschleißheim) bezogen. Alle anderen Gase und Gasgemische stammen von Messer Griesheim (Ludwigshafen) und entsprachen der Reinheitskategorie 5.0.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch denitrifizierende Bakterien

Zu Beginn meiner Diplomarbeit wurden mir von der AG Cook und vom LS Schink einige denitrifizierende Stämme zur Verfügung gestellt. Es sollte ein geeigneter Organismus gefunden werden, mit dem Experimente zum anaeroben Abbau von Protocatechuat durchgeführt werden konnten. Dazu wurden die Stämme *Thauera aromatica* Stamm AR-1, *Thauera aromatica* Stamm K172, *Azoarcus anaerobius*, *Paracoccus pantotrophus*, *Paracoccus pantotrophus* (NKNCysa), *Alcaligenes* sp. (NKNTau) und die Anreicherungen Phlow und Milva auf Wachstum auf Protocatechuat hin untersucht. Nach 2, 5 und 9 Tagen wurde jede Kultur mikroskopiert, die OD₅₇₈ und die Nitritentwicklung mit Teststäbchen bestimmt.

Da ursprünglich der Abbau von Hydrochinon untersucht werden sollte, wurden die Stämme auch auf ein Wachstum auf Hydrochinon getestet. Keiner der Stämme konnte auf Hydrochinon wachsen, geringe Nitritentwicklung konnte auf Wachstum auf Substratresten aus der Vorkultur zurückgeführt werden.

In Tabelle 6 ist zusammengefasst, wie sich die Kulturen auf Protocatechuat verhielten.

Tabelle 6: Wachstum von verschiedenen Denitrifizierern auf Protocatechuat

Getesteter Stamm	Wachstum auf Protocatechuat
<i>T. aromatica</i> AR-1	++
<i>T. aromatica</i> K172	+
<i>A. anaerobius</i>	+
<i>P. pantotrophus</i>	–
<i>P. pantotrophus</i> NKNCysa	(–)
<i>Alcaligenes</i> sp. NKNTau	(+)
Phlow	+
Milva	–

+ und ++ bedeuten Wachstum bzw. sehr gutes Wachstum, – kein Wachstum, bei (+) bzw.(–) war ein Wachstum nicht eindeutig erkennbar

Da *T. aromatica* AR-1 am besten wuchs, wurde dieser Stamm für die Experimente zur Untersuchung des Abbaus von Protocatechuat eingesetzt.

3.1.1 Wachstum von *Thauera aromatica* AR-1 auf Protocatechuat

T. aromatica AR-1 oxidierte Protocatechuat mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und N_2 ging mit Substratverbrauch sowie einem Anstieg der optischen Dichte einher (Abb. 4) Nach Übertragung der Kultur (1 %-ig) in frisches Medium wurde eine lag-Phase von 1 bis 2 Tagen beobachtet. Bei der Zentrifugation entstand ein festes, dunkelbraunes Pellet. Auch der Kulturüberstand war braun gefärbt. Die Elektronenbilanz konnte mit 78 % nicht geschlossen werden.

Die Stöchiometrie des Protocatechuatumsatzes ist in Tabelle 7, die bestimmten Wachstumsparameter in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: Stöchiometrie der Umsetzung von Protocatechuat mit Nitrat durch *T. aromatica* AR-1.

Substrat verbraucht	2,0 mM
Zellmasse gebildet ^a	49,4 mg/l
Nitrat verbraucht	7,5 mM
Nitrit gebildet	3,2 mM

^a: Die Berechnung erfolgte über den OD_{578} -Trockenmasse Umrechnungsfaktor, der in Tabelle 8 angegeben ist.

Assimilatorischer Stoffwechsel



Dissimilatorischer Stoffwechsel

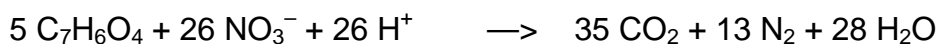


Tabelle 8: Wachstumsparameter von *T. aromatica* AR-1 bei Wachstum auf Protocatechuat unter Reduktion von Nitrat.

Wachstumsrate(μ)	0,033 h ⁻¹
Verdopplungszeit (t_d)	21 h
OD_{578} -Trockenmassen Korrelation	265 (mg Trockenmasse) l ⁻¹
molarer Wachstumsertrag Y_s	51 (mg Trockenmasse) mol ⁻¹
in vivo-Umsatzrate	11,5 nmol min ⁻¹ (mg Trockenmasse) ⁻¹
Elektronenbilanz	78 %

Die OD_{578} -Trockenmasse Korrelation bezieht sich auf eine $OD_{578} = 1$.

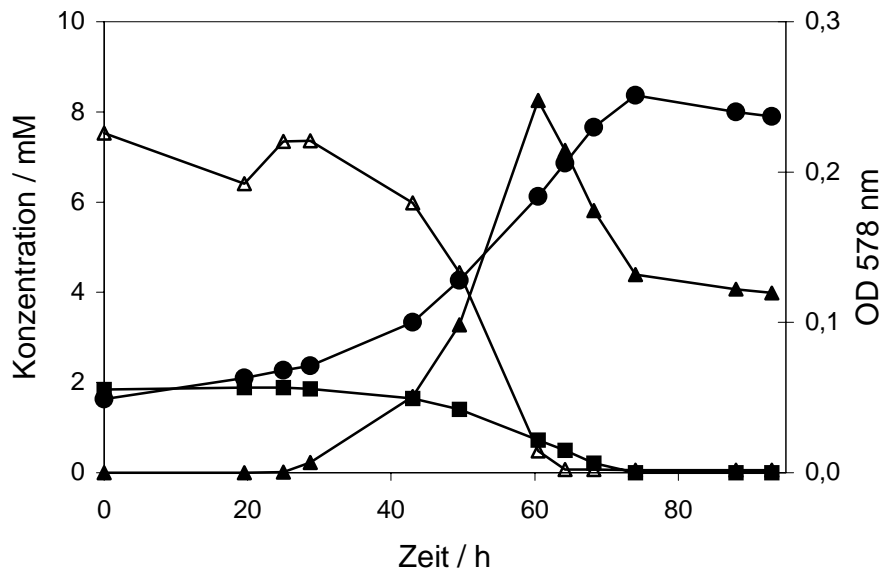


Abb. 4: Wachstum von *T. aromatica* AR-1 auf Protocatechuat (2 mM) mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor. (●) OD₅₇₈, (■) Protocatechuat, (▲) Nitrit, (△) Nitrat.

3.1.2 Abbau von Protocatechuat, α -Resorcyilat und Benzoat in dichten Zellsuspensionen

3.1.2.1 Vorversuche zur Durchführung der Experimente und zur Konservierung der Proben

Um abiotische von bakteriell katalysierten Reaktionen unterscheiden zu können, wurden vor Beginn der Experimente Kontrollversuche ohne Bakterien angesetzt. Zur Einschätzung des Einflusses von molekularem Sauerstoff auf das Testsystem wurde der Standardtest mit anoxischem Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,2), 1 mM Protocatechuat und 5 mM Nitrat bzw. Nitrit angesetzt. Eine Testreihe wurde dann Sauerstoff exponiert und mit Luft durchströmt, die andere Reihe wurde wie im späteren Versuch strikt anoxisch behandelt. Die Ansätze, die der Luft ausgesetzt waren, verhielten sich wie die anoxischen, erst nach einigen Stunden (> 5 h) war eine Protocatechuatabnahme zu sehen.

Um die Auswirkungen, die ein Abstoppen der Reaktion mit Phosphorsäure (100 mM) hat, beurteilen zu können, wurde immer jeweils eine Probe 1:1 mit Phosphorsäure versetzt und mit der nicht angesäuerten, 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnten Probe verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass, sobald Nitrit

in der Probe vorhanden war, in der HPLC-Analyse mehrere nicht weiter identifizierte Peaks auftraten.

Auch in Proben, die bei 4 °C in Kaliumphosphatpuffer bei pH 4 oder in destilliertem Wasser unter N₂ aufbewahrt wurden, konnte nach einigen Tagen kein Protocatechuat mehr detektiert werden.

Wurden die Proben eingefroren und nach zwei bis drei Tagen mit der HPLC analysiert, so konnte unabhängig von der vorhergehenden Behandlung kein Protocatechuat mehr nachgewiesen werden.

Daraus schloss sich, dass die Proben baldmöglichst analysiert werden sollten und nicht mit Phosphorsäure abgestoppt werden dürfen, da Nitrit immer in Ansätzen mit Nitrat entsteht. Das galt natürlich auch für die Proben, die während der Wachstumsexperimente entnommen wurden.

Bei der Behandlung der Proben, die Benzoat oder α -Resorcyolat enthielten, konnte auf das von Bodo Philipp erprobte Verfahren zurück gegriffen werden (Philipp 1999). Proben mit α -Resorcyolat konnten in destilliertem Wasser bei 4 °C längere Zeit aufbewahrt werden, Proben, die nur Benzoat enthielten, wurden mit Phosphorsäure abgestoppt.

Alle Proben wurden in der Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert, um die Zellen zu entfernen.

3.1.2.2 Protocatechuatabbau

Dichte Zellsuspensionen von *T. aromatica* AR-1 setzten Protocatechuat unter Reduktion von Nitrat, Nitrit oder N₂O mit einer Rate von 8,5 nmol min⁻¹ (mg Trockenmasse)⁻¹ um (Abb. 5). Ohne terminalen Elektronenakzeptor konnte keine Protocatechuatabnahme beobachtet werden. Während des Abbaus akkumulierten einige Zwischen-, Neben- oder Endprodukte. Diese konnten per HPLC detektiert werden. Wurde Nitrat durch N₂O ersetzt, war ein weiteres Produkt zu erkennen, das bei der gleichen Retentionszeit wie Nitrit eluierte. Im Zeitverlauf des Experiments (1-2 h) wurde dieses Produkt wieder abgebaut, daraus lässt sich schließen, dass es sich um ein Zwischenprodukt handelt (Abb. 6). Dieses Produkt erschien interessant für einen Hinweis auf die Abbaustrategie zu sein, es wurden deshalb einige Referenzsubstanzen mit der HPLC analysiert; jedoch keine der folgenden Substanzen eluierte bei der Retentionszeit des Zwischenprodukts. Als Referenzen wurden Benzoat, 3-HB, 4-HB, α -Resorcyolat, β -Resorcyolat,

γ -Resorcylat, Gentisat, 2,3,4-THB, Resorcin, Brenzcatechin, Hydrochinon, HHQ und Phloroglucin verwendet. Brenzcatechin schien eine ähnliche Retentionszeit wie das unbekannte Produkt aufzuweisen, bei einer Koelution von Brenzcatechin und der zu analysierenden Probe wurden die beiden Substanzen jedoch eindeutig getrennt. Ein Versuch Protocatechuat mit $K_3Fe(CN)_6$ zu oxidieren führte zu einem undefinierten Gemisch, das in der HPLC-Analyse viele Peaks ergab. In der Synthesvorschrift (Morgan 1961) zur Oxidation von Protocatechuat zu 4-Carboxybenzochinon-1,2 war ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm angegeben. Dieses Maximum konnte bei den Analysen mit *online* Spektren der einzelnen Peaks bei keinem Peak erkannt werden (Nicht dargestellt). Zellsuspensionen, die nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, konnten später im Zellsuspensionsexperiment Protocatechuat mit geringerer Rate abbauen, dabei häuften sich keine Zwischenprodukte an.

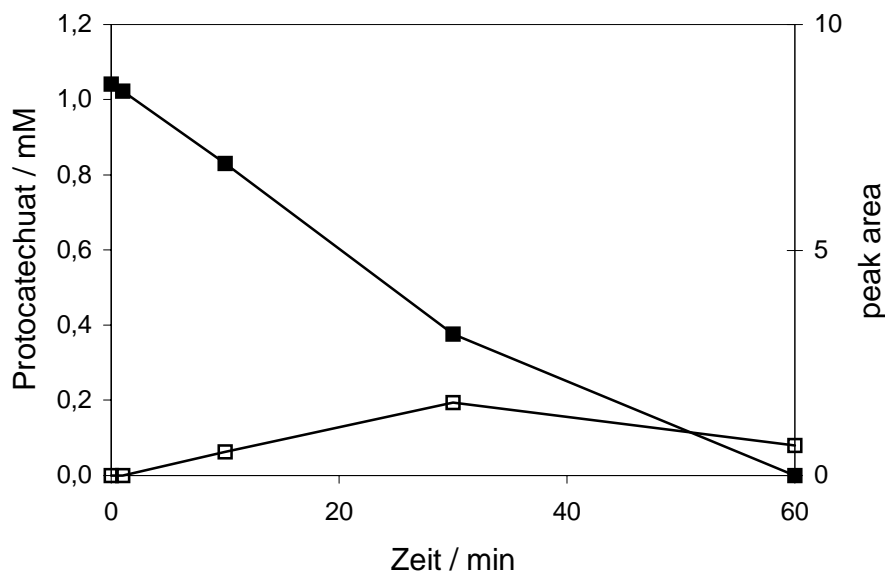


Abb. 5: Protocatechuatabbau durch *T. aromatica* AR-1 in dichter Zellsuspension mit N_2O als Elektronenakzeptor. (■) Protocatechuat, (□) unbekanntes Zwischenprodukt, dargestellt in peak area Einheiten.

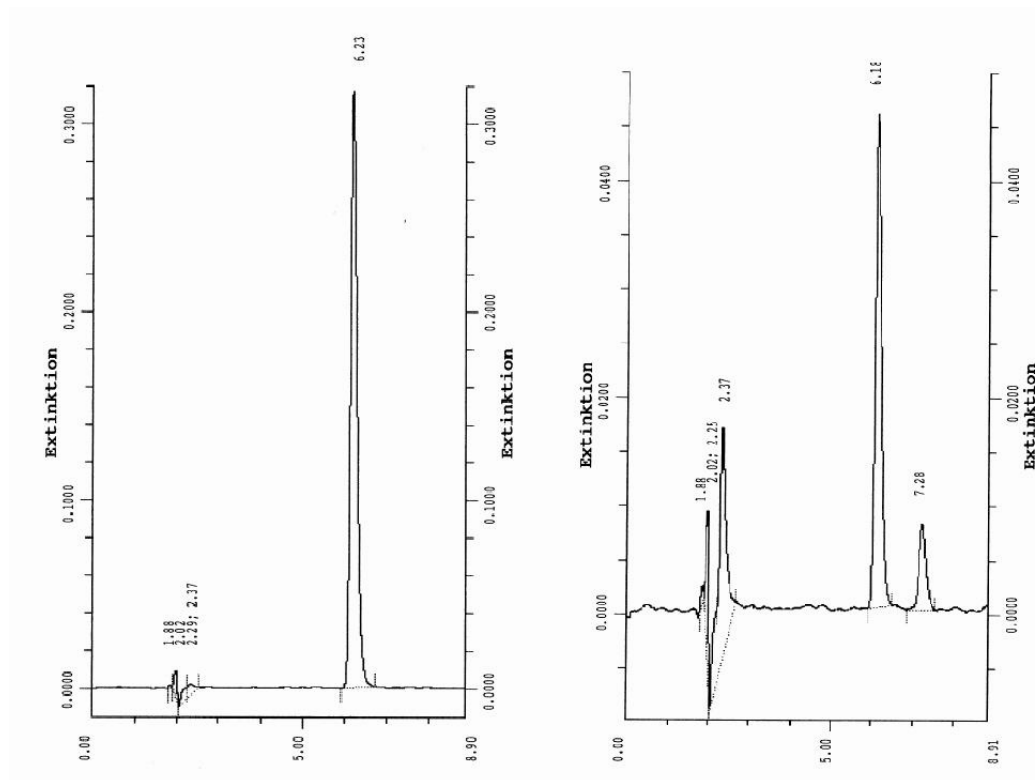


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme von Proben aus Zellsuspensionsexperimenten zum Start der Reaktion (linkes Chromatogramm) und nach einer Reaktionszeit von 30 min (rechtes Chromatogramm); der Peak mit einer Retentionszeit von 6,23 min (bzw. 6,18 min) stellt Protocatechuat dar, der mit einer Retentionszeit von 7,28 min das unbekannte Zwischenprodukt.

3.1.2.3 Induktionsexperimente

Aufbauend auf die Experimente, die Bodo Philipp zur Untersuchung der Induzierbarkeit der verschiedenen Abbauege von α -Resorcyilat und Benzoat durchgeführt hatte (Philipp und Schink 2000), wurde *T. aromatica* AR-1 auf sein Verhalten hinsichtlich des Abbaus von Protocatechuat untersucht. Zellen, die auf Benzoat gewachsen waren, waren für den Abbau von α -Resorcyilat nicht induziert und umgekehrt.

Zur Erweiterung dieses Induktionsexperiments wurden Zellen auf Protocatechuat angezogen. Im Zellsuspensionstest wurde dann Benzoat, α -Resorcyilat und Protocatechuat als Substrat eingesetzt. Benzoat wurde mit einer Rate von $4,8 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ abgebaut. Diese Rate liegt in der Größenordnung des Umsatzes von Protocatechuat ($8,5 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$). α -Resorcyilat

wurde auch über längere Zeit nur mit einer äußerst geringen Rate von $0,14 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ umgesetzt (Abb. 7).

Wurden die Zellen auf Benzoat angezogen, so konnten sie im Zellsuspensionsversuch Protocatechuat ($6,8 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) genauso gut wie Benzoat ($5,4 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) abbauen, α -Resorcyilat jedoch nicht (Abb. 8). Zellen, die auf α -Resorcyilat gewachsen waren, waren ebenfalls für den Abbau von Protocatechuat induziert. Die Umsatzrate für Protocatechuat lag mit 1,0 bis $7,9 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ im Bereich der Umsatzrate für α -Resorcyilat $2,3 \text{ nmol (mg Zellmasse)}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Benzoat wurde nur mit einer äußerst geringen Rate abgebaut (Abb. 9).

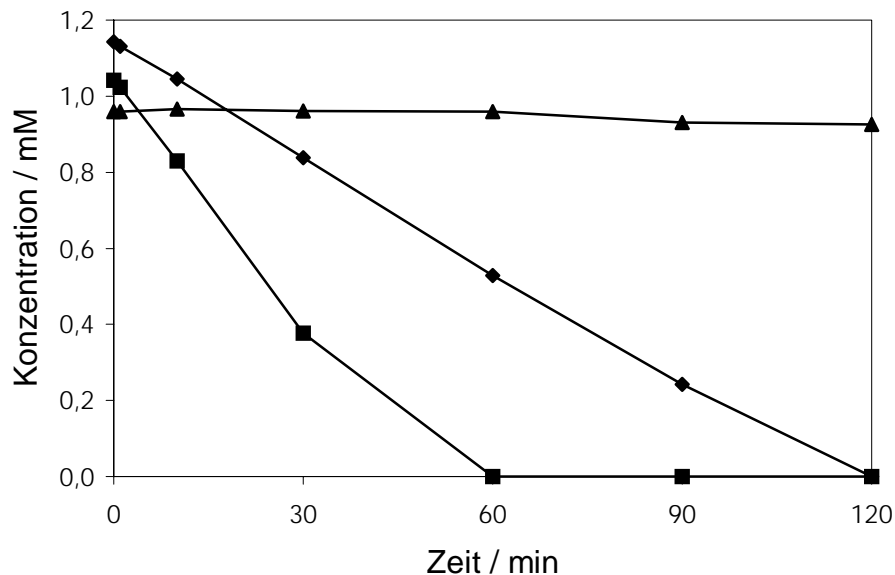


Abb. 7: Abbau von (■) Protocatechuat, (◆) Benzoat und (▲) α -Resorcyilat mit N_2O als Elektronenakzeptor in dichter Zellsuspension von *T. aromatica* AR-1, auf Protocatechuat gewachsen.

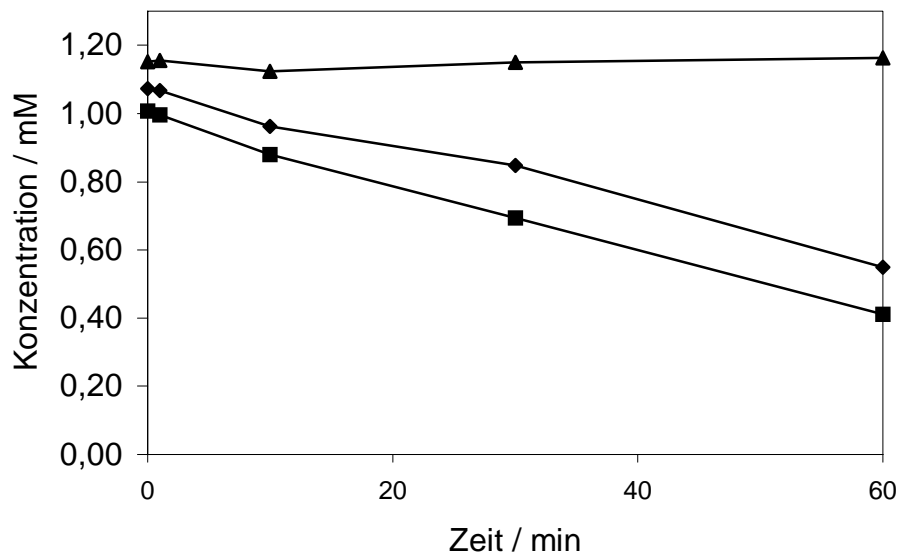


Abb. 8: Abbau von (■) Protocatechuat, (◆) Benzoat und (▲) α -Resorcylat mit N_2O als Elektronenakzeptor in dichter Zellsuspension von *T. aromatica* AR-1, auf Benzoat gewachsen.

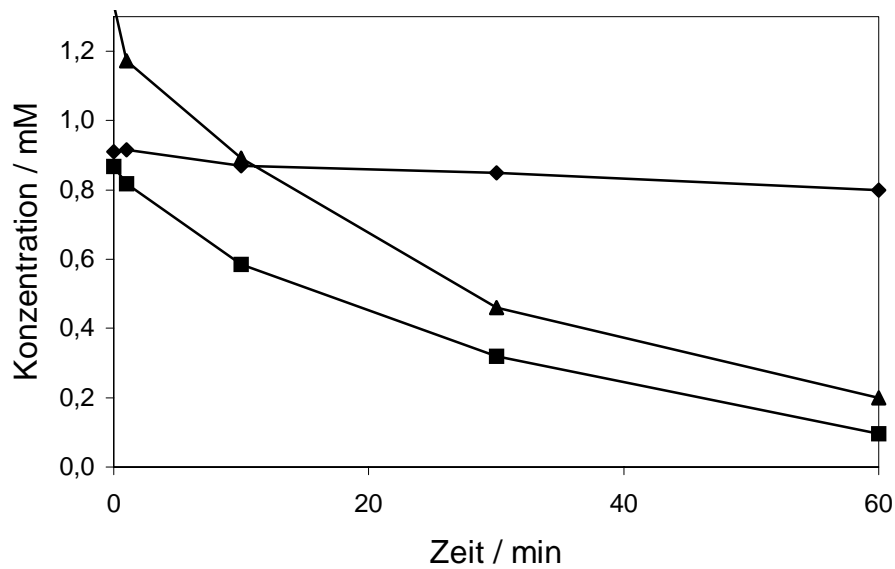


Abb. 9: Abbau von (■) Protocatechuat, (◆) Benzoat und (▲) α -Resorcylat mit N_2O als Elektronenakzeptor in dichter Zellsuspension von *T. aromatica* AR-1, auf α -Resorcylat gewachsen.

3.1.3 Untersuchungen zum Wachstum auf Substratgemischen

Die Zellsuspensionsexperimente hatten nahegelegt, dass der Abbau von Protocatechuat bei Wachstum auf Benzoat sowie bei Wachstum auf α -Resorcyilat induziert war. Jedoch war bei Wachstum auf Protocatechuat der Abbau von α -Resorcyilat nicht induziert. Mit Wachstumsexperimenten wurde nun versucht, weitere Hinweise für eine Induktion zu gewinnen.

Wurden Zellen, die auf Protocatechuat angezogen worden waren, auf α -resorcyilat- bzw. benzoathaltiges Medium übertragen, wuchsen die Zellen genauso schnell an, wie auf Medium mit Protocatechuat als Wachstumssubstrat. Die Umstellung auf die anderen Substrate war also ohne erkennbare Wachstumsverzögerung möglich. Wurden Zellen aus einer Protocatechuat-Vorkultur auf Medium übertragen, das sowohl Protocatechuat als auch Benzoat enthielt, so konnte man ein zweiphasiges Wachstum beobachten. Die Zellen wuchsen dabei zunächst nach der üblichen lag-Phase von ein bis zwei Tagen exponentiell an. Nach ca. 40 h kam es dann ohne eine ausgeprägte stationäre Phase zunächst zu einer leichten Abnahme der optischen Dichte. Danach blieb die OD_{578} für kurze Zeit konstant, bis eine zweite exponentielle Wachstumsphase einsetzte, die in einer stabilen stationären Phase endete. Während des Wachstums wurde immer zuerst Benzoat abgebaut. Die erste Wachstumsphase endete, nachdem Benzoat vollständig abgebaut worden war. In dieser ersten Wachstumsphase nahm die Protocatechuatkonzentration nicht ab. Erst zu Beginn der zweiten Wachstumsphase stieg die Abbaurate deutlich an. Das Einsetzen der stationären Phase korreliert zeitlich mit dem vollständigen Abbau von Protocatechuat. Es handelt sich hierbei also um ein klassisches diauxisches Wachstumsverhalten, in dessen Verlauf immer zuerst Benzoat vollständig abgebaut wurde, bevor Protocatechuat als Substrat dienen konnte (Abb. 10).

Das Phänomen des zweiphasigen Wachstums bei *T. aromatica* AR-1 konnte schon in Experimenten mit α -Resorcyilat und Benzoat im Medium beobachtet werden (Philipp und Schink 2000). Mit diesen beiden Substraten war die Zweiphasigkeit wesentlich ausgeprägter. Es konnte eine sehr lange lag-Phase beobachtet werden, nachdem Benzoat verbraucht war. Zu diesem Zeitpunkt war schon alles Nitrat in Nitrit umgewandelt. Wurde nachträglich Nitrat zugegeben,

nachdem Benzoat verbraucht war, konnte keine kürzere lag-Phase beobachtet werden (nicht dargestellt).

Wurden die Zellen auf Medium mit α -Resorcylat und Protocatechuat übertragen, so wuchsen die Zellen exponentiell an. Nach ca. 65 h verlangsamte sich das Wachstum bis dann nach ca. 100 h eine stationäre Phase erreicht wurde. Während dieses Wachstums wurde jedoch α -Resorcylat immer zuerst abgebaut. Der Protocatechuatabbau setzte weniger als 3 h versetzt ein. Sobald alles α -Resorcylat aufgebraucht war, trat die beschriebene Verlangsamung des Wachstums ein. Während des Wachstums trat die typische rosa Verfärbung auf, die im Zusammenhang mit α -Resorcylat und Nitrat stand (Philipp 1999). Diese Verfärbung änderte sich nach ca. 60 h in eine braune Verfärbung (Abb. 11).

Ein dritter Ansatz wurde in Medium durchgeführt, das α -Resorcylat, Benzoat und Protocatechuat enthielt. Dabei verhielt sich das Wachstum wie in dem zu Beginn beschriebenen Experiment zum Wachstumsverhalten auf α -Resorcylat und Benzoat. In der zweiten lag-Phase, die sehr lang war (ca. 100 h), war nach der Abnahme der OD_{578} ein ständiges, langsames Wachstum zu beobachten, bis dann nach ca. 150 h eine kurze exponentielle Phase zu erkennen war. Auch in diesem Fall wurde als erstes Substrat Benzoat verbraucht, der Protocatechuatabbau setzte schon ein, bevor Benzoat gänzlich aufgebraucht war. α -Resorcylat wurde, sobald Benzoat nicht mehr im Medium vorhanden war, zu einer geringen Rate abgebaut, diese Rate stieg dann nach ca. 150 h in geringem Maße an. Die stationäre Phase setzte erst nach mehr 200 h ein (Abb. 12).

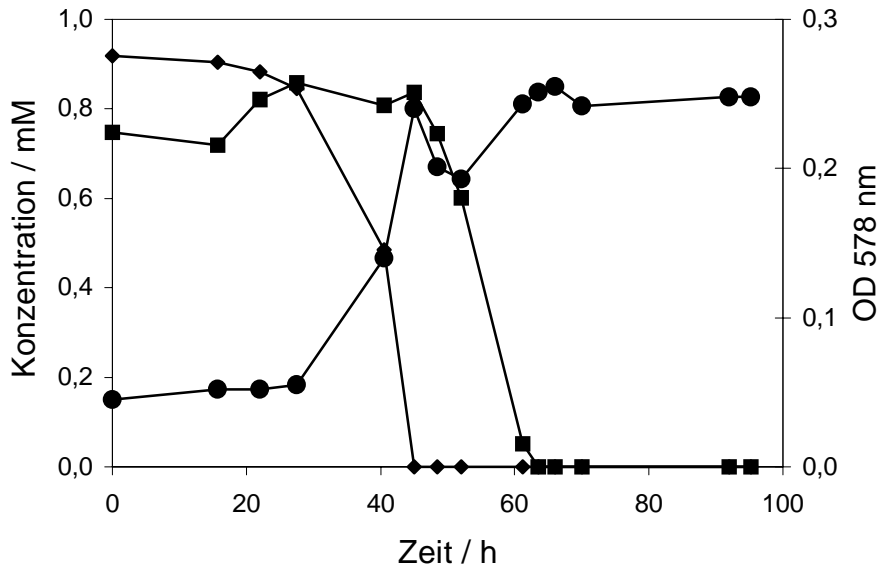


Abb. 10: Wachstum (●) OD₅₇₈ von *T. aromatica* AR-1 auf (■) Protocatechuat und (◆) Benzoat mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.

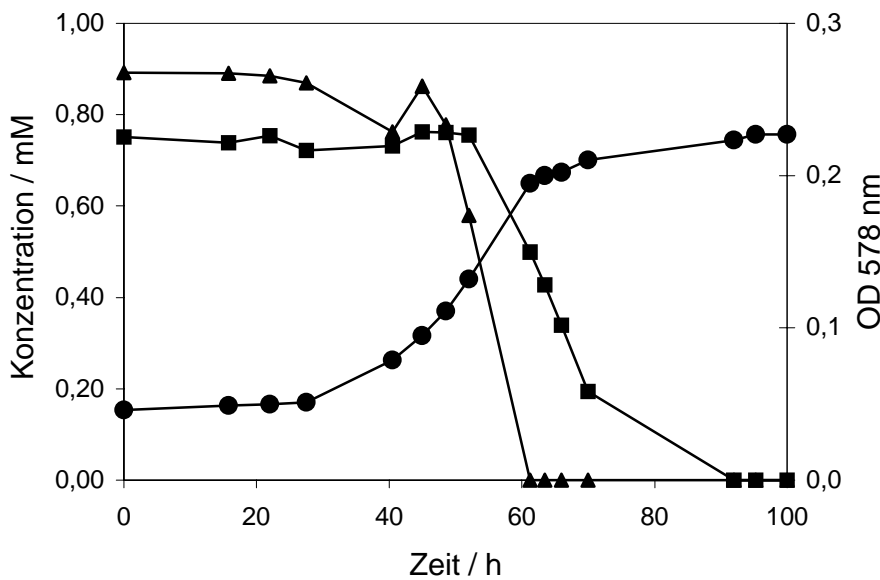


Abb. 11: Wachstum ((●) OD₅₇₈) von *T. aromatica* AR-1 auf (■) Protocatechuat und (▲) α -Resorcylat mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.

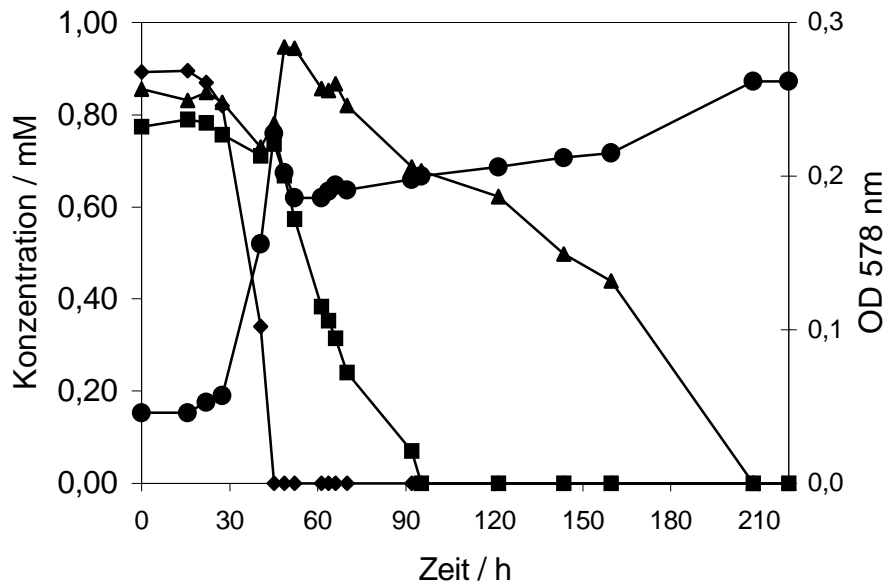


Abb. 12: Wachstum ((●) OD₅₇₈) von *T. aromatica* AR-1 auf (■) Protocatechuat, (◆) Benzoat und (▲) α -Resorcyilat mit 15 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.

3.1.4 Biochemische Untersuchungen zur Induktion der verschiedenen Abbauwege

3.1.4.1 SDS-PAGE von zellulären Proteinen

In den Induktionsexperimenten mit dichten Zellsuspensionen von *T. aromatica* AR-1 wurde deutlich, dass nach Wachstum auf α -Resorcyilat der Abbau von Protocatechuat möglich war, andererseits waren die Zellen nach Wachstum auf Protocatechuat nicht für den Abbau von α -Resorcyilat induziert. Um herauszufinden, ob diese Beobachtung sich als Unterschied im Bandenmuster der zellulären Proteine wiederfinden lässt, wurden zellfreie Extrakte von *T. aromatica* AR-1, gewachsen auf Protocatechuat, Benzoat oder α -Resorcyilat durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die verschiedenen Extrakte wiesen nach gelelektrophoretischer Auftrennung unterschiedliche Proteinbandenmuster auf. Es konnten in allen Spuren Banden gefunden werden, die nur in diesen vorkamen. Ein Vergleich mit dem Bandenmuster der gereinigten Benzoyl-CoA-Reduktase jedoch machte deutlich, dass diese Banden in allen Spuren vorhanden waren (Abb. 13).

3.1.4.2 Immunologischer Nachweis der Benzoyl-CoA-Reduktase

Wie bereits in der Dissertation von Bodo Philipp (Philipp 1999) erwähnt, reagiert ein Antiserum aus Kaninchen gegen die Benzoyl-CoA-Reduktase aus *T. aromatica* K172 mit dem entsprechenden Enzym aus dem Stamm AR-1.

Mit Hilfe dieses Antiserums konnte auf dem Western-Blot in Extrakten von benzoatgewachsenen Zellen und protocatechuatgewachsenen Zellen die Benzoyl-CoA-Reduktase in gleicher Intensität nachgewiesen werden. In Extrakten α -resorcylatgewachsener Zellen war ein wesentlich schwächeres Signal zu erkennen (Abb. 14). Normalerweise reagiert der Antikörper nur mit den drei größten Untereinheiten des Enzyms (Philipp 1999). In diesem Blot konnten alle vier Untereinheiten des gereinigten Enzyms nachgewiesen werden, zusätzliche Banden in dieser Spur stammen von Abbauprodukten des Enzyms.

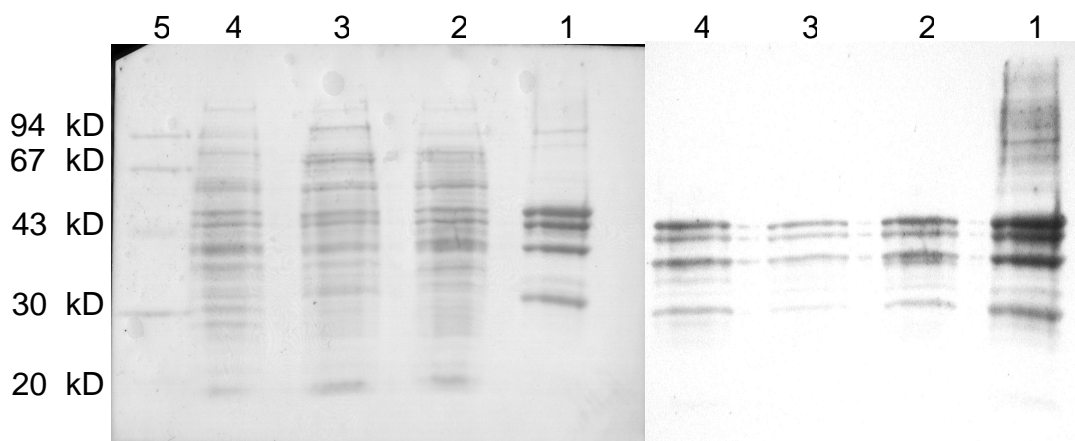


Abb. 13: Geblottete Proteinbanden auf Nitrocellulosemembran von SDS-PAGE mit zellfreien Extrakten von *T. aromatica* AR-1 Kulturen, die auf Benzoat (Spur 2), α -Resorcylat (Spur 3) bzw. Protocatechuat (Spur 3) angezogen worden waren. Auf Spur 1 wurde gereinigte Benzoyl-CoA-Reduktase aus *T. aromatica* K172, auf Spur 5 ein Gemisch mit Markerproteinen aufgetragen.

Abb. 14: Western-Blot zur Detektion der Benzoyl-CoA-Reduktase in zellfreien Extrakten von *T. aromatica* AR-1 Zellen, die auf Benzoat (Spur 2), α -Resorcylat (Spur 3) bzw. Protocatechuat (Spur 3) angezogen worden waren. Auf Spur 1 wurde gereinigte Benzoyl-CoA-Reduktase aus *T. aromatica* K172 aufgetragen. Der dargestellte Blot wurde von der links dargestellten Membran entwickelt.

3.2 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch eisenreduzierende Bakterien

3.2.1 Kultivierungsversuche der bereits vorhandenen Stämme auf Protocatechuat, α -Resorcylat und Gentisat

Zur Überprüfung des Wachstums konnte bei der Kultivierung mit Eisenhydroxid nicht eine Zunahme der OD₅₇₈ herangezogen werden. So wurde unter dem Mikroskop abgeschätzt, ob die Anzahl der Bakterien gestiegen war. Außerdem wurde in regelmäßigen Abständen die Fe²⁺-Konzentration bestimmt. Gelegentlich wurde mit Hilfe der HPLC überprüft, ob eine Substratabnahme zu verfolgen war.

Durch die Reaktionen zwischen Protocatechuat und den verschiedenen Eisenspezies war eine Messung der Protocatechuatkonzentration äußerst problematisch. Dabei lag die Anfangskonzentration schon weit unter dem zu erwartenden Wert.

Keiner der im Labor bereits vorhandenen eisenreduzierenden Stämme (*Geobacter sulfurreducens* DFR 1 und DFR 2, *Geobacter metallireducens* Anreicherungen FON II, H₂M II, AcMN II und die Kulturen 3-2-A und 3-3-D) konnte auf Protocatechuat wachsen. Dazu wurden die verschiedenen Kulturen wie die Anreicherungen 10 %-ig in Medium gegeben, welches 1 mM Protocatechuat und 20 mM Eisenhydroxid enthielt. *G. metallireducens* konnte auch nicht mit Eisen(III)citrat und Protocatechuat wachsen. Nach vier Wochen konnte eine geringfügige Zunahme von Fe(II) (3 mM) in den Ansätzen mit *G. metallireducens* mit Eisen(III)citrat und Gentisat gemessen werden. Bei *G. metallireducens* wurde anschließend noch überprüft, ob eine Zugabe von Acetat zu der Kultur zu einer Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) führt. Das war bei allen drei Substraten festzustellen.

3.3 Anreicherung und Isolierung von eisenreduzierenden Bakterien auf Dihydroxybenzoaten

3.3.1 Beschreibung des Inokulums

3.3.1.1 Sedimentkerne

Bei den Sedimentkernen waren farbliche Heterogenitäten zu erkennen. Die obere Schicht bestand aus flockigem Material, während die unterliegende Säule

kompakter war. Diese konnte in eine ca. 2 cm dicke rötliche Schicht, darunter 5 – 10 cm dicke graue Schicht und einer unteren grau-schwarzen Schicht eingeteilt werden. Die Übergänge der einzelnen Lagen waren fließend. Da es sich um Sedimentkerne aus dem Bodensee-Profundal handelte, die untereinander wenig Varianz aufweisen, können von anderen Sedimentkernen bestimmte physikalische Parameter übernommen werden. Aus anderen Untersuchungen mit Bodensee-Profundalsedimenten ist bekannt, dass ab einer Tiefe von weniger als 0,5 cm die Sauerstoffsättigung des Sediments bei 0 % ist (Benz 1998), die Konzentration an Eisen(II) mit der Tiefe zunimmt (Benz 1998) und der pH des Sedimentkerns zwischen 6,8 und 7,2 liegt (Kappler et al., in Vorbereitung).

3.3.1.2 Bodenproben

Die Bodenprobe aus dem Uniwald (Konstanz) bestand aus relativ trockenem, kompaktem Material, das mit einer Laubschicht bedeckt war. Nach dem beschriebenen Verfahren (Öhlinger 1993) konnte nach 30 minütiger Inkubation der Probe in 0,01 M CaCl_2 -Lösung ein pH von 5,6 in der Lösung gemessen werden. Von dem Bodenmaterial wurde keine Eisenbestimmung vorgenommen, durch die rötlich-braune Farbe konnte jedoch angenommen werden, dass Eisen ausreichend vorhanden wäre. Der Standort im Wald bietet Anlass zur Annahme, dass Protocatechuat-abbauende Organismen vorhanden sein könnten.

3.3.2 Verlauf der Anreicherungen

Die Anreicherungen wurden zunächst nur optisch verfolgt. Dabei spielte die Beobachtung der Farbänderung des Niederschlags eine große Rolle. Durch die Zugabe von amorphem Eisenhydroxid war zu Beginn ein großvolumiger rost-roter Niederschlag in den Kulturflaschen. Im Laufe der Eisenreduktion wechselte die Farbe zu grau oder schwarz. Außerdem reduzierte sich das Volumen des Niederschlages erheblich.

Die Anreicherungen mit Protocatechuat wiesen auch eine intensive violette Färbung auf, die durch einen Komplex von Protocatechuat mit FeCO_3 hervorgerufen wird. Wurden FeCl_2 und Protocatechuat in Kaliumphosphatpuffer (pH 7) gegeben entstand keine violette Farbe. In einigen Kulturen verschwand diese Tönung während der Bebrütung (Abb. 15), diese wurden dann weiter übertragen.

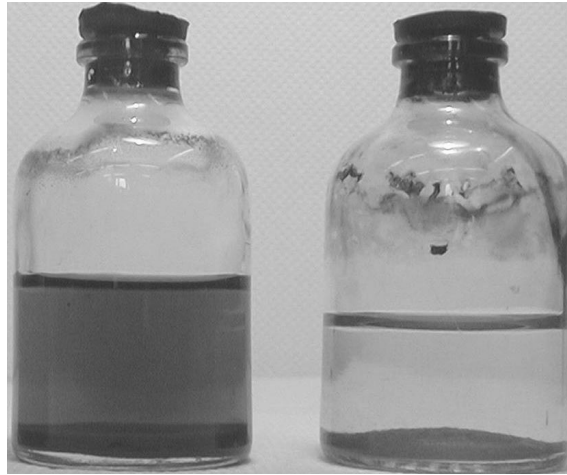


Abb. 15: Anreicherungskultur eisenreduzierender Bakterien, die auf Protocatechuat als einziger Energie und Kohlenstoffquelle wachsen können. Abgebildet sind eine frisch angeimpfte Anreicherungskultur (linke Flasche) und eine Anreicherungskultur nach 4 Wochen Inkubation (rechte Flasche).

Sobald nach 2 Wochen bis 3 Monaten eine Veränderung in den Kulturfläschchen sichtbar war, wurden die Anreicherungen auf frisches Medium übertragen. Zum Teil wuchsen Kulturen, die zu früh übertragen wurden, sehr langsam an, so dass eine Übertragung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgreicher war.

Die Anreicherungen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop betrachtet. Zu Beginn der Anreicherung waren viele verschiedene morphologische Typen im Bild, neben Kokken, länglichen Kokken, lange Stäbchen, Spirillen und Vibrionen waren bei den Sedimentproben auch noch Diatomeen zu sehen. Das mikroskopische Bild vereinheitlichte sich zunehmend, bis in der zweiten Übertragung der Sedimentproben auf Protocatechuat kleine, bewegliche Vibrionen dominierten.

Zudem wurde später auch in regelmäßigen Abständen die Fe(II)- und die Protocatechuatkonzentration bestimmt. Das eingesetzte Fe(III) wurde vollständig zu Fe(II) reduziert (Abb. 16). Trotz der bereits erwähnten Probleme, die sich bei der HPLC Messung zur Bestimmung der Protocatechuatkonzentration ergaben, konnte eine Abnahme von Protocatechuat beobachtet werden (Abb. 16).

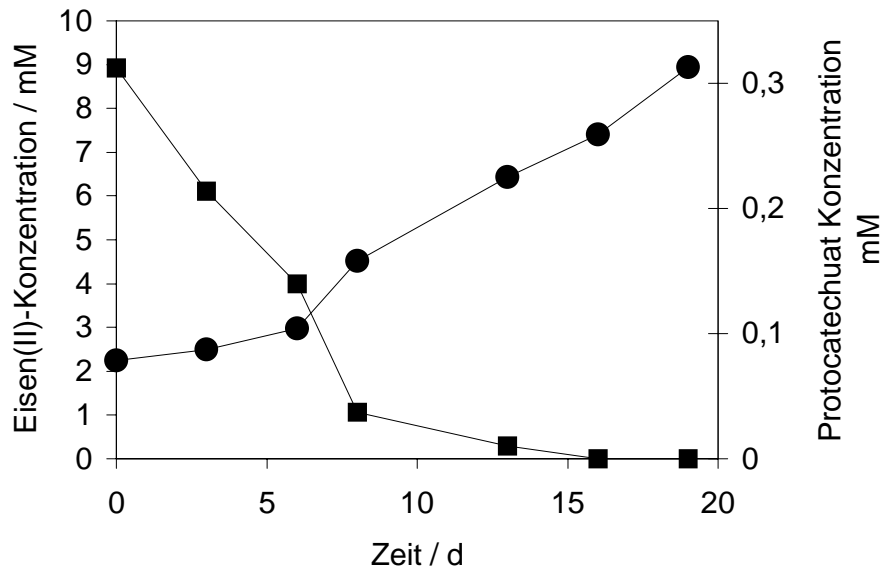


Abb. 16: (●) Eisen(III)reduktion und (■)Protocatechuatabbau einer Anreicherung aus Bodensee-Profundalsediment in der zweiten Übertragung auf Protocatechuat nach dreimaligem Passagieren auf Benzolat.

3.3.3 Isolierung von Reinkulturen

3.3.3.1 Beschreibung der ersten Verdünnungsreihe

Die Agar-Shake Verdünnungsreihen hatten je nach verwendetem Elektronenakzeptor unterschiedliche Farben.

Shake-Reihen mit AQDS waren zu Beginn durch den Protocatechuat-Eisen-Komplex violett. Nach zwei bis vier Wochen waren die niedrigen Verdünnungsstufen komplett reduziert. Sie erhielten dann eine orangene Farbe, die violette Tönung verschwand. Es waren einige helle, kleine, kugelförmige und wenige schwarze, große Kolonien mit ausgefranster Peripherie gewachsen. Die vierte Verdünnungsstufe war hingegen farblos und enthielt viele sehr kleine, dunkelrote Kolonien mit scharfen Umrissen. In den höheren Verdünnungen hingegen war keinerlei Veränderung zu beobachten.

Wurde Fumarat als Elektronenakzeptor eingesetzt, waren auch diese Röhren zu Beginn violett. Nach ca. zwei Wochen waren bis zur sechsten Verdünnung kugelförmige, schwarze Kolonien gewachsen. Nach weiterer Bebrütung konnte man kleinere und größere Kolonien unterscheiden. Auch hier waren viele der hellen, kleineren Kolonien vorhanden.

Die Kontrollreihe ohne Protocatechuat unterschied sich, bis auf das Fehlen der violetten Farbe, nicht von der mit Protocatechuat. Auch hier waren bis zur sechsten Verdünnung Kolonien gewachsen. Dabei handelt es sich um Fumaratgärer.

Shake-Reihen mit Protocatechuat ohne Elektronenakzeptor waren bis zur fünften Verdünnung vereinzelt mit schwarzen Kolonien bewachsen, in der sechsten Verdünnung waren dann noch viele kleine, blasse, scheibenförmige Kolonien in der oberen Hälfte des Röhrchens zu sehen, in tieferen Lagen waren noch wenige rosarote, kugelförmige Kolonien. Bei diesen Kolonien kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Protocatechuat vergärende Organismen handelt.

$K_3Fe(CN)_6$ führte in den Shakes zu einer grau-braunen Farbe. Nach ca. drei Wochen änderte sich diese bis zur fünften Verdünnung in eine leichte gelb-grüne Tönung. Dabei waren sehr viele türkisfarbene, kugelförmige Kolonien zu sehen. In der sechsten Verdünnung blieb die graue Trübung noch bestehen, und es waren nur wenige intensiv türkisfarbene Kolonien gewachsen von denen einige gepickt wurden.

3.3.3.2 Beschreibung der zweiten Verdünnungsreihe

Mehrere Kolonien aus dem Ansatz mit $K_3Fe(CN)_6$ und Protocatechuat wurden gepickt und in eine zweite Agar-Shake-Verdünnungsreihe gegeben. Auch hier wurde als Kontrolle eine Verdünnungsreihe nur mit Protocatechuat ohne $K_3Fe(CN)_6$ angesetzt.

In einigen Verdünnungsreihen waren hier nach drei Wochen schon vereinzelt Kolonien gewachsen. In einer Reihe waren in der 3. Verdünnung die gleichen Kolonien zu sehen, wie die, die ursprünglich gepickt wurden. Im Kontrollansatz ohne $K_3Fe(CN)_6$ sind zum Einen kleine Kolonien, die in der oberen Schicht im Agar und auch auf der Oberfläche zu sehen; zum Anderen sind in tieferen Schichten kleine Kolonien, die Blasen im Agar verursachen.

Die Kolonien, die in den anderen Reihen gewachsen sind, unterscheiden sich jedoch von denen aus der ersten Reihe. Sie sind relativ klein und bilden einen Hof. Außerdem sind sie nicht so intensiv türkis gefärbt. Es ist nur noch dieser Kolonietyp in allen Ansätzen zu sehen. In den Kontrollansätzen sind die gleichen Kolonien zu sehen.

3.3.3.3 Charakterisierung der Protocatechuat verwertenden Neuisolate

Eine Reinkultur konnte im Laufe der Arbeit noch nicht gewonnen werden. Es befinden sich noch die erwähnten Ansätze in der zweiten Agar-Shake-Verdünnungsreihe.

4. Diskussion

4.1 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch denitrifizierende Bakterien

Während des Wachstums von *T. aromatica* AR-1 auf Protocatechuat konnte man eine bräunliche Verfärbung des Mediums beobachten. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet war dunkelbraun. Im mikroskopischen Bild erschienen die Zellen dunkler als auf Benzoat gewachsene Zellen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Protocatechuat nicht vollständig zu CO₂ oxidiert wurde, sondern zum Teil zu einem Polymer kondensiert und in die Zellen eingelagert wurde. Möglicherweise wurde die Verfärbung durch einen Speicherstoff hervorgerufen, da bei den Zellsuspensionsversuchen aufgefallen ist, dass Nitrat auch ohne die Zugabe von Protocatechuat reduziert wurde. Andererseits müsste in diesem Fall die Elektronenbilanz geschlossen werden, sobald die Kultur länger als bis zum vollständigen Verbrauch des Protocatechuats inkubiert wird. Dies war jedoch nicht der Fall. Insofern widersprechen die Beobachtungen der Zellsuspensionsexperimente denen der Elektronenbilanzerstellung. Jedoch wurde von den Ansätzen, mit denen die Elektronenbilanz erstellt wurde, nur noch ca. 5 h nach Verbrauch des Substrats Proben zur Nitrat- und Nitritbestimmung genommen. Um sicherzustellen, dass die beobachtete Nitritentwicklung in Abwesenheit von Protocatechuat in den Zellsuspensionsexperimenten kein Artefakt ist, sollte von einer Kultur noch längere Zeit nachdem Protocatechuat komplett abgebaut wurde, die Nitritkonzentration bestimmt werden.

Der Abbau von Protocatechuat fand nur in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors statt, somit kann eine Vergärung des Substrats durch *T. aromatica* AR-1 ausgeschlossen werden.

4.1.1 Induktion der verschiedenen Abbauewege

Die Ergebnisse aus den Experimenten zum diauxischen Wachstum zeigen, dass bei Wachstum auf einem Substratgemisch nicht unbedingt das Phänomen der Diauxie auftreten muss. α -Resorcyilat und Protocatechuat werden gleichzeitig abgebaut, wobei *T. aromatica* AR-1 eine Präferenz für α -Resorcyilat aufweist. Eine Inhibition einer der beiden möglicherweise unterschiedlichen Stoffwechselwege

liegt hier nicht vor. Aus früheren Untersuchungen von *T. aromatica* AR-1 ist bekannt, dass α -Resorcyolat mit einer höheren Rate abgebaut wird als Protocatechuat ($t_{d,\alpha\text{-Resorcyolat}} = 12,5 \text{ h}$ (Gorny 1993); $t_{d,\text{Protocatechuat}} = 21 \text{ h}$). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass α -Resorcyolat schneller verbraucht ist, wenn α -Resorcyolat und Protocatechuat im Medium vorliegen, und der Abbau nicht durch andere Substrate gehemmt wird. Auch die Induktionsexperimente weisen darauf hin, dass α -Resorcyolat über einen anderen Wege abgebaut wird als Protocatechuat. Dabei können beide Stoffwechselwege problemlos nebeneinander existieren. Also kann davon ausgegangen werden, dass Protocatechuat nicht als Repressor für den HHQ-Weg, über den α -Resorcyolat abgebaut wird, wirkt. Ein interessanter Aspekt ist jedoch, dass Zellen, die auf α -Resorcyolat gewachsen sind, Protocatechuat ohne weiteres abbauen können, jedoch nicht umgekehrt. Folglich scheint der Abbau von Protocatechuat keiner besonderen Induktion zu bedürfen. Der Abbau von α -Resorcyolat wird jedoch nur induziert, wenn die Kultur auf α -Resorcyolat gewachsen ist.

Ganz anders verhält es sich bei einer Substratkombination von α -Resorcyolat, Protocatechuat und Benzoat. Hierbei scheint der Stoffwechsel von Protocatechuat nicht gehemmt zu sein, der von α -Resorcyolat jedoch sehr wohl. Der Abbau von α -Resorcyolat unterliegt in Anwesenheit von Benzoat einer Katabolitrepression (Philipp und Schink 1999). Hier spiegelt sich auch das Ergebnis aus den Induktionsexperimenten wider: Kulturen, die auf Benzoat oder Protocatechuat angezogen wurden, bauen in dichter Zellsuspension α -Resorcyolat nicht oder nur in äußerst geringem Maß ab.

Bei einer Kombination von Benzoat und Protocatechuat als Substrate war zwar in einem Ansatz ein diauxisches Wachstum zu erkennen, es war jedoch nicht sehr ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass der Protocatechuatabbau nicht wie der Abbau von α -Resorcyolat einer Repression durch Benzoat unterliegt. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Zellsuspensionsexperimenten ergibt sich daraus ein geschlossenes Bild: Zellen, die auf Benzoat gewachsen waren, können Protocatechuat abbauen, α -Resorcyolat jedoch nicht. Auf α -Resorcyolat angewachsene Zellen können auch ohne lag-Phase Protocatechuat abbauen, jedoch Benzoat nur nach längerer Inkubation (Philipp 1999). Sind die Zellen auf Protocatechuat gewachsen, können sie sofort Benzoat abbauen, α -Resorcyolat

jedoch nicht. Diese Ergebnisse erklären die sehr lange lag-Phase bei dem Wachstum auf einer Kombination der drei Substrate Protocatechuat, Benzoat und α -Resorcyilat. Durch die Anwesenheit von Benzoat ist der Abbau von α -Resorcyilat inhibiert, der von Protocatechuat jedoch nicht (oder nicht so stark). Also wird Protocatechuat sofort anschließend abgebaut. Dadurch wird die Induktion für α -Resorcyilat noch mehr verzögert. Eine Hemmung ist aber nicht so stark ausgeprägt wie bei Benzoat und α -Resorcyilat.

Dieses Bild wird durch das Ergebnis aus dem Western-Blot noch ergänzt. So sind Zellen, die auf Benzoat oder Protocatechuat gewachsen sind, sowohl für den Abbau von Benzoat als auch für den Abbau von Protocatechuat induziert, Zellen die auf α -Resorcyilat gewachsen sind, weisen nur ein schwaches Signal für die Benzoyl-CoA-Reduktase, die als Schlüsselenzym für den Benzoyl-CoA-Weg angesehen wird, auf. Allerdings wird Protocatechuat von Zellsuspensionen abgebaut, die zuvor auf α -Resorcyilat gewachsen waren. Das könnte einen Hinweis darauf sein, dass der Abbau von Protocatechuat sowohl über den Benzoyl-CoA-Weg als auch über den HHQ-Weg laufen kann. Zu diesem Thema wurden schon gegensätzliche Ergebnisse geliefert. So konnte Gorny (1993) eine Acyl-CoA-Synthetase Aktivität mit Protocatechuat (Benzoat, 3-HB und 4-HB) als Substrat zeigen. Des weiteren konnte in der gleichen Arbeit die Reduktion von Protocatechuyl-CoA und von 4-Hydroxybenzoyl-CoA, nicht jedoch von 3-Hydroxybenzoyl-CoA mit verschiedenen Elektronendonoren gemessen werden. Möglicherweise sind die Enzyme zur Aktivierung von Protocatechuat und zur Reduktion von Protocatechuyl-CoA relativ unspezifisch und können neben ihrem eigentlichen Substrat (vermutlich Benzoat) auch andere aromatische Säuren mit CoA verestern bzw. aktivierte aromatische Säuren reduzieren.

Dabei sollte nicht vergessen werden, dass bei Wachstum auf Protocatechuat die Benzoyl-CoA-Reduktase nachweisbar ist. Die Induktion dieses Enzyms muss durch Protocatechuat ausgelöst worden sein. Eine Aktivierung von α -Resorcyilat mit CoA konnte bisher nicht beobachtet werden (Gallus und Schink 1998). Das stützt die Annahme, dass der Weg des Abbaus von Protocatechuat und Benzoat sich von dem des Abbaus von α -Resorcyilat unterscheidet. Auf der anderen Seite konnten in protocatechuatgewachsenen Zellen geringe Aktivitäten der HHQ-Dehydrogenase ($2,0 \text{ mU mg Protein}^{-1}$) gemessen werden (Philipp 1999), was für

einen oxidativen Abbauweg von Protocatechuat spricht. Diese Aktivität ist jedoch sehr gering und kann mit der HHQ-Dehydrogenase-Aktivität benzoatgewachsener Zellen verglichen werden.

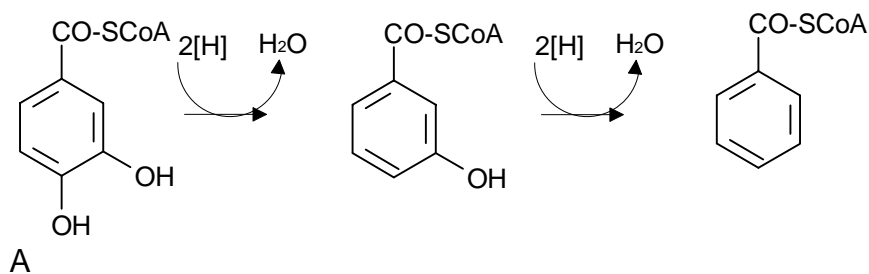
Scheinbar wird Protocatechuat über den gleichen Weg wie Benzoat abgebaut. Es tritt jedoch trotzdem eine Wachstumsverzögerung ein, wenn *T. aromatica* AR-1 in Medium wächst, in dem sowohl Benzoat als auch Protocatechuat vorliegt. Benzoat wird wohl das bevorzugte Substrat für die entsprechenden Enzyme im Abbau dieser beiden Aromaten sein. Es muss aber ein weiterer Mechanismus vorhanden sein, der das zweiphasige Wachstumsverhalten erklärt. Möglicherweise ist dieses Verhalten keine echte Diauxie, sondern liegt nur darin begründet, dass Protocatechuat langsamer abgebaut wird, genauso wie es bei dem Substratgemisch Protocatechuat- α -Resorcyolat der Fall sein könnte.

Der Abbau von den verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Aromaten durch *T. aromatica* wird durch Induktoren und Repressoren reguliert. Dabei muss α -Resorcyolat als Induktor der HHQ-Wegs fungieren und Benzoat oder auch Benzoyl-CoA als Repressor für diesen Weg. Die Experimente geben keinen Hinweis darauf, dass Protocatechuat als Repressor wirkt. Dass α -Resorcyolat nicht abgebaut wird, wenn die Zellen auf Protocatechuat gewachsen waren, lässt sich damit erklären, dass der Induktor im Wachstumsmedium nicht vorlag. Der Abbau von Protocatechuat wird sowohl von Benzoat als auch von Protocatechuat induziert. Das gleiche gilt für den Abbau von Benzoat. In *Rhodopseudomonas palustris* gibt es Hinweise darauf, dass Benzoyl-CoA selbst der Induktor für den Benzoyl-CoA-Weg ist (Egland und Harwood 1999). Ist dies für *T. aromatica* AR-1 ebenso der Fall, muss Protocatechuyl-CoA dehydroxyliert werden, damit Benzoyl-CoA in der nötigen Konzentration in den Zellen vorliegt, um die Enzyme für den Benzoyl-CoA-Weg zu induzieren. Trotzdem sollte nicht vergessen werden, dass einige Enzyme des Benzoyl-CoA-Wegs konstitutiv vorhanden sind, die Benzoyl-CoA-Synthetase (Gallus und Schink 1998), sowie die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase und die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase (Gallus 1996). Von den genannten Enzymen konnten in α -resorcyolatgewachsenen Zellen spezifische Aktivitäten gemessen werden, die nur unwesentlich geringer waren als die in benzoatgewachsenen Zellen (Gallus 1996; Gallus und Schink 1998).

Um den Abbau von Protocatechuat durch *T. aromatica* AR-1 weiter aufzuklären, ist es wichtig, ein geeignetes System zu finden, in dem Protocatechuat im zellfreien Extrakt umgesetzt wird. Hierzu gibt es schon Ansätze von Gorny (1993), wobei beobachtet wurde, dass Protocatechuat zu Protocatechuyl-CoA aktiviert und anschließend reduziert wird.

Eine weitere Möglichkeit für den Abbau von Protocatechuat ist die, dass Protocatechuat wie Benzoat mit CoA aktiviert wird, anschließend die *para*-ständige Hydroxylgruppe entfernt wird und die Benzoyl-CoA-Reduktase an dieser Stelle zwei Elektronen in den Ring einfügt, ohne dass die zweite Hydroxylgruppe eliminiert wird. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, dass von Protocatechuyl-CoA beide Hydroxylgruppen entfernt werden und Benzoyl-CoA dann wie im Benzoatabbau reduziert wird. Somit könnte auch einfach erklärt werden, dass der Abbau beider Substrate (Protocatechuat und Benzoat) durch Protocatechuat induziert wird, wenn sich die Ergebnisse von *R. palustris* auf *T. aromatica* übertragen lassen.

In Abb. 17 sind vier verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt, wie der Abbau von Protocatechuat nach einer Aktivierung mit CoA weitergehen könnte. Eine weitere Möglichkeit könnte über eine Oxidation von Protocatechuyl-CoA führen, so dass in folgenden Schritten Hydroxyhydrochinon entstehen könnte. Dazu müsste nur noch eine weitere Hydroxylgruppe in *meta*-Stellung zu den bereits in Protocatechuat vorhandenen eingefügt werden. Eine Decarboxylierung erscheint unglaublich, wenn zuvor Protocatechuat mit CoA aktiviert wurde. Solch eine Reaktion wurde bisher noch nie beschrieben.



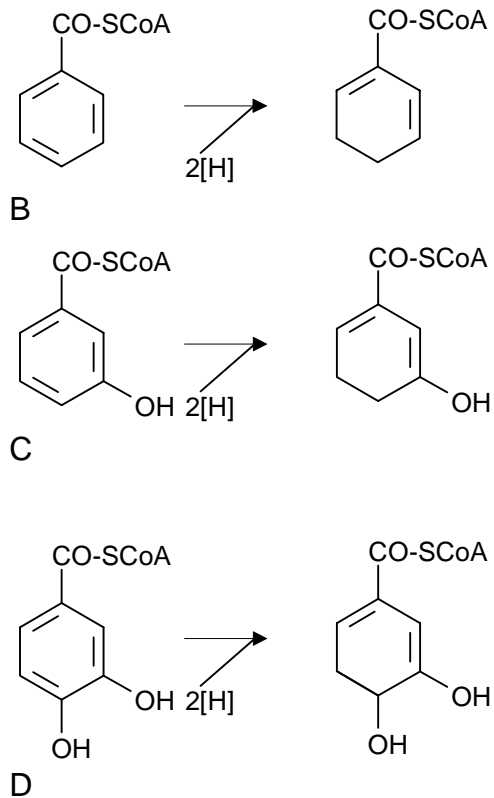


Abb. 17: Dargestellt sind die Möglichen Schritte im Abbau von Protocatechuat nach der Aktivierung zu Benzoyl-CoA. A: Reduktive Eliminierung beider Hydroxylgruppen; B: Anschließende Reduktion von Benzoyl-CoA; C: Reduktion von 3-Hydroxybenzoyl-CoA; D: Reduktion von Protocatechuyl-CoA

4.2 Untersuchungen zum Abbau von Protocatechuat durch eisenreduzierende Bakterien

4.2.1 Anreicherung und Isolation von Protocatechuat-abbauenden Eisenreduzierern

Zu Beginn war besonders die Verfärbung des Kulturmediums aufgefallen. Diese Verfärbung trat nur in Anwesenheit von Protocatechuat und FeCl_2 im Medium auf. Da diese Verfärbung nach Inkubation in einigen Ansätzen wieder verschwand, in anderen jedoch nicht, wurde davon ausgegangen, dass in ersteren ein Protocatechuatabbau stattgefunden hat. Catecholate sind bekannt in ihrer Funktion als Siderophore (Bergeron und McManis 1991; Winkelmann 1991), das heißt, sie haben komplexbildende Eigenschaften. Siderophore sind dann notwendig, wenn Eisen in geringer Konzentration für die Bakterien verfügbar ist. Dabei handelt es sich meist um dreiwertige Eisenspezies, die dann von den Siderophoren gebunden werden. Diese violette Farbe im Medium wird vermutlich von Eisen(III)ionen, die

bei der Reduktion des Mediums durch FeCl_2 entstanden sind, verursacht. Dieses komplexierte Eisen(III) stellt eine weitere Quelle als Elektronenakzeptor dar. Auf der anderen Seite wird durch chemische Reaktionen im Medium, die im Zusammenhang mit der Komplexbildung stehen, die nicht weiter aufgeklärt wurden, auch die Verfügbarkeit der Energie- und Kohlenstoffquelle, Protocatechuat, beeinflusst.

In den Agar-Shake-Verdünnungsreihen konnte man erkennen, dass sich unter den angereicherten Bakterien nicht nur Eisenreduzierer, sondern auch gärende Mikroorganismen befinden. Selbst in der zweiten Verdünnungsreihe waren diese Gärer noch vorhanden. Es ist möglich, dass es sich hierbei um Organismen handelt, die Protocatechuat vergären, aber auch Eisen(III) reduzieren, da während der Anreicherung immer auch Eisen(III) reduziert wurde. Es gibt bereits viele Hinweise auf gärende Organismen (*Escherichia coli*, *Clostridium pasteurianum*, *Enterococcus cecorum*, *Propionibacterium freudenreichii* und *Lactobacillus lactis*), die während des Gärungsprozesses entstandene Reduktionsäquivalente an anorganische Elektronenakzeptoren wie Eisen(III), Mangan(IV) oder an oxidierte Huminsäuren abgeben (Benz et al. 1998; Lovley 1991). Dabei kann das Gärproduktspektrum hin zu oxidierten Produkten verschoben werden und die Kultur einen höheren Zellertrag erreichen.

Zum Anderen kann es sich auch um eine Mischkultur handeln, in welcher ein Partner Protocatechuat vergärt und ein zweiter die Gärprodukte unter Reduktion von Eisen(III) mineralisiert. Bei der Vergärung von Protocatechuat wurde schon beobachtet, dass Protocatechuat nur decarboxyliert wird, Brenzcatechin aber nicht weiter abgebaut wird (Zhang und Wiegel 1990). In methanogenen Anreicherungen wurde ebenfalls eine Decarboxylierung zu Brenzcatechin beobachtet (Tschech 1985). Brenzcatechin wird in dieser Anreicherung weiter zu Acetat gespalten und dann vollständig zu CO_2 und Methan umgesetzt. Die Vermutung, dass es sich bei der Anreicherung, die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt wurde, um eine syntrophe Kultur handelt, liegt nahe, da im Verlauf der Kultivierung immer zuerst die violette Farbe verschwand während die Eisen(III)reduktion noch weiter lief. Um dies zu überprüfen, müssten Produktanalysen von Kulturen vorgenommen werden, die ohne Elektronenakzeptor wachsen. Außerdem könnte ohne weiteres untersucht werden, ob Acetat (oder ein anderes Gärprodukt) zu einer Eisen(III)reduktion in der Anreicherungskultur führt.

Mit der Strategie der Voranreicherung auf schlecht vergärbaren Substraten, wie Acetat oder Benzoat, wurde versucht, eine Anreicherung von Gärern in der Kultur zu vermeiden. Das schließt natürlich nicht aus, dass trotzdem Protocatechuatgärer angereichert wurden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Bakterien Sulfat reduzieren, das dabei entstehende Sulfid wiederum reagiert mit Eisen(III) zu Eisen(II), wobei oxidiertere Schwefelspezies (S^0 , SO_4^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, S_5^{2-} oder S_4^{2-}) entstehen (Benz 1998; Peiffer 1994). Dieser Kreislauf kann so lange fortgeführt werden, bis kein oxidierter Elektronenakzeptor mehr zur Verfügung steht. Sulfidbestimmungen konnten auf diese Vermutung keinen Hinweis liefern, was an den geringen Konzentrationen des eingesetzten Sulfats und den oben erwähnten chemischen Reaktionen in den Kulturflaschen liegen kann. Es konnte jedoch immer wieder beobachtet werden, dass in einigen Ansätzen sich im Laufe der Inkubationszeit der Niederschlag schwarz (Magnetit oder FeS) verfärbte. Tests mit einem Magneten, ob es sich dabei möglicherweise um Magnetit handelte, fielen negativ aus. Außerdem konnte auch gelegentlich ein Sulfidgeruch wahrgenommen werden. Zu Beginn wurde Sulfat in der Anreicherung auch noch in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, was diese Vermutung noch bestärkte. Diese Anreicherungsbedingungen waren sowohl für Sulfatreduzierer als auch für Eisenreduzierer geeignet. Auch hier bietet sich an, mit einem einfachen Test zu überprüfen, ob in der Anreicherungskultur Sulfat in Anwesenheit von Protocatechuat reduziert wird. Des Weiteren kann untersucht werden, ob mögliche Gärprodukte zu einer Reduktion von Sulfat führen. Um die daraus gewonnene Erkenntnis in Zusammenhang mit der beobachteten Eisen(III)reduktion zu bringen, müsste sterilen Ansätzen, unter Kultivierungsbedingungen, Sulfid zugegeben werden. Die darauf folgende Eisen(II)bildung kann anschließend mit der in den Anreicherungskulturen beobachteten Eisen(II)bildung in Relation gestellt werden. Möglicherweise sind auch für die sulfidabhängige Eisen(III)reduktion Bakterien verantwortlich. Da Sulfid durch Fe(III) rasch chemisch oxidiert wird (Canfield et al. 1993 B; Ehrlich 1995), ist eine Kultivierung solcher Organismen nur in Gradientensystemen möglich (Benz 1998). Allerdings ist es durchaus möglich, dass Sulfid chemisch zu elementarem Schwefel oxidiert wird, dessen anschließende Oxidation, die chemisch nur sehr langsam erfolgt (Berner 1970), an eine mikrobielle Eisen(III)reduktion gekoppelt ist.

4.2.2 Wachstum von Reinkulturen auf Protocatechuat

Die eisenreduzierenden Kulturen, die in dieser Arbeit auf die Fähigkeit zum Wachstum auf Protocatechuat, α -Resorcylat und Gentisat hin getestet wurden, konnten auf keinem der genannten Substrate in den eingesetzten Konzentrationen wachsen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Kulturen durch die Substrate vergiftet wurden, da die Substrate immer 1 mM und nicht in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurden. Außer bei *G. metallireducens* wurde nie überprüft, ob eine acetatabhängige Reduktion von Eisen(III) stattfindet. Acetat wurde in den Ansätzen mit *G. metallireducens* nach vier Wochen Inkubation mit den Dihydroxybenzoaten zugegeben, woraufhin eine Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) folgte. Daraus kann geschlossen werden, dass *G. metallireducens* nicht durch die Aromaten vergiftet wurde. Eine aromatenabhängige Reduktion von Eisen(III) konnte jedoch nur mit Gentisat als Substrat festgestellt werden, mit α -Resorcylat oder Protocatechuat jedoch nicht. Wachstum auf diesen Substraten hat demnach nicht stattgefunden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird der anaerobe Abbau von Protocatechuat durch den denitrifizierenden Stamm *Thauera aromatica* AR-1 beschrieben. Anreicherungen von Bakterien, die Protocatechuat, α -Resorcyilat oder Gentisat mit Eisen(III) als Elektronenakzeptor abbauen können, bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen zum anaeroben Abbau dieser Dihydroxybenzoate.

Der Abbau von Protocatechuat durch *Thauera aromatica* AR-1 wird vermutlich über eine Veresterung mit CoA eingeleitet. Die Benzoyl-CoA-Reduktase konnte in Zellen, die auf Protocatechuat oder Benzoat gewachsen waren, immunologisch nachgewiesen werden, nicht jedoch in Zellen die auf α -Resorcyilat gewachsen waren.

Beim Abbau von Protocatechuat in dichter Zellsuspension akkumuliert ein Zwischenprodukt, dessen Signal in der HPLC-Analyse im weiteren Verlauf des Experiments wieder abnimmt. Eine Identifikation des Produkts steht noch aus. In wachsenden Kulturen konnte eine Dunkelfärbung der Zellen und des Kulturüberstands beobachtet werden.

Eine Kultur, die auf Protocatechuat und amorphem Eisen(III)hydroxid angereichert wurde, befindet sich im zweiten Reinigungsschritt. Die Anreicherungskultur reduzierte Eisen(III) während des Wachstums auf Protocatechuat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle. Die Anreicherungen auf α -Resorcyilat und Gentisat wurden nicht weiter verfolgt.

Die Stämme *Geobacter sulfurreducens* DFR1 und DFR2, *Geobacter metallireducens*, die Kulturen 3-2-A, 3-3-D, FON II, H₂M II und AcMN II konnten mit amorphem Eisen(III)hydroxid als Elektronenakzeptor nicht auf Protocatechuat, α -Resorcyilat oder Gentisat wachsen. *Geobacter metallireducens* konnte auch nicht mit Eisen(III)citrat auf diesen Substraten wachsen, mit Gentisat als Wachstumssubstrat war eine geringfügige Eisen(III)reduktion festzustellen.

1. Literaturverzeichnis

- Anders, H. J., A. Kaetzke, P. Kämpfer, W. Ludwig und G. Fuchs.** 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera* as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 327-333.
- Atlas, R. M. und R. Bartha.** 1987. Biogeochemical Cycling: Carbon, Hydrogen, and Oxygen. In: *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 322-325. The Benjamin/Cummings Publ. Co, Menlo Park, CA.
- Aziz, N. H., S. E. Farag, L. A. Mousa und M. A. Abo-Zaid.** 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.* **93**: 43-54.
- Beller, H. R. und A. M. Spormann.** 1997. Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition of fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**: 670-676.
- Benz, M., A. Brune und B. Schink.** 1998. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **169**: 159-165.
- Benz, M., B. Schink und A. Brune.** 1998. Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4507-4512.
- Benz, M.** 1998. Funktion von Eisenverbindungen in dissimilatorischen mikrobiellen Redoxprozessen. Dissertation, Universität Konstanz.
- Bergeron, R. J. und J. S. McManis.** 1991. Synthesis of catecholamide and hydroxamate siderophores. In: *CRC Handbook of microbial iron chelates* (ed. G. Winkelmann), CRC Press, Florida.
- Berner, R. A.** 1970. Sedimentary pyrite formation. *Am. J. Sci.* **268**: 1-23.
- Biegert, T., G. Fuchs, J. Heider.** 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668.

- Bisaillon, J. G., F. Lépine, R. Beaudet und M. Sylvestre.** 1991. Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 2131-2134.
- Blakemore, R. P.** 1982. Magnetotactic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **36**: 217-238.
- Boll, M. und G. Fuchs.** 1995. Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**: 921-933.
- Boll, M. und G. Fuchs.** 1998. Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **251**: 946-954.
- Boll, M., S. S. P. Albracht und G. Fuchs.** 1997. Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic metabolism. A study of adenosintriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **244**: 840-851.
- Bonting, C. F. C. und G. Fuchs.** 1996. Anaerobic metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**: 402-408.
- Bronstein, I., J. C. Voyta, Y. Vant Erve und L. J. Kricka.** 1991. Advances in ultrasensitive detection of proteins and nucleic acids with chemiluminescence: novel derivatized 1,2-dioxetane enzyme substrates. *Clin. Chem.* **37**: 1526-1527.
- Brune, A. und B. Schink.** 1990. Pyrogallol-to-phloroglucionol conversion and other hydroxyl-transfer reactions catalyzed by cell extracts of *Pelobacter acidigallici*. *J. Bacteriol.* **172**: 1070-1076.
- Brune, A. und B. Schink.** 1992. Phloroglucionol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: Fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol.* **157**: 417-424.
- Caccetta, R. A., K. D. Croft, L. J. Beilin und I. B. Puddey.** 2000. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 67-74.
- Canfield, D. E., B. B. Jørgensen, H. Fossing, R. Glud, J. Gundersen, N.B. Ramsing, B. Thamdrup, J. W. Hansen, L. P. Nielsen und P. O. J. Hall.** 1993 A.

Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar. Geol.* **113**: 27-40.

Canfield, D. E., B. Thamdrup und J. W. Hansen. 1993 B. The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: Iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **53**: 3867-3883.

Cline, J. D. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 454-458.

Crichton R.1991. Inorganic biochemistry of iron metabolism. Ellis Horwood Limited, Chichester, UK.

Dagley, S. 1971. Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **6**: 1-46.

Davis, D. H., M. Doudoroff, R. Y. Stanier und M. Mandel. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 375-390

Denger K., H. Laue und A. M. Cook. 1997. Anaerobic taurine oxidation: A novel reaction by a nitrate-reducing *Alcaligenes* sp. *Microbiology* **143**: 1919-1924.

Egland, P. G. und C. S. Harwood. 1999. BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, a Fnr family member. *J. Bacteriol.* **181**: 2102-2109.

Ehrlich, H. L. 1995. Geomicrobiology of Iron. In H. L. Ehrlich (ed.), *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, Inc., New York. 283-346.

Emerson, D. und C. Moyer. 1997. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4784-4792.

Falbe, J. und M. Regiz (eds). 1997. *Römpp Lexikon Chemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Fetzner, S. 1998. Bacterial dehalogenation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 633-657.

Frankel, R. B., R. P. Papaefthymiou, R. P. Blakemore und W. O'Brien. 1983. Fe₃O₄ precipitation in magnetotactic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **763**: 147-159.

Fraústo da Silva, J. J. R. und R. J. P. Williams.1991. *The biological chemistry of the elements*. Clarendon Press, Oxford.

- Gallus, C. und B. Schink.** Anaerobic degradation of α -resorcyate by *Thauera aromatica* strain AR-1 proceeds via oxidation and decarboxylation to hydroxyhydroquinone. Arch. Microbiol. **169**: 333-338.
- Gallus, C., N. Gorny, W. Ludwig und B. Schink.** 1997. Anaerobic Degradation of α -resorcyate by a Nitrate-reducing Bacterium, *Thauera aromatica* Strain AR-1. System. Appl. Microbiol. **20**: 540-544.
- Gibson, J., M. Dispensa und C. S. Harwood.** 1997. 4-hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. J. Bacteriol. **179**: 634-642.
- Gibson, K. J. und J. Gibson.** 1992. Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 696-698.
- Glöckler, R., A. Tschsch und G. Fuchs.** 1989. Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species. FEBS Lett. **251**: 237-240.
- Gorny, N.** 1993. Der anaerobe Abbau von Brenzcatechin und Hydrochinon. Dissertation. Universität Konstanz.
- Gorny, N. und B. Schink.** 1994 A. Hydroquinone degradation via reductive dehydroxylation of gentisyl-CoA by a strictly anaerobic fermenting bacterium. Arch. Microbiol. **161**: 131-135.
- Gorny, N. und B. Schink.** 1994 B. Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. Strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3396-3400.
- Gorny, N., G. Wahl, A. Brune und B. Schink.** 1992. A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. Arch. Microbiol. **158**: 48-53.
- Greenwood, N. N. und A. Earnshaw.** 1984. Chemistry of the elements. Pergamon Press, Oxford.
- Hackett, W. F., W. J. Connors, T. K. Kirk und J. G. Zeikus.** 1977. Microbial decomposition of synthetic ^{14}C -labeled lignins in nature: Lignin biodegradation in a variety of natural materials. Appl. Environ. Microbiol. **33**: 43-51.

- Haddock, J. D. und J. G. Ferry.** 1993. Initial steps in the anaerobic degradation of 3,4,5-trihydroxybenzoate by *Eubacterium oxidoreducens*: characterization of mutants and role of 1,2,3,5-tetrahydroxybenzene. *J. Bacteriol.* **175**: 669-673.
- Haider, K.** 1996. Abbau und Umwandlung der Hauptbestandteile in Pflanzenresten. In: *Biochemie des Bodens.* pp. 22-32. Enke, Stuttgart.
- Hallbeck, L. und K. Pedersen.** 1991. Autotrophic and mixotrophic growth of *Gallionella ferruginea*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2657-5661.
- Harwood C. S., R. E. Parales.** 1996. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 553-590.
- Harwood, C. S., G. Burchardt, H. Herrmann und G. Fuchs.** 1999. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA-pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 439-458.
- Heider, J. und G. Fuchs.** 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**: 577-596.
- Heider, J., M. Boll, K. Breese, S. Breinig, C. Ebenau-Jehle, U. Feil, N. Gad'on, D. Laempe, B. Leuthner, M. El-S. Mohamed, S. Schneider, G. Burchard und G. Fuchs.** 1998. Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **170**: 120-131.
- Hungate, R. E.** 1969. A rolltube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J. R., D. W. Ribbons (eds.). *Methods in microbiology*, vol. 3 B, Academic Press, London: 133-149.
- Kappler, A., M. Benz, B. Schink und A. Brune.** 2000. Depth distribution and redox properties of humic acids and iron species, and enumeration of iron-reducing and humic-acid-reducing bacteria in a freshwater sediment. In Vorbereitung.
- Kluge, C., A. Tschech und G. Fuchs.** 1990. Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **155**: 68-74.
- Koch, J. W. Eisenreich, A. Bacher und G. Fuchs.** 1993. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **211**: 649-661.
- Krieger, C. J., H. R. Beller, M. Reinhard, A. M. Spormann.** 1999. Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *J. Bacteriol.* **181**: 6403-6410.

- Krumholz, R. und M. P. Bryant.** 1988. Characterization of the pyrogallol-phloroglucinol isomerase of *Eubacterium oxidoreducens*. J. Bacteriol. **170**: 2472-2479.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Lee, I. R. und M. Y. Yang.** 1994. Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell. Arch. Pharm. Res. **17**: 476-479.
- Li, W.-T., S. Goodwin.** 1994. The reductive ring cleavage pathway of anaerobic aromatic hydrocarbon degradation by *Geobacter metallireducens*. Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. **94**: 447.
- Lovley, D. R.** 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol. Rev. **55**: 259-287.
- Lovley, D. R. und E. J. P. Phillips.** 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. Appl. Environ. Microbiol. **51**: 683-689.
- Lovley, D. R., E. J. P. Phillips und D. J. Lonergan.** 1991. Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments. Environ. Sci. Technol. **25**: 1062-1067.
- Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby und S. Goodwin.** 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. Arch. Microbiol. **159**: 336-344.
- Masella R., A. Cantafora, D. Modesti, A. Cardilli, L. Gennaro, A. Bocca und E. Coni.** 1999. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. Redox. Rep. **4**: 113-21.
- Middelhoven, W. J.** 1993. Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeast and yeast like fungi. A literature review and an experimental approach. Antonie van Leeuwenhoek **63**: 125-144.
- Mikosch C., K. Denger, E.-M. Schaefer und A. M. Cook.** 1999. Anaerobic oxidations of cysteate: Degradation via L-cysteate: 2-oxoglutarate aminotransferase in *Paracoccus pantotrophus*. Microbiology **145**: 1153-1160.

- Mohn, W. W. und J. M. Tiedje.** 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**: 482-507.
- Morgan, L. R.** 1962. Oxidation of protocatechuic acid with peroxyacetic acid. *J. Org. Chem.* **27**: 1208-1210.
- Mori, H., K. Matsunaga, Y. Tanakamaru, K. Kawabata, Y. Yamada, S. Sugie und A. Nishikawa.** 1999. Effects of protocatechuic acid, S-methylmethanethiosulfonate or 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)ethenyl)-2(5H)-furanone(KYN-54) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* **135**: 123-127.
- Müller, J. A.** 2000. Anaerober Abbau von Kresolen und Monohydroxybenzoaten. Dissertation. Universität Konstanz.
- Müller, J. A. und B. Schink.** 2000. Initial steps in the fermentation of 3-hydroxybenzoate by *Sporotomaculum hydroxybenzoicum*. *Arch. Microbiol.* **173**: 288-295.
- Müller, J. A., A. S. Galushko, A. Kappler und B. Schink.** 1999. Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Arch. Microbiol.* **172**: 287-294.
- Nozawa, T., Y. Maruyama.** 1988. Anaerobic metabolism of phthalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **170**: 5778-5784.
- Öhlinger, R.** 1993. Methods in Soil Chemistry. In: Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler und R. Margesin (eds.). *Methods in Soil Biology*, Springer-Verlag, Berlin: 396.
- Peiffer, S.** 1994. Reaction of H₂S with Ferric Oxides: Some Conceptual Ideas on Its Significance for Sediment-Water Interactions. In: *Advances in Chemistry Series*. Baker, L. A.: *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*. **237**: 371-390.
- Pfennig, N., H. G. Trüper.** 1981. Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. In: Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel (eds.): *The Prokaryotes*, Vol. I, Springer-Verlag, Berlin: 279-289.
- Philipp, B.** 1999. Neuartige oxidative Reaktionen beim anaeroben Abbau phenolischer Verbindungen durch denitrifizierende Bakterien. Dissertation, Universität Konstanz.

- Philipp, B. und B. Schink.** 1998. Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. J. Bacteriol. **180**: 3644-3649.
- Philipp, B. und B. Schink.** 2000. Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1. Arch. Microbiol. **173**: 91-96.
- Rainey, F. A., D. P. Kelly, E. Stackebrandt, J. Burghardt, A. Hiraishi, Y. Katayama und A. P. Wood.** 1999. A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **49**: 645-651.
- Richter, G.** 1988. Phenole. pp. 379-403. In: Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Thieme, Stuttgart.
- Sauvant, M. P., D. Pepin, J. Guillot.** 1999. Effects of humic substances and phenolic compounds on the in vitro toxicity of aluminium. Ecotoxicol. Environ. Saf. **44**: 47-55.
- Schink, B., B. Philipp und J. Müller.** 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. Naturwissenschaften **87**: 12-23.
- Schnell, S. und B. Schink.** 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch. Microbiol. **155**: 183-190.
- Schwertmann U. und R. M. Cornell.** 1991. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization. VCH, Weinheim.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson und D. C. Klenk.** 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Analy. Biochem. **150**: 76-85.
- Stookey, L. L.** 1970. Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron. Anal. Chem. **42**: 779-781.
- Straub, K. L., M. Benz, B. Schink und F. Widdel.** 1996. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1458-1460.
- Straub, K. L., M. Hanzlik und B. E. E. Buchholz-Cleven.** 1998. The Use of Biologically Produced Ferrihydrite for the Isolation of Novel Iron-Reducing Bacteria. System. Appl. Microbiol. **21**: 442-449.

- Stumm, W. und J. J. Morgan.** 1981. Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons, New York.
- Tien, M. und T. K. Kirk.** 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science **221**: 661-663.
- Towe, K. M. und W. F. Bradley.** 1967. Mineralogical constitution of colloidal "hydrous ferric oxide". J. Colloid. Interface. Sci. **24**: 384-392.
- Tschech, A. und G. Fuchs.** 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. Arch. Microbiol. **148**: 213-217.
- Vogel, T. M. und D. Grbic-Galic.** 1986. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 200-202.
- Wetzel, R. G.** 1983. Limnology. Saunders College Publishing, Orlando, FL, USA.
- Wiberg, N.** 1985. Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin.
- Widdel, F.** 1980. Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen.
- Widdel, F. und N. Pfennig.** 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of a new sulfate-reducer enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov. sp. nov. Arch. Microbiol. **129**: 395-400.
- Widdel, F., G. W. Kohring, F. Mayer.** 1983. Studies in dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. Arch. Microbiol. **134**: 286-294.
- Widdel, F., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus und B. Schink.** 1993. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. Nature **362**: 834-836.
- Winkelmann, G.** 1991. Specificity of iron transport in bacteria and fungi. In CRC Handbook of microbial iron chelates (ed. G. Winkelmann), CRC Press, Florida, USA.
- Wohlfarth, G. und G. Diekert.** 1997. Anaerobic dehalogenases. Curr. Opin. Biotechnol. **8**: 290-295.

Zehnder, A. J. B., W. Stumm. 1988. Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: Zehnder, A. J. B. (ed.) Biology of anaerobic microorganisms. pp. 1-38. John Wiley & Sons Inc., New York.

Zhang, X. und J. Wiegel. 1990. Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming *para*-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products. *Microb. Ecol.* **20**: 103-121.

