



UFZ-Bericht

ORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 2/2002

Dissertation

Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle Dekontamination sulfathaltiger Wässer

Christina Walther

RS

02

323 MA

ISSN 0948-9452

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)



00409520

Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle Dekontamination sulfathaltiger Wässer

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

Vorgelegt
von Diplom-Biochemikerin Christina Sophia Margarete Walther
geboren am 15.02.1973 in Dresden

Dekan:	Prof. Dr. M. Schlegel
Gutachter:	Prof. Dr. J. R. Andreesen
	Prof. Dr. W. Babel
	Prof. Dr. W. Fritsche

Tag der Verteidigung:	14. 12. 2001
-----------------------	--------------

Diese Arbeit wurde gefördert durch die
Deutsche Bundesstiftung Umwelt
Fördernummer 6000/410.

Bibliographische Beschreibung

Walther, Christina

Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle Dekontamination sulfathaltiger Wässer

Universität Leipzig, Dissertation

115 S., 196 Lit., 35 Abb., 23 Tab.

Referat

Saure Bergbauwässer entstehen u.a. durch die Oxidation sulfidischer Erze und stellen eine potentielle Belastung für Grund- bzw. Oberflächenwasser dar. Zur Behandlung der oft schwermetallbelasteten Wässer bietet sich neben chemischen Verfahren (Kalkfällung) die mikrobielle Dekontamination durch sulfatreduzierende Bakterien an. Dazu muß den Bakterien ein geeigneter Elektronendonator zur Verfügung gestellt werden. Bei der Wahl eines Substrates müssen neben der mikrobiellen Verfügbarkeit ökonomische und prozeßtechnische Parameter beachtet werden. Methanol bietet sich sowohl aufgrund seines Preises als auch seiner chemischen Eigenschaften an, wird jedoch von den meisten bekannten Sulfatreduzierern nicht als Substrat genutzt.

In dieser Arbeit werden zwei binäre Mischkulturen beschrieben, bei denen Methanoloxidation und Sulfatreduktion in unterschiedlichen Mikroorganismen stattfinden. Neben Untersuchungen zum elektronenübertragenden Intermediat werden Versuche zur Effizienz des Elektronentransfer zwischen Methanoloxidation und Sulfatreduktion sowie die Energiekonservierung in der Mischkultur diskutiert.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMD	<i>acid mine drainage</i> ; beim Bergbau anfallende saure Wässer
bp	Basenpaare
BES	Bromethansulfonsäure
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETI	elektronenübertragendes Intermediat
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
KBE	koloniebildende Einheiten
MeOH	Methanol
MPB393	aus der Anreicherungskultur B393 stammendes methylotrophes Isolat
PQQ	Pyrrlochinolin-chinon
r.p.m.	Umdrehungen pro Minute
SRB	sulfatreduzierende Bakterien/sulfatreduzierendes Bakterium
SRB378	aus der Anreicherungskultur B378 stammendes sulfatreduzierendes Isolat
SRB393	aus der Anreicherungskultur B393 stammendes sulfatreduzierendes Isolat
SRM	Sulfatreduzierermedium
SRM-Fe	Sulfatreduzierermedium mit reduziertem Eisengehalt
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofolsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
WF4	aus der Anreicherungskultur B378 stammendes methylotrophes Isolat
ΔG°	freie Reaktionsenthalpie
ΔG°	freie Standardreaktionsenthalpie (25° C, 1 atm, pH 7), alle Angaben aus Thauer <i>et al.</i> (1977)

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Saure Bergbauwässer	1
1.2	Sulfatreduzierer und Methanol	3
1.3	Substratoxidation und Elektronenakzeptorreduktion in unterschiedlichen Organismen	5
1.4	Das elektronenübertragende Intermediat	10
1.5	Energiegewinn beim Wasserstofftransfer	11
1.6	Konkurrenz um Wasserstoff	13
1.6.1	Unterschiedliche Affinität	13
1.6.2	Schwellenwertmodell	14
1.6.3	Weitere Faktoren	16
1.7	Sulfatreduktion mit methyilotrophem Partner	17
1.8	Ziel- und Aufgabenstellung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Herkunft der Mikroorganismen	20
2.2	Isolation und Stammhaltung	20
2.3	Kultivierung der Stämme	21
2.3.1	Vorkulturen und deren Aufbereitung	21
2.3.2	Versuche zu Wachstum und Vermehrung/batch-Ansätze	22
2.3.3	Versuche im Rührkesselreaktor	23
2.3.4	Sulfatreduktion mit Wasserstoff Wachstum mit Wasserstoff / Kohlendioxid	23
2.3.5	Substratverwertungsspektren	25
2.3.6	Mechanische Disaggregation von MPB393	25
2.4	16S rDNA-Sequenzierung	26
2.4.1	Zellyse und DNA-Extraktion	26
2.4.2	PCR-Primer und Parameter	26
2.4.3	Reinigung der PCR-Produkte	27
2.4.4	Sequenzierung und Sequenzvergleich	27
2.5	Analytische Methoden	28
2.5.1	Sulfat	29
2.5.2	Lactat	29
2.5.3	Methanol	29
2.5.4	Acetat	29
2.5.5	Gasmessungen	30
2.5.6	Protein	31

2.5.7	Standardabweichungen der häufig verwendeten Analysenmethoden	31
2.6	Mikroskopie und Photographie	31
2.6.1	Verwendete Geräte	31
2.6.2	Färbemethoden	32
2.7	Medien und Puffer	33
2.7.1	Sulfatreduzierermedium (SRM)	33
2.7.2	Sulfatreduzierermedium mit reduziertem Eisengehalt (SRM-Fe)	34
2.7.3	Medium 311*, Medium 120, klares Mineralsalzmedium	35
2.7.4	TAE-Puffer	36
2.8	Chemikalien und Gase	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Sulfatreduktion unter Methanolverbrauch in den Anreicherungskulturen B378 und B393	37
3.2	Isolation und Beschreibung der sulfatreduzierenden Bakterien SRB378 und SRB393	39
3.2.1	16S rDNA Analyse	39
3.2.2	Substratverwertungsspektren	40
3.3	Isolation methylotropher Bakterien aus den Anreicherungskulturen B378 und B393	43
3.3.1	Methylotrrophe Isolate der Kultur B378	43
3.3.2	Methylotrrophe Isolate der Kultur B393	45
3.4	Charakterisierung des Isolates WF4 Gemeinsame Kultivierung mit SRB378	47
3.4.1	Verwertung organischer Substrate durch WF4 mit Carbonat und in Kokultur mit SRB378	48
3.5	Charakterisierung des Isolates MPB393 Gemeinsame Kultivierung mit SRB393	50
3.6	Das elektronenübertragende Intermediat	53
3.6.1	Wasserstoffbildung durch WF4	53
3.6.2	Sulfatreduktion mit Wasserstoff durch SRB378	54
3.6.3	Kultur MPB-SRB393	57
3.7	Einflüsse auf Wasserstofftransfer und Sulfatreduktion	57
3.7.1	Vergleich mit Referenzstämmen	57
3.7.2	Disaggregation von MPB393	59
3.7.3	Anwesenheit weiterer Elektronenakzeptoren	63
3.7.4	Verhältnis von WF4 zu SRB378	63
3.7.5	pH-Wert	65
3.7.6	Substratkonzentration	67

4.	Diskussion	69
4.1	Die Sulfatreduzierer SRB378 und SRB393	69
4.1.1	Methanolverwertung	69
4.2	Sulfatreduktion in Mischkulturen methyilotropher und sulfatreduzierender Bakterien	71
4.2.1	WF4/SRB378 – syntrophe Sulfatreduktion	72
4.2.2	MPB393/SRB393 Konkurrenz um Elektronen	76
4.3	Wasserstoff als elektronenübertragendes Intermediat	79
4.3.1	Wasserstoffproduktion bei der Verwertung organischer Substrate	80
4.3.2	Wasserstoffverwertung durch die sulfatreduzierenden Isolate	81
4.3.3	Weitere Versuche zur Sulfatreduktion mit Wasserstoff	82
4.4	Effizienz der Methanolverwertung – Einflüsse auf den Elektronentransfer zur Sulfatreduktion	83
4.4.1	Aggregation und räumliche Nähe	84
4.4.2	Biomasseverhältnis der Partner und Energiegewinn	86
4.4.3	Abiotische Einflüsse – Möglichkeiten der Steuerung für einen Prozeß	88
4.5	Methanol als Substrat für ein technisches Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion	91
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literatur	97

1. Einleitung

1.1 Saure Bergbauwässer

Im Bergbau anfallende saure Wässer (*acid mine drainage*, AMD) wurden als „*the most important and widespread industry related pollution problem*“ bezeichnet (California Mining Waste Study, 1988). Derartige Wässer entstehen, wenn sulfidische Erze (Kiese, z.B. Pyrit) mit Wasser und Sauerstoff in Kontakt treten und durch mikrobielle Aktivität (*Thiobacilli*) oder abiotisch oxidiert werden.

Gleichung 1



Die Oxidation des gebildeten Eisen(II) zu Eisen(III), welches wiederum Sulfide oxidiert, trägt zur zusätzlichen Versauerung bei. Eine weitere Ursache ist die *in situ* Laugung von Halden oder Untertagevorkommen durch Schwefelsäure. Die entstehenden Wässer zeichnen sich durch einen niedrigen pH-Wert, hohe Sulfatkonzentrationen und ein von der Lagerstätte abhängiges Vorkommen an gelösten (Schwer-)Metallionen aus. Dadurch stellen sie eine potentielle Belastung sowohl für Grund- als auch Oberflächenwasser dar.

Das gebräuchlichste Verfahren zur Aufbereitung von Grubenabwässern sowie Sickerwässern von Halden oder Schlammabsetzanlagen ist die Neutralisation mit Kalk (Wakao *et al.*, 1979, Tsukamoto u. Miller, 1999) oder Kalkstein (Maree u. du Plessis, 1994). Dabei wird Sulfat als Gips gefällt, Metallionen werden entweder als Hydroxide oder durch Adsorption an den Gips immobilisiert. Dieses Verfahren ist mit einem erheblichen Stoffeintrag verbunden, zudem entsteht mit Schwermetallen kontaminierter Gipsschlamm, der seinerseits entsorgt werden muß.

Auf der Suche nach alternativen Verfahren wurden seit den sechziger Jahren Versuche unternommen, die metabolische Kapazität sulfatreduzierender Bakterien (SRB) zur Dekontamination schwefelsaurer Wässer zu nutzen (Tuttle *et al.*, 1969). SRB reduzieren Sulfat unter Protonenverbrauch zu Sulfid (Gleichung 2), welches mit Schwermetallen zu Metallsulfiden reagiert. Auch Metalle, die keine schwerlöslichen Sulfide bilden, können durch Sorption an Eisensulfid immobilisiert werden (Watson u. Ellwood, 1999). Die zur Sulfatreduktion notwendigen

Elektronen müssen in für die SRB zugänglichen Substraten zur Verfügung gestellt werden. Aus Kostengründen und wegen des meist sehr hohen Aufkommens kontaminierter Wässer wurden anstelle definierter Substrate überwiegend Abfallprodukte eingesetzt (Beispiele in Tabelle 1), ohne daß Kenntnis über die abbauenden und sulfatreduzierenden Mikroorganismen, die auftretenden Zwischenprodukte und die von den SRB tatsächlich genutzten Intermediate (mit Ausnahme von Molke) vorlag. Zudem war oft ein zweiter aerober Bioreaktor nötig, um den CSB des Ablaufes zu senken (Barnes *et al.*, 1992).

Tabelle 1: Für die mikrobiologische Sanierung saurer Bergbauwässer eingesetzte Abfallprodukte

Holzmehl	Tuttle <i>et al.</i> , 1969 Wakao <i>et al.</i> , 1979
Sägemehl-/Kompostgemisch ¹	Dvorak <i>et al.</i> , 1992, Chang <i>et al.</i> , 2000
Heu, Stroh	Bécharde <i>et al.</i> , 1994
Molke	Christensen <i>et al.</i> , 1996
Klärschlamm	Heal u. Salt, 1999
Dung	Zaluski <i>et al.</i> , 1999
Zellulose ²	Chang <i>et al.</i> , 2000
Eichenholzspäne ³	Chang <i>et al.</i> , 2000
Waldboden	Chang <i>et al.</i> , 2000

Die Frage nach den von Sulfatreduzierern genutzten Intermediaten kann durch den Einsatz definierter Substrate beantwortet werden. Eine Abnahme der Sulfatkonzentration in Versuchsanlagen zur Sulfatreduktion/Neutralisation schwefelsaurer Wässer wurde mit Wasserstoff und Acetat (Govind *et al.*, 1999), Ethanol (Barnes *et al.*, 1992) oder Lactat (el Bayoumy *et al.*, 1998, Elliot *et al.*, 1998) als Substrat erreicht. In Laborreaktoren zur Sulfatreduktion mit Lactat als Substrat kam es jedoch zur (unerwünschten) Acetatakkumulation, da unvollständig oxidierende, d.h. nicht-acetatverwertende Sulfatreduzierer schneller

¹ Abfallprodukt bei der Produktion von *Agaricus bisporous*

² Abfallprodukt bei Papierherstellung

³ Abfallprodukt bei der Produktion von *Lentinus edodes*

wuchsen als acetatoxidierende Spezies, welche aus dem Reaktor ausgewaschen wurden (Christensen *et al.*, 1996). Methanol bietet u. a. aufgrund seines niedrigen Preises und seiner unbegrenzten Wasserlöslichkeit Vorteile beim Einsatz in biotechnologischen Verfahren (Babel, 1987). In Arbeiten von Barnes *et al.* (1992) wird beschrieben, daß mit Methanol als Substrat in Bioreaktoren keine Senkung der Sulfatgehalte metall- und sulfatbelasteten Grundwassers, sondern Methanogenese zu beobachten war. Dem widersprechen Ergebnisse von Tsukamoto u. Miller (1999), die durch Zusatz von Methanol in Reaktoren zur mikrobiologischen Behandlung saurer Bergbauwässer eine Senkung der Sulfatkonzentration um 88% erreicht haben. Eine Charakterisierung der beteiligten Mikroorganismen erfolgte nicht.

1.2 Sulfatreduzierer und Methanol

Dissimilatorische sulfatreduzierende Bakterien (SRB) nutzen Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor.

Gleichung 2

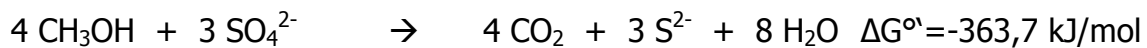


Ein Teil der frei werdenden Energie⁴ kann konserviert und für Synthesen genutzt werden. Die zur Reduktion notwendigen Redoxäquivalente müssen in einem durch die SRB verwertbaren Substrat zur Verfügung gestellt werden, welches auch gleichzeitig Kohlenstoffquelle sein kann und damit Wachstum und Vermehrung ermöglicht. Unter diesen Voraussetzungen sind SRB geeignet, sulfathaltige Abwässer in einem technischen Verfahren kontinuierlich zu dekontaminieren.

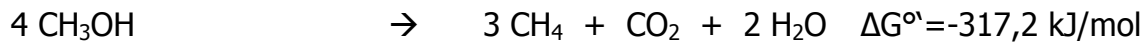
Die Oxidation von Methanol mit Sulfat (Gleichung 3) ist ein exergoner Prozeß und kann daher Energie für Wachstum und Vermehrung liefern. Methanol entsteht beispielsweise beim mikrobiellen Abbau von Pektin (Schink u. Zeikus, 1980) und galt im Gegensatz zu Wasserstoff oder Acetat lange Zeit als „nichtkompetitives“ Substrat (Oremland u. Polcin, 1982), d.h. es waren keine Sulfatreduzierer bekannt, die mit methanogenen (Gleichung 4) oder homoacetogenen (Gleichung 5) Bakterien um dieses Substrat konkurrierten.

⁴ Differenz zwischen den Bildungsenthalpien der Produkte und der Ausgangsstoffe

Gleichung 3



Gleichung 4



Gleichung 5



Seit den achtziger Jahren wurden verschiedene *Desulfovibrio*-Arten isoliert, die Methanol zu Kohlendioxid oxidieren, es jedoch nicht als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können, so z.B. MB6 (Braun u. Stolp, 1985), *Desulfovibrio carbinolicus* (Nanninga u. Gottschal, 1986; 1987) oder *Desulfovibrio alcoholivorans* (Qatibi *et al.*, 1991). Alle bisher beschriebenen *Desulfovibrio*-Arten benötigen beim Wachstum auf Wasserstoff (zur Energiegewinnung) und Kohlendioxid (welches assimiliert werden kann) eine zusätzliche Kohlenstoffquelle⁵, wie z.B. in Hefeextrakt enthaltene organische Verbindungen (Mechalas u. Rittenberg, 1960) oder Acetat (Sorokin, 1966). Auch für *Desulfovibrio salexigens* wurde beschrieben, daß dieser Methanol als Substrat nutzen kann (Zellner *et al.*, 1986), allerdings wurden keine Angaben darüber gemacht, ob zur Sulfatreduktion oder auch als alleinige Kohlenstoffquelle.

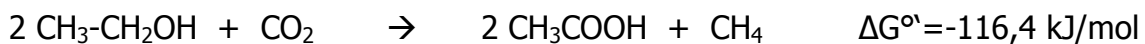
Sulfatreduzierer, die Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können, sind z. B. *Desulfobacterium catecholicum* (Szewzyk u. Pfennig, 1987) oder *Desulfotomaculum orientis* (Hanselmann *et al.*, 1995). Dieser gram-positive Sporenbildner oxidiert Methanol in Gegenwart von Sulfat zu Kohlendioxid; Methanolassimilation findet jedoch nur in carbonatgepufferter Medium statt. Der Stoffwechselweg ähnelt dem homoacetogener Bakterien (Hanselmann *et al.*, 1995). Tatsächlich ist dieses Bakterium in der Lage, Methanol in Abwesenheit von Sulfat fermentativ unter Acetatbildung zu nutzen. Wie *Desulfotomaculum orientis* assimiliert auch *Desulfobacterium catecholicum* Methanol über den Acetyl-CoA-Weg (Szewzyk u. Pfennig, 1987).

⁵ *Desulfovibrio baarsii*, für welchen die Nutzung von Formiat und Kohlendioxid als einzige Energie- bzw. Kohlenstoffquelle beschrieben wurde (Jansen *et al.*, 1984), wurde als *Desulfoarculus baarsii* reklassifiziert (Widdel u. Bak, 1992).

1.3 Substratoxidation und Elektronenakzeptorreduktion in unterschiedlichen Organismen

1940 wurde *Methanobacillus omelianskii* beschrieben (Barker, 1940), ein Bakterium, welches Ethanol zu Acetat oxidiert und Carbonat zu Methan reduziert.

Gleichung 6

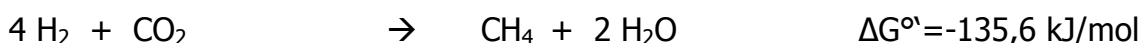


Die Isolierung gestaltete sich schwierig, da trotz wiederholter Verdünnungsreihen in Weichagar immer drei verschiedene Kolonietypen auftraten, von denen zwei nicht weiter kultiviert werden konnten. Das kultivierbare Isolat galt lange Zeit als der einzige Stamm, welcher in der Lage war, andere Substrate als Wasserstoff/Kohlendioxid, Acetat oder reduzierte C1-Verbindungen zur Methanogenese zu nutzen. Erst genauere Untersuchungen zum Wachstum mit Wasserstoff zeigten, daß es sich hierbei um eine Mischkultur aus einem ethanol-oxidierenden und einem methanogenen Bakterium handelt (Bryant *et al.*, 1967). Aus Ethanol wird vom sog. S-Organismus Acetat und Wasserstoff gebildet (Gleichung 7), letzterer wird von dem anderen in der Kultur enthaltenen Organismus (später als *Methanobacterium bryantii* identifiziert; Balch *et al.*, 1979; Zinder, 1993) zur Methanbildung genutzt (Gleichung 8).

Gleichung 7



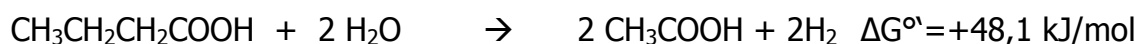
Gleichung 8



Seitdem wurden weitere, sog. syntrophe Mischkulturen beschrieben, in denen zwei oder mehr Mikroorganismen in enger Abhängigkeit voneinander existieren. Eine Komponente oxidiert das Substrat; die dabei entstehenden Redoxäquivalente werden von einem zweiten Organismus zur Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors genutzt. In Tabelle 2 (Seite 8) sind weitere Beispiele aufgeführt, bei denen ein an die Übertragung eines Intermediates gekoppelter Elektronentransfer zwischen den Partnern stattfindet.

Die Isolation einiger Bakterien wurde erst durch die gezielte Kokultivierung mit wasserstoffzehrenden Partnern möglich. Es war bekannt, daß bei der anaeroben Mineralisierung komplexer organischer Substrate sowohl fermentative als auch methanogene Mikroorganismen beteiligt sind. Primärprodukte sind Fettsäuren, Ethanol, Wasserstoff und Kohlendioxid; nur die letzten beiden sind (abgesehen von Acetat) Substrate für methanogene Bakterien. Es stellt sich also die Frage, wie länger-kettige Substrate der Methanogenese zugeführt werden, d.h. welche Organismen die Fettsäureoxidation zu Acetat, Wasserstoff und Kohlendioxid katalysieren. Aus Pansenflüssigkeit konnte ein solches „Bindeglied“ isoliert werden (McInerney *et al.*, 1979), nachdem das methanogene Bakterium *Methanospirillum hungatei* dem zur Kultivierung verwendeten Agar zugegeben worden war. Diese hydrogenotrophe Spezies hielt den Wasserstoffpartialdruck niedrig und gestaltete dadurch die Fettsäureoxidation unter Wasserstoffbildung, welche bei Standardbedingungen endergon ist (Gleichung 9), energetisch günstig.

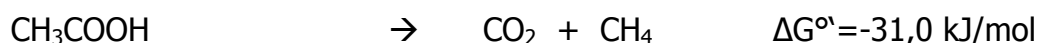
Gleichung 9



Der Fettsäure-Oxidierer *Syntrophomonas wolfei* (McInerney *et al.*, 1981) war in der Lage, Fettsäuren von Butyrat bis Octanoat zu Acetat bzw. Propionat und Wasserstoff zu oxidieren. Dies geschah aber nur in Gegenwart eines hydrogenotrophen „Helfers“ (Sulfatreduzierer; Gleichung 2 oder Methanogener; Gleichung 8), welcher den gebildeten Wasserstoff verbrauchte.

Auch in einer von Zinder u. Koch (1984) beschriebenen thermophilen acetatoxidierenden Mischkultur bestand eine ähnlich enge energetische Abhängigkeit. In dieser Kultur wurden die aus der Acetatoxidation entstehenden Redoxäquivalente zur Methanogenese genutzt.

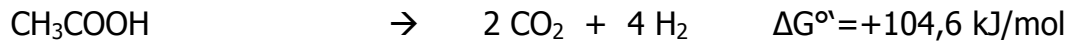
Gleichung 10



Es war bekannt, daß Acetat ein Substrat für die Methanogenese ist; zudem war die Isolation acetatverwertender methanogener Bakterien gelungen (Zeikus *et al.*, 1975; Smith u. Mah, 1980). Es blieb jedoch umstritten, ob unter physiologischen Bedingungen genügend Energie zum Wachstum gewonnen werden kann (Zeikus *et al.*, 1975). Um so erstaunlicher war, daß die bei der Methanogenese aus Acetat freiwerdende Energie (-32,7 kJ/mol unter *in situ* Bedingungen) ausreichte, das

Wachstum zweier in der Kultur nachgewiesener Organismen zu ermöglichen (Zinder u. Koch, 1984). Das Isolat AOR (*acetate oxidizing rod*) oxidierte Acetat zu Kohlendioxid und Wasserstoff (Gleichung 11), welcher von dem in der Kultur ebenfalls vorhandenem methanogenen Bakterium (*Methanobacterium* sp.) zur Methanogenese (Gleichung 8) genutzt wurde.

Gleichung 11



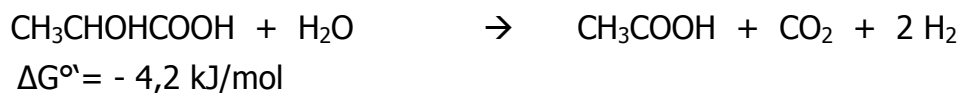
Die Kultivierung von AOR auf Acetat gelang ausschließlich in Gegenwart des hydrogenotrophen Partners. Mit Wasserstoff und Kohlendioxid als Substrat wurde jedoch Acetat gebildet (Lee u. Zinder, 1988), weswegen diesem Isolat der Spitzname „*Reversibacterium*“ gegeben wurde (Thauer *et al.*, 1989).

Tabelle 2: Beispiele für interspecies electron transfer

Substrat	Oxidierer	Reduzierer	Elektronenakzeptor	Referenz
Ethanol	S-Organismus	Methanogenes Isolat	CO ₂	Bryant <i>et al.</i> , 1967
Butyrat	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Methanospirillum hungatei	CO ₂	McInerney <i>et al.</i> , 1981
Lactat	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>	CO ₂	Traore <i>et al.</i> , 1983
Acetat	„acetate oxidizing rod“	<i>Methanobacterium</i> THF	CO ₂	Zinder u. Koch, 1984
Acetat	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Wolinella succinogenes	NO ₃ ⁻	Cord-Ruwisch <i>et al.</i> , 1998
Methanol	<i>Clostridium sphenoides</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Fe ³⁺	Daniel <i>et al.</i> , 1999
Methan	<i>Methanobacteriales</i>	<i>Desulfosarcina/Desulfococcus</i> sp.	SO ₄ ²⁻	Boetius <i>et al.</i> , 2000

Neben den eben beschriebenen sog. obligat syntrophen Kulturen, gibt es auch Assoziationen, in denen eine Spezies nur in Abwesenheit seines sonst bevorzugten Elektronenakzeptors die Redoxäquivalente auf einen Partnerorganismus überträgt. *Desulfovibrio vulgaris* war in Abwesenheit von Sulfat in der Lage, Lactat zu Acetat zu oxidieren (Gleichung 12), wenn er gemeinsam mit *Methanosarcina barkeri* kultiviert wurde, welcher den entstehenden Wasserstoff zur Methanogenese (Gleichung 8) nutzte (Traore *et al.*, 1983). Die Summe der in der Mischkultur stattfindenden Reaktionen entsprach somit der Methanbildung aus Lactat; eine ähnliche Assoziation wurde auch für die Methanbildung aus Ethanol (Bryant *et al.*, 1977) oder Formiat (Guyot u. Braumann, 1986) beschrieben.

Gleichung 12



Die Funktion sulfatreduzierender Bakterien als syntrophe Oxidierer (Zeikus *et al.*, 1993, Raskin *et al.*, 1996) könnte eine Erklärung für deren hohe Anzahl und Aktivität in Habitaten mit kleiner Sulfatkonzentration wie industrielle (Wu *et al.*, 1991) oder kommunale (Fukui *et al.*, 2000) anaerobe Abwasseraufbereitungsanlagen oder geflutete Reisfelder (Krylova *et al.*, 1997) sein.

Während unter den eben beschriebenen Bedingungen die Redoxäquivalente vom Sulfatreduzierer auf das methanogene Bakterium übertragen werden, findet bei der anaeroben Methanoxidation ein Elektronenfluß in die entgegengesetzte Richtung statt. Die in anaeroben Sedimenten gemessene Oxidation von Methan (Barnes u. Goldberg, 1976) war immer nur in Zusammenhang mit Methanogenese zu beobachten (Zehnder u. Brock, 1980). Experimente zur Inhibierung methanogener (Hoehler *et al.*, 1994) und sulfatreduzierender (Hansen *et al.*, 1998) Bakterien lieferten Hinweise für die Oxidation von Methan mit Sulfat als Elektronenakzeptor durch ein Konsortium dieser Mikroorganismen.

Gleichung 13



Methanogene Bakterien oxidieren Methan zu Kohlendioxid und Wasserstoff (Rückreaktion von Gleichung 8), welcher vom Sulfatreduzierer genutzt wird

(Gleichung 2). In methanhydrathaltigen Tiefseesedimenten konnten durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden enge Assoziationen methanogener (*Methanosarcinales*) und sulfatreduzierender (*Desulfosarcina/Desulfococcus*-verwandter) Bakterien nachgewiesen werden (Boetius *et al.*, 2000).

1.4 Das elektronenübertragende Intermediat

Überträger von Redoxäquivalenten können z.B. Wasserstoff, Formiat oder Acetat sein (Schink, 1992). Der Nachweis des elektronenübertragenden Intermediates ist schwierig, da dessen Konzentration sehr gering ist. Die unter Standardbedingungen meist endergone Oxidation des Substrates liefert nur dann biologisch nutzbare Energie, wenn die Produktkonzentration (also die des reduzierten Intermediates) klein im Verhältnis zur Substratkonzentration ist.

Beobachtungen, daß sich die Methanbildung in Pansenflüssigkeit nach Wasserstoff-, nicht jedoch nach Formiatinjektionen erhöht, ließen den Schluß zu, daß Wasserstoff ein wichtiges Intermediat („*key intermediate*“) in anaeroben Nahrungsketten (z.B. Methanbildung aus Zellulose) ist (Hungate, 1967).

Boone und Mitarbeiter (1989) hingegen kamen aufgrund von Experimenten zur Geschwindigkeit der Methanbildung aus Butyrat durch eine syntrophe Kultur aus *Syntrophomonas wolfei* und *Methanobacterium formicicum* zu dem Schluß, daß die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasserstoff die hohen Umsatzraten nicht zulassen würde und daher 95% des Elektronentransfers auf Formiatdiffusion zurückzuführen sind. Ähnliche Ergebnisse (90 % Elektronentransfer durch Formiat) ergaben Untersuchungen zur Methanogenese aus Lactat oder Ethanol durch eine syntrophe Kultur aus *Desulfovibrio vulgaris* und *Methanobacterium formicicum* (Thiele u. Zeikus, 1988).

Bei der anaeroben Methanoxidation (Gleichung 13) könnte Wasserstoff oder Acetat als elektronenübertragendes Intermediat fungieren (Boetius *et al.*, 2000); Acetat wäre zugleich Kohlenstoffquelle für den oxidierenden Partner.

Vor dem Hintergrund der mikrobiellen Eisenreduktion und der damit verbundenen Problematik eines unlöslichen und schlecht zugänglichen Elektronenakzeptors wurden in jüngerer Zeit auch Cytochrome (Seeliger *et al.*, 1998), Huminsäuren (Lovley *et al.*, 1998) und Chinone (Newman u. Kolter, 2000) als extrazelluläre Elektronencarrier diskutiert. Ein im Überstand einer syntrophen Mischkultur aus *Geobacter sulfurreducens* und *Wolinella succinogenes* nachgewiesenes 9,6 kDa Cytochrom, welches von *Geobacter sulfurreducens* reduziert und von *Wolinella succinogenes* oxidiert wurde (Seeliger *et al.*, 1998), könnte die syntrophe

Oxidation von Acetat mit Nitrat als Elektronenakzeptor (Cord-Ruwisch *et al.*, 1998) vermitteln.

1.5 Energiegewinn beim Wasserstofftransfer

In syntrophen Kulturen sind beide Partner auf die Energie angewiesen, die aus der Gesamtreaktion zur Verfügung gestellt wird. Die unter Standardbedingungen oft endergonen Oxidationsreaktionen (z.B. Gleichung 7, Gleichung 9, Gleichung 11) können nur zusammen mit einer energieliefernden Reaktion (z.B. Gleichung 2, Gleichung 8) ablaufen. Wieviel Energie aus einer Teilreaktion für den jeweiligen Partner zur Verfügung steht, hängt neben der Substrat- und Produktkonzentration der Gesamtreaktion entscheidend von der Konzentration des elektronenübertragenden Intermediates (z.B. Wasserstoff) ab. Die Wasserstoffkonzentration muß klein genug sein, um die Oxidation des Substrates unter *in-situ* Bedingungen nicht zu inhibieren, aber noch so groß, daß bei Reduktion des Elektronenakzeptors „biologische Energie“ gewonnen werden kann (Zinder u. Koch, 1984; Schink u. Friedrich, 1994).

Für die Bildung eines Mol ATP sind abhängig vom pH-Wert etwa 43,9...50,2 kJ aufzuwenden; die Effizienz der Energiewandlung beträgt bei anaeroben Bakterien 25-50% (Thauer *et al.*, 1977). Betrachtet man jedoch die Energiebeträge, welche unter *in situ* Bedingungen maximal konserviert werden können (Tabelle 3), so sind diese selbst ohne Berücksichtigung des immer auftretenden Wärmeverlustes nicht groß genug, um die Synthese eines ATP je Reaktion zu gewährleisten.

Untersuchungen zur Butyratoxidation durch *Syntrophomonas wolfei* (Wallrabenstein u. Schink, 1994) zeigten, daß ein Teil des bei der β -Oxidation entstehenden ATP zur Bildung eines Protonengradienten verwendet wird, welcher die Reduktion von Butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA ermöglicht. Dadurch wurde in der Summe nicht 1 ATP je Reaktion gebildet (was thermodynamisch nicht möglich gewesen wäre), sondern entsprechend der Stöchiometrie der protonen-translozierenden ATPase nur 1/3 ATP. Der Energiebetrag, welcher zum Transfer eines Protons durch die Membran notwendig ist, stellt den Mindestbetrag dar, der zur Energiekonservierung notwendig ist (Schink u. Friedrich, 1994). Er ist abhängig von der Stöchiometrie der ATPase und kann daher ein Viertel bis die Hälfte der zur ATP-Synthese notwendigen Energie betragen (Kleerebezems u. Stams, 2000).

Tabelle 3: Freie Enthalpie (maximal konservierbare Energie) verschiedener Reaktionen unter *in situ* Bedingungen

Gleichung		<i>In situ</i> Konzentrationen	$\Delta G'$ (kJ/mol)	Referenz
8	Methanogenese mit Wasserstoff	$1 < [H_2] < 10 \text{ Pa}$	-20...-40	Thauer <i>et al.</i> , 1993
8, 9, 10	methanogene Oxidation von Butyrat	[Butyrat] 10 μM [Acetat] 50 μM [CO ₂] 0,3 bar [H ₂] 10 ^{-4,7} bar [CH ₄] 0,7 bar	-39,4 (je Butyrat) -21 (je Teilreaktion)	Schink u. Friedrich, 1994
10	Methanogenese aus Acetat	[Acetat] 20 mM [HCO ₃ ⁻] 30 mM [CH ₄] 0,35 atm	-32,7	Zinder u. Koch, 1984
13	anaerobe Methanoxidation	[SO ₄ ²⁻] 5 mM [HS ⁻] 2,5 mM [HCO ₃ ⁻] 17 mM [CH ₄] 0,2 mM	-22,4 (je Methan) -11,2 (je Teilreaktion)	Harder, 1997

Bei der anaeroben Methanoxidation (Gleichung 13) liegt der Betrag der für jeden Partner verfügbaren Energie (bei gleicher Verteilung) noch unterhalb des für die Protonentranslokation notwendigen Energiebetrages (Harder, 1997). Die Umkehrung der für methanogene Bakterien energieliefernden Reaktion (Gleichung 8) erfordert sehr niedrige Wasserstoffkonzentrationen (<0,1 nM, Hoehler *et al.*, 1994), bei denen der Sulfatreduzierer jedoch noch konservierbare Energie gewinnen muß. Durch ein Oszillieren der Wasserstoffkonzentration zwischen Werten, die Energiegewinn *entweder* durch Methanoxidation *oder* durch Sulfatreduktion ermöglicht, könnten beide Partner Energie konservieren (Harder, 1997).

1.6 Konkurrenz um Wasserstoff

Sowohl acetogene, methanogene als auch sulfatreduzierende Bakterien können Wasserstoff zur Reduktion ihres entsprechenden Elektronenakzeptors nutzen (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988). Wenn Wasserstoff als Substrat limitiert vorliegt, treten hydrogenotrophe Organismen und die entsprechenden energieliefernden Prozesse in Konkurrenz. Die hydrogenotrophe Mikrobenflora im Pansen enthält sowohl homoacetogene als auch methanogene Bakterien; der Hauptteil des durch fermentative Bakterien gebildeten Wasserstoffs wird jedoch zur Methanogenese und nicht zur Homoacetogenese genutzt (Mackie u. Bryant, 1994). Untersuchungen zur Methanbildung in Anwesenheit von Eisen(III) oder Sulfat zeigten, „dass durch den bei der Umwandlung von Gyps und Eisenoxid zu CaCO_3 und Eisensulfür frei werdenden Sauerstoff die Bildung von CO_2 sehr erheblich vergrößert und ebenso die des CH_4 verringert ist.“ (Hoppe-Seyler, 1886). Auch in marinen Sedimenten wurde Methanogenese nur beobachtet, wenn zunächst alles verfügbare Sulfat reduziert worden war (Martens u. Berner, 1974; Abram u. Nedwell, 1978a). Die Methankonzentration in der Atemluft korreliert negativ mit der Anzahl sulfatreduzierender Bakterien im Dickdarm (Dore *et al.*, 1995). Als weiteres Beispiel seien Biogasreaktoren genannt, wo bei Abwässern, deren CSB/Sulfat-Verhältnis (g/g) kleiner als 10 ist, eine Reduktion oder Inhibierung der Methanogenese beobachtet werden kann (O'Flaherty *et al.*, 1998). Neben der möglichen toxischen Wirkung von Schwefelwasserstoff (Cappenberg, 1974a; 1974b; Isa *et al.*, 1986; Mizuno *et al.*, 1998) oder Sulfat (Fang *et al.*, 1997) auf methanogene Bakterien oder der Bildung von Schwermetallsulfid-Präzipitaten auf den Bakterienoberflächen (Liu u. Fang, 1998) wurde als Grund dafür die Konkurrenz von methanogenen und sulfatreduzierenden Bakterien um den von syntrophen Oxidierern gebildeten Wasserstoff angeführt (Abram u. Nedwell, 1978b).

1.6.1 Unterschiedliche Affinität

Die erfolgreiche Verdrängung methanogener durch sulfatreduzierende Bakterien kann anhand kinetischer Parameter begründet werden. Die Halbsättigungskonstanten methanogener Bakterien sind höher als die sulfatreduzierender Bakterien, welche somit eine höhere Affinität für Wasserstoff haben (Kristjansson *et al.*, 1982, Robinson u. Tiedje, 1984). In Tabelle 4 sind K_s -Werte für verschiedene hydrogenotrophe Bakterien und Habitate aufgeführt.

Tabelle 4: K_s-Werte in wasserstoffverwertenden Kulturen

Organismus/Habitat	K _s (app.) (µM)	Referenz
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (Marburg)	1,3	Kristjansson <i>et al.</i> , 1982
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	1,8	Robinson u. Tiedje, 1984
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1,9	Robinson u. Tiedje, 1984
<i>Methanospirillum hungatei</i>	5,0	Robinson u. Tiedje, 1984
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	6,6	Kristjansson <i>et al.</i> , 1982
<i>Methanosarcina barkeri</i>	13,1	Robinson u. Tiedje, 1984
Pansenflüssigkeit	4,1-9,2	Robinson u. Tiedje, 1982
Faulschlamm	4,4-6,8	Robinson u. Tiedje 1982

Es muß beachtet werden, daß solche Messungen mit methodischen Unsicherheiten behaftet sind. Die wasserstoffverbrauchende Reaktion muß so langsam ablaufen (durch entsprechendes Verdünnen der Probe), daß die Diffusion des Wasserstoffs von der Gas- in die Flüssigphase keine Auswirkung auf die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit hat (Robinson und Tiedje, 1982). Auch die Diffusionsgeschwindigkeit des Wasserstoffs in der Flüssigphase kann limitierend wirken (Boone *et al.*, 1989). Hinzu kommt, daß für viele anaerobe Stoffwechselprozesse nicht alle Voraussetzungen des Michaelis-Menten Modells⁶ (keine Produktinhibierung, keine Rückreaktion zum Enzym-Substrat-Komplex) erfüllt sind (Hoh u. Cord-Ruwisch, 1996). Die ermittelten K_s-Werte liegen im µM-Bereich und damit weitaus höher als die in anaeroben Sedimenten gemessenen Wasserstoffkonzentrationen (siehe Tabelle 5).

1.6.2 Schwellenwertmodell

Als alternative Erklärung zum Michaelis-Menten-Modell wurde das sog. „Schwellenwertmodell“ vorgeschlagen (Lovley *et al.*, 1982). Aufgrund von Messungen der stationären Wasserstoffkonzentration in sulfidogenen und methanogenen Habitaten wurde postuliert, daß Sulfatreduzierer die stationäre Wasserstoffkonzentration unterhalb des Wertes senken, bei dem Methanogenese stattfinden kann (Lovley *et al.*, 1982). Dieses Modell gilt nicht nur für

⁶ Es soll nicht das Wachstum von Kulturen mit Wasserstoff als Energiequelle betrachtet werden, sondern lediglich die enzymatische Reduktion des Elektronenakzeptors mit Wasserstoff.

Sulfatreduzierer und Methanogene, sondern es konnte auf weitere anaerobe Atmungsmechanismen erweitert werden. Wasserstoffmessungen in aquatischen Sedimenten zeigten, daß die stationäre Wasserstoffkonzentration mit dem vorherrschenden Reduktionsprozess bzw. der Anwesenheit des jeweiligen Elektronenakzeptors (Nitrat, Mangan(IV), Eisen(III), Sulfat, Kohlendioxid) korrelierte (Hoehler *et al.*, 1998) und daß Sedimente mit gleichem Elektronenakzeptor ähnliche stationäre Wasserstoffkonzentrationen aufwiesen (Lovley u. Goodwin, 1988). Ähnliche Ergebnisse ergaben Messungen der stationären Wasserstoffkonzentration in syntrophen Kulturen mit hydrogenotrophen Organismen, welche unterschiedliche Elektronenakzeptoren nutzten. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der stationären Wasserstoffkonzentration in der Reihenfolge homoacetogene > methanogene > sulfatreduzierende > fumaratreduzierende > nitratreduzierende Bakterien (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988). Die Schwellenwertkonzentration, oberhalb derer ein bestimmter Elektronenakzeptor mit Wasserstoff reduziert wurde, korreliert mit dem Redoxpotential des Elektronenakzeptors. In Tabelle 5 sind die stationären Wasserstoffkonzentrationen bei Anwesenheit unterschiedlicher Elektronenakzeptoren dargestellt.

Tabelle 5: Stationäre Wasserstoffkonzentrationen bei der mikrobiellen Reduktion unterschiedlicher Elektronenakzeptoren (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988; Lovley u. Goodwin, 1988)

Reaktion	ΔG° (kJ/ H ₂)	stat. [H ₂] (nM)
$2 \text{ NO}_3^- + 5 \text{ H}_2 + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$	-224	< 0,05
$\text{MnO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{Mn(OH)}_2$	-163	< 0,05
$2 \text{ Fe(OH)}_3 + \text{H}_2 \rightarrow 2 \text{ Fe(OH)}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	-50	0,20
$\text{SO}_4^{2-} + 4 \text{ H}_2 \rightarrow \text{S}^{2-} + 4 \text{ H}_2\text{O}$	-38	1-1,5
$\text{CO}_2 + 4 \text{ H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ H}_2\text{O}$	-34	7-10
$2 \text{ CO}_2 + 4 \text{ H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 4 \text{ H}_2\text{O}$	-26	77

Zur Erklärung der verschiedenen Wasserstoffkonzentrationen wurde ein kinetisches Modell vorgeschlagen (Hoh u. Cord-Ruwisch, 1996), das sich vom Haldane-Ansatz ableitet und eine Rückreaktion des Produktes zum Enzym-Substrat-Komplex zuläßt. Diesem Modell zufolge ist die Schwellenwertkonzentration diejenige Wasserstoffkonzentration, bei der die

Reduktion des Elektronenakzeptors noch genügend konservierbare Energie liefert. Je niedriger die freie Standardreaktionsenthalpie für die Reduktion eines Elektronenakzeptors ist, um so höher muß die Wasserstoffkonzentration sein, damit die Reaktion exergon bleibt. Dieses Modell berücksichtigt jedoch nicht, daß zur Bildung des für anabole Prozesse notwendigen ATP ein Mindestbetrag konservierbarer Energie frei werden muß (Kleerebezem u. Stams, 2000).

1.6.3 Weitere Faktoren

Die Fähigkeit hydrogenotropher Mikroorganismen, um limitierten⁷ Wasserstoff zu konkurrieren, wird nicht allein vom Energiegewinn aus der Elektronenakzeptorreduktion bestimmt. Ein Beispiel ist der Fluß von Redoxäquivalenten in den Enddärmen höherer Termiten (Brauman *et al.*, 1992). Obwohl die Methanogenese aus Wasserstoff und Kohlendioxid mehr Energie liefert als die Acetogenese, war bei einigen der untersuchten Termitenspezies die Bildung von Acetat der vorherrschende wasserstoffverbrauchende Prozeß (Breznak u. Kane, 1990). Neben axialen Wasserstoffgradienten und Wasserstoffdiffusion durch die Epithelien benachbart liegender Darmbereiche, was eine Akkumulation von Wasserstoff auf den für die Acetogenese notwendigen Schwellenwert ermöglicht (Tholen u. Brune, 1999; Brune u. Friedrich 2000), wurde auch ein radialer Wasserstoffgradient und das gehäufte Vorkommen homoacetogener Bakterien im zentralen Bereich des Darmlumens (Brune, 1998) als Erklärung angeführt.

Aufgrund der geringen Diffusionsgeschwindigkeit von Wasserstoff fördert die räumliche Nähe der Bakterien („*juxtaposition*“, Conrad *et al.*, 1985) oder deren Assoziation in Flocken den Wasserstofftransfer in syntrophen Mischkulturen (Thiele *et al.*, 1988). Als Beispiel sei der Einsatz sog. „*biomethanation granules*“ zur Beschleunigung der methanogenen Phase in Biogasreaktoren genannt (Thiele *et al.*, 1990). In den ca. 1 mm großen Aggregaten liegen syntrophe Oxidierer und methanogene Bakterien in enger räumlicher Assoziation vor, was den Wasserstofftransfer begünstigt. Untersuchungen einer thermophilen syntrophen Mischkultur aus *Thermotoga maritima* (organoheterotropher Oxidierer) und *Methanococcus jannaschii* (hydrogenotropher Methanogener) zeigten, daß die Trennung der Partner durch eine Dialysemembran (welche für Wasserstoff permeabel war) den Wasserstofftransfer komplett inhibierte (Muralidharan *et al.*, 1996), was ebenfalls auf die Notwendigkeit des engen Beisammenseins bzw. der

⁷ Hiermit sind Wasserstoffkonzentrationen gemeint, die nahe der Schwellenwertkonzentration liegen, welche die Reduktion des Elektronenakzeptors thermodynamisch ermöglicht.

Aggregation der Mikroorganismen hindeutete. Wie erfolgreich verschiedene hydrogenotrophe Bakterien um Wasserstoff konkurrieren, hängt daher nicht zuletzt von deren Entfernung zum wasserstoffproduzierenden Partner ab. Als weiteres Beispiel seien anaerobe Festbetteaktoren aufgeführt, in denen die oben beschriebene Hemmung der Methanogenese bei sulfathaltigen Abwässern nicht auftrat (Collerane *et al.*, 1994), da sich methanogene Bakterien eher als sulfatreduzierende Bakterien auf Trägermaterialien wie Polyurethan immobilisieren ließen (Isa *et al.*, 1986).

1.7 Sulfatreduktion mit methylotrophem Partner

Für ein Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion mit Methanol käme vor allem der Einsatz methylotropher Sulfatreduzierer in Frage. Wenn Sulfatreduzierer jedoch nicht in der Lage sind, Methanol direkt als Substrat zu nutzen, muß ein geeigneter methanoloxidierender Partner vorhanden sein, der ihnen die Elektronen aus dem Methanol zur Verfügung stellt. Unter anaeroben Bedingungen kann Methanol über unterschiedliche Wege metabolisiert werden (Abbildung 1).

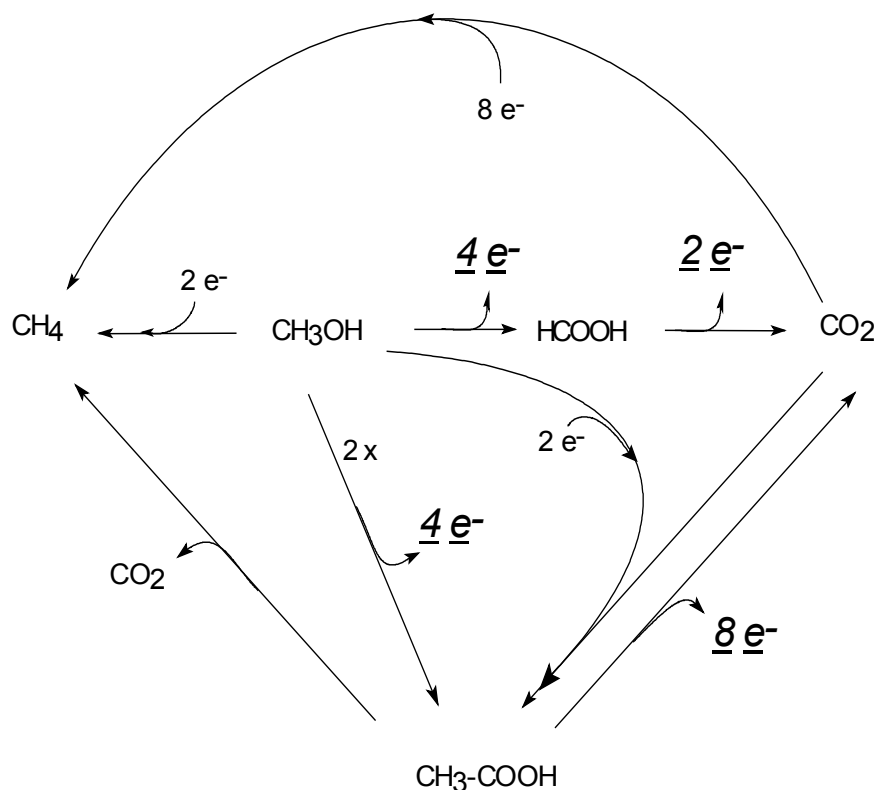


Abbildung 1: Oxidation und Reduktion von Methanol unter anaeroben Bedingungen. Die Pfeile kennzeichnen mögliche elektronenliefernde Reaktionen (unterstrichen) bzw. mit der Sulfatreduktion konkurrierende Prozesse.

Methanol kann von *Methanosarcina*-Arten zu Methan reduziert werden (Balch *et al.*, 1979; Bryant u. Boone, 1987; Kjeltjens u. Vogel, 1993; Abbildung 2). Oxidationsprodukte sind Kohlendioxid, Acetat oder Formiat, letztere können weiter oxidiert werden (Hamlet u. Baylock, 1969; Winters u. Ljungdahl, 1989; Diekert u. Wohlfahrt; 1994; Daniel *et al.*, 1999).

Die Elektronen, die bei der Oxidation frei werden, müssen in geeigneter Form (als Wasserstoff, Formiat etc.) auf den Sulfatreduzierer übertragen werden. Wenn dem Methanoloxidierer kein „eigener“ Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, ist er auf die Anwesenheit des Sulfatreduziers angewiesen. In diesem Fall würden alle aus dem Methanol stammenden Elektronen zur Sulfatreduktion zur Verfügung stehen; eine solche Mischkultur würde sich physiologisch nicht von einem methylotrophen Sulfatreduzierer unterscheiden. Die komplette syntrophe Oxidation von Methanol wurde z.B. für ein clostridienähnliches Isolat in Kokultur mit einem Eisenreduzierer und Eisen(III) beschrieben (Daniel *et al.*, 1999).

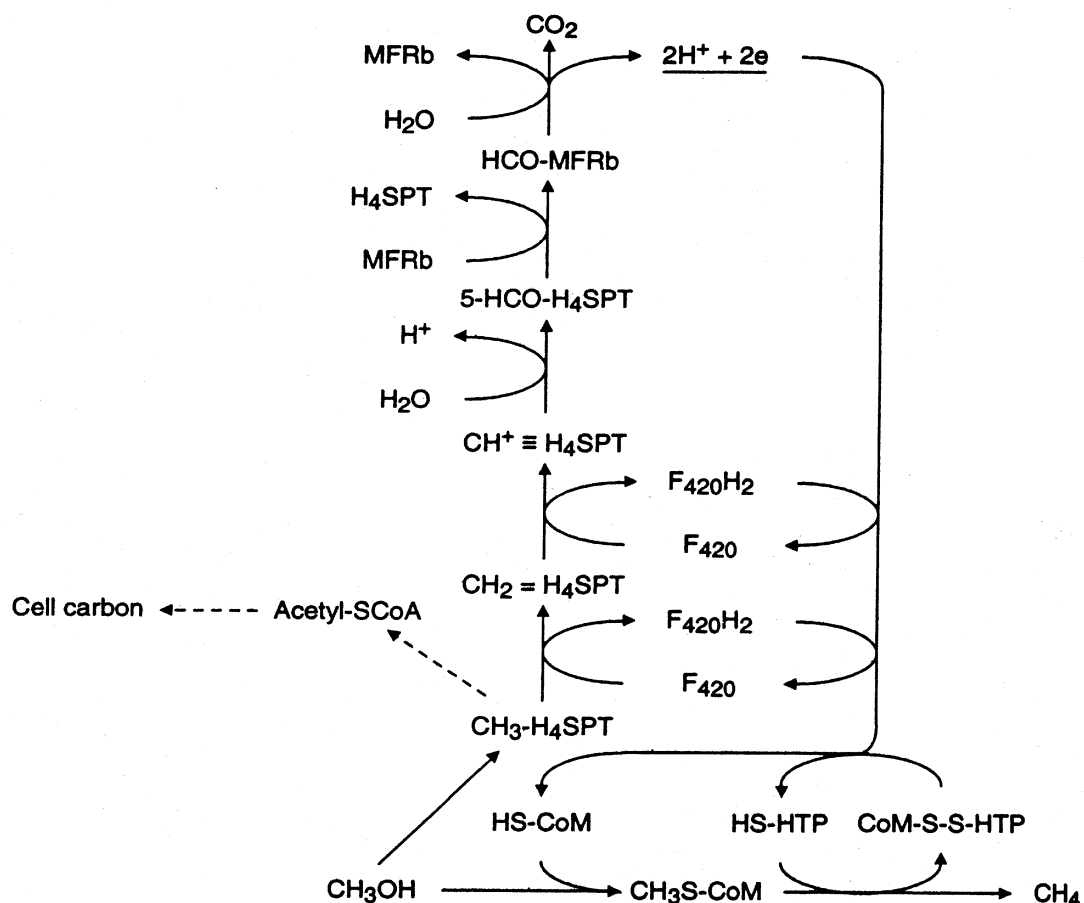


Abbildung 2: Methanolverwertung durch methanogene Bakterien (aus Kjeltjens u. Vogel, 1993). Methanol wird zu Methan reduziert; dazu notwendige Elektronen stammen aus der Oxidation von Methanol zu Kohlendioxid. F_{420} : Coenzym F_{420} ; H_4SPT : 5,6,7,8-Tetrahydrosarcinopterin; HS-CoM : Coenzym M; HS-HTP : 7-Mercaptoheptanoyl-L-Threoninphosphat; MFRb : Methanofuran-b.

1.8 Ziel- und Aufgabenstellung

Die mikrobielle Sulfatreduktion mit Methanol soll als eine Möglichkeit zur Dekontamination sulfathaltiger Bergbauwässer untersucht werden.

Dazu sind Mikroorganismen zu isolieren, die in der Lage sind, Methanol als Elektronendonator für die Sulfatreduktion und als Kohlenstoffquelle zur Regeneration des Biokatalysators zu nutzen.

Um Methanol effizient, d.h. ohne Elektronenfluß auf andere Elektronenakzeptoren, zur Sulfatreduktion zu nutzen, wäre es wünschenswert, über einen Sulfatreduzierer zu verfügen, der in der Lage ist, Methanol zu oxidieren und zu assimilieren, d.h. als Substrat für Wachstum und Vermehrung zu nutzen. Wenn dies nicht der Fall ist, soll eine Mischkultur zusammengestellt werden, die aus einer methanoloxidierenden und einer sulfatreduzierenden Komponente besteht, welche das vom methylo trophen Partner gebildete elektronenübertragende Intermediat nutzen kann.

Das ETI soll identifiziert werden, um Bedingungen zu finden, unter denen ein möglichst hoher Anteil des Methanols zur Sulfatreduktion genutzt wird. Der Einfluß folgender Faktoren auf den Elektronentransfer und somit auf die Effizienz der Sulfatreduktion mit Methanol soll untersucht werden:

- pH-Wert
- Substratkonzentration
- Verhältnis der Biomasse der einzelnen Partner
- Anwesenheit weiterer Elektronenakzeptoren
- Assoziation der Mikroorganismen

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Mikroorganismen

Die Kulturen B378 und B393 wurden von Dr. Barbara C. Hard zu Verfügung gestellt. B378 stammt aus dem Schlamm eines Abwassertümpels der stillgelegten Zuckerfabrik in Helmsdorf. B393 stammt aus einer Kupfermine in Averøy (Norwegen). Von der DSMZ (Braunschweig) wurden folgende Referenzstämme bezogen:

Acetobacterium woodii 1030^T

Desulfovibrio vulgaris subsp. *vulgaris* 644^T

Methanosarcina barkeri 800^T

2.2 Isolation und Stammhaltung

Für Wachstum und Isolation auf Agarplatten wurde das AnaeroGenTM-Anaerobiersystem (OXOID Ltd, Basingstoke, UK) verwendet. Das Anaerocult[®]-System (Merck KgaA, Darmstadt) erwies sich als ungeeignet, da hier Wasserstoff gebildet wird. Dieser kann von hydrogenotrophen Bakterien genutzt werden und täuscht somit Wachstum auf nicht verwerteten Substraten vor. Zum anderen inhibierte Wasserstoff das Wachstum des homoacetogenen Isolates auf Medium ohne Carbonat. Alle Ansätze wurden bei 30°C inkubiert.

Die Isolation der Bakterien aus den Kulturen B378 und B393 erfolgte auf Sulfatreduzierermedium (SRM, 2,5 % Agar, Rezeptur auf Seite 33). Methanol, Lactat und Acetat (jeweils 10 mM) wurden als Substrate eingesetzt. In den zur Inkubation der methyloptrophen Bakterien verwendeten Anaerobtopf wurden vier mit dem sulfatreduzierenden Isolat SRB378 beimpfte Agarplatten (SRM/Lactat) gegeben.

Die Stammhaltung der Sulfatreduzierer und des acetogenen Isolates erfolgte auf den zur Isolation verwendeten Medien (2,5% Agar). Alle 2 Monate wurden die Isolate überimpft und auf Reinheit geprüft.

Zur Isolation methanogener Bakterien wurden Verdünnungsreihen (bis 10⁻¹⁰) in Medium 120 (100 mM Methanol, Rezeptur auf Seite 35) angesetzt. Penicillin (2g/L)

und Molybdat (20 mM) wurden zur Inhibierung von Eubakterien⁸ bzw. Sulfatreduzierern⁹ zugegeben. Aus der höchsten gewachsenen Verdünnungsstufe wurden Verdünnungsreihen im Weichagar (Medium 120 wie oben, 1% Agarose, bis 10^{-7}) angesetzt. Unter der Stereolupe wurden einzelne Kolonien entnommen und wiederum in Flüssigmedium kultiviert. Nach insgesamt 4 Passagen Flüssigkultur/Weichagar waren keine Begleitkulturen mikroskopisch sichtbar. Bei weiterer Kultivierung auf Medium 120 ohne Molybdat und Penicillin konnte ausschließlich das Wachstum des methanogenen Isolates beobachtet werden. Die Kultivierung auf festem Medium (Med. 120, 2,5% Agar) war möglich, jedoch gestaltete sich die Passage auf flüssiges Medium schwierig.

2.3 Kultivierung der Stämme

Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte entweder in randvoll gefüllten DURAN[®]-Flaschen (Schott, Mainz) oder in zu Hälfte gefüllten Transfusionsflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden) unter N₂ bzw. CO₂-Atmosphäre bei 30°C. Die Transfusionsflaschen wurden mit Chlorbutylgummistopfen verschlossen. In Versuchen zur Analyse der Gasphase wurden dicht schließende Butylgummistopfen eingesetzt.

2.3.1 Vorkulturen und deren Aufbereitung

Vorkulturen der sulfatreduzierenden Isolate SRB378 und SRB393 sowie des Referenzstammes *Desulfovibrio vulgaris* (DSM644^T) wurden auf Sulfatreduzierermedium mit reduziertem Eisengehalt (SRM-Fe, Rezeptur auf Seite 34) gezogen. Lactat und Hefeextrakt (1g/L) wurden als Substrat zugesetzt. 50 mL Flüssigkultur wurden mit einer Einzelkolonie beimpft. Größere Volumina wurden 1:20 mit gewachsener Flüssigkultur angeimpft. Wenn kein Lactat mehr nachweisbar war (ca. 3-4 Tage, Lactattest siehe analytische Methoden), wurden die Bakterien in den (unten beschriebenen) Versuchen eingesetzt.

⁸ Penicillin hemmt als Murein-Biosynthese-Inhibitor vor allem das Wachstum gram-positiver Bakterien; die Angaben zum Einsatz bei der Isolation methanogener Bakterien wurden der Literatur entnommen (Whitman *et al.*, 1992 und dort zitierte Literatur).

⁹ Molybdat interagiert mit dem sulfat-aktivierenden Enzym ATP-Sulfurylase und wird zur spezifischen Inhibierung der dissimilatorischen Sulfatreduktion eingesetzt (Taylor u. Oremland. 1979; Smith u. Klug, 1981).

Zur Kultivierung von WF4 und *Acetobacterium woodii* (DSM1030^T) wurde eine Kolonie in 15 mL SRM (Methanol und Hefe als Substrat) suspendiert und im Anaerobtopf inkubiert. Für die weitere Kultivierung (1:10 angeimpft) wurde carbonatgepuffertes Medium (311*, Rezeptur auf Seite 35) mit Methanol und Hefextrakt als Substrat verwendet. Die Vorkultur wurde für Versuche eingesetzt, wenn kein Methanol (siehe analytische Methoden) mehr nachweisbar war.

MPB393 und *Methanosarcina barkeri* (DSM 800^T) wurden auf Medium 120 (carbonatgepuffert, Rezeptur auf Seite 35) bzw. klarem Mineralsalzmedium (phosphatgepuffert, Rezeptur auf Seite 35) mit Methanol (30 mM) kultiviert.

Zur Gewinnung von Biomasse für Versuche in dichter Suspension wurden die Bakterien in 1L-Duran[®]-Flaschen (Sulfatreduzierer, Acetogene/Sulfatreduzierer-Mischkultur) oder in 1L Transfusionsflaschen (Methanogene) kultiviert. Die gewachsene Kultur wurde in 85 mL NALGENE[®] Oak Ridge-Zentrifugenbechern (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) abzentrifugiert (15 min, 13000 g, 4°C). Anschließend wurde die Biomasse mit klarem Mineralsalzmedium gewaschen, nochmals abzentrifugiert, in klarem Mineralsalzmedium resuspendiert und bei 4°C unter H₂/CO₂-Atmosphäre (80/20) bis zum Versuchsbeginn gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden unter anaeroben Bedingungen ausgeführt.

2.3.2 Versuche zu Wachstum und Vermehrung/batch-Ansätze

Für Versuche zu Substratverwertung, Wachstum und Vermehrung wurde SRM (phosphatgepuffert, mit Sediment, Rezeptur auf Seite 33), klares Mineralsalzmedium (phosphatgepuffert, ohne Sediment, Rezeptur auf Seite 35) oder Medium 311* (carbonatgepuffert, Rezeptur auf Seite 35) verwendet. Für Versuche zum Einfluß von Carbonat auf die Sulfatreduktion wurde carbonatgepuffertes Medium 311* mit erhöhter Sulfatkonzentration (3g/L) eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde Methanol (30 mM) als Substrat eingesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Details zu verwendeten Medien und Versuchsbedingungen sind im Kapitel Ergebnisse bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Bei Versuchen zur Messung der Wasserstoffkonzentration im ppm-Bereich war es notwendig, die Vorkulturen bzw. unter H₂/CO₂ (80/20) gelagerten Zellsuspensionen 30 min mit Stickstoff zu spülen, um den Eintrag von Wasserstoff in den Versuchsansatz zu verringern.

Flüssigkulturen in Duran[®]-Flaschen wurden in einer Bactron[™]-Anaerob-Werkbank (Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, USA) inkubiert und beprobt. Probennahme aus Transfusionsflaschen erfolgte mit einer sterilen, stickstoffgespülten Einwegspritze. Methanol-, Sulfat- und Acetatkonzentration sowie der Proteingehalt

wurden bestimmt. Bei Versuchen mit methanogenen Kulturen wurde Methan in der Gasphase bestimmt (siehe analytische Methoden).

2.3.3 Versuche im Rührkesselreaktor

Versuche zur kontinuierlichen Sulfatreduktion sowie zur Sulfatreduktion mit Wasserstoff wurden in 0,5 L Rührkesselreaktoren (Braun, Melsungen) durchgeführt. Für Zu- und Abläufe sowie die Begasung wurde Schlauchmaterial mit geringer Gaspermeabilität (Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 6: Verwendetes Schlauchmaterial; Angaben zur Gaspermeabilität aus Sowers u. Noll, 1995 sowie PharMed®-Datenblatt

Handelsname	Hersteller	autoklavierbar	Gaspermeabilität ¹⁰ (N ₂)
PharMed®	Norton, Akron, OH, USA	+	8
TYGON®	Norton, Akron, OH, USA	-	0,02-0,03
Viton®	Du Pont De Nemours, Coatesville, PA, USA	+ ¹¹	0,4

Der Reaktor wurde nach dem Autoklavieren (40 min, 121°C) mit 300 mL Medium gefüllt und anschließend 30 min mit Stickstoff begast. Erst dann erfolgte die Zugabe von Methanol und der Impfkultur. Temperatur, pH-Wert und Rührergeschwindigkeit konnten *on-line* gemessen und geregelt werden; weiterhin wurden Meßdaten zum Säure- (1M H₂SO₄ oder 1M HCl) und Laugeverbrauch (1 M NaOH) erfaßt. Alle 4 Stunden wurde für eine Minute bei 300 r.p.m. gerührt. Zur Probenahme wurde der Gasraum mit Stickstoff gespült und der Reaktorinhalt voll durchmischt.

2.3.4 Sulfatreduktion mit Wasserstoff -

Wachstum mit Wasserstoff / Kohlendioxid

Untersuchungen zur Sulfatreduktion mit Wasserstoff sowie zum autotrophen Wachstum wurden in 0,5 L Rührreaktoren durchgeführt. Für beide Versuche wurde ein Prüfgas aus 80% H₂ und 20% CO₂ eingesetzt.

¹⁰ $10^{-10} \times \text{Gasvolumen (cm}^3\text{)} \times \text{Wanddicke (cm)} / [\text{Fläche (cm}^2\text{)} \times \text{Zeit (sec)} \times \text{Gasdruck (cm Hg)}]$

¹¹ Nach mehrmaligem Autoklavieren sinkt die mechanische Stabilität; als Pumpschlauch ungeeignet.

Um den Wasserstoffverbrauch bei der Sulfatreduktion zu messen, wurde eine gewachsene Kultur des Sulfatreduzierers ca. 30 min mit einem Gemisch des Prüfgases und N_2 begast. Der Gasraum des Reaktors wurde mit einem mit Vakuumpumpenöl gefüllten U-Rohr verbunden. Nachdem die Gaszufuhr unterbrochen war, wurde eine Gasprobe zur gaschromatographischen Bestimmung von CO_2 , H_2 , O_2 und N_2 genommen. Die Volumenreduktion durch Wasserstoffverbrauch konnte im U-Rohr gemessen werden. Nach ca. 3-4 h wurde eine weitere Gasprobe genommen und der Versuch beendet. Protein- und Sulfatkonzentration wurden ebenfalls zu Beginn und am Ende bestimmt.

Stickstoff wurde als Inertgas zugegeben unter der Annahme, daß sich die Stoffmenge des Stickstoffes nicht ändert (Gleichung 14) und sich die durch den Wasserstoffverbrauch hervorgerufene Gesamtvolumenverringerng durch die Erhöhung des Stickstoffanteils im Gas ermitteln läßt.

Gleichung 14: $x_{N2A} * V_A = x_{N2E} * V_E$

Gleichung 15: $V_A = V_E + \Delta V$

$$\rightarrow V_E = \frac{\Delta V}{\frac{x_{N2E}}{x_{N2A}} - 1}$$

x_{N2A} : Volumenanteil des Stickstoffs am Anfang

x_{N2E} : Volumenanteil des Stickstoffs am Ende

ΔV : Volumenänderung im U-Rohr

V_A : Gesamtvolumen am Anfang

V_E : Gesamtvolumen am Ende

Für die Untersuchung auf autotrophes Wachstum wurde die Kultur kontinuierlich mit dem Prüfgas begast. Zusätzlich wurde Acetat (10 mM) als möglicherweise notwendige Kohlenstoffquelle zugegeben.

Bei Versuchen zur Verwertung von Lactat und Wasserstoff (100% i. d. Gasatmosphäre) wurde der Wasserstoffverbrauch (Volumenabnahme im U-Rohr) zu jeder Probenahme bestimmt. Anschließend wurde der Gasraum 2 min mit Wasserstoff gespült und ein neuer Startwert ermittelt. Die gemessenen Volumina wurden um die beim Kontrollansatz (100% Stickstoffatmosphäre) beobachteten Volumenänderungen korrigiert.

2.3.5 Substratverwertungsspektren

Versuche zur Verwertung diverser organischer Verbindungen (Tabelle 7) wurden in Sulfatreduzierermedium bzw. Medium 311* angesetzt. 15 mL Medium wurden mit 0,75 mL gewachsener Vorkultur angeimpft. Die Isolate wurden einzeln oder gemeinsam mit oder ohne Carbonat kultiviert (Tabelle 8). Bei gemeinsamer Kultivierung von B378 und WF4 wurde eine auf Lactat und Methanol gewachsene Vorkultur eingesetzt. Zu Versuchsbeginn und nach dreiwöchiger Inkubation bei 30°C wurden Sulfat- und Proteinkonzentration gemessen. Proteinzunahme um 10 mg/L und Sulfatabnahme um 2 mM verglichen mit der Kontrolle ohne Substrat wurden als Indiz für Wachstum und Sulfatreduktion gewertet.

Tabelle 7: Auf Verwertung durch die Isolate getestete Verbindungen (Konzentration: 10 mM)

Alkohole	Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol, Glycerol
Aldehyde	Formaldehyd, Acetaldehyd
Carbonsäuren	Formiat, Acetat, Lactat, Pyruvat, Malat, Fumarat, Succinat, Benzoat
Amine/Aminosäuren	Alanin, Cholin, Betain
Monosaccharide	Glucose, Fructose

Tabelle 8: Kultivierung der Isolate einzeln und gemeinsam auf verschiedenen Medien

Isolat	Medium
SRB378	SRM
SRB393	SRM
WF4	SRM, 311*
SRB378/WF4	SRM

2.3.6 Mechanische Disaggregation von MPB393

3 L Vorkultur wurden, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, abzentrifugiert, gewaschen und die Zellen in 15 mL klarem Mineralsalzmedium resuspendiert. 10 Eppendorfreaktionsgefäße (Volumen: 2 mL) wurden mit 500 µL Glasperlen (Korngröße 150µm) befüllt und in die Anaerobenwerkbank überführt. Die Reaktionsgefäße wurden mit nochmals durchgemischter Zellsuspension randvoll gefüllt

und dicht verschlossen. Die mechanische Disaggregation erfolgte in einer MM-2 Schwingmühle (Retsch GmbH & Co. Kg, Haan, vorgekühlte Zelle); die Parameter sind im Abschnitt Ergebnisse (3.7.2) aufgeführt. Der gesamte Inhalt der Reaktionsgefäße (2 je Ansatz) wurde sofort in mit 40 mL klarem Mineralsalzmedium befüllte Serumflaschen (100 mL, Stickstoffatmosphäre) überführt. Dazu und für weitere Probenahmen wurde eine stickstoffgespülte Spritze verwendet.

2.4 16S rDNA-Sequenzierung

2.4.1 Zellyse und DNA-Extraktion

Für Zellyse und DNA-Extraktion der Eubakterien-Isolate wurde das NucleoSpin® C+T-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Zellaufschluß und DNA-Extraktion des methanogenen Isolates erfolgten nach einem modifizierten Protokoll des FastDNA® Extraktionskits für Böden (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA). 60 mL einer gewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert (15 min, 8000 g) und das Pellet mit den im Kit vorhandenen Keramik/Silica-Perlen (MULTIMIX 2 Tissue Matrix Tube), 978 mL Phosphatpuffer und 122 mL MT-Puffer versetzt. Der Aufschluß (2mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, 15 min, maximale Leistung, vorgekühlte Zelle) wurde in einer MM-2 Schwingmühle (Retsch GmbH & Co. Kg, Haan) durchgeführt. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers.

2.4.2 PCR-Primer und Parameter

Für die Amplifikation der Eubakterien-16S-rDNA-Fragmente wurden die Universalprimer 27F und 1525R (Lane *et al.* 1991, Tabelle 12) verwendet. Zur Amplifikation der 16S-rDNA-Fragmente des methanogenen Isolates wurden die Archaea-Primer 1AF und 1100AR (Hales *et al.* 1996, Tabelle 12) eingesetzt. Für den PCR-Ansatz wurden TAQ-Polymerase und dNTPs (Tag PCR Master Mix Kit, Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt (Tabelle 9). Zyklus-Parameter sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: PCR-Ansatz

21 µL	H ₂ O (dest.)
25 µL	Master Mix
1 µL	Primer F (5pmol/µL)
1 µL	Primer R (5pmol/µL)
2 µL	Zellysat

Tabelle 10: Zyklus-Parameter für PCR

5 min	95°C	
45 sec	95°C	30 Zyklen
45 sec	58°C	
75 sec	72°C	
5 min	72°C	

2.4.3 Reinigung der PCR-Produkte

Das PCR-Produkt wurde in Agarosegel aufgereinigt. Zur Herstellung der Gele (1,5% Agarose) und als Laufpuffer für die Elektrophorese (50 V, MUPID-21 Elektrophoresekommer, Advance, Tokio, J) wurde 0,5 x TAE-Puffer (Rezeptur auf Seite 36) verwendet. Anschließend wurde das Amplifikat mit dem Quia Quick™ Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosgel extrahiert.

2.4.4 Sequenzierung und Sequenzvergleich

Für die Sequenzierreaktion (Tabelle 11) wurde das Big Dye™ Terminator Cycle Sequenzierkit (PE Biosystems, Warrington, UK) verwendet, ein genaues Protokoll ist in Müller *et al.* (1999) zu finden. Für Sequenzierung der Eubakterien-Isolate wurden acht unterschiedliche Sequenzierprimer (Tabelle 12, Zeile 1-8) verwendet. Für das methanogene Isolat wurden nur die für die Amplifikation verwendeten Primer (Tabelle 12, Zeile 9/10) als Sequenzierprimer eingesetzt. Nach der Aufreinigung durch Ethanolfällung wurde mit einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, Warrington, UK) sequenziert.

Tabelle 11: Sequenzierungsansatz

10-x µL	H ₂ O (dest.)
1 µL	Reaktionsmix
1 µL	Primer
x µL ¹²	Amplifikat

Tabelle 12: Verwendete Primer (Lane *et al.*, 1991; Hales *et al.*, 1996)

27F	5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'
357F	5'-CTC-CTA-CGG-GAG-GCA-GCA-G-3'
519R	5'-GTA-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-3'
530F	5'-GTG-CCA-GCA-GCC-GCG-GTA-3'
926F	5'-AAA-CTC-AAA-GGA-ATT-GAC-GG-3'
1100R	5'-GGG-TTG-CGC-TCG-TTG-CGG-3'
1525R	5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CCG-3'
1114F	5'-CCG-CAA-CGA-GCG-CAA-CCC-3'
1AF	5'-TC(CT)-G(GT)T-TGA-TCC-(CT)G(GC)-C(AG)G-AG-3'
1100AR	5'-TGG-GTC-TCG-CTC-GTT-G-3'

Konsenssequenzen wurden mit dem Programm „assembler“ (PE Biosystems, Warrington, UK) erstellt. Zum Vergleich mit DNA Sequenz-Datenbanken wurde das Ähnlichkeitssuchprogramm BLASTN 2.0.8 (*basic local alignment search tool*; Altschul *et al.*, 1997) verwendet.

2.5 Analytische Methoden

Photometrische Messungen wurden an einem U2000 Spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokio, J) durchgeführt. Details zu chromatographischen Methoden sind in Tabelle 13 aufgeführt.

¹² Das Volumen richtete sich nach dem DNA-Gehalt des gereinigten Amplifikats und wurde nach der Elektrophorese bestimmt. Üblicherweise wurden 2-4 µL Amplifikat eingesetzt.

2.5.1 Sulfat

Die Messung der Sulfatkonzentration erfolgte mit dem Spectroquant® Schnelltest 14791 (Merck KgaA, Darmstadt) oder ionenchromatographisch (DX-100 Ionenchromatograph, DIONEX Co., Sunnyvale, CA, USA). Für den Schnelltest wurde der Kulturüberstand (6 min, 10000g) 1:10 verdünnt und nach dem Protokoll des Herstellers behandelt. Kalibriert wurde mit Na₂SO₄ (wasserfrei) im Bereich 0,2-2 mM. Für die ionenchromatographische Bestimmung wurden die Proben 1:100 verdünnt.

2.5.2 Lactat

Zur Bestimmung der Lactatkonzentrationen wurde der Lactatschnelltest 735-10 der Firma Sigma Diagnostics, Inc. (St. Louis, MO, USA) verwendet. 10 µL Kulturüberstand (6 min, 10000g) bzw. mitgelieferter Standard (10 mM) wurden mit 1 mL Reagenzlösung versetzt. Die Absorption wurde nach 7 min bei 540 nm gegen die Reagenzlösung gemessen.

2.5.3 Methanol

Die Methanolkonzentrationen der Proben wurden an einem GC1000 Gaschromatographen mit HSS 86.50 Headspace-Autosampler (beide Geräte: DANI Strumentazione Analitica, Monza, I) gemessen. 1 mL Kulturüberstand (6 min, 10000g, 4°C) wurde in ein 20mL Headspace-Vial gegeben, das mit einem Butyl/Teflon-Septum und Bördelkappe (alles ESWE-Analysentechnik, Gera) verschlossen wurde. Kalibriert wurde im Bereich 0-30 mM mit einem Methanol/Wasser-Gemisch.

2.5.4 Acetat

Die Messung der Acetatkonzentrationen erfolgte mittels HPLC (Gina-50, Gynkotec, Gemeringen) bzw. IC (siehe Sulfatmessung). Die Messung mittels HPLC (Ionenpaarchromatographie) ermöglichte die Acetatanalyse der unverdünnten Proben. Dazu wurde 500 µL Kulturüberstand (6 min, 10000g) durch einen Mikrospin-Zentrifugenfilter (PP, 45 µm, membraPure, Bodenheim) filtriert und in ein 2 mL Rotilabo®-Probengefäß gegeben, das mit Silikon/Teflon-Septum und Schraubkappe (alles Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verschlossen wurde. Für die ionenchromatographische Bestimmung wurden die Proben 1:10 verdünnt.

2.5.5 Gasmessungen

Die simultane Messung von Methan-, Stickstoff-, Wasserstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen erfolgte an einem HP6890 Gaschromatographen (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Messungen der Methankonzentration erfolgten ebenfalls gaschromatographisch (GC3800, VARIAN GmbH, Darmstadt). Zur Bestimmung der Wasserstoffkonzentration im ppm-Bereich wurde ein *reducing gas analyser* RGA3 (TRACE Analytical, Menlo Park, CA, USA) eingesetzt¹³.

Tabelle 13: Chromatographische Methoden

Analyt	Methode/Säule	Temperatur	Mobile Phase	Detektor
Sulfat/Acetat	Ionenaustauschchromatographie 046124, IonPac AS14	RT	1:1 NaHCO ₃ (0,6 mM) Na ₂ CO ₃ (4,8 mM)	Leitfähigkeit
Methanol	Gaschromatographie HP19091N-231, INNOWax	45°C	N ₂	FID
Acetat	Ionenpaarchromatographie Carb-Ex	40°C	H ₂ SO ₄ (5 mM)	UV/VIS (210 nm)
Wasserstoff Sauerstoff Stickstoff Methan Kohlendioxid	Gaschromatographie Säule 1: HP19096C-010, Füllung Porapak Q Säule 2: HP19001A-MA2, Füllung Molsieb 5A,	40°C (0) 10°C/min 100°C (1 min) 5°C/min 120°C (0)	He	WLD
Methan	Gaschromatographie 7536 CP, Füllung Molsieb 5A	100°C	He	WLD
Wasserstoff (ppm-Bereich)	Gaschromatographie keine Angabe des Herstellers	RT	N ₂	HgO

¹³ Wasserstoffmessungen bei Kultivierung der Mischkultur WF4/SRB378 wurden bei Prof. Dr. Schink, Universität Konstanz durchgeführt.

2.5.6 Protein

Protein wurde nach der Methode von Bradford (1978) bestimmt. 1 mL Probe wurde abzentrifugiert (6 min, 10000g) und das Pellet mit 1M NaOH 10 min bei 100°C lysiert. Kalibriert wurde im Bereich 0-100 mg/L mit RSA Fraktion V. 50-100 µL Zellysat wurden mit 1 mL Bioquant® Protein-Reagenzlösung 1.10306 (Merck KGaA, Darmstadt) versetzt. Nach 2 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Bei Versuchen in SRM (sedimenthaltig) wurde 1mL unbeimpftes Medium wie eine Probe behandelt und der ermittelte Meßwert von dem der Proben subtrahiert.

2.5.7 Standardabweichungen der häufig verwendeten Analysenmethoden

Aufgrund des geringen Arbeitsvolumens der Ansätze mußte das Probenvolumen beschränkt werden. Daher war in den meisten Fällen nur eine Doppelbestimmung der Meßwerte möglich. Für eine Fehlerabschätzung wurde bei den häufig angewendeten Analysenmethoden die jeweilige Standardabweichung (n=15) ermittelt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Standardabweichungen (n=15) häufig angewendeter Analysenmethoden

Analyt	Mittelwert der Messungen	relative Standardabweichung
Protein (photometrisch)	78,6 mg/L	3,6 %
Sulfat (photometrisch)	17,7 mM	5,3 %
Methanol (gaschromatographisch)	10,4 mM	4,1 %
Wasserstoff (gaschromatographisch; HgO-Detektor)	23 ppm	8,8 %

2.6 Mikroskopie und Photographie

2.6.1 Verwendete Geräte

Details zu photographischen Aufnahmen sind bei der jeweiligen Abbildung angegeben. Folgende Mikroskope und bildgebende Verfahren wurden verwendet:

- Axiolab Durchlichtmikroskop, MC 80 Mikroskop-Kamera (beide Geräte: Carl Zeiss Microscope Division, Oberkochen)

- Axioscop Durchlichtmikroskop (Carl Zeiss Microscope Division, Oberkochen)
HBO 100 UV-Lichtquelle (Atto Instruments, Rockville, MD, USA)
DXC-930P Colorvideocamera (SONY, Tokio, J)
Optimas 4.1 Bildanalysesoftware (Stemmer, Berlin)
- TCS 4D konfokales Laserscannigmikroskop (Leica, Heidelberg), Ar/Kr Laser
ScanWare Ver. 5.1A Bildanalysesoftware (Leica, Heidelberg)

2.6.2 Färbemethoden

Für die Gram-Färbungen der Isolate wurden Färbelösungen (110218; 109218; 109217) von Merck (Darmstadt) verwendet.

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen mit SYTO[®]9 gefärbt. Zur selektiven Anfärbung gram-positiver Zellen wurde Hexidiniumiodid verwendet. Beide Farbstoffe waren im Live Bac*Light*[™] Bacterial Gram Stain Kit L-7005 (Molecular Probes, Eugen, OR, USA) enthalten, welches nach den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Anregung bei 480 nm führt bei SYTO[®]9 zu grüner (500 nm), bei Hexidiniumiodid zu roter (625 nm) Fluoreszenz.

2.7 Medien und Puffer

2.7.1 Sulfatreduzierermedium (SRM)

(nach Postgate, 1984)

Lösung 1:

FeSO ₄	0,5	g
H ₂ O (dest.)	10	mL

Lösung 2 (Reduktionslösung):

Thioglycolsäure-Natriumsalz	0,1	g
Ascorbinsäure	0,1	g
H ₂ O (dest.)	10	mL
mit N ₂ überblasen		
Dithionit	20	mg

Lösung 3:

CaSO ₄	1,0	g
NH ₄ Cl	1,0	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0	g
H ₂ O (dest.)	980	mL

Substrate:

Lactatlösung (50%)	5,5	mL
o. Methanol (1M)	30	mL
o. Na-Acetat (1M)	10	mL

Spurenelementelösung SL10 (wie DSM-Medium 141):

Nitrilotriessigsäure	1,5	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,0	g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5	g
NaCl	1,0	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1	g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18	g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01	g
KAl(SO ₄) x 12 H ₂ O	0,02	g
H ₃ BO ₃	0,01	g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01	g
NiCl x 6 H ₂ O	0,025	g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3	mg
H ₂ O (dest.)	1000	mL

Lösungen separat unter N₂ autoklavieren, Spurenelemente sterilfiltrieren
pH 7,2 einstellen (mit NaOH)

2.7.2 Sulfatreduzierermedium mit reduziertem Eisengehalt (SRM-Fe)

Lösung 1 (Reduktionslösung): wie Lösung 2 bei Sulfatreduzierer-Medium

Lösung 2:

CaSO ₄	1,0	g
NH ₄ Cl	1,0	g
KH ₂ PO ₄	0,5	g
MgSO ₄ x7H ₂ O	2,44	g
Hefeextrakt	1,0	g
H ₂ O (dest.)	990	mL
Lactatlösung (50%)	5,5	mL

Lösungen separat unter N₂ autoklavieren
pH 7,2

2.7.3 Medium 311*, Medium 120, klares Mineralsalzmedium

	Medium 311*	Medium 120	Klares Mineralsalzmedium
K ₂ HPO ₄	0,348 g	0,348 g	0,348 g
KH ₂ PO ₄	0,227 g	0,227 g	0,227 g
NH ₄ Cl	0,5 g	0,5 g	0,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g	0,5 g	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g	0,25 g	0,1 g
NaCl	2,25 g	2,25 g	1,0 g
Na ₂ SO ₄			2,5g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O			0,6 g
NaHCO ₃	4,0 g	0,85 g	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g	0,002 g	0,002 g
NaHSeO ₃	10 ⁻⁷ mol		
Resazurin	1,0 mg	2,0 mg	
Hefeextrakt	1,0 g	2,0 g	
Casiton		2,0 g	
H ₂ O (dest.)	940 mL	940 mL	950 mL
Gas	N ₂ /CO ₂ (80/20)	N ₂ /CO ₂ (80/20)	N ₂

Begasen und unter Gas in Transfusionsflaschen autoklavieren

Nach dem Autoklavieren aus sterilen Stammlösungen zugeben:

Reduktionslösung I	10 mL	10 mL	
Reduktionslösung II	10 mL	10 mL	10 mL
Vitaminlösung	10 mL	10 mL	10 mL
Spurenelemente SL-10	1 mL	1 mL	1 mL
Methanol (1M)	30 mL	30 mL	30 mL

Reduktionslösung I:

100 mL destilliertes Wasser 30 min mit Stickstoff begasen, 3 g Cystein-HCl x H₂O darin lösen, mit Stickstoff begasen und in Transfusionsflasche unter Stickstoffatmosphäre autoklavieren.

Reduktionslösung II:

100 mL destilliertes Wasser 30 min mit Stickstoff begasen, 3 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ darin lösen, mit Stickstoff begasen und in Transfusionsflasche unter Stickstoffatmosphäre autoklavieren.

Vitaminlösung: (wie DSMZ-Medium 141)

Biotin	2,0	mg
Folsäure	2,0	mg
Pyridoxin-HCl	10,0	mg
Thiamin-HCl x 2 H_2O	5,0	mg
Riboflavin	5,0	mg
Nikotinsäure	5,0	mg
D-Ca-Pantothersäure	5,0	mg
Vitamin B ₁₂	0,1	mg
p-Aminobenzoessäure	5,0	mg
Liponsäure	5,0	mg
H_2O (dest.)	1000	mL

Vitamine in Wasser lösen, sterilfiltrieren, dunkel und kühl aufbewahren.

2.7.4 TAE-Puffer

Tris HCL	40	mM	6,30	g/L
EDTA	1,0	mM	0,37	g/L
Natriumacetat pH 8,0	200	mM	16,4	g/L

2.8 Chemikalien und Gase

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien in p.A.-Qualität von Merck KgA, Darmstadt bzw. Carl Roth GmbH & Co., Darmstadt verwendet. Gase und Prüfgase (Klasse 2) wurden von LINDE Technische Gase GmbH, Leuna bezogen. Die Synthese der PCR-Primer erfolgte durch MWG-Biotech AG, Ebersberg.

3. Ergebnisse

3.1 Sulfatreduktion unter Methanolverbrauch in den Anreicherungskulturen B378 und B393

Es wurden zwei Anreicherungskulturen zur Verfügung gestellt. Zunächst sollte überprüft werden, ob darin enthaltene Bakterien in der Lage sind, Methanol als Elektronendonator für die Sulfatreduktion und als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Bei der Kultivierung auf Sulfatreduzierermedium (SRM) konnte sowohl in der Kultur B378 (Abbildung 3) als auch in der Kultur B393 (Abbildung 4) Abnahme der Methanol- und Sulfatkonzentration sowie Zunahme der Proteinkonzentration (Vermehrung) beobachtet werden. Im Gegensatz zu Kultur B393 wurde während der Kultivierung von B378 Acetat gebildet.

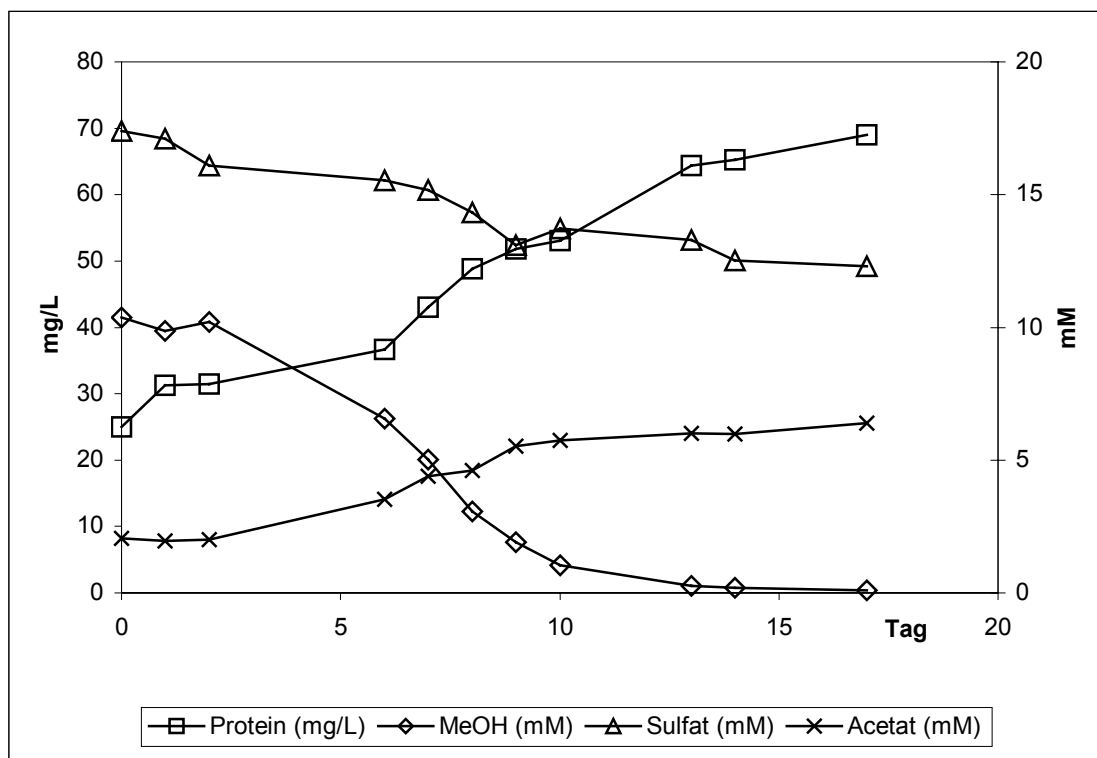


Abbildung 3: Wachstum (Zunahme des Proteingehaltes), Methanolverwertung und Sulfatreduktion in der Anreicherungskultur B378 (Sulfatreduzierermedium 10 mM Methanol, 1:10 angeimpft)

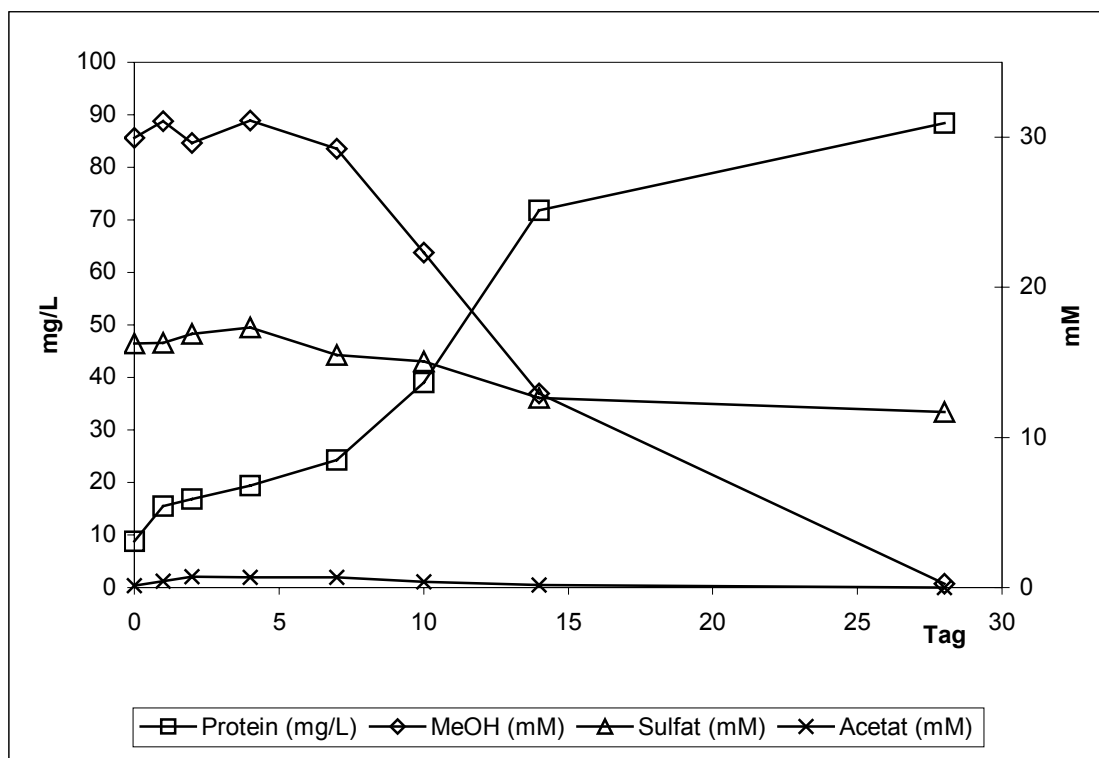


Abbildung 4: Wachstum (Zunahme der Proteinkonzentration), Methanolverwertung und Sulfatreduktion in der Anreicherungskultur B393 (Sulfatreduzierermedium 30 mM Methanol, 1:10 angeimpft)

Während der Kultivierung auf SRM veränderte sich der im Medium enthaltene Niederschlag. Im unbeimpften Medium bestand dieser vor allem aus Eisen- und Calciumphosphat. Das während der Kultivierung durch Sulfatreduktion gebildete Sulfid reagierte mit Eisen zu Eisensulfid, was zu einer Schwärzung der Kulturflüssigkeit und zu einer Veränderung der Kristallstruktur des Niederschlages führte.

3.2 Isolation und Beschreibung der sulfatreduzierenden Bakterien SRB378 und SRB393

Aus beiden Anreicherungskulturen wurden sulfatreduzierende Bakterien isoliert. Die Anreicherungskulturen wurden auf SRM (je 10 mM Methanol, Acetat oder Lactat; 2,5 % Agar) ausgestrichen. Nach 30 Tagen Inkubationszeit wurden schwarze Kolonien oder Kolonien mit schwarzen Höfen auf neue Agarplatten überimpft. Nur mit Lactat als Substrat konnte Wachstum von Sulfatreduzierern beobachtet werden.

Auf den mit der Kultur B378 beimpften Agarplatten bildeten sich fleischfarbene Kolonien mit schwarzem Hof (bis zur vollständigen Schwärzung des Mediums) mit einem Durchmesser von 0,5 - 1,5 mm. Dieser Sulfatreduzierer wird im Folgenden SRB378 genannt. Der aus Kultur B393 isolierte Sulfatreduzierer (SRB393) bildete durchgehend schwarz gefärbte Kolonien mit einem maximalen Durchmesser von 1 mm.

Mikroskopisch sind sich die Isolate sehr ähnlich. Bei beiden Sulfatreduzierern handelt es sich um gekrümmte, ca. 2-2,5 µm lange Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5 µm. Beide Isolate sind gram-negative Bakterien.

3.2.1 16S rDNA Analyse

Mit den im Methodenteil angegebenen Primern wurden für die Isolate SRB378 und SRB393 jeweils acht Fragmente sequenziert. Die Länge der Konsensussequenzen betrug 1531 Basen für SRB378 und 1506 Basen für SRB393. Die jeweils höchste Homologie der 16S rDNA-Sequenz der Isolate zu bereits bekannten Sequenzen ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Homologie der 16S rDNA Sequenz von Isolaten und Referenzstämmen

Isolat	Homologie	Referenz
SRB378	99,4%	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (ATTC27774)
SRB393	98%	<i>Desulfovibrio longreachensis</i> (Redburn u. Patel, 1993)

Die Homologie zwischen beiden Isolaten betrug 90,1%.

3.2.2 Substratverwertungsspektren

Eine weitere Charakterisierung der sulfatreduzierenden Isolate SRB378 und SRB393 erfolgte aufgrund der von ihnen zu Wachstum bzw. Sulfatreduktion genutzten Substrate (Abbildung 5 u. Abbildung 6). Beide Isolate waren nicht in der Lage, Methanol für Wachstum oder Sulfatreduktion zu nutzen. Im Unterschied zu SRB378 verwertete SRB393 eine geringere Anzahl Substrate (z.B. kein Glycerol, Cholin) und bildete beim Wachstum auf gleichen Substraten (z.B. Ethanol, Butanol) weniger Biomasse, reduzierte jedoch mehr Sulfat.

Auch bei den Versuchen zur Verwertung von Wasserstoff als Elektronendonator und Energiequelle bildete SRB393 (Abbildung 8) verglichen mit SRB378 (Abbildung 7) weniger Biomasse je reduziertem Sulfat (SRB378: 4,3 mg/mM; SRB393: 3,8 mg/mM).

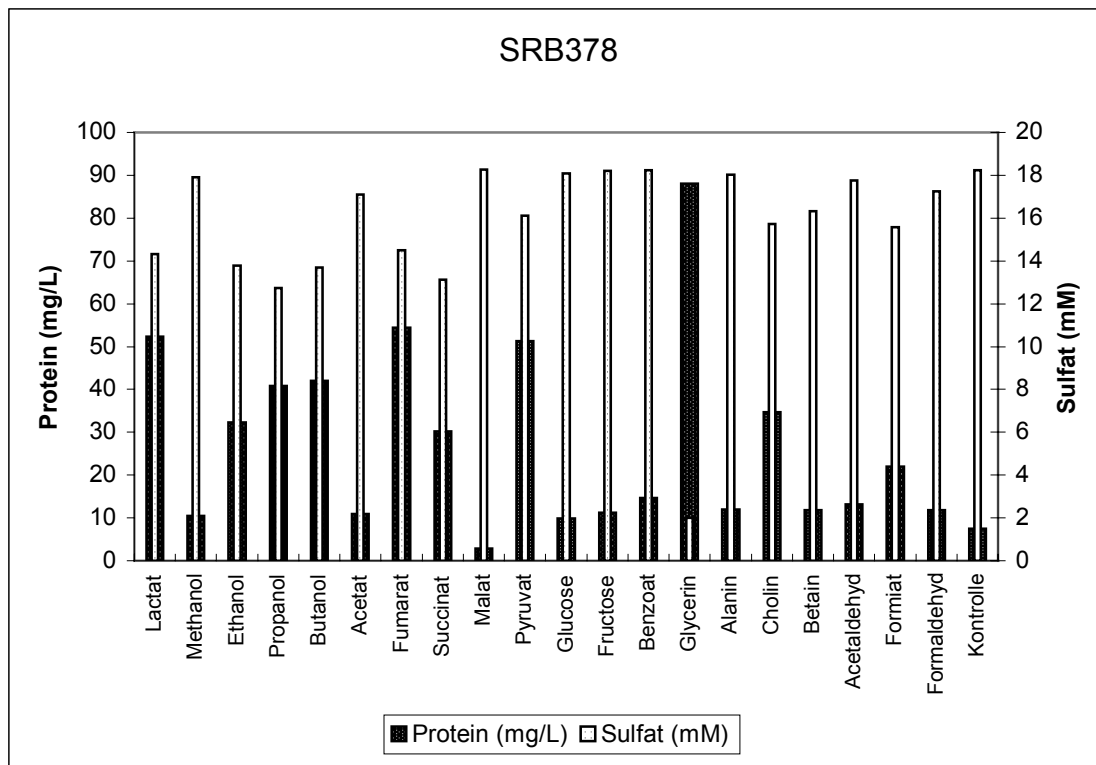


Abbildung 5: Sulfatreduktion und Proteinzunahme von SRB378 nach 21 Tagen auf verschiedenen Substraten (SRM, jeweils 10 mM Substrat, rechts: Kontrolle ohne Substrat)

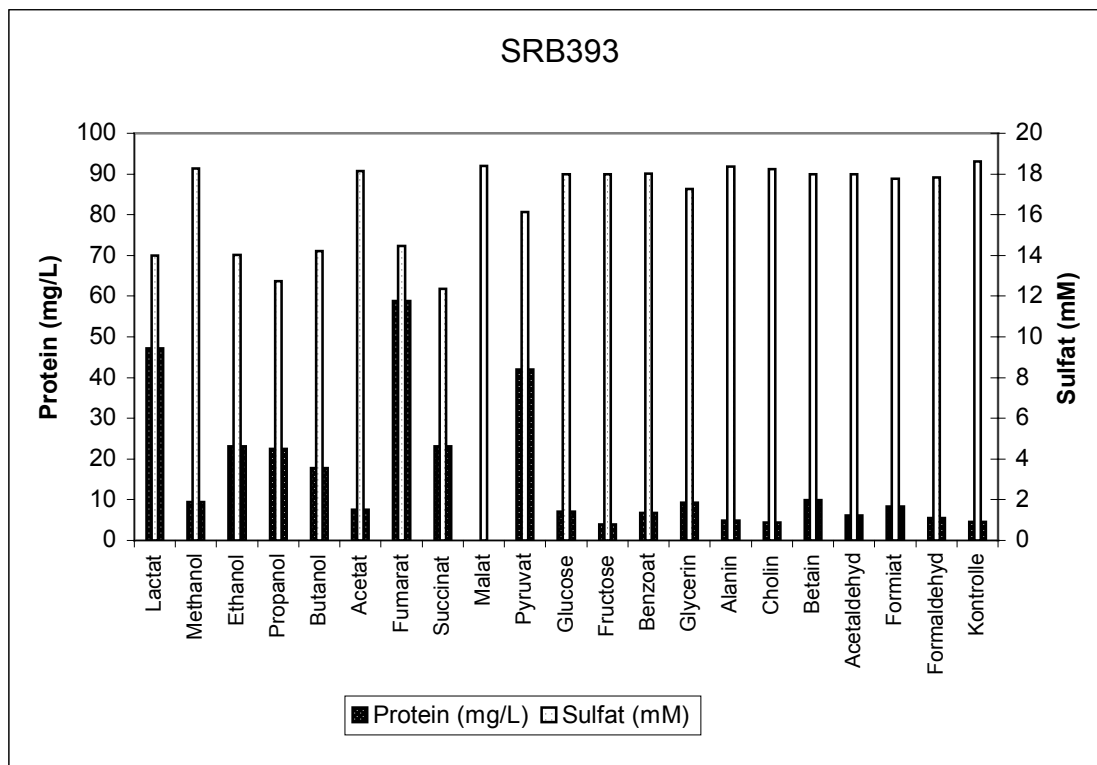


Abbildung 6: Sulfatreduktion und Proteinzunahme von SRB393 nach 21 Tagen auf verschiedenen Substraten (SRM, jeweils 10 mM Substrat, rechts: Kontrolle ohne Substrat)

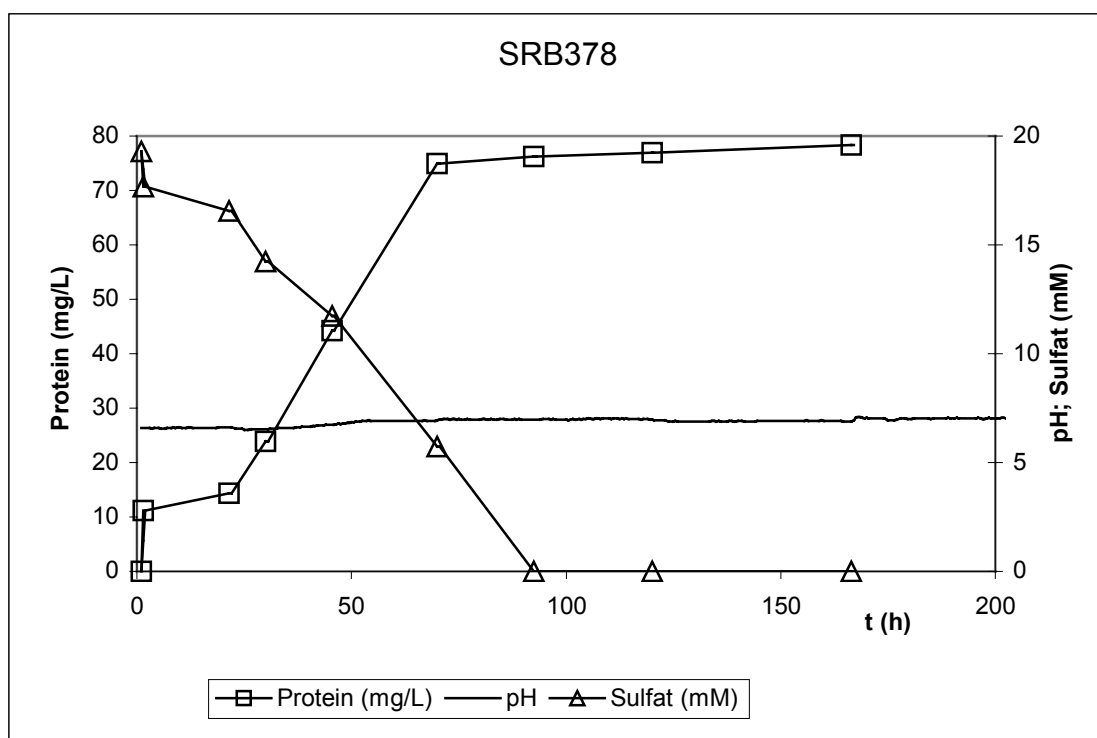


Abbildung 7: Sulfatreduktion und Wachstum bei Kultivierung des Isolates SRB378 auf Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat (SRM-Fe, 10 mM Acetat, H_2/CO_2 (80/20) 20 mL/min)

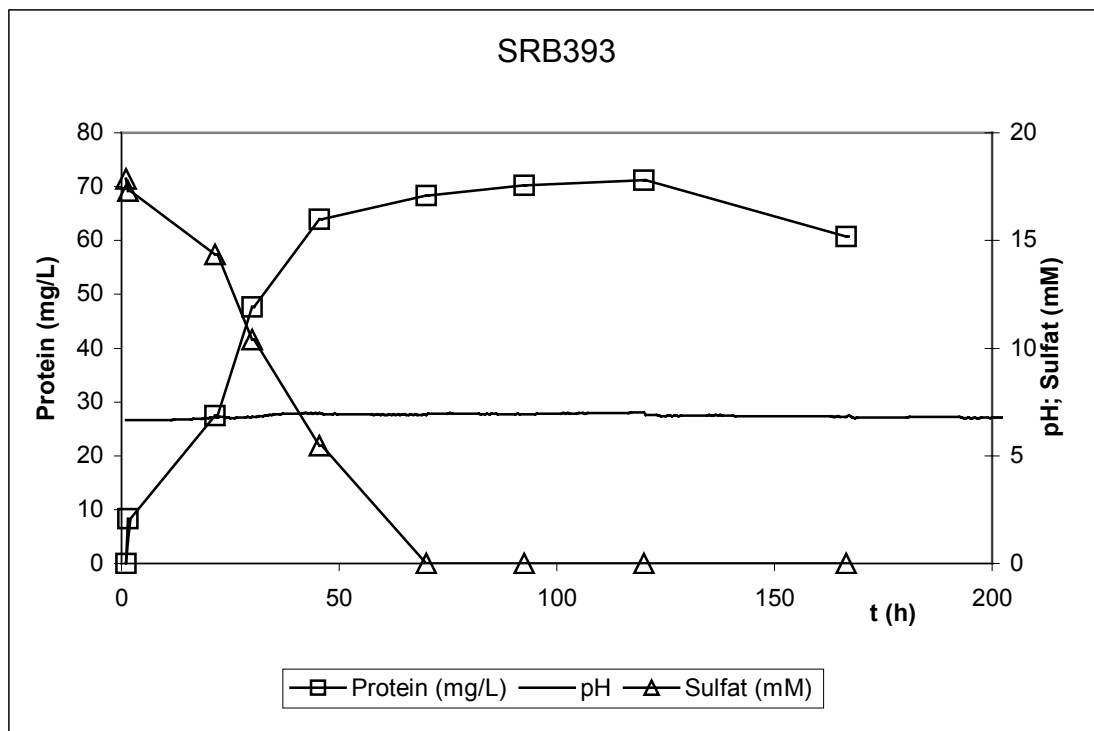


Abbildung 8: Sulfatreduktion und Wachstum bei Kultivierung des Isolates SRB393 auf Wasserstoff, Kohlendioxid und Acetat (SRM-Fe, 10 mM Acetat, H_2/CO_2 (80/20) 20 mL/min)

3.3 Isolation methylotropher Bakterien aus den Anreicherungskulturen B378 und B393

Da die beiden aus den Anreicherungskulturen isolierten Sulfatreduzierer SRB378 und SRB393 nicht in der Lage waren, Methanol zu Sulfatreduktion oder Wachstum zu nutzen, sollten methanolverwertende Bakterien aus den jeweiligen Anreicherungen isoliert werden.

3.3.1 *Methylotrrophe Isolate der Kultur B378*

Aus der Anreicherungskultur B378 konnten auf Sulfatreduzierermedium (10 mM Methanol, 2,5 % Agar) 4 methylotrrophe Stämme isoliert werden (WF1-WF4). Bei keinem Isolat konnte Sulfatreduktion beobachtet werden. Tabelle 16 zeigt einen Überblick über die Zell- und Koloniemorphologie dieser methylotrphen Isolate.

Tabelle 16: Methylotrrophe Isolate der Anreicherungskultur B378

Isolat	Koloniemorphologie (10 d)	Zellmorphologie
WF1	Ø 2 mm; flach	Stäbchen
WF2	Ø 1-1,5 mm; gezackter Rand	kurze mobile Stäbchen
WF3	Ø 1 mm; glatter Rand	Kokken/kurze Stäbchen
WF4	Ø < 0,5 mm, glatter Rand	Stäbchen, spitze Enden

Die Kultivierung der methylotrphen Isolate in Sulfatreduzierermedium gestaltete sich zunächst schwierig, daher blieben Versuch zur gemeinsamen Kultivierung mit SRB378 vorerst ohne eindeutiges Ergebnis.

In einem weiteren Versuch wurden während des Wachstums von B378 auf Methanol/Sulfat an den in Abbildung 9 gekennzeichneten Tagen die Zahl der koloniebildenden Einheiten der in der Kultur enthaltenen Mikroorganismen bestimmt. Die Zellzahl des Isolates WF4 stieg stärker als die aller anderen in der Kultur enthaltenen Bakterien an (Abbildung 10). Daher wurde angenommen, daß dieses Isolat in der Kultur die größte Aktivität hinsichtlich Methanolassimilation und Wachstum besaß. WF4 und SRB378 wurden für weitere Versuche zur Sulfatreduktion mit Mischkulturen verwendet.

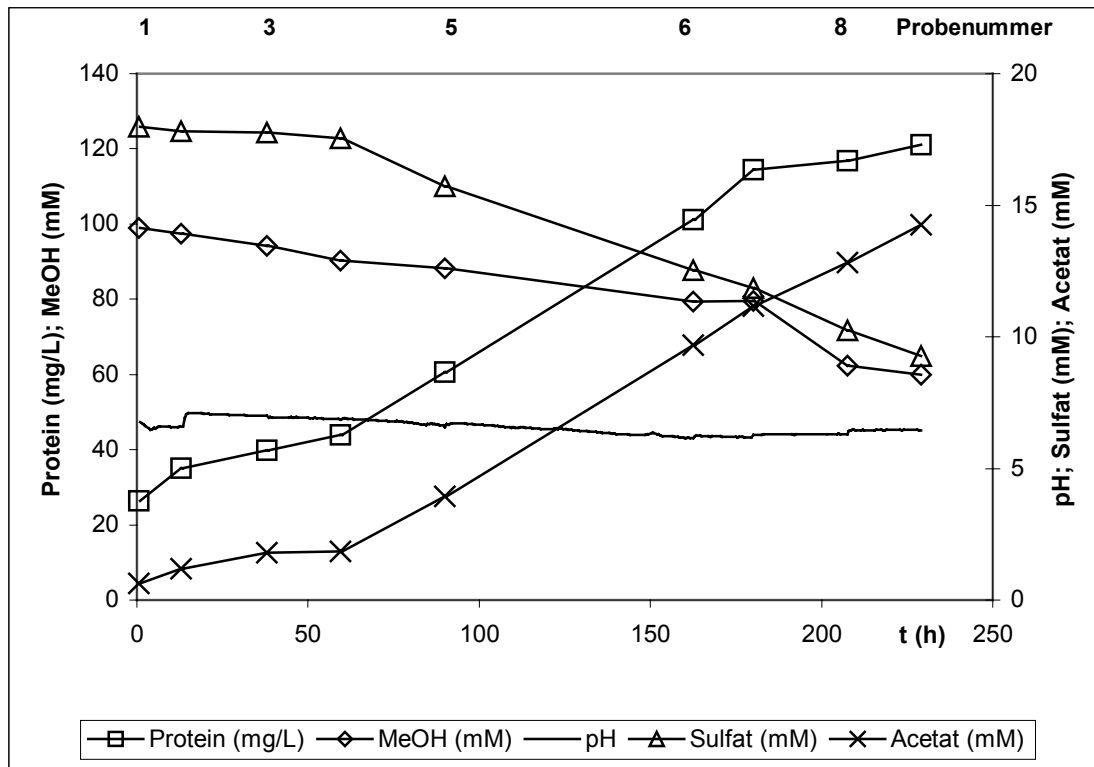


Abbildung 9: Kultivierung der Anreicherung B378 auf Methanol und Sulfat (SRM, 100 mM MeOH). Die Zahlen im oberen Diagrammteil bezeichnen die Probenahmezeitpunkte für die Zellzahlbestimmung der Isolate WF1-WF4 und SRB378.

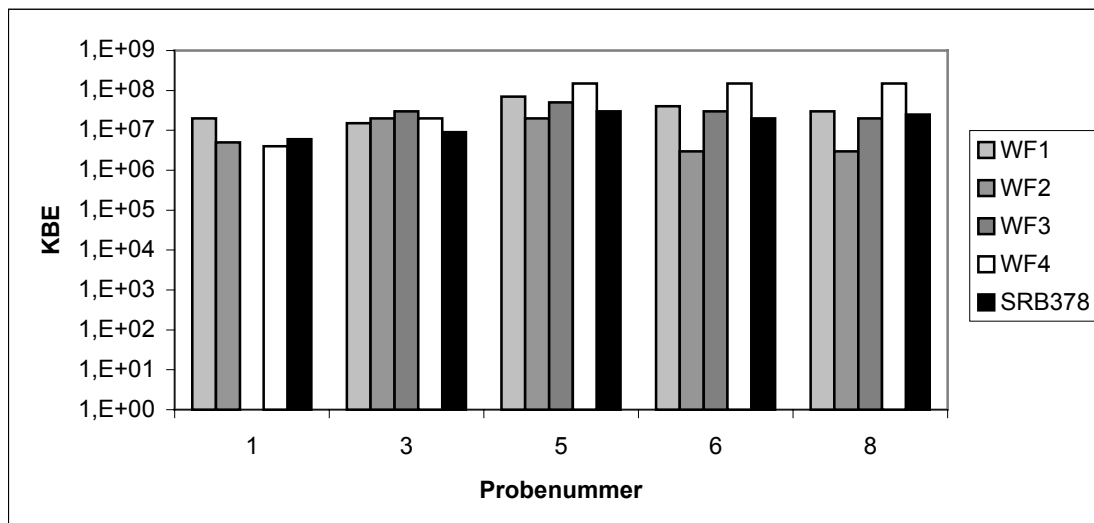


Abbildung 10: Wachstum der Isolate WF1-WF4 und SRB378 in der Anreicherungskultur. An den in Abb. 9 gekennzeichneten Punkten wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten der einzelnen Isolate bestimmt (SRM, 10 mM MeOH, 2,5 % Agar, 10 Tage inkubiert).

3.3.2 *Methylotheobacter Isolates der Kultur B393*

Mit Methanol als Substrat konnten 5 verschiedene Stämme aus der Anreicherungskultur B393 isoliert werden. Wie bei den aus Kultur B378 isolierten Stämmen gestaltete sich deren Kultivierung in Flüssigmedium schwierig, so daß eine gemeinsame Kultivierung der methylotheobacteren Isolate mit SRB393 keine eindeutigen Ergebnisse zeigte.

Während der Kultivierung der Anreicherungskultur auf Lactat (10 mM) oder Methanol (10 mM) trat Gasbildung im Sediment auf. Anhand ihrer charakteristischen Autofluoreszenz¹⁴ konnten methanogene Bakterien in der Kultur B393 nachgewiesen werden.

Bei der Kultivierung von B393 auf Methanol und Sulfat unter Zusatz von Bromethansulfonsäure¹⁵ wurde wie erwartet kein Methan gebildet, allerdings waren sowohl Methanolverwertung als auch Sulfatreduktion nicht mehr nachweisbar (Abbildung 11).

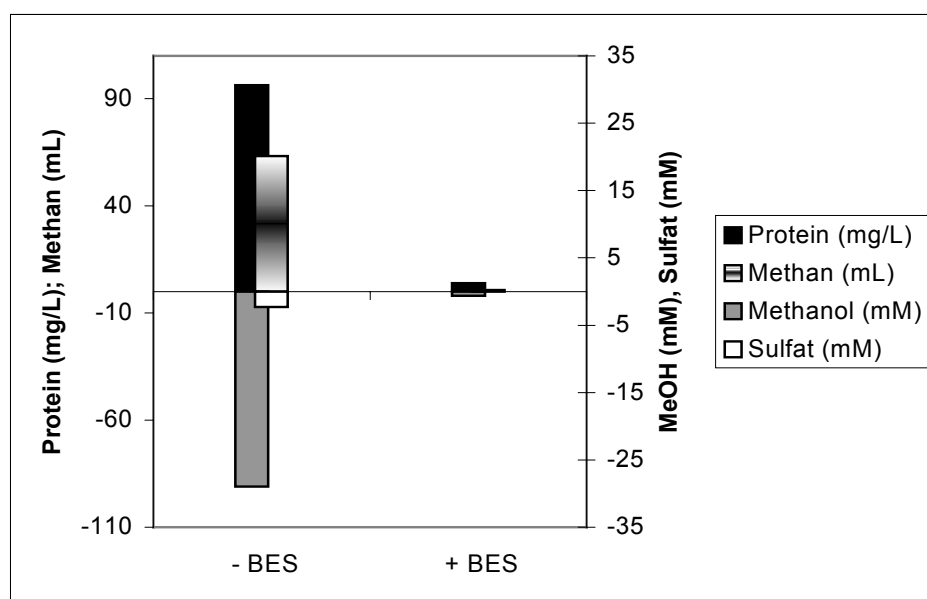


Abbildung 11: Kultivierung der Anreicherungskultur B393 auf Methanol und Sulfat mit und ohne Bromethansulfonsäure (BES). Protein- und Methanbildung sowie Methanol- und Sulfatverwertung nach 22 Tagen (SRM, 30 mM MeOH)

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß in der Kultur enthaltene methanogene Bakterien in die Sulfatreduktion mit Methanol involviert waren. Es gelang jedoch nicht, methanogene Bakterien auf Agarplatten zu kultivieren und zu isolieren. Daher wurden zunächst Verdünnungsreihen in einem carbonatgepufferten Medium (Med. 120) angesetzt, wobei Penicillin (2g/L) zugegeben wurde, um das Wachstum (gram-positiver) Eubakterien zu inhibieren. Wachstum trat bis zur einer Verdünnung von 10^{-7} auf, wobei die methanogenen Bakterien unabhängig von der Verdünnungsstufe entweder als einzelne Zellen (Trübung im Kulturröhrchen) oder als Zellaggregate bis 2 mm Durchmesser vorlagen.

Die Einzelzellsuspensionen konnten nur schwer weiter kultiviert werden (Wachstum nur bis Verdünnungsstufe 10^{-1}); daher wurden die Zellaggregate mit einer Kanüle ($\varnothing$ 0,8 mm) suspendiert und weiter verdünnt. Mikroskopische Untersuchungen dieser Verdünnungsreihen zeigten, daß zusätzlich zu den unregelmäßig geformten Zellen (2-4 μ m Durchmesser) des methanogenen Bakteriums noch vibrio-förmige nicht fluoreszierende Zellen in der Kultur vorhanden waren, die zudem einen Geruch nach Schwefelwasserstoff aufwies. Auch durch weitere Verdünnung im Weichagar konnte diese sulfatreduzierende Begleitkultur nicht eliminiert werden. Erst als zusätzlich zum Penicillin noch Molybdat (20 mM) in das Medium gegeben wurde, wuchsen mikroskopisch reine Kulturen des methanogenen Bakteriums. Durch wiederholtes Kultivieren der aus dem Weichagar entnommenen Kolonien in Flüssigkultur und im Weichagar (4 Passagen) wurde eine Kultur des methanogenen Bakteriums (MPB393) erhalten, in welcher auch nach Kultivierung ohne Penicillin bzw. Molybdat mikroskopisch keine Begleitkulturen nachweisbar waren.

Das methanogene Isolat MPB393 und der ebenfalls aus der Kultur B393 isolierte Sulfatreduzierer SRB393 wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

¹⁴ Methanogene Bakterien zeigen aufgrund des Redoxcarriers F_{420} bei Anregung mit ultravioletterem Licht (350-420 nm) eine charakteristische blaugrüne Fluoreszenz (Mink u. Dugan, 1977; Jones *et al.*, 1987).

¹⁵ Bromethansulfansäure inhibiert als Coenzym M-Strukturanalogon die Methyl-Coenzym M-Reduktase und wird zur spezifischen Inhibierung methanogener Bakterien eingesetzt (Gunsalus *et al.*, 1978)

3.4 Charakterisierung des Isolates WF4

Gemeinsame Kultivierung mit SRB378

Bei dem aus der Kultur B378 stammenden Isolat WF4 handelt es sich um ein gram-positives, 3-5 μm x 1 μm großes Bakterium. Die Isolate WF4 und SRB378 waren aufgrund der Unterschiede in Gram-Verhalten und Zellgröße mikroskopisch zur unterscheiden.

Die gemeinsame Kultivierung von WF4 und SRB378 mit Methanol als Substrat gelang nur, wenn zum Animpfen eine auf Lactat gewachsene Mischkultur von SRB378 und WF4 verwendet wurde. In dieser Impfkultur war die Zellzahl von SRB378 wesentlich höher als die von WF4.

Wenn diese Kultur in Medium mit Methanol überführt wurde (1:10), war eine Abnahme der Methanol- und Sulfatkonzentration (0,21 mol red. Sulfat je mol Methanol), Zunahme der Proteinkonzentration (Wachstum) sowie Acetatbildung zu beobachten (Abbildung 12). Darüber hinaus wurde geprüft, ob die Mischkultur in der Lage ist, Sulfat in einem kontinuierlichen Prozeß zu reduzieren. Die gewachsene Kultur konnte bei einer Durchflußrate von 0,005/h kontinuierlich kultiviert werden (0,25 mol red. Sulfat je mol Methanol), allerdings nahm die Acetatkonzentration dabei ab, d.h. für Acetat stellte sich kein *steady state* ein. Eine Erhöhung der Durchflußrate (0,01/h) führte zur Sulfat- und Methanolakkumulation, eine weitere Kultivierung war auch im *batch*-Betrieb nicht mehr möglich.

Versuche, die Veränderung der Zellzahlen von WF4 und SRB378 während der gemeinsamen Kultivierung zu verfolgen, waren nicht erfolgreich. Die spezifisch gefärbten mikroskopischen Präparate konnten nicht ausgezählt werden, da vor allem WF4 in Eisensulfidflocken des Sulfatreduzierermediums aggregierte.

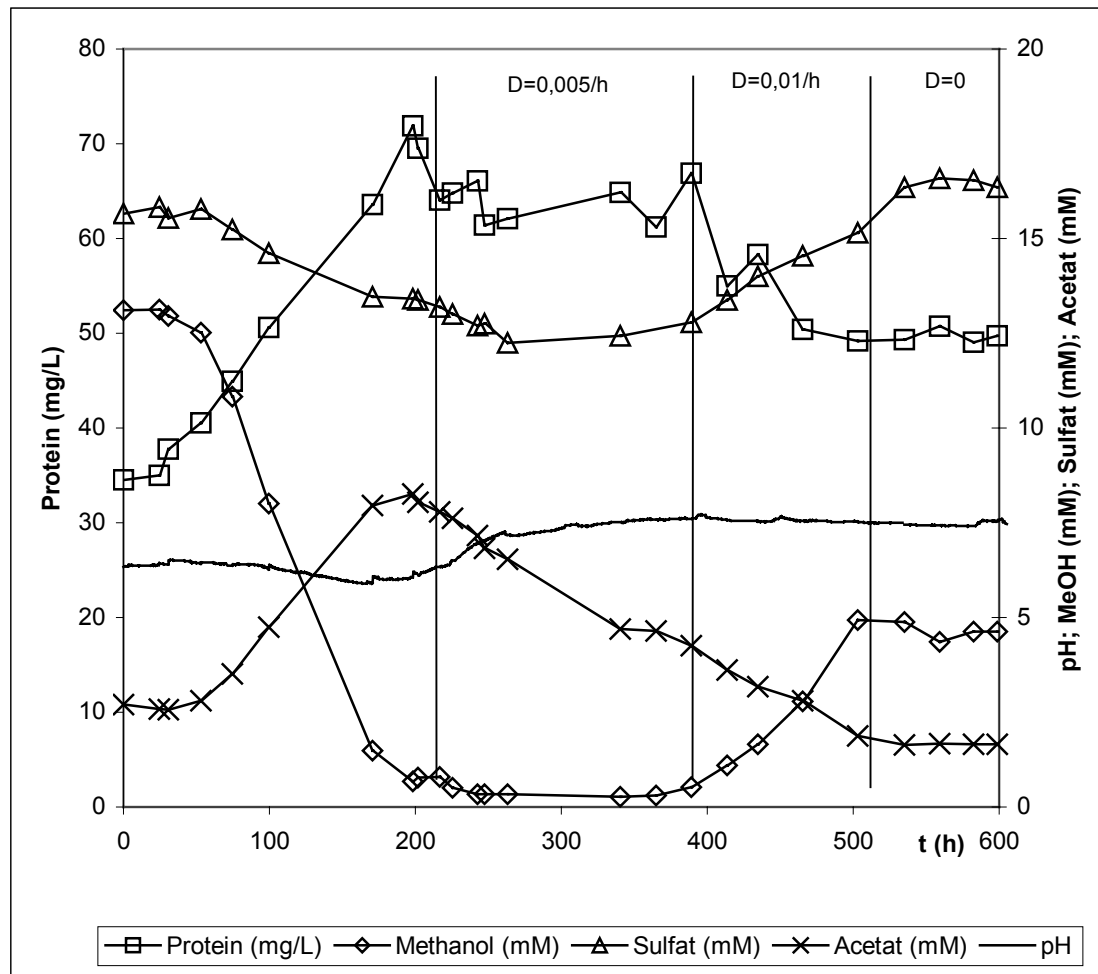


Abbildung 12: Wachstum und Sulfatreduktion in der Mischkultur WF4/SRB378 mit Methanol und Sulfat, kontinuierlicher Betrieb ab 210 h (SRM, 10 mM MeOH, Zulauf: SRM, 18 mM Sulfat, 10 mM MeOH).

3.4.1 Verwertung organischer Substrate durch WF4 mit Carbonat und in Kokultur mit SRB378

Zur Charakterisierung des Isolates WF4 wurde die Verwertung diverser Substrate einzeln und gemeinsam mit SRB378 untersucht (Tabelle 17).

WF4 nutzte einige Substrate nur in Anwesenheit von Carbonat oder bei der gemeinsamen Kultivierung mit SRB378 und in Anwesenheit von Sulfat. Es handelte sich hierbei um reduzierte C1-Substrate (Methanol) oder Substrate, die C1-Verbindungen freisetzen (Betain). Höher oxidierte Substrate (Fructose) konnten ohne die Anwesenheit eines Elektronenakzeptors von WF4 verwertet werden. Die gemeinsame Kultivierung von WF4 und SRB378 ermöglichte die Sulfatreduktion mit Substraten (wie Methanol), die dem Sulfatreduzierer allein nicht zugänglich waren.

Tabelle 17: Substratverwertung der Isolate WF4 und SRB378 einzeln und gemeinsam. Die Kultivierung erfolgte auf Medium ohne Carbonat (SRM) bzw. mit Carbonat (30 mM, Med. 311*). Die Substratkonzentration betrug 10 mmol/L.

	WF4 auf SRM	WF4 auf Med. 311*	WF4/SRB378 auf SRM	
	Wachstum	Wachstum	Wachstum	Sulfat-Red.
Methanol	-	+	+	+
Ethanol	-	+	+	+
Propanol	+	+	+	+
Butanol	-	-	+	+
Acetat	-	-	-	-
Fumarat	-	-	+	-
Succinat	+	+	+	+
Malat	-	-	-	-
Pyruvat	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	(+)
Fructose	+	+	+	(+)
Benzoat	-	-	-	-
Glycerin	-	-	+	+
Alanin	-	-	-	-
Cholin	-	-	+	+
Betain	-	+	+	+
Acetaldehyd	-	-	-	-
Formiat	-	+	+	+
Formaldehyd	-	-	-	-
Lactat	-	-	+	+

Die 16S rDNA-Analyse für WF4 ergab die größte Homologie (95,2%) zu *Acetobacterium fimetarium* (Kotsyurbenko *et al.*, 1995).

3.5 Charakterisierung des Isolates MPB393

Gemeinsame Kultivierung mit SRB393

Wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben, liegt MPB393 in unterschiedlichen Zellformen vor. In Medium 120 (carbonatgepuffert; 30 mM Methanol) bildeten sich bis zu 2 mm große Zellaggregate, die aus ca. 4-10 Zellen großen „Cysten“ bestanden. Einzelne Zellen waren nicht zu beobachten.

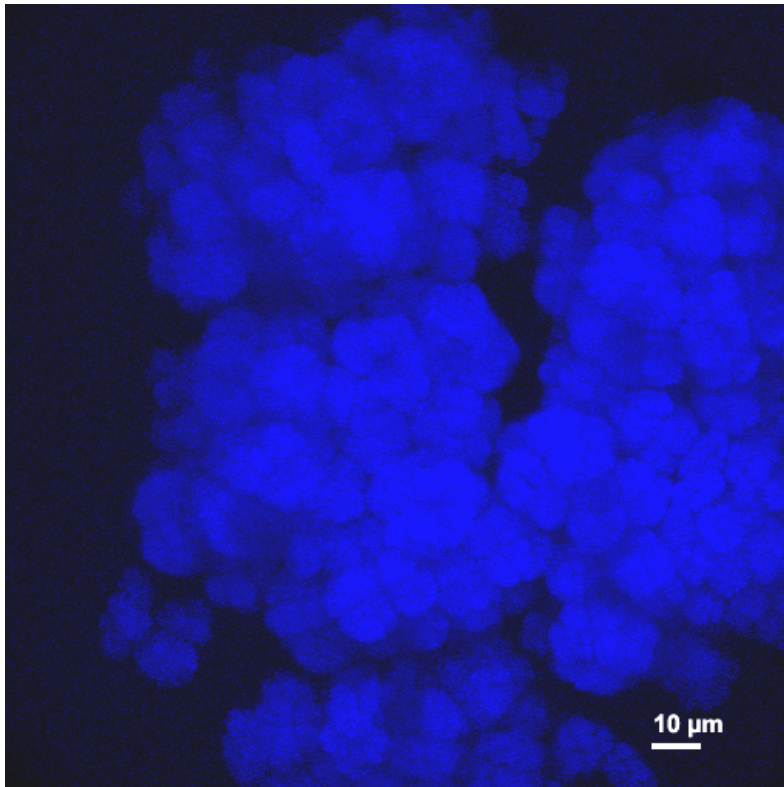


Abbildung 13: Laserscanningmikroskop-Aufnahme eines Zellaggregates des Isolates MPB393. (Autofluoreszenz-Aufnahme, Anregung: 360 nm, Detektion: 450 nm; 63 x 10 x 1)

Wenn die Kultur alterte (ca. 2 Wochen nach letzter Methanolzugabe), konnte es zur Disaggregation in Einzelzellen kommen, die noch zur Methanogenese befähigt waren, jedoch nicht weiter kultiviert werden konnten. In phosphatgepufferten Medien (SRM, klares Mineralsalzmedium) wuchsen die Aggregate nicht größer als 1 mm. In SRM (sedimenthaltig) waren zudem noch kleinere, 4-10 Zellen große Aggregate und sehr wenige Einzelzellen zu beobachten.

Da methanogene Bakterien ein eher limitiertes Substratverwertungsspektrum haben und die Verwertung von Methanol bereits darauf hindeutete, daß es sich bei MPB393 um eine Art der Gattung *Methanosarcina* handelt, wurde auf Versuche zur Verwertung organischer Substrate verzichtet.

Bei der Analyse der 16S rDNA von MPB393 gelang lediglich die Sequenzierung eines 455 bp-Fragmentes, welches 100 % Homologie zur 16S rDNA von *Methanosarcina mazei* (DSM 2053^T) zeigte.

Versuche zur gemeinsamen Kultivierung und Sulfatreduktion durch MBP393 und SRB393 blieben zunächst erfolglos. In allen *batch*-Ansätzen (SRM, 30 mM MeOH) war Methanolverbrauch und Methanogenese, jedoch keine Sulfatreduktion zu beobachten. Mikroskopische Untersuchungen zeigten zudem, daß nur die Zellzahl (bzw. Aggregatgröße) von MPB393, nicht aber die von SRB393 zunahm.

Daher wurde, wie in den Versuchen mit WF4 und SRB378, eine Vorkultur aus SRB393 und MPB393 mit Lactat als Substrat angesetzt. In dieser Kultur fand zunächst ein verstärktes Wachstum von SRB393 statt. Nach 2 Tagen war Methanbildung zu beobachten. Nach weiteren 2 Tagen wurde diese Kultur als Impfkultur zu Versuchen im Rührkesselreaktor eingesetzt (Abbildung 14).

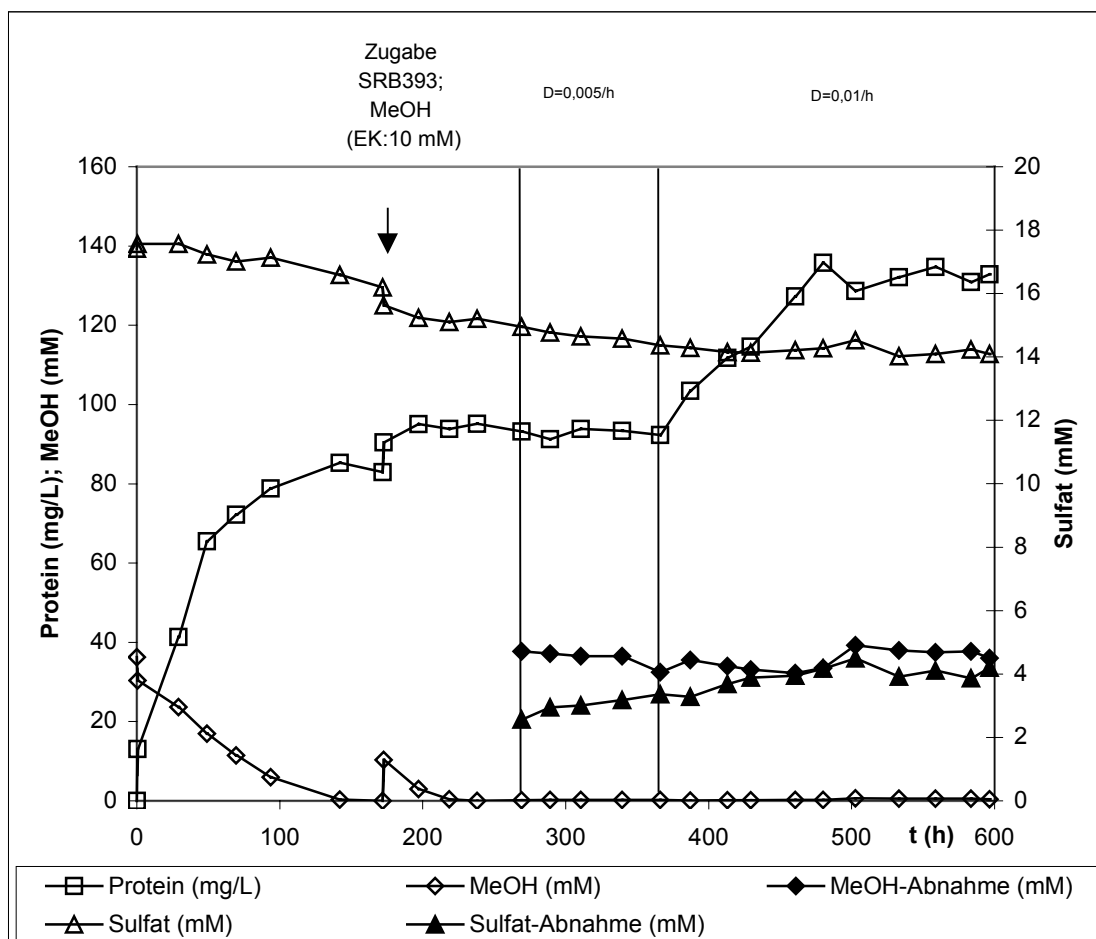


Abbildung 14: Gemeinsame Kultivierung von MPB393 und SRB393 auf Methanol und Sulfat (SRM, 30 mM MeOH, Zulauf: SRM 18 mM Sulfat, 35 mM Methanol).

In den ersten 180 h nahm Methanol vollständig ab und es war Biomassezuwachs, jedoch nur sehr geringe Sulfatreduktion zu beobachten. Daher wurde mit SRB393 nachgeimpft und erneut Methanol zugegeben. Obwohl noch immer kaum Sulfatreduktion stattfand, wurde nach vollständigem Methanolverbrauch auf kontinuierliche Betriebsweise umgestellt ($D=0,005/h$). Unter diesen Bedingungen fand Sulfatreduktion (Verringerung der Zulaufkonzentration um 3,5 mM) statt, zudem veränderte sich der Aggregationszustand (Form und Struktur des Zellverbundes) des Isolates MPB. Statt in großen Aggregaten lagen die Zellen nun überwiegend als Einzelzellen, 4-10 Zellaggregaten oder lockeren Zellverbänden (Abbildung 15) vor, welche zudem von vibrioiden Zellen (SRB393) umgeben oder durchsetzt waren. Eine Erhöhung der Durchflußrate ($D=0,01/h$) führte zu einer Senkung der Sulfatkonzentration des Zulaufs um 4 mM.

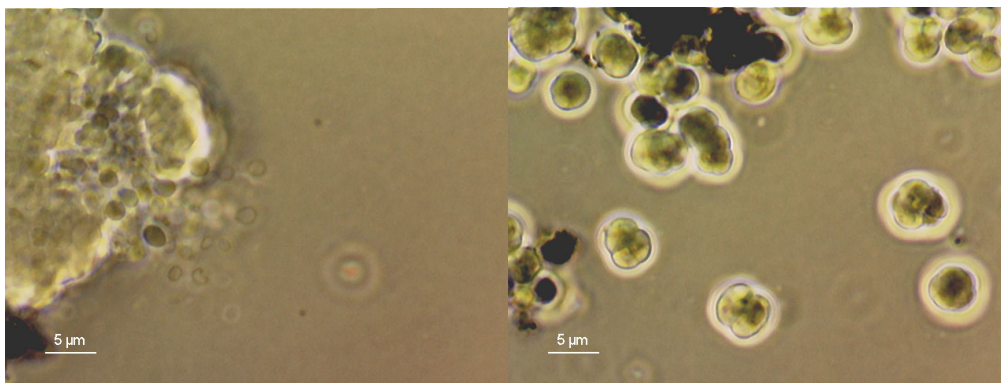


Abbildung 15: Disaggregation von MPB393 in Kokultur mit SRB393 während der kontinuierlichen Sulfatreduktion mit Methanol in Einzelzellen (links) oder 4-10 Zellaggregate (rechts). Phasenkontrastaufnahme (100 x 1 x 1)

Im Verlauf der Kultivierung bildeten sich an Gefäßwandung und im Sediment wieder größere Aggregate von MPB393, die jedoch mit SRB393 und Eisensulfidflocken durchsetzt bzw. überzogen waren (Abbildung 16), was darauf hindeutete, daß Sulfatreduktion in unmittelbarer Nähe der methanogenen Bakterien stattfand.

Die kontinuierlich kultivierte Kultur MPB393/SRB393 wurde zum Animpfen aller weiteren Versuche zu Methanolverwertung und Sulfatreduktion verwendet.

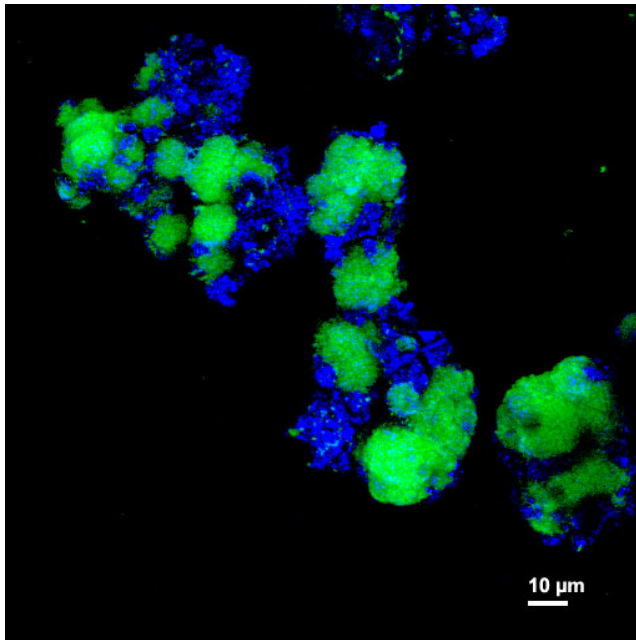


Abbildung 16: Laserscanningmikroskop-Aufnahme methanogener Aggregate nach 3-wöchiger Kultivierung von MPB393/SRB393 im Rührkesselreaktor. Aggregate von MPB393 (grün) sind mit Eisensulfidflocken (blau) durchsetzt. Grün: Syto 9 Färbung, Anregung: 488 nm, Detektion: 500-550 nm, blau: Streulicht (63 x 1 x 1)

3.6 Das elektronenübertragende Intermediat

Um die Sulfatreduktion mit Methanol durch die Mischkulturen näher zu untersuchen, wurden zunächst Versuche zur Identifizierung der elektronenübertragenden Intermediate durchgeführt.

3.6.1 Wasserstoffbildung durch WF4

Während der Kultivierung von WF4 auf Methanol in Abwesenheit von Carbonat akkumulierte Wasserstoff bis zu einer Konzentration von ca. 1600 ppm in der Gasphase (Abbildung 17), danach kam sowohl die Methanolverwertung als auch die Acetatbildung zum Erliegen. Formiat war zu keinem Zeitpunkt im Kulturüberstand nachweisbar. SRB378 konnte sowohl Wasserstoff als auch Formiat zur Sulfatreduktion nutzen, da aber bei WF4 nur Wasserstoffbildung beobachtet wurde, konnte angenommen werden, daß es sich bei dem elektronenübertragenden Intermediat um Wasserstoff handelte.

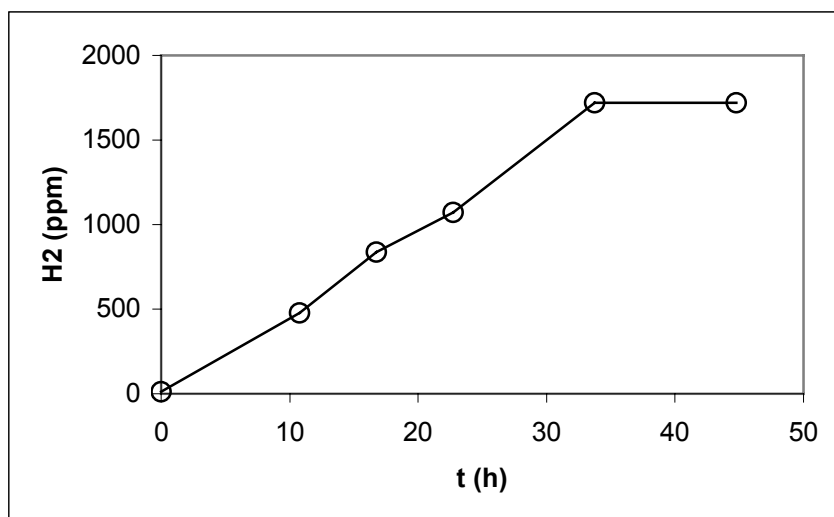


Abbildung 17: Wasserstoffbildung durch WF4 bei der Kultivierung auf Methanol ohne Carbonat (Klares Mineralsalzmedium, 10 mM MeOH)

3.6.2 Sulfatreduktion mit Wasserstoff durch SRB378

Neben Versuchen zu Sulfatreduktion mit Methanol durch die Mischkultur WF4/SRB378 wurden weitere Versuche zur Wasserstoffverwertung und Sulfatreduktion durch das Isolat SRB378 durchgeführt.

Wasserstoff wurde sehr schnell zur Sulfatreduktion genutzt (Abbildung 18); die Sulfatreduktionsrate betrug $9,5 \mu\text{mol}/(\text{h} \times \text{mg}_{\text{Protein}})$. Die durch Bildung von Sulfid und Austreten von Schwefelwasserstoff hervorgerufene Erhöhung des pH-Wertes wurde durch Nachdiffusion von Kohlendioxid in die Flüssigphase gepuffert.

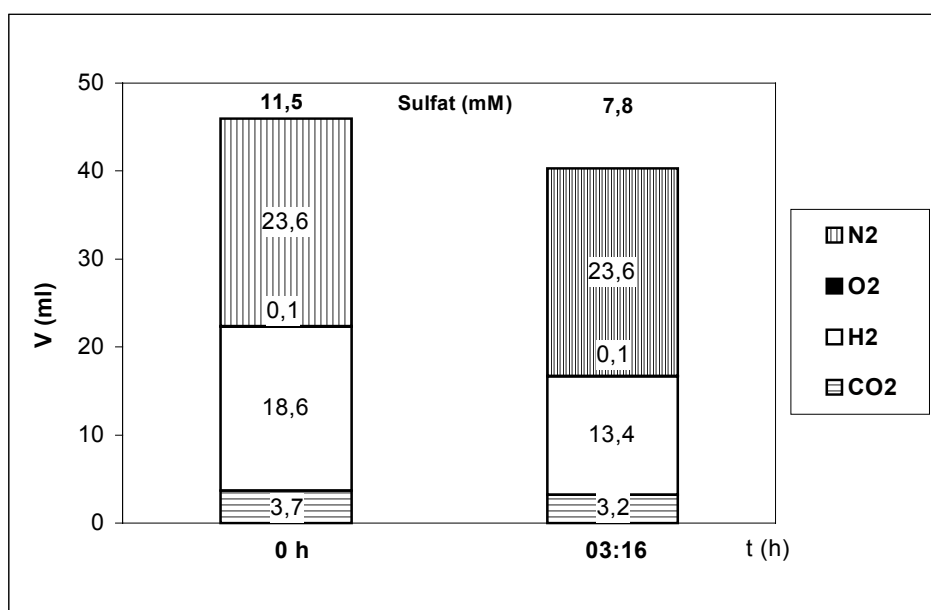


Abbildung 18: Wasserstoffverwertung und Sulfatreduktion durch SRB378

Wie bereits Versuche zur Verwertung diverser Substrate zeigten, konnte die aus der Sulfatreduktion mit Wasserstoff entstehende Energie von SRB378 zum Wachstum genutzt werden, wenn Acetat und Kohlendioxid als Kohlenstoffquellen vorhanden waren (vgl. Abbildung 7).

Beim Begasen einer gewachsenen Kultur von SRB378 mit Wasserstoff trat während der Sulfatreduktion ein pH-Anstieg auf, da der gebildete Schwefelwasserstoff aus dem Medium entfernt wurde. Durch Nachtitrieren mit Schwefelsäure konnte Sulfat kontinuierlich reduziert werden (Abbildung 19). Die Sulfatreduktionsrate sank im Laufe der Zeit (ab ca. 100 h).

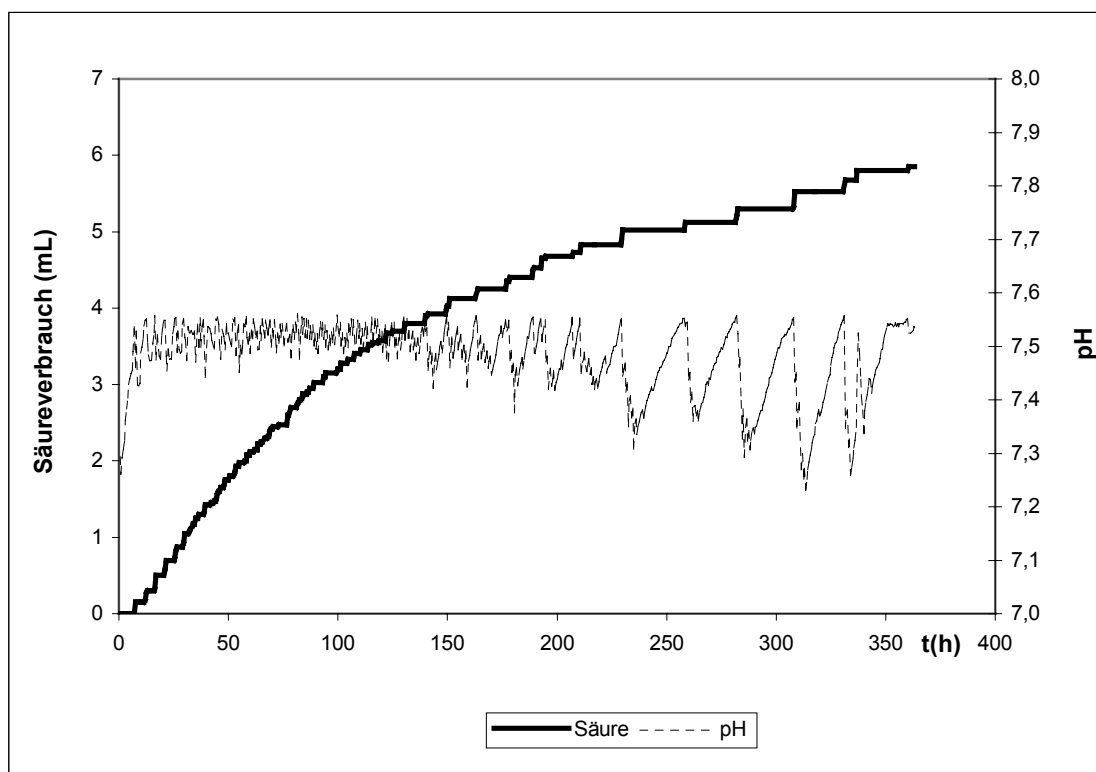


Abbildung 19: Sulfatreduktion (Schwefelsäureverbrauch) mit Wasserstoff durch die Kultur SRB378. Der pH- Sollwert wurde auf 7,5 gesetzt; titriert wurde mit 1 M H_2SO_4 (SRM-Fe, H_2 20 mL/min).

Wenn SRB378 sowohl Wasserstoff als auch Lactat als mögliche Elektronendonoren zur Verfügung standen, wurde Wasserstoff bevorzugt zur Sulfatreduktion genutzt (Abbildung 20). Bei der Kultivierung ohne Wasserstoff wurde Lactat vollständig verwertet (0,44 mol Sulfat/mol Lactat). Mit Wasserstoff als zusätzlichem Elektronendonator wurde alles eingesetzte Sulfat (18,4 mM) reduziert und zu Versuchsende war nicht alles Lactat (18,5 mM, unterstöchiometrische Zugabe) verbraucht. Das eingesetzte Sulfat wurde hauptsächlich durch Wasserstoff

reduziert, somit stand kein Akzeptor für die bei der Lactatoxidation entstehenden Elektronen zur Verfügung.

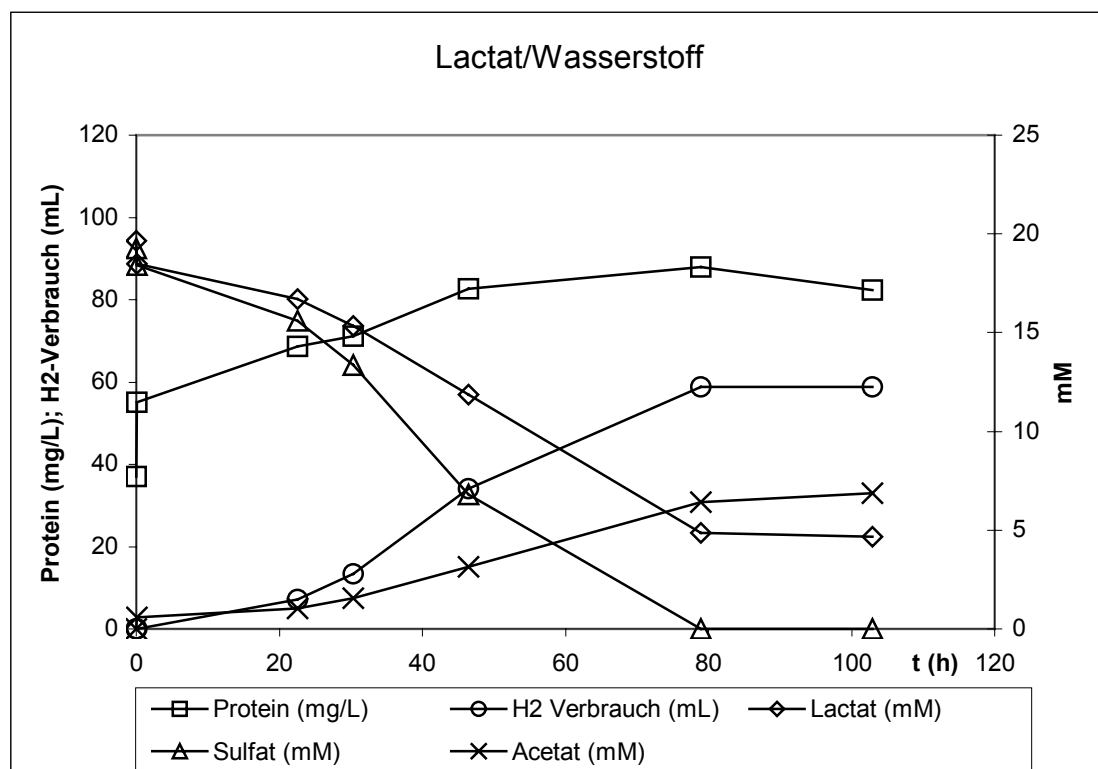
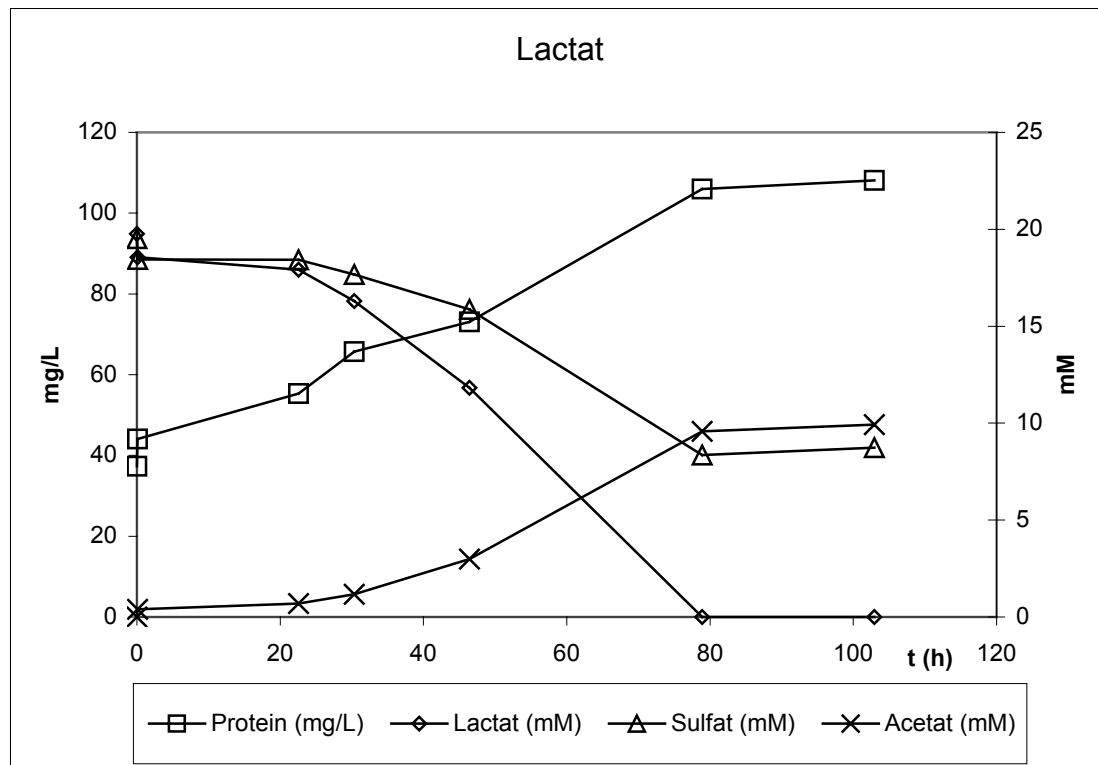


Abbildung 20: Kultivierung von SRB378 auf Lactat (oben) und Lactat und Wasserstoff (unten). Wasserstoff wird bevorzugt zur Sulfatreduktion genutzt und hemmt die Oxidation von Lactat (SRM, 20 mM Lactat, oben: N₂-Gasphase, unten: H₂-Gasphase).

3.6.3 Kultur MPB-SRB393

Weder Wasserstoff- noch Formiatbildung konnte bei der Kultivierung von MPB393 auf Methanol nachgewiesen werden. Allerdings wurden für diese Versuche zunächst Kulturen eingesetzt, in denen MPB393 in größeren Aggregaten vorlag. Wie oben beschrieben, fand bei gemeinsamer Kultivierung mit SRB393 in diesen Kulturen keine Sulfatreduktion statt. Weitere Versuche zur Wasserstoffbildung durch die Kultur MPB393 sind im Abschnitt 3.7.2 beschrieben.

3.7 Einflüsse auf Wasserstofftransfer und Sulfatreduktion

Im Folgenden werden Versuche beschrieben, in denen der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Wasserstofftransfer zwischen den methyilotrophen und den sulfatreduzierenden Bakterien untersucht wurde. Von besonderem Interesse war dabei das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol, da dies ein Maß für den Elektronenfluß vom methyilotrophen zum sulfatreduzierenden Bakterium darstellt.

Nicht alle Versuche konnten mit beiden Mischkulturen (WF4/SRB378; MPB393/SRB393) durchgeführt werden. Wie oben beschrieben, gestaltete sich die *batch*-Kultivierung von MPB393/SRB393 schwierig, so daß die Versuche zum Einfluß von Carbonat (Abschnitt 3.7.3) und des Biomasseverhältnisses (Abschnitt 3.7.4) nur mit WF4/SRB378 durchgeführt wurden. Versuche zur kontinuierlichen Sulfatreduktion (Einfluß von pH-Wert, Substratkonzentration) wurden nur mit der Kultur MPB393/SRB393 durchgeführt, da hier höhere Durchflußraten ($D=0,01/h$) im Vergleich zu WF4/SRB378 ($D=0,005/h$) gewählt werden konnten (vgl. Abbildung 12, Abbildung 14).

3.7.1 Vergleich mit Referenzstämmen

Um zu überprüfen, ob Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeit, Wasserstoff zu produzieren bzw. zu verwerten, zwischen verschiedenen Arten einer Gattung bestehen, wurden die Isolate SRB378 und SRB393 sowie *Desulfovibrio vulgaris* (DSM 644^T) als Referenzstamm mit den methyilotrophen Isolaten WF4, MPB393 und den Referenzstämmen *Acetobacterium woodii* (DSM 1030^T) und *Methanosarcina barkerii* (DSM 800^T) kultiviert. In Tabelle 18 ist jeweils der Zeitpunkt, ab welchem keine Methanolabnahme mehr stattfand, sowie das

Verhältnis von reduziertem Sulfat bzw. gebildetem Acetat zu verwertetem Methanol dargestellt.

Tabelle 18: Kultivierung methylotherpher und sulfatreduzierender Isolate und Referenzstämme (SRM, 30 mM MeOH)

Methylotherphes Bakterium	Sulfatred. Bakterium	Zeitpunkt bis zur konstanten MeOH- Konzentration	Red. Sulfat/ Methanol (mol/mol)	Acetat/ Methanol (mol/mol)
WF4	SRB378	8 d (1,9 mM)	0,23	0,47
	SRB393	12 d (1,9 mM)	0,26	0,45
	<i>Dv. vulgaris</i>	12 d (1,4 mM)	0,27	0,44
<i>A. woodii</i>	SRB378	Bis Versuchsende (21 d) keine Abnahme der Methanolkonzentration	-	-
	SRB393		-	-
	<i>Dv. vulgaris</i>		-	-
MPB393	SRB378	5 d (0 mM)	0	0
	SRB393	5 d (0 mM)	0,03	0
	<i>Dv. vulgaris</i>	5 d (0 mM)	0,02	0
<i>Ms. barkerii</i>	SRB378	5 d (0 mM)	0,21	0
	SRB393	5 d (0 mM)	0,24	0
	<i>Dv. vulgaris</i>	5 d (0mM)	0,23	0

In den Ansätzen der sulfatreduzierenden Bakterien mit WF4 sowie dem methanogenen Referenzstamm *Ms. barkerii* zeigte sich, daß Unterschiede zwischen den Sulfatreduzierern hinsichtlich des Verhältnisses von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol bestehen. In Ansätzen mit SRB378 als sulfatreduzierendem Partner wird weniger Sulfat je Methanol reduziert (und in Ansätzen mit WF4 mehr Acetat gebildet) als in Ansätzen mit SRB393 oder *Dv. vulgaris*.

Bei der Kultivierung der sulfatreduzierenden Bakterien (SRB378, SRB393, *Dv. vulgaris*) mit dem Referenzstamm *A. woodii* wurde kein Methanol verwertet. In parallelen Ansätzen in SRM (30 mM MeOH) mit Hefeextrakt (0,5 g/L) war Methanolverwertung und Sulfatreduktion durch die Kulturen mit *A. woodii* zu beobachten (nicht gezeigt). Vorversuche ergaben, daß nach Zugabe von

Hefeextrakt (1g/L) zu Reinkulturen der sulfatreduzierenden Isolate (ohne weitere Substrate) die Sulfatkonzentration um 2,8 mM abnahm, so daß diese Versuche nicht ausgewertet wurden.

In den Kokulturen sulfatreduzierender Bakterien mit dem Isolat MPB393 war, wie auch schon in vorhergehenden *batch*-Ansätzen, zwar Abnahme der Methanolkonzentration, jedoch keine Sulfatreduktion zu beobachten.

3.7.2 Disaggregation von MPB393

Wie die Versuche zur kontinuierlichen Sulfatreduktion von MPB393 und SRB393 zeigten, disaggregierte MPB393 im Verlaufe der Kultivierung in Einzelzellen und 4-10 Zellaggregate (vgl. Abbildung 15). Wie Tabelle 4 zeigt, war in *batch*-Kultivierungen sulfatreduzierender Bakterien mit *Methanosarcina barkerii*, einem methanogenen Bakterium, welches im Gegensatz zu MPB393 in 4-Zellaggregaten vorliegt, Sulfatreduktion zu beobachten.

Zellaggregate von MPB393 wurden in der Schwingmühle disaggregiert (Abbildung 22 bis Abbildung 25), um zum einen Wasserstoffproduktion und zum anderen Sulfatreduktion bei Kokultivierung mit SRB393 in Abhängigkeit von der Aggregatgröße zu messen.

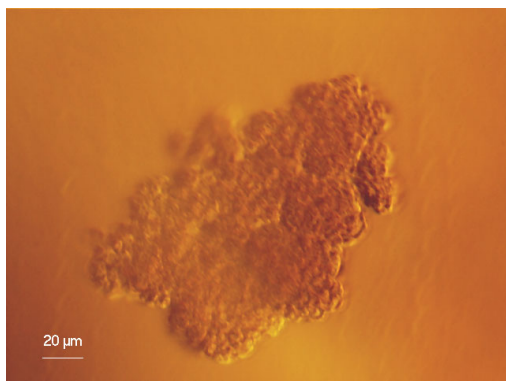


Abbildung 21: MPB393 (Med. 120, 50 mM MeOH). Phasenkontrastaufnahme (40 x 1 x 1)

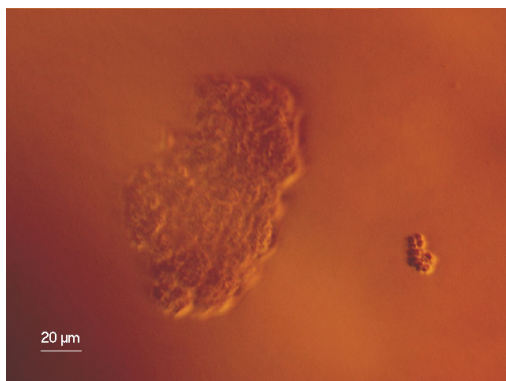


Abbildung 22: MPB393 in Schwingmühle disaggregiert (Glaskugeln 150 µm, 5 min, 30 % Leistung). Phasenkontrastaufnahme (40 x 1 x 1)

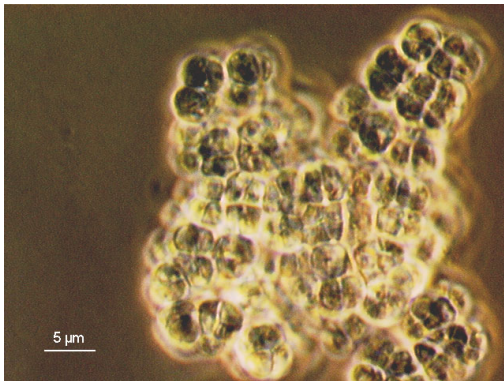


Abbildung 23: MPB393 in Schwingmühle disaggregiert (Glaskugeln 150 µm, 2 min, 60 % Leistung). Phasenkontrastaufnahme (100 x 1 x 1)

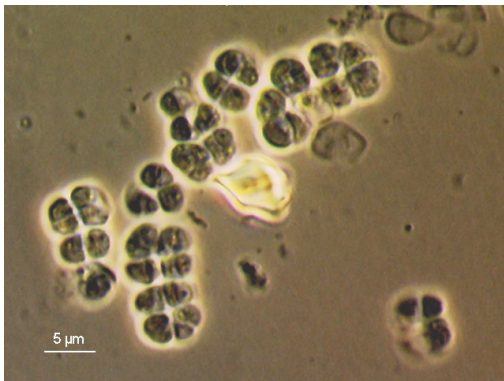


Abbildung 24: MPB393 in Schwingmühle disaggregiert (Glaskugeln 150 µm, 10 min, 60 % Leistung). Phasenkontrastaufnahme (100 x 1 x 1)



Abbildung 25: MPB393 in Schwingmühle disaggregiert (Glaskugeln 150 µm, 10 min, 100 % Leistung). Phasenkontrastaufnahme (100 x 1 x 1)

Die disaggregierten Zellen bzw. die unbehandelten Zellen wurden in klares Mineralsalzmedium (20 mM MeOH) überführt und die Wasserstoffproduktion während der Kultivierung gemessen (Abbildung 26 bis Abbildung 30).

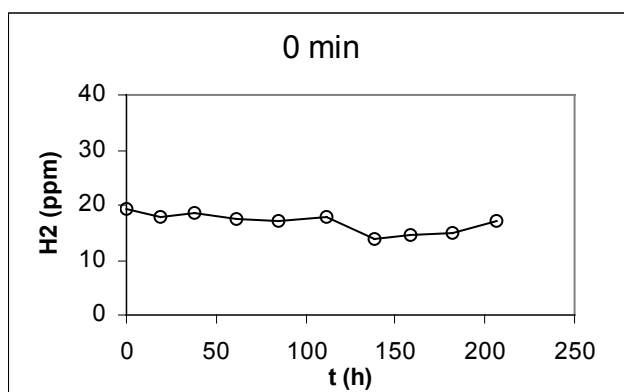


Abbildung 26: Wasserstoffkonzentration während der Kultivierung von MPB 393. (unbehandelte Zellen; klares Mineralsalzmedium, 20 mM MeOH)

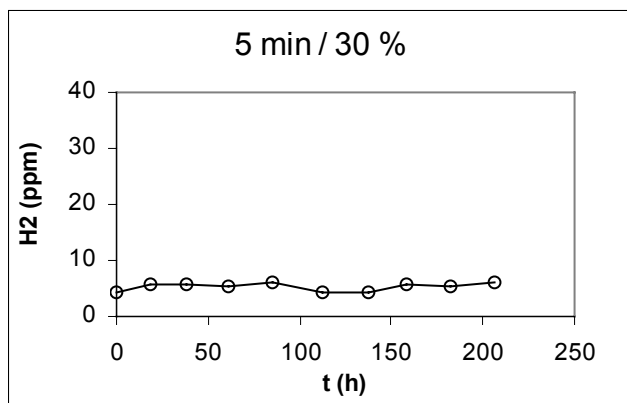


Abbildung 27: Wasserstoffkonzentration während der Kultivierung von MPB393. (Schwingmühle 5 min 30%; klares Mineralsalzmedium, 20 mM MeOH)

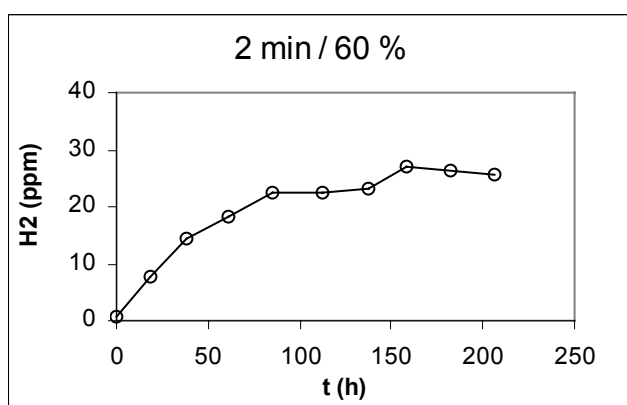


Abbildung 28: Wasserstoffkonzentration während der Kultivierung von MPB393. (Schwingmühle 2 min 60%; klares Mineralsalzmedium, 20 mM MeOH)

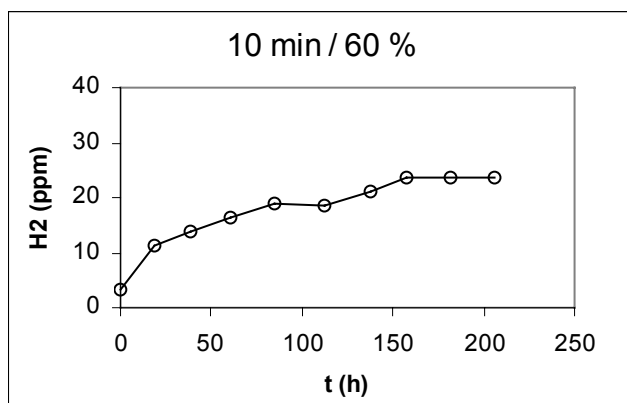


Abbildung 29: Wasserstoffkonzentration während der Kultivierung von MPB393. (Schwingmühle 10 min 60%; klares Mineralsalzmedium, 20 mM MeOH)

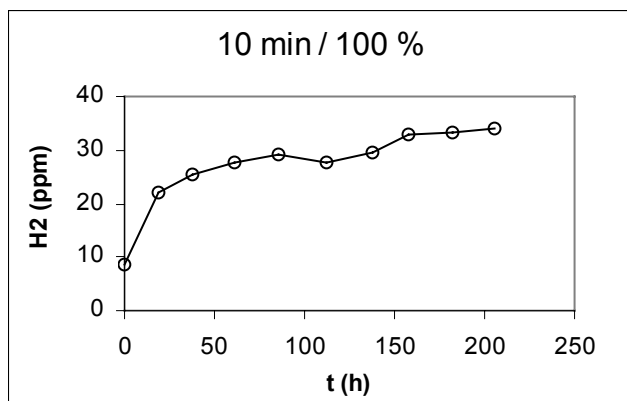


Abbildung 30: Wasserstoffkonzentration während der Kultivierung von MPB393. (Schwingmühle 10 min 100%; klares Mineralsalzmedium, 20 mM MeOH)

Wenn MPB393 in kleineren Zellaggregaten oder als Einzelzellen vorliegt (vgl. Abbildung 23 bis Abbildung 25), wird während der Kultivierung auf Methanol Wasserstoff ins Medium und somit in die Gasphase abgegeben (Abbildung 28 bis Abbildung 30). Bei aggregierten Zellen (Abbildung 21), wie sie auch in den vorher beschriebenen *batch*-Versuchen eingesetzt wurden, war keine Wasserstoffproduktion nachweisbar (Abbildung 26, Abbildung 27). Zu Beginn der Kultivierung war die Wasserstoffkonzentration im Ansatz mit unbehandelten Zellen höher (ca. 20 ppm) als in den Ansätzen mit disaggregierten Zellen (1-9 ppm). Dies läßt sich mit dem Eintrag von Wasserstoff aus der Anaerobenwerkbank erklären. Im unbeimpften Kontrollansatz betrug die Wasserstoffkonzentration stets weniger als 1 ppm.

Nach Abschluß des Versuchs (216 h) war in den beimpften Ansätzen kein Methanol mehr nachweisbar. Nach dem Spülen des Gasraums mit Stickstoff (1 h, 20 mL/min), wurden SRB393-Zellsuspension (Proteinkonzentration im Ansatz: ca. 300 mg/L) und Methanol (Konzentration im Ansatz: 20 mM) zugegeben. Nach 160 Stunden war Methanol in allen Ansätzen vollständig verbraucht; das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol in den Ansätzen ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Sulfatreduktion in Ansätzen mit MPB393 (unbehandelte und disaggregierte Zellen) und SRB393 (klares Mineralssalzmedium, 20 mM MeOH)

Ansatz	Reduziertes Sulfat je Methanol (mol/mol)
Unbehandelte Zellen	0,01
5 min 30 %	0,05
2 min 60 %	0,25
10 min 60 %	0,26
10 min 100 %	0,14

Wenn MPB393 stärker disaggregiert vorliegt (vgl. Abbildung 23, Abbildung 24), wird mehr Sulfat je Methanol reduziert als in Ansätzen mit großen Zellaggregaten. Im Ansatz mit den 10 min bei 100% behandelten Zellen waren bereits Zelltrümmer bzw. aus der Methanochondroitin-Matrix herausgelöste Zellen zu beobachten (vgl. Abbildung 25). Obwohl dies keinen negativen Einfluß auf die

Wasserstoffproduktion hatte (vgl. Abbildung 30), war in diesem Ansatz die Sulfatreduktion geringer als in den Ansätzen mit disaggregierten intakten Zellen.

3.7.3 Anwesenheit weiterer Elektronenakzeptoren

Da WF4 in carbonathaltigem Medium Methanol verwertet (vgl. Tabelle 17), wurde untersucht, ob Sulfatreduktion in der Mischkultur WF4/SRB378 auch in Gegenwart von Carbonat stattfindet. Wie Abbildung 31 zeigt, wird unter diesen Bedingungen Methanol verwertet, jedoch kein Sulfat reduziert, sondern 0,72 mol Acetat je mol Methanol gebildet. Bei der Kultivierung von WF4 unter gleichen Bedingungen (nicht gezeigt) betrug dieser Wert 0,80 mol Acetat je mol Methanol.

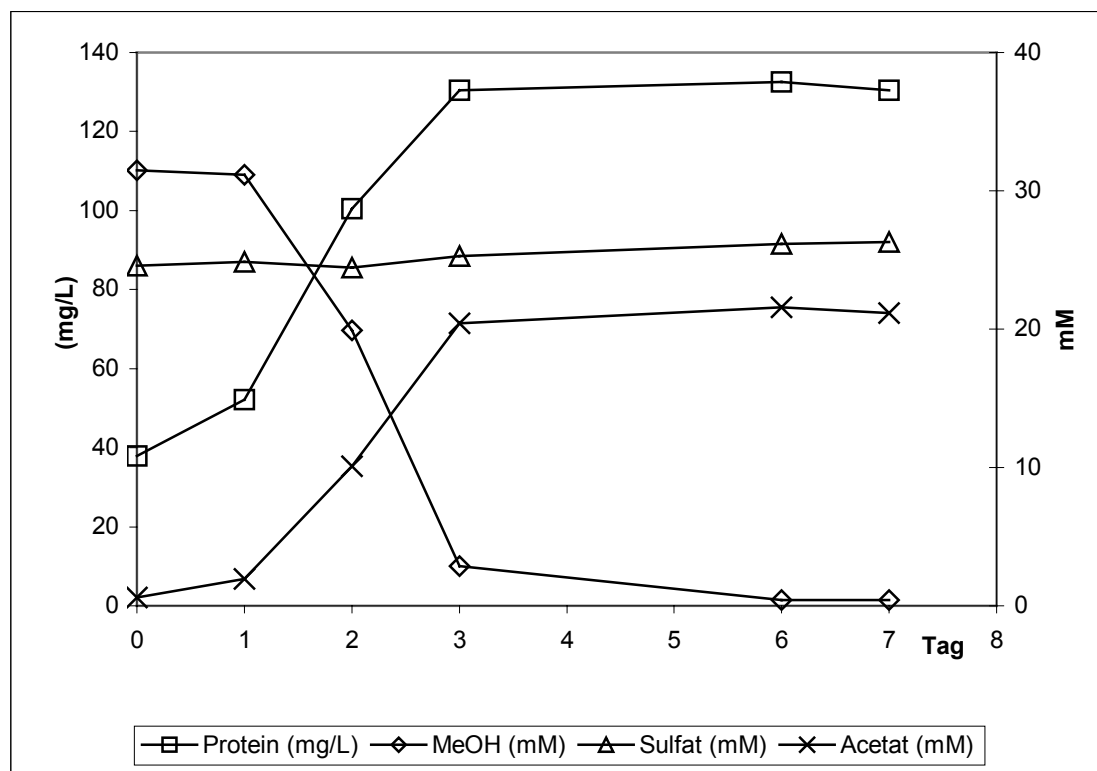


Abbildung 31: Kultivierung von WF4/SRB378 mit Methanol und Carbonat. Methanol wird verwertet; es findet jedoch keine Sulfatreduktion, sondern ausschließlich Acetogenese statt. (Medium 311*, 30 mM Methanol).

3.7.4 Verhältnis von WF4 zu SRB378

Bei der *batch*-Kultivierung von WF4 und SRB378 wurde Methanolverwertung und Sulfatreduktion nur beobachtet, wenn mit einer auf Lactat gewachsenen Vorkultur, in der die Zellzahl von SRB378 sehr viel höher als die von WF4 war, angeimpft

wurde. Mikroskopische Untersuchungen ergaben, daß das Verhältnis der Zellzahlen von WF4 und SRB378 sich im Verlauf der Kultivierung auf Methanol änderte. Um zu überprüfen, ob das Verhältnis von methylophemem zu sulfatreduzierendem Bakterium Einfluß auf die stationäre Wasserstoffkonzentration und die Sulfatreduktion hat, wurden WF4 und SRB38 in unterschiedlichen Verhältnissen (gemessen anhand der Proteinkonzentration) auf Methanol und Sulfat kultiviert (Abbildung 32).

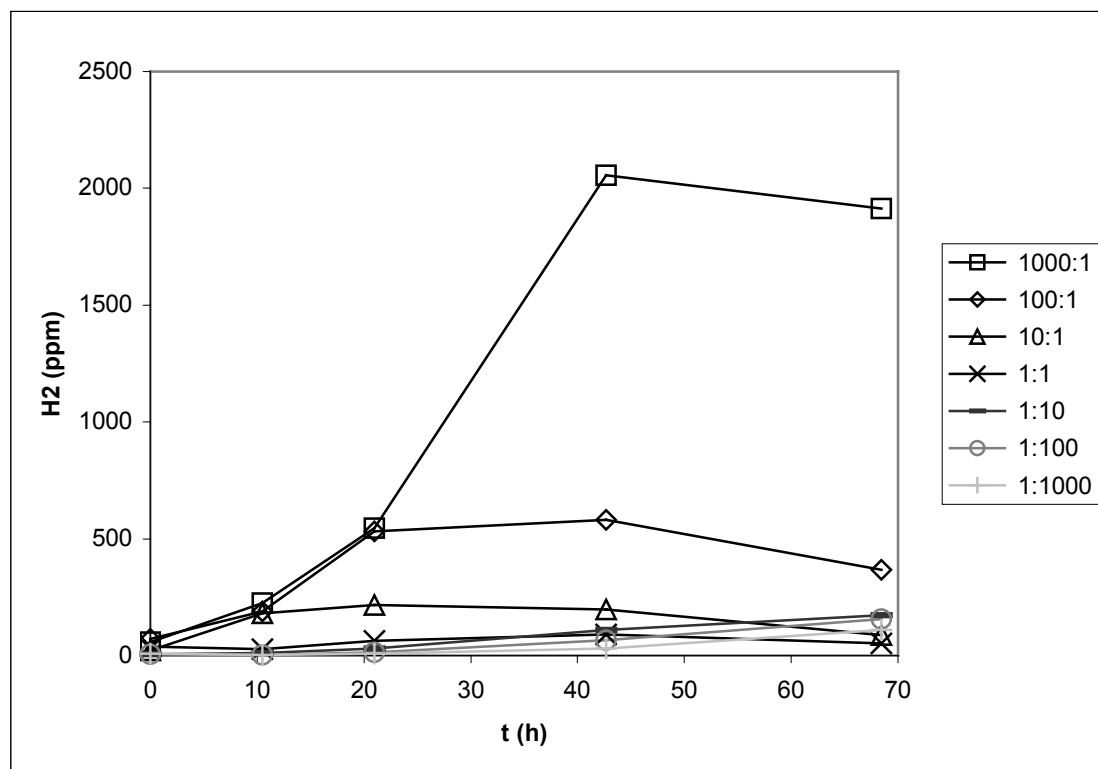


Abbildung 32: Stationäre Wasserstoffkonzentrationen in Abhängigkeit vom WF4:SRB-Verhältnis (klares Mineralsalzmedium, 15 mM MeOH, Proteinkonzentration ca. 400 mg/L)

Bereits bei einem Verhältnis von WF4 zu SRB378 von 10:1 wird der von WF4 gebildete Wasserstoff vollständig von SRB378 zur Sulfatreduktion genutzt. Eine Erhöhung des Anteils des Sulfatreduzierers führte zu keiner weiteren Senkung der stationären Wasserstoffkonzentration.

Nach 70 h war Methanol in den Ansätzen mit einem Verhältnis WF4:SR378 von 10:1 und 1:1 vollständig verbraucht. In dem Ansatz mit einem Verhältnis WF4:SRB378 von 1:1000 war nur eine geringe Methanolverwertung (< 1 mM) zu beobachten. In allen übrigen Ansätzen nahm die Methanolkonzentration um etwa

50 % ab. Wie Abbildung 33 zeigt, ist das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol abhängig vom Verhältnis WF4:SRB378.

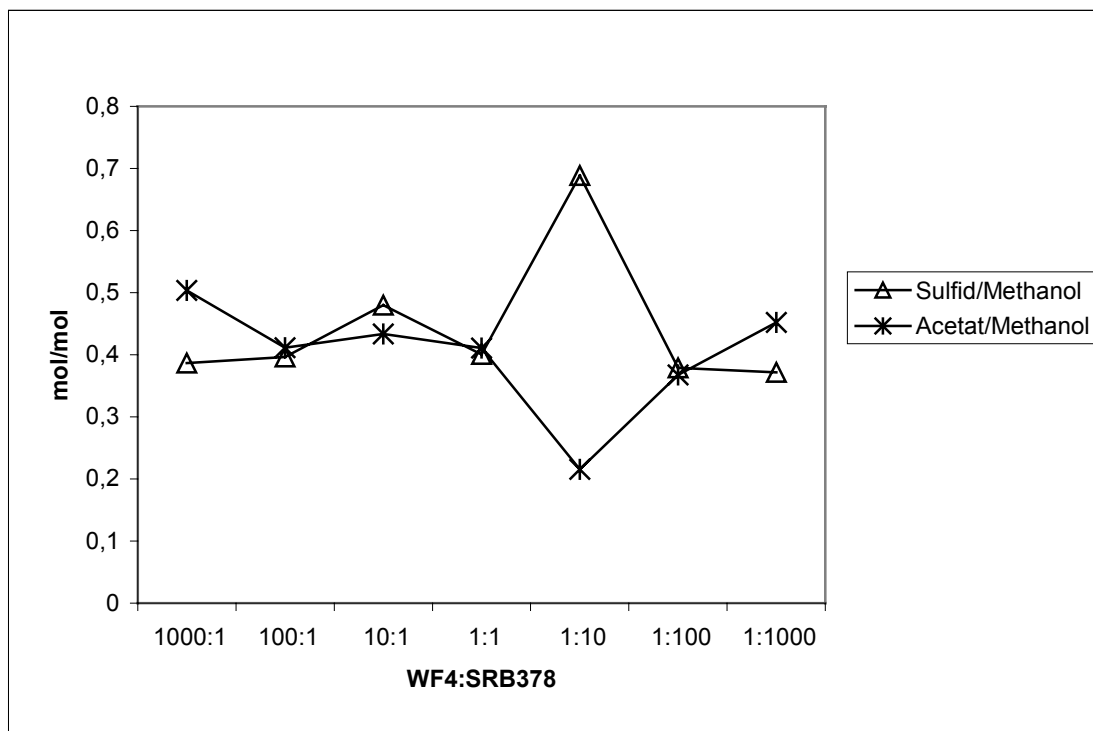


Abbildung 33: Je Methanol gebildetes Sulfid bzw. Acetat in Abhängigkeit vom WF4:SRB378-Verhältnis (klares Mineralsalzmedium, 15 mM MeOH)

Ist SRB378 in etwa 10-fachem Überschuß zu WF4 vorhanden, wird mehr Sulfid und weniger Acetat je Methanol gebildet als bei anderen Verhältnissen von WF4:SRB378.

3.7.5 pH-Wert

Versuche zur Abhängigkeit der Sulfatreduktion in der Mischkultur MPB393/SRB393 vom pH-Wert gestalteten sich zunächst schwierig. Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, war in *batch*-Ansätzen keine Sulfatreduktion zu beobachten. Bei der Kultivierung im Rührkesselreaktor zeigte sich, daß eine Volldurchmischung der Kulturflüssigkeit bereits ab Rührgeschwindigkeiten von 20 r.p.m. die Sulfatreduktion inhibierte, wodurch pH-Regelung im Fermenter nicht möglich war. Es wurden daher Versuche zur kontinuierlichen Sulfatreduktion der Kultur MPB393/SRB393 in Abhängigkeit vom pH-Wert des zulaufenden Mediums durchgeführt. In allen Versuchen betrug die Durchflußrate 0,01/h; der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,5 M HCl und 1 M NaOH geregelt. Nachdem sich der pH-

Wert im Rührkesselreaktor nicht mehr änderte, wurde während der folgenden 100 h die Differenz zwischen den Sulfatkonzentrationen des Zulaufs und Ablaufs sowie die stationäre Methanolkonzentration im Fermenter bestimmt. Die gemittelten Werte der vier jeweils aller 24 Stunden erfolgten Probenahmen sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Kontinuierliche Kultivierung von MPB393/SRB393 bei unterschiedlichen pH-Werten des zugegebenen Mediums (SRM, pH-Wert des Zulaufes auf die in Spalte 1 angegebenen pH-Werte geregelt, $D=0,01/h$, Spalte 4 u. 5: gemittelte Werte aus 4 Proben)

pH_{Zulauf}	pH_{Ablauf}	Zeit bis zum konstanten pH im Fermentor (h)	MeOH_{Ablauf} (mM)	Red. Sulfat je Methanol (mol/mol)
5,0	-	Abbruch des Versuches nach 500 h	$0,37 \pm 0,02$	0
5,5	6,8	315	$0,41 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$
6,0	7,0	170	$0,42 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,01$
6,5	7,4	190	$0,16 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$
7,0	7,4	120	$0,51 \pm 0,08$	$0,11 \pm 0,01$
7,5	7,4	190	$0,29 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,01$
8,5	8,4	210	$0,34 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,01$

Sulfatreduktion durch die Mischkultur MPB393/SRB393 war bei pH_{Zulauf}-Werten von 5,5 bis 8,5 zu beobachten. Der pH-Wert im Fermentor lag unabhängig vom pH_{Zulauf} im neutralen Bereich, lediglich bei einem pH_{Zulauf} von 8,5 fand keine Neutralisation statt. Bei einem pH_{Zulauf} von 5,0 stellte sich kein konstanter pH-Wert im Fermentor ein; der Versuch wurde daher nach 500 Stunden abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt bestand keine Differenz zwischen der Sulfatkonzentration des Zulaufs und des Ablaufs, obwohl immer noch Methanol verwertet wurde.

Versuche zur pH-Abhängigkeit der Sulfatreduktion in der Mischkultur WF4/SRB378 wurden in *batch*-Ansätzen durchgeführt. Es zeigte sich eine pH-Wert-Abhängigkeit des Verhältnisses von reduziertem Sulfat zu verbrauchten Methanol (Abbildung 34).

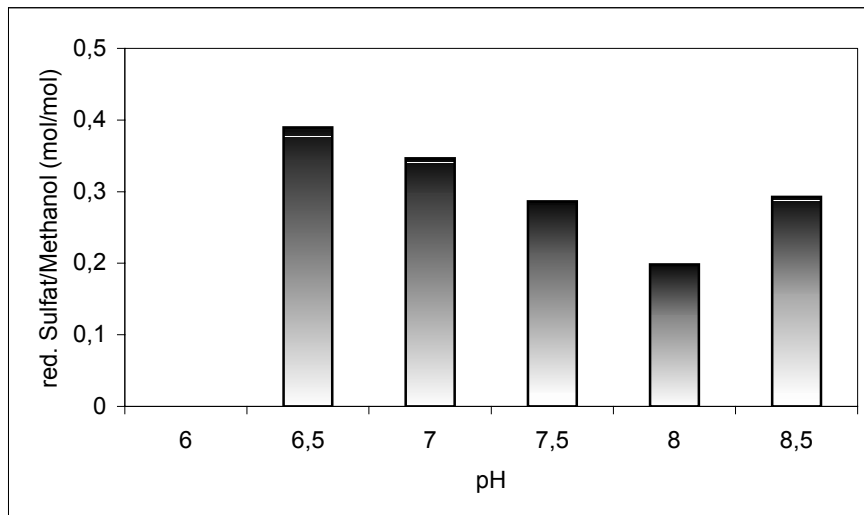


Abbildung 34: pH Abhängigkeit der Sulfatreduktion in der Mischkultur MKF4/SRB378 (SRM, 30 mM MeOH)

Bei pH-Wert 6,5 wurde das meiste Sulfat je Methanol reduziert, bei pH-Wert 6,0 war weder Methanolverwertung noch Sulfatreduktion zu beobachten. Allerdings blieb der pH-Wert beim Wachstum in schwach gepuffertem SRM nicht konstant, sondern sank aufgrund des gebildeten Acetates.

Es wurden daher Versuche mit dichter Zellsuspension (Proteinkonzentration ca. 230 mg/L) in HEPES-gepuffertem Mineralsalzmedium (HEPES-Konzentration 50 mM) durchgeführt, hier war bei pH-Wert 8,5 das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol am höchsten (0,38 mol/mol) und bei neutralen pH-Werten (7,0-7,5) am geringsten (0,29 mol/mol).

3.7.6 Substratkonzentration

Die Ergebnisse der Versuche mit MPB393/SRB393 im Rührkesselreaktor sind in Tabelle 21 zusammengefaßt. Die aufgeführten Werte wurden aus 4 Proben innerhalb 100 h nach Erreichen von konstanten Methanol- und Sulfatkonzentrationen im Ablauf gemittelt.

Tabelle 21: Kontinuierliche Kultivierung von MPB393/SRB393 im Rührkesselreaktor bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen im Zulauf (SRM, MeOH-Konzentration siehe Spalte 1, $D = 0,01/h$, Spalte 3: gemittelte Werte aus 4 Proben)

MeOH_{Zulauf} (mM)	Zeit bis zur konstanten Sulfat- und MeOH-Konzentration im Ablauf (h)	Reduziertes Sulfat je Methanol (mol/mol)
12	160	$0,10 \pm 0,01$
31	190	$0,11 \pm 0,01$
47	270	$0,09 \pm 0,01$
90	450	$0,10 \pm 0,02$

Je höher die Methanolkonzentration im Zulauf war, desto länger dauerte es, bis konstante Sulfat- und Methanolkonzentrationen im Ablauf gemessen werden konnten. Die stationäre Methanolkonzentration war bis zu einer Zulaufkonzentration von 47 mM kleiner als 0,5 mM. Bei einer Methanolkonzentration im Zulauf von 90 mM betrug die Ablaufkonzentration nach 450 h 4,5 mM. Die Substratkonzentration hatte keinen Einfluß auf das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol.

4. Diskussion

4.1 Die Sulfatreduzierer SRB378 und SRB393

Die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion ist in einer morphologisch und physiologisch diversen Gruppe von Bakterien vertreten (Widdel u. Bak, 1992; Fukui *et al.*, 1999) und wird als Ergebnis einer konvergenten Evolution anstelle eines einzelnen evolutionären Ereignisses diskutiert (Le Gall u. Fauque; 1988). Entsprechend groß ist die Vielfalt hinsichtlich der Habitate und der zur Sulfatreduktion genutzten Substrate.

Die sulfatreduzierenden Isolate SRB378 und SRB393 wurden anhand ihrer Morphologie, der verwerteten Substrate sowie der Akkumulation von Acetat beispielsweise beim Wachstum auf Lactat (unvollständige Oxidation) als Arten der Gattung *Desulfovibrio* klassifiziert (Widdel u. Pfennig, 1984, Voordouw, 1995). Analyse und Vergleich der 16S rDNA-Sequenzen bestätigten die Einordnung. SRB378 und SRB393 zeigten sowohl physiologische als auch phylogenetische Unterschiede. Auffällig war die, verglichen mit SRB393, höhere Anzahl der durch SRB378 verwerteten Substrate. Beim Wachstum auf gleichen Substraten reduzierte SRB378 bezogen auf die Substratkonzentration weniger Sulfat als SRB393, bildete jedoch mehr Biomasse (vgl. Abschnitt 3.2.2, Seite 40).

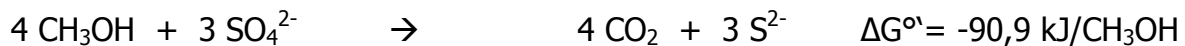
Dieser Unterschied kann für den Einsatz der Sulfatreduzierer in einem technischen Verfahren zur Sulfatreduktion von Bedeutung sein. In einem solchen Verfahren soll das eingesetzte Substrat vorwiegend zur Sulfatreduktion und, abgesehen von der notwendigen „Erhaltung des Katalysators“, nicht zur Biomassebildung genutzt werden, so daß hier der Einsatz des „ineffizienten“ (bezogen auf die Biomassebildung) Sulfatreduzierers SRB393 zu bevorzugen wäre.

Ebenfalls wichtig für den technischen Einsatz ist die für viele *Desulfovibrio*-Arten beschriebene Sauerstofftoleranz (z.B. Sass *et al.*, 1997) bzw. die Fähigkeit, Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu nutzen (z.B. Dannenberg *et al.*, 1992, Krekeler *et al.*, 1993, Johnson *et al.*, 1997, Eschemann *et al.*, 1999), was Anaerobiose und damit Sulfatreduktion auch bei oxischen Wässern ermöglicht.

4.1.1 Methanolverwertung

Bei der kompletten Oxidation von Methanol zu CO₂ und Nutzung sämtlicher entstehenden Elektronen für die Sulfatreduktion (Gleichung 16) ist ein Verhältnis von 0,75 mol reduziertem Sulfat je Methanol zu erwarten.

Gleichung 16



Es ist zu beachten, daß 0,75 mol red. Sulfat je Methanol lediglich den theoretischen Maximalwert darstellt, der durch verschiedene Faktoren beeinflußt wird. Dazu gehören die Verwertung von Methanol als Kohlenstoffquelle, was Wachstum der Bakterien und somit „Erhaltung des Biokatalysators“ in einem kontinuierlichem Prozeß ermöglicht. In oxischen sulfathaltigen Bergbauwässern können weitere Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff oder Eisen(III) vorliegen, deren Reduktion das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol ebenfalls verringert.

Die Nutzung von Methanol als Kohlenstoff- oder Energiequelle konnte weder bei SRB378 noch bei SRB393 beobachtet werden. Somit sind zur Dekontamination sulfathaltiger Wässer mit Methanol als Substrat die sulfatreduzierenden Isolate allein nicht geeignet. Eine Aufgabe dieser Arbeit lautete, methylo trope sulfatreduzierende Bakterien zu isolieren, daher soll auf dieses Thema trotz der negativen Ergebnisse näher eingegangen werden.

Die Fähigkeit zur Nutzung von Methanol als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle ist nur für sehr wenige Arten sulfatreduzierender Bakterien beschrieben und erfordert zusätzlich zur Anwesenheit methanol- bzw. methylgruppenoxidierender Enzyme die Fähigkeit, Methylverbindungen oder CO_2 (als Endprodukt der Methanoloxidation) zu fixieren.

In den methylo trophen Sulfatreduzierern *Desulfobacterium catecholicum* (Szewzyk u. Pfennig, 1987) und *Desulfotomaculum orientis* (Hanselmann *et al.*, 1995) wurde CO-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen und der Acetyl-CoA-Weg als Weg zur Methanoloxidation und Kohlenstofffixierung zugleich diskutiert. *Desulfotomaculum orientis* ist in der Lage, Methanol komplett mit Sulfat als Elektronenakzeptor zu oxidieren; allerdings muß Carbonat im Medium vorhanden sein (Hanselmann *et al.*, 1995). In Abwesenheit von Sulfat kann *Desulfotomaculum orientis* Methanol zur Reduktion von Carbonat nutzen (Klemps *et al.*, 1985, Hanselmann *et al.*, 1995) und ähnelt damit hinsichtlich der Energiekonservierung methylo trophen homoacetogenen Bakterien.

Die Nutzung von Methanol als Elektronendonator erfordert zumindest die Anwesenheit methanol- bzw. methylgruppenoxidierender Enzyme. Literatur zu methanoloxidierenden Enzymen in den *Desulfovibrio*-Arten, für welche die Nutzung von Methanol als Elektronendonator beschrieben wurde (vgl. Einleitung; Braun u. Stolp, 1985; Nanninga u. Gottschal, 1986; 1987; Qatibi *et al.*, 1991), konnte nicht

gefunden werden. Für *Desulfovibrio gigas* wurde eine NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase beschrieben, bei der jedoch mit Methanol als Substrat keine Aktivität gemessen werden konnte (Hensgens *et al.*, 1993).

Einige sulfatreduzierende Bakterien sind in der Lage, Methylgruppen aus methylierten Verbindungen zu oxidieren. Für *Desulfobacterium autotrophicum* und ein weiteres marines *Desulfobacterium*-Isolat ist die Oxidation von Methylgruppen aus Betain über den oxidativen Zweig des Acetyl-CoA-Weges beschrieben (Heijthuisen u. Hansen, 1989). Dabei wurden die Aktivitäten von CO-Dehydrogenase, Formiat-Dehydrogenase und methylviologenabhängiger Hydrogenase bestimmt; eine Aktivitätsbestimmung von Methyltransferasen, die für den Transfer von Methylgruppen aus Betain oder auch Methanol zu den C1-oxidierenden Enzymen notwendig sind, erfolgte nicht. Die Oxidation von Methylgruppen aus Dimethylsulfonylpropionat (van der Maarel *et al.*, 1996) erfolgt nach einer Aktivierung durch THF-abhängige Methyltransferasen (Jansen u. Hansen, 1998). Methanol (C-Oxidationszahl -2) konnte jedoch nicht über den für die Methylgruppen (C-Oxidationszahl -3) beschriebenen Weg oxidiert werden.

Da in der Literatur nur ausgewählte Beispiele zur Methanolverwertung durch Sulfatreduzierer zu finden waren, wurde auf weitere Versuche zur Isolation methylotropher Sulfatreduzierer verzichtet. In der Folge beschäftigte sich die Arbeit mit dem Einsatz methylotropher sulfatreduzierender Mischkulturen zur Dekontamination sulfathaltiger Wässer.

4.2 Sulfatreduktion in Mischkulturen methylotropher und sulfatreduzierender Bakterien

Da Versuche zur Isolation eines methylotrophen Sulfatreduzierers erfolglos waren, in den Anreicherungskulturen jedoch Sulfatreduktion und Methanolverwertung beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 3.1, Seite 37), mußte angenommen werden, daß beide Prozesse in unterschiedlichen Organismen stattfinden. Das Interesse richtete sich daher auf die Isolation der methylotrophen Bakterien, welche zusammen mit dem jeweiligen schon isolierten Sulfatreduzierer kultiviert werden sollten. Die Aufgabe war, wie auch bei der Isolation der Sulfatreduzierer, eine Kultur zu finden, welche die Sulfatreduktion mit Methanol katalysiert.

Die Fähigkeit zur Methanolverwertung ist für eine im Vergleich zu sulfatreduzierenden Bakterien große Anzahl carbonatreduzierender Bakterien beschrieben. Als methanolverwertende Enzyme sind zum einen eine PQQ-abhängige Methanoldehydrogenase in *Clostridium thermoautotrophicum* (Winters u. Ljungdahl,

1989) und zum anderen Methyltransferasen beschrieben, beispielsweise in *Methanosarcina barkeri* (van der Meijden *et al.*, 1983; 1984b), *Eubacterium limosum* (van der Meijden *et al.*, 1984a) oder *Sporomusa ovata* (Stupperich *et al.*, 1992, Stupperich u. Konle, 1993). Für den Transfer der Methylgruppe und die Spaltung der C-O-Bindung des Methanols ist ein starkes Nucleophil nötig; in der für *Sporomusa ovata* beschriebenen cobamid-abhängigen Methyltransferase fungiert Co(I) als Elektronendonator und Methylgruppenakzeptor (Stupperich, 1991; Stupperich u. Konle, 1993). Dieses Corrinoide wird als eine der am stärksten reduzierten physiologischen Verbindungen beschrieben ($E'_0 = -609$ mV).

Es sind also zwei Arten der Aktivierung des Methanols möglich, zum einen oxidativ über eine Methanoldehydrogenase und zum anderen die reduktiv mittels einer Methyltransferase.

Wenn Methanoloxidation und Sulfatreduktion in unterschiedlichen Mikroorganismen stattfinden, müssen Elektronen zwischen den Organismen transferiert werden. Die Reduktion des elektronenübertragenden Intermediates (ETI) durch den Methanoloxidierer und die Oxidation des ETI durch den Sulfatreduzierer macht die die Gesamtreaktion begleitende Energie für die Partner biologisch konservierbar. Die Verteilung der zur Verfügung stehenden Energie hängt somit entscheidend von der Art des elektronenübertragenden Intermediates bzw. von den freien Reaktionsenthalpien bei Reduktion und Oxidation des ETI ab.

Es ist zu erwarten, daß der Elektronentransfer abhängig von der Art der Aktivierung des Methanols ist. So könnte die Oxidation von Methanol Formiat und Wasserstoff als mögliche ETI bereitstellen (s.a. Abschnitt 4.3, Seite 79). Im Gegensatz dazu werden bei der reduktiven Aktivierung von Methanol zunächst Elektronen verbraucht.

4.2.1 WF4/SRB378 – syntrophe Sulfatreduktion

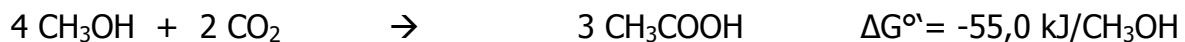
Aus der Anreicherungskultur B378 wurde das methylotrophe Bakterium WF4 isoliert. Die beobachtete Acetatbildung bei der Kultivierung in carbonatgepuffertem Medium (Abbildung 31, Seite 63) war ein Hinweis auf einen homoacetogenen Stoffwechsel (Balch *et al.*, 1977; Ljungdahl, 1986). Die Verwertung von Methanol ist für eine Reihe homoacetogener Bakterien verschiedener Gattungen beschrieben (Tabelle 22), jedoch nicht für *Acetobacterium fimetarium* (Kotsyurbenko *et al.*, 1996), dessen 16SrDNA-Sequenz die höchste Homologie zu der von WF4 aufwies.

Tabelle 22: Beispiele für methanolverwertende homoacetogene Bakterien verschiedener Gattungen

Gattung	Spezies	Referenz
<i>Acetobacterium</i>	<i>A. woodii</i>	Kerby <i>et al.</i> , 1983
	<i>A. carbinolicum</i>	Eichler u. Schink, 1984
	<i>A. bakii</i>	Kotsyurbenko <i>et al.</i> , 1996
	<i>A. paludosum</i>	Kotsyurbenko <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostridium</i>	<i>C. formicoaceticum</i>	Andreesen <i>et al.</i> , 1970
	<i>C. thermoautotrophicum</i>	Wiegel <i>et al.</i> , 1981
	<i>C. thermoaceticum</i>	Wiegel u. Garrison, 1985
<i>Sporomusa</i>	<i>S. ovata</i>	Möller <i>et al.</i> , 1984

Bei der Acetatbildung aus Methanol wird Carbonat als Elektronenakzeptor und Kohlenstoffquelle genutzt.

Gleichung 17



Die Verwertung von Methanol durch WF4 gelang nur, wenn Carbonat im Medium vorhanden war, was die anfänglichen Schwierigkeiten bei der Kultivierung auf SRM erklärt. Wenn kein Carbonat vorhanden ist, wie z.B. bei der Kultivierung in SRM, fehlt ein Akzeptor für die bei der Methanoloxidation entstehenden Elektronen¹⁶; diese werden von WF4 zur Reduktion des ETI verwendet. Dieses kann bei gemeinsamer Kultivierung mit SRB378 zur Sulfatreduktion genutzt werden.

Gleichung 18



¹⁶ Die Bildung von Acetat (C-Oxidationszahl –3/+3) aus Methanol (C-Oxidationszahl –2) ist mit der Abgabe von Elektronen verbunden und kann daher als Oxidationsreaktion bezeichnet werden.

Bei der kompletten Oxidation von Methanol zu CO_2 werden 8 Elektronen freigesetzt (Gleichung 16); bei der zusätzlichen Bildung von Acetat aus Methanol (Gleichung 18) werden jedoch nur 2 Elektronen zur Sulfatreduktion genutzt. Der bei der Kultivierung von WF4/SRB78 gemessene Wert von 0,21-0,25 mol reduziertes Sulfat je mol Methanol (vgl. Abschnitt 3.4, Seite 47) entspricht etwa 28-30% der im Methanol „enthaltenen“ Elektronen und liegt somit nur geringfügig niedriger als der theoretische Wert (0,25 mol red. Sulfat je Methanol, s. Gleichung 18). Der verringerte Wert könnte durch die Nutzung von Methanol als Kohlenstoffquelle erklärt werden (s. Seite 69).

In der Literatur beschriebene Interaktionen zwischen homoacetogenen und sulfatreduzierenden Bakterien beziehen sich meist auf die Konkurrenz um Wasserstoff, der beispielsweise von syntrophen Oxidierern gebildet wird (z.B. Cord-Ruwisch *et al.*, 1988, Conrad u. Wetter, 1990, Morvan *et al.*, 1996). Homoacetogene Bakterien wurden aber auch als Wasserstoffproduzenten in syntrophen Assoziationen beschrieben; so wird der durch *Acetobacterium carbinolicum* bei der Oxidation primärer Alkohole gebildete Wasserstoff von *Methanospirillum hungatei* zur Methanbildung genutzt (Eichler u. Schink, 1984).

Auch bei WF4/SRB378 handelt es sich um eine syntrophe Assoziation. WF4 kann Methanol in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors (Carbonat) nicht verwerten, im Gegenzug ist SRB378 auf das von WF4 gebildete ETI angewiesen, um es zur Sulfatreduktion und damit Energiekonservierung zu nutzen.

In Anwesenheit von Carbonat und Sulfat wurde bei der Kultivierung von WF4/SRB378 keine Sulfatreduktion, sondern nur Acetatbildung beobachtet. Die Stoffmenge des gebildeten Acetates (0,72 mol je mol Methanol) liegt im Bereich des aus Gleichung 17 zu erwartenden Wertes (0,75 mol/mol).

In der Literatur wurde für Assoziationen aus homoacetogenen und sulfatreduzierenden Bakterien Sulfatreduktion mit Methanol auch in Anwesenheit von Carbonat beschrieben. Obwohl der homoacetogenen Spezies *Sporomusa ovata* Carbonat als Elektronenakzeptor zur Verfügung stand, wurden 33 % der bei der Methanoxidation abgegebenen Elektronen an die sulfatreduzierende Spezies (*Desulfovibrio vulgaris*) übertragen (Heijthuisen u. Hansen, 1986). In einer von Cord-Ruwisch und Ollivier (1986) beschriebenen Mischkultur aus *Sporomusa acidovorans* und *Desulfovibrio vulgaris* G6 wurde das eingesetzte Methanol komplett durch Sulfat reduziert und es war (in Gegenwart von Carbonat) keine Acetatbildung zu beobachten. Diese Kultur unterschied sich bezüglich des Verhältnisses von reduziertem Sulfat je Methanol nicht von einer methylo trophen sulfatreduzierenden Reinkultur.

Um abschätzen zu können, ob ein vollständiger Elektronentransfer auch in einem kontinuierlichen Sulfatreduktionsprozeß zu erwarten wäre, wurden die möglichen konservierbaren Energiebeträge bei der Reduktion von Sulfat oder Carbonat betrachtet. Bei der Kultivierung von WF4 und SRB378 mit Methanol kommen 3 Möglichkeiten des Elektronenflusses in Betracht:

- A: Methanol wird vollständig oxidiert; alle Elektronen werden zur Sulfatreduktion genutzt (Gleichung 16; $\Delta G^\circ = -90,9 \text{ kJ/CH}_3\text{OH}$).
- B: Methanol wird zu Acetat oxidiert; die dabei entstehenden Elektronen stehen zur Sulfatreduktion zur Verfügung (Gleichung 18; 0,25 mol reduziertes Sulfat je mol Methanol; $\Delta G^\circ = -66,8 \text{ kJ/CH}_3\text{OH}$).
- C: Methanol wird zu Acetat oxidiert; als Elektronenakzeptor dient dabei aus vorhergehender Methanoloxidation oder im Medium enthaltenes Carbonat; es wird kein Sulfat reduziert (Gleichung 17; $\Delta G^\circ = -55,0 \text{ kJ/CH}_3\text{OH}$).

Die freie Standardreaktionsenthalpie bei der komplette Methanoloxidation (A) ist negativer als die der Acetogenese (B oder C). Man könnte also annehmen, daß die Sulfatreduktion bevorzugt gegenüber der Acetogenese abläuft, wie es z.B. für Butyrat (Mizuno *et al.*, 1998) oder Wasserstoff beschrieben (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988; Conrad u. Wetter, 1990) ist. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß in syntrophen Assoziationen die die Gesamtreaktion begleitende Energie zwischen den Partnern „aufgeteilt“ wird, wobei die Verteilung von Art und Konzentration des ETI abhängig ist (siehe Seite 71). Bei gleicher Verteilung zwischen WF4 und SRB378 beträgt der maximal konservierbare Energiebetrag bei Weg A -45 kJ/MeOH für jeden Partner und ist somit geringer als der Betrag, der bei der Acetogenese durch WF4 (Weg C) konserviert werden könnte. Hinzu kommt, daß die komplette Oxidation von Methanol zu Kohlendioxid (und Wasserstoff) ein unter Standardbedingungen endergoner Prozeß ($\Delta G^\circ = + 23,5 \text{ kJ/CH}_3\text{OH}$) ist, welcher nur durch eine sehr niedrige ETI-Konzentration thermodynamisch möglich wird. Die Energiekonservierung erfolgt in homoacetogenen Bakterien (neben elektronentransfergekoppeltem Protonentransport) hauptsächlich durch Substratkettenphosphorylierung bei der Acetatkinase-Reaktion (Wood *et al.*, 1986). Für WF4 verringert sich also der Energiegewinn bei der Oxidation von Methanol verglichen mit der Acetatbildung aus Methanol.

In Abwesenheit von Carbonat bietet die syntrophe Sulfatreduktion mit Methanol unter Acetatbildung (B) sowohl WF4 als auch SRB378 die Möglichkeit, Energie zu konservieren. Ein weiterer Elektronentransfer ($> 0,25 \text{ mol red. Sulfat je Methanol}$) oder die Sulfatreduktion in Anwesenheit von Carbonat bedeutet einen Verlust an

konservierbarer Energie für WF4, weshalb unter diesen Bedingungen SRB378/Sulfat und Carbonat als konkurrierende Elektronenakzeptoren bei der Energiekonservierung von WF4 angesehen werden müssen (siehe auch Seite 79). Da für einen kontinuierlichen Sulfatreduktionsprozeß durch die Mischkultur WF4/SRB378 beide Partner in der Lage sein müssen, Energie zu konservieren, muß eine ineffiziente Methanolverwertung in Kauf genommen werden.

4.2.2 MPB393/SRB393 Konkurrenz um Elektronen

Wie in Abschnitt 3.3.2 (Seite 45) beschrieben, gestaltete sich die Isolation von MPB393 schwierig. Trotz mehrfacher Verdünnungen im Weichagar konnte eine vibrioformige Begleitkultur nicht eliminiert werden. Die Isolation von MPB393 gelang nur durch die Zugabe von Molybdat zum Medium, wodurch sulfatreduzierende Bakterien spezifisch inhibiert wurden.

Ähnliche Probleme bei der Isolation eines nicht näher bezeichneten Isolates der Gattung *Methanosarcina* wurden von Zhilina (1975) beschrieben. In dieser methanogenen Anreicherungskultur (Acetat als Substrat) waren vibrioformige Zellen eines Sulfatreduzierers (*Desulfovibrio sp.*) in unmittelbarer Nähe und im Inneren der schwammigen Aggregate der methanogenen Kultur zu finden; letztere konnte in Abwesenheit der Sulfatreduzierer nicht wachsen.

MPB393 wurde aufgrund seiner Fähigkeit, Methanol als Substrat für Wachstum und Vermehrung zu nutzen, selektiert. Es sind ca. 20 Spezies methyлотropher¹⁷ methanogener Bakterien beschrieben (Garcia *et al.*, 2000), so z.B. Arten der Gattungen *Methanosarcina* oder *Methanosphaera*, wobei letztere zusätzlich Wasserstoff als Elektronendonator benötigen (Miller u. Wolin, 1985).

Das Isolat MPB393 konnte aufgrund seiner Fähigkeit zur Methanolverwertung als eine Art der Gattung *Methanosarcina*¹⁸ eingeordnet werden. Die 16S rDNA-Sequenz eines 455 bp-Fragmentes von MPB393 zeigte 100% Homologie zur Sequenz von *Methanosarcina mazei*.

Für diese Spezies (welche zunächst als Typusstamm der Gattung *Methanococcus* galt; Mah u. Kuhn, 1984; Maestrojuán *et al.*, 1992), werden verschiedene „morphologische Stadien“ beschrieben (Mah, 1980), die sich teilweise mit den für ein nicht näher bezeichnetes *Methanosarcina*-Isolat beschriebenen „Morphotypen“

¹⁷ In der angegebenen Literaturstelle wird hiermit die Fähigkeit zur Verwertung von Methanol, Methylaminen oder Dimethylsulfid bezeichnet.

¹⁸ Weitere methyлотrophe Spezies der Ordnung *Methanosarcinales* werden als halophil beschrieben (Garcia *et al.*, 2000)

(Zhilina, 1975; Zhilina u. Zavarzin, 1978) decken. So besteht z.B. der von Zhilina (1975) definierte „Morphotyp 1“ aus Einzelzellen („*cocci*“), welche in 2-8-Zellaggregaten („*packets*“) zusammenliegen, die wiederum ein „Pseudoparenchym“ bilden. Ähnliche Strukturen konnten auch für die Reinkultur von MPB393 gefunden werden, in welcher die Aggregate bis zu einer Größe von 2 mm wuchsen (vgl. Abbildung 13, Seite 50). Die Bildung so großer Aggregate in der Gattung *Methanosarcina* wurde nur für die Art *Methanosarcina mazei* beschrieben (Maestrojuán *et al.*, 1992). Es liegt daher nahe, auch MPB393 als einen Stamm dieser Art einzuordnen.

Im Gegensatz zu dem homoacetogenen Isolat WF4 ist das methanogene Isolat MPB393 bei der Methanolverwertung nicht auf einen externen Elektronenakzeptor angewiesen. Methanol wird von MPB393 zu CO₂ oxidiert und zu CH₄ reduziert (Gleichung 19), so daß es sich dabei um einen Fermentationsmechanismus (d.h. Disproportionierung eines organischen Substrates) und nicht um einen Atmungsmechanismus (d.h. Übertragung von Elektronen auf einen anorganischen Akzeptor oder Fumarat) handelt.

Gleichung 19



Daher besteht für MPB393 keine „Notwendigkeit“, Elektronen an SRB393 zu übertragen; im Gegensatz zu WF4/SRB378 kann MPB393/SRB393 nicht als syntrophe Assoziation bezeichnet werden.

In der Literatur wurden jedoch Beispiele für die Sulfatreduktion durch Mischkulturen methanogener und sulfatreduzierender Bakterien gefunden, wobei die Substrate den Sulfatreduzierern allein nicht zugänglich waren. So führte die Zugabe von Sulfat zu anaeroben Sedimenten zur Inhibierung der Methanogenese aus Acetat und zur Sulfatreduktion, selbst wenn keine acetatverwertenden Sulfatreduzierer vorhanden waren (Achnich *et al.*, 1995). Auch in definierten Mischkulturen aus *Methanosarcina barkeri* und *Desulfovibrio vulgaris* konnte eine Verringerung der Methanogenese aus Acetat oder Methanol, beides Substrate, die dem Sulfatreduzierer nicht zugänglich waren, im Vergleich zu der Reinkultur des Methanogenen beobachtet werden, statt dessen wurden bis zu 42% der durch Methanoloxidation verfügbaren Elektronen zur Sulfatreduktion genutzt (Phelps *et al.*, 1985).

Die Methanogenese aus Methanol (Gleichung 19; -66,8 kJ/ CH₃OH) ist von der Freisetzung eines negativeren Energiebetrages begleitet als die Sulfatreduktion mit Methanol (Gleichung 16; -90,9 kJ/ CH₃OH). Hierbei oxidiert MPB393 Methanol unter

Bildung eines ETI, welches von SRB393 zur Sulfatreduktion genutzt wird. Wie auch in der Kultur WF4/SRB378 stellt sich die Frage, ob die gemeinsame Methanolverwertung Vorteile für das methylotherme Isolat MPB393 hat.

Die Energiekonservierung bei methanogenen Bakterien erfolgt bei der Reduktion von CoM-S-S-HTP¹⁹ zu HS-CoM²⁰ und HS-HTP²¹ (Kjeltjens u. Vogels, 1993; Bäumer *et al.*, 1998) durch $F_{420}H_2$ ²² und ist somit an die Bildung von CoM-S-S-HTP und mithin an die Reduktion von Methanol zu Methan gekoppelt (vgl. Abbildung 2, Seite 18). Der Elektronentransfer von MPB393 an SRB393 bedeutet somit einen Verlust an konservierbarer Energie für MPB393. Die Assoziation von MPB393 und SRB393 ist also durch eine Konkurrenz um Elektronen gekennzeichnet, wobei MPB393 die im Methanol „enthaltenen“ Elektronen überhaupt erst für SRB393 zugänglich macht.

Zur Möglichkeit der Energiekonservierung bei der Oxidation von Methanol zu Kohlendioxid durch methanogene Bakterien konnten keine Angaben gefunden werden. Die Oxidation von Formylmethanofuran²³ zu Kohlendioxid ist durch eine freie Standardreaktionsenthalpie von -16 kJ/mol gekennzeichnet; der Betrag wäre hoch genug für die Konservierung von Energie durch Protonentranslokation (siehe Abschnitt 1.5, Seite 11). Die Frage nach dem involvierten Elektronencarrier, dem Reaktionsmechanismus sowie einer möglichen Energiekonservierung ist jedoch nicht eindeutig geklärt (Kjeltjens u. Vogels, 1993; Müller *et al.*, 1993; Deppenmeier *et al.*, 1996 und dort zitierte Literatur).

Die Energiekonservierung bei der Oxidation von Methanol durch MPB393 unter Abgabe eines ETI an SRB393 würde den bei der Sulfatreduktion mit Methanol höheren Betrag konservierbarer Energie für beide Partner nutzbar machen. Unter diesen Bedingungen wäre MBP393 nicht auf die Bildung von Methan (welche die Effizienz der Methanolverwertung senkt) zur Energiekonservierung angewiesen.

Bestimmungen der Biomasseverhältnisse der einzelnen Partner in wachsenden Kulturen könnten Hinweise auf den Energiegewinn geben; vor allem aufgrund der Aggregation traten jedoch, wie auch in der Kultur WF4/MPB378, Probleme bei verschiedenen Methoden zur differenzierten Biomassebestimmung auf.

¹⁹ CoM-S-S-HTP: Coenzym M / 7-Mercapto-Heptanoyl-L-Threonin Phosphat Heterodisulfid

²⁰ HS-CoM: Coenzym M; Methylgruppenakzeptor im methanogenen Stoffwechsel

²¹ HS-HTP: 7-Mercapto-Heptanoyl-L-Threonin Phosphat; physiologisches Reduktionsmittel für Methyl-Coenzym M

²² $F_{420}H_2$: reduziertes Coenzym F_{420}

²³ Intermediat bei der Oxidation von Methanol zu Kohlendioxid durch methanogene Bakterien, siehe Abbildung 2, Seite 18

WF4 und SRB378 ließen sich anhand ihrer unterschiedlichen Zellwandstrukturen spezifisch anfärben. Die Spezies lagen jedoch nicht in homogener Verteilung, sondern in enger Assoziation mit dem anorganischen Sedimenten vor, was (ebenso wie die Aggregation von MPB393) eine mikroskopische Analyse verhinderte. Die Zellzahlbestimmung mittels Flow-Cytometrie sowie der Einsatz fluoreszenzmarkierter 16S rDNA-Sonden (Manz *et al.*, 1998; Rocheleau *et al.*, 1999; Santegoeds *et al.*, 1999) kam aus gleichen Gründen nicht in Frage. Für MPB393/SRB393 wurde die gaschromatographische Fettsäureanalyse (Vainshtein *et al.*, 1992; Sunamara *et al.*, 1999) zur spezifischen Quantifizierung der Biomasse in Erwägung gezogen. Hier hätten jedoch die zur Hydrolyse der archaealen Etherlipide notwendigen harschen Aufschlußbedingungen (HF, 46%) die Stabilität der Phospholipide und somit die Analyse der eubakteriellen Zellmembranbestandteile beeinträchtigt.

Es wurden keine Hinweise auf eine mögliche Energiekonservierung bei der Oxidation von Methanol durch MPB393 gefunden. Es muß daher angenommen werden, daß Wachstum und Vermehrung von MPB393 in der Mischkultur immer von der Bildung von Methan abhängig sind, was die Effizienz der Sulfatreduktion mit Methanol verringert.

4.3 Wasserstoff als elektronenübertragendes Intermediat

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, werden verschiedene organische und anorganische Verbindungen als ETI in syntrophen Assoziationen beschrieben. Wasserstoffproduktion bei der Verwertung von Methanol konnte sowohl bei dem Isolat WF4 als auch bei dem (mechanisch disaggregierten) Isolat MPB393 nachgewiesen werden. Die aus den jeweiligen Kulturen isolierten Sulfatreduzierer SRB378 und SRB393 waren in der Lage, Wasserstoff zur Sulfatreduktion zu nutzen.

Formiat wurde weder von WF4 noch von MPB393 während der Methanolverwertung gebildet; zudem war SRB393 nicht in der Lage, Sulfat mit Formiat zu reduzieren. Formiat kann daher als ETI ausgeschlossen werden, obwohl es aufgrund der verglichen mit Wasserstoff höheren Diffusionsgeschwindigkeit als bevorzugter Überträger von Redoxäquivalenten in syntrophen Kulturen diskutiert wurde (Thiele u. Zeikus 1988; Boone *et al.*, 1989). Es kann z.B. bei der PQQ-abhängigen Oxidation von Methanol (Winters u. Ljungdahl, 1989) oder aus Formyl-THF (reverse Formyl-THF-Synthetase-Reaktion, Himes u. Rabinowitz, 1962) gebildet werden; diese Reaktion würde die Bildung eines ATP über Substratkettenphosphorylierung und somit Energiekonservierung für den methanoxidierenden Partner erlauben.

Cytochrome wurden ebenfalls als extrazelluläre Elektronencarrier beschrieben (Seeliger *et al.*, 1998; Cord-Ruwisch *et al.*, 1998). Obwohl das Vorkommen von Cytochromen sowohl für *Desulfovibrio*- (Odom u. Peck, 1984) als auch für *Methanosarcina*-Arten (Kühn u. Gottschalk, 1983) beschrieben ist, wurde deren Funktion als Elektronencarrier *zwischen* den Spezies MPB393 und SRB393 nicht in Betracht gezogen, da keine charakteristische Färbung des Kulturüberstandes zu beobachten war.

4.3.1 Wasserstoffproduktion bei der Verwertung organischer Substrate

Die Bildung von Acetat aus Methanol durch WF4 entspricht formal einer Oxidationsreaktion, so daß reduzierte Elektronencarrier gebildet werden. Diese können zur Bildung molekularen Wasserstoffs genutzt werden, welche jedoch bei bereits geringen Konzentrationen (1600 ppm bei WF4) zum Erliegen kam (vgl. Abbildung 17, Seite 54). Die Reduktion von Protonen und Bildung von Wasserstoff durch fermentative Oxidierer ist mittlerweile für eine Reihe syntropher Assoziationen beschrieben²⁴ (Abschnitt 1.4, Seite 10) und gilt als Schlüsselprozeß bei der anaeroben Mineralisierung komplexer organischer Substrate (z.B. Hungate, 1967; Ianotti *et al.*, 1973; Übersichten z.B. in: Wolin u. Miller, 1982; Mackie u. Bryant, 1991; Zinder, 1993).

Die Bildung von Wasserstoff bei der Verwertung von Methanol konnte auch bei MPB393 (vgl. Abbildung 28 bis Abbildung 30, Seite 61) beobachtet werden, obwohl hier keine Notwendigkeit besteht, überschüssige Redoxäquivalente in Form von Wasserstoff abzugeben. Auch ist bei einigen Versuchen mit WF4/SRB378 ein Wasserstofftransfer über das stöchiometrisch notwendige Verhältnis (0,25 mol red. Sulfat je mol Methanol, Gleichung 18) hinaus beobachtet worden. Hier müssen weitere Wasserstoffbildungsmechanismen in Betracht gezogen werden.

Nicht nur Mikroorganismen, denen kein geeigneter Elektronenakzeptor für die Oxidation des Substrates zur Verfügung steht und die daher auf die Anwesenheit eines wasserstoffverwertenden Partners angewiesen sind (wie z.B. WF4), geben Wasserstoff ab. Auch wenn Substratoxidation und Akzeptorreduktion in einem Organismus stattfinden (wie z.B. bei MPB393), können während des Wachstums auf organischen Substraten Spuren von Wasserstoff freigesetzt werden. Die Freisetzung von Wasserstoff („hydrogen burst“) tritt beispielsweise beim Wachstum von

²⁴ Im Zusammenhang mit der Endosymbiontentheorie werden syntrophe Assoziationen aus wasserstoffproduzierenden Eubakterien und hydrogenotrophen Archaea als Vorläufer eukaryotischer Zellen diskutiert (Martin u. Müller, 1998; López-García u. Moreira, 1999).

Desulfovibrio vulgaris Miyazaki auf Lactat und Sulfat (Tsuji u. Yagi, 1980), von *Acetobacterium woodii* auf Fructose (Braun u. Gottschalk, 1981), von *Methanosarcina*-Arten auf Kohlenmonoxid (O'Brien *et al.*, 1984) oder Acetat (Lovley u. Ferry, 1984; Boone *et al.*, 1987; Krzycki *et al.*, 1987) und von *Sporomusa acidovorans* auf Methanol (Cord-Ruwisch u. Ollivier, 1986) auf.

Für methylotrophe methanogene Bakterien wird eine Coenzym F₄₂₀-abhängige Hydrogenase als wasserstoffproduzierendes Enzym beschrieben. Dieses multifunktionale Enzym katalysiert zum einen den Elektronentransfer zwischen F₄₂₀ und Ferredoxin; aus der Substratoxidation stammende „überschüssige“ Redoxäquivalente (reduziertes F₄₂₀) können jedoch auch zur Protonenreduktion verwendet werden (Kjeltjens u. Vogels, 1993), was zur Wasserstoffproduktion bei der Verwertung von Acetat oder Methanol (also Substraten, die zum Teil oxidiert werden) führt. Da bereits Wasserstoffbildung bei den Isolaten WF4 und MBP393 gemessen werden konnte, wurde auf Nachweis und Aktivitätsbestimmung von Hydrogenasen verzichtet. Die gemessene Aktivität wäre nur von bedingter Aussagekraft gewesen, da bei der Wasserstoffbildung aus Methanol mehrere (methanoloxidierende) Enzyme beteiligt sind.

4.3.2 Wasserstoffverwertung durch die sulfatreduzierenden Isolate

Sowohl SRB378 als auch SRB393 sind in der Lage, Wasserstoff als Elektronendonator zur Sulfatreduktion zu nutzen. Die dabei freiwerdende Energie kann für Wachstum und Vermehrung genutzt werden, wenn Kohlendioxid und Acetat als Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen. Dabei zeigen sich, wie auch bei der Verwertung anderer Substrate, Unterschiede zwischen den Isolaten hinsichtlich der gebildeten Biomassebildung je reduziertem Sulfat (vgl. Abschnitt 4.1). Demgegenüber steht eine bei SRB393 höhere „Effizienz“ bei der Wasserstoffverwertung in Kokultur mit wasserstoffproduzierenden Partnern (vgl. Tabelle 18, Seite 58). Bei der Kultivierung mit gleichem methanoloxidierenden Partner ist das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol bei SRB393 (und *Desulfovibrio vulgaris*) höher als bei SRB378. Da beide Isolate und der Referenzstamm den gleichen Elektronenakzeptor verwenden, kann die Differenz im Elektronenfluß nicht auf einen Unterschied der freien Standardreaktionsenthalpie der Elektronenakzeptorreduktion zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 1.6.2, Seite 14). Eine mögliche Erklärung wären Unterschiede zwischen SRB378 und SRB393 hinsichtlich der Affinität für Wasserstoff und der Aktivität der in die Sulfatreduktion involvierten Enzyme, was wiederum Bedeutung bei der Auswahl eines sulfatreduzierenden Bakteriums für ein technisches Verfahren hätte. Hier ist es

sinnvoll, einen möglicherweise ineffizienteren (bezüglich der Energieausbeute), dafür aber für Wasserstoff affineren Sulfatreduzierer einzusetzen, um einen möglichst hohen Anteil an Wasserstoff (bzw. Elektronen) für die Sulfatreduktion zu nutzen.

4.3.3 Weitere Versuche zur Sulfatreduktion mit Wasserstoff

Im Verlauf der Untersuchungen zur Wasserstoffverwertung durch die sulfatreduzierenden Isolate stellte sich die Frage, ob Wasserstoff direkt (und nicht über den „Umweg“ Methanol und methanoxidierendes Bakterium) als Substrat für ein technisches Verfahren zur Sulfatreduktion eingesetzt werden kann. Erste Versuche zeigten, daß SRB378 in der Lage ist, als Schwefelsäure (einfachstes Modell eines sauren sulfathaltigen Wassers) zudosiertes Sulfat mit Wasserstoff zu reduzieren (vgl. Abbildung 19, Seite 55). Der dabei gebildete Schwefelwasserstoff wird durch den Gasstrom ausgetragen; der damit verbundene pH-Anstieg wird durch die zudosierte Schwefelsäure kompensiert, was eine einfache Regelung des Zulaufes in Abhängigkeit von der Sulfatreduktionsrate erlaubt. Die Sulfatreduktionsrate sank im Laufe der Zeit, möglicherweise aufgrund des Absterbens der Biomasse und Enzyminaktivierung. Die Zugabe einer Kohlenstoffquelle würde die Regeneration des Biokatalysators ermöglichen; im Falle von SRB378 müßten Acetat und Kohlendioxid zudosiert werden. Durch die zusätzliche Kultivierung autotropher homoacetogener Bakterien kann auf die Zugabe von Acetat verzichtet werden (van Houten *et al.*, 1995).

Für die Behandlung eines sauren Bergbauwassers wurde bereits ein technisches Verfahren mit Wasserstoff und Kohlendioxid als Substrat zur Sulfatreduktion beschrieben (Foucher *et al.*, 2001). Die Nachteile eines solchen Verfahrens sind die schlechte Löslichkeit und Dosierbarkeit von Wasserstoff sowie Probleme bei Transport, Lagerung und Umgang (Explosionsgefahr).

Ein weiterer Versuch beschäftigte sich mit der Sulfatreduktion durch SRB378 mit Lactat und Wasserstoff als Substrat (vgl. Abbildung 20, Seite 56). Beide Substrate wurden durch die Kultur gleichzeitig zur Sulfatreduktion genutzt. Im Ansatz ohne Wasserstoff wurde alles eingesetzte Lactat verwertet (0,44 mol red. Sulfat je mol Lactat; theoretischer Wert: 0,5 mol/mol). In Anwesenheit von Wasserstoff und Lactat wurde Sulfat (18 mM) vollständig reduziert; dabei wurde jedoch nicht alles eingesetzte Lactat oxidiert, was auf eine teilweise Beeinflussung der Lactatoxidation durch Wasserstoff zurückzuführen sein könnte.

In der Literatur ist Wasserstoff als Intermediat der Lactatoxidation beschrieben (Tsuji u. Yagi, 1980). Dabei wird Lactat zunächst cytoplasmatisch oxidiert und der dabei gebildete Wasserstoff im Periplasma reoxidiert. Die dabei entstehenden Elektronen

werden im Cytoplasma zur Sulfatreduktion genutzt, während die Protonen im Periplasma verbleiben. Diese Ladungstrennung generiert einen Protonengradienten („*hydrogen cycling model*“, Odom u. Peck, 1984). Hydrogenasen sind ubiquitär in sulfatreduzierenden Bakterien vertreten (Brugna *et al.*, 1999), allein in der Gattung *Desulfovibrio* sind 3 verschiedene Typen beschrieben (Fauque *et al.*, 1988; Le Gall u. Fauque, 1988). *Hydrogen cycling* als genereller energiekonservierender Mechanismus in Sulfatreduzierern wird jedoch kontrovers diskutiert (Cypionka u. Dilling, 1986). Die Inhibierung der periplasmatischen Hydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* beeinträchtigt zwar die Wasserstoff-, nicht jedoch die Lactatoxidation mit Sulfat (Fitz u. Cypionka, 1991). Unterschiedliche Wege der Energiekonservierung bei der Oxidation von Lactat oder Wasserstoff wurden auch für andere *Desulfovibrio*-Arten beschrieben (Pereira *et al.*, 1998). Aufgrund von Versuchen zur Energieausbeute bei der Nutzung von Lactat oder Wasserstoff durch *Desulfovibrio vulgaris* wurden vektorieller Elektronentransport und *hydrogen cycling* als simultan ablaufende Mechanismen der Energiekonservierung postuliert (Noguera *et al.*, 1998).

Die Beeinträchtigung der Lactatoxidation durch Wasserstoff schließt unterschiedlicher Wege der Substratoxidation nicht aus, deutet aber darauf hin, daß aus der Wasserstoffoxidation stammende Elektronen bevorzugt zur Sulfatreduktion verwendet werden. Dies hat Einfluß auf das Wachstum der Kultur, da bei der Lactatoxidation im Gegensatz zur Wasserstoffoxidation Energiekonservierung über Substratkettenphosphorylierung (Acetat-Kinase-Reaktion) möglich ist.

4.4 Effizienz der Methanolverwertung –Einflüsse auf den Elektronentransfer zur Sulfatreduktion

Wie im Abschnitt 4.2 gezeigt, werden sowohl in der Kultur WF4/SRB378 als auch in der Kultur MPB393/SRB393 nicht alle aus dem Methanol verfügbaren Elektronen zur Sulfatreduktion genutzt. Aufgrund der in Abschnitt 3.6.2 (Seite 54) dargestellten Ergebnisse wurde die Sulfatreduktion mit Wasserstoff als limitierender Schritt ausgeschlossen. Die effiziente Verwertung von Methanol als Substrat hängt somit vor allem von einem möglichst hohen Transfer von Redoxäquivalenten (also Wasserstoff) vom methanoxidierenden zum sulfatreduzierenden Bakterium ab. Im Folgenden werden Ergebnisse aus Versuchen diskutiert, die sich mit Möglichkeiten zur Manipulation des Elektronenflusses beschäftigten. Als Kriterium wird dabei das Verhältnis von reduziertem Sulfat je verbrauchtem Methanol angesehen.

4.4.1 Aggregation und räumliche Nähe

Bei der gemeinsamen Kultivierung von MPB393 und dem sulfatreduzierenden Isolat SRB393 war Sulfatreduktion nur dann zu beobachten, wenn MPB393 in kleinen Aggregaten (4-10 Zellen) bzw. Einzelzellen vorlag. In *batch*-Kulturen (MPB393/SRB393) mit Methanol als Substrat waren stets nur Zellaggregate von MPB393 zu finden und es konnte keine Sulfatreduktion gemessen werden. Bei *batch*-Kultivierung des methylotrophen methanogenen Referenzstammes *Methanosarcina barkeri* mit verschiedenen sulfatreduzierenden Spezies fand hingegen Sulfatreduktion statt (vgl. Tabelle 18, Seite 58). In Zusammenhang mit den in Abschnitt 3.7.2 (Seite 59) dargestellten Ergebnissen wurde angenommen, daß vor allem der Aggregationszustand von MPB393 Einfluß auf die Sulfatreduktion hat.

Disaggregation von MPB393 und somit Sulfatreduktion mit Methanol durch MPB393/SRB393 fand nur unter folgenden Bedingungen statt:

- wenn zum Animpfen eine auf Lactat gewachsene Mischkultur aus MPB393 und SRB393 eingesetzt wurde,
- wenn die weitere Kultivierung von MPB393/SRB393 auf SRM unter kontinuierlichen Bedingungen erfolgte.

In der Literatur wurden für *Methanosarcina mazei* S-6 und *Methanosarcina mazei* LYC detaillierte Zyklen von Wachstum in Aggregaten bzw. Einzelzellen beschrieben (Robinson, 1986). Auf die Bedingungen, unter denen eine Änderung des Aggregationszustandes stattfindet, wurde allerdings nur in geringem Umfang eingegangen. Für *Methanosarcina mazei* S-6 wurde die Freisetzung von Einzelzellen aus Aggregaten bei Calcium- bzw. Magnesiumionenkonzentrationen höher als 0,54 bzw. 0,4 mM beschrieben. Auch die Erhöhung der Substratkonzentration (z.B. von 50 mM auf 150 mM Methanol) begünstigte die Disaggregation in Einzelzellen (Xun *et al.*, 1988). Für *Methanosarcina mazei* LYC wurde die spontane Disaggregation bei pH-Werten oberhalb von 7,0 aufgrund eines sauerstofflabilen „disaggregierenden“ Enzyms beschrieben (Liu *et al.*, 1985). Bei MPB393 konnte ebenfalls eine spontane Disaggregation der Zellen beobachtet werden; diese schien allerdings nicht vom pH-Wert des Mediums abzuhängen, sondern trat vielmehr in gealterten Kulturen ca. 2 Wochen nach der letzten Substratzugabe auf und war somit, anders als für *Methanosarcina mazei* LYC beschrieben (Liu *et al.*, 1985), nicht von einem aktiven Stoffwechsel abhängig. Zudem war, anders als bei *Methanosarcina mazei* LYC, eine weitere Kultivierung disaggregierter Zellen von MPB393 nicht möglich.

Da alle Versuche zur Kultivierung von MPB/SRB393 im gleichen Medium (SRM) durchgeführt wurden, ist ein Einfluß der Erdalkalitionenkonzentration auf den Aggregationszustand von MPB393 auszuschließen.

Es ist vielmehr ein Einfluß des zur Vorkultivierung eingesetzten Substrates und der metabolischen Aktivität des Sulfatreduzierers SRB393 auf den Aggregationszustand von MPB393 Betracht zu ziehen (vgl. Abschnitt 3.5, Seite 50). Bei der Kultivierung von MPB393 und SRB393 auf Lactat wurde dies zunächst von SRB393 zu Acetat oxidiert, welches wiederum als Substrat für MPB393 diente. Die beginnende Disaggregation von MPB393 in der Mischkultur könnte also auf die Verwertung von Acetat anstelle von Methanol zurückzuführen sein; allerdings wurde bei der Kultivierung der Reinkultur MPB393 auf SRM mit Acetat kaum eine Veränderung der Zellstruktur beobachtet.

Eine weitere Erklärung für die Disaggregation von MPB393 in der Mischkultur könnte die metabolische Aktivität von SRB393 sein. Sowohl bei der Verwertung von Lactat durch SRB393 als auch in der kontinuierlich auf Methanol kultivierten Mischkultur wird Sulfid gebildet, wodurch SRB393 Energie für Wachstum und Vermehrung zu Verfügung steht. Wie in Abschnitt 1.6.3 (Seite 16) dargestellt, müssen sich die beim Wasserstofftransfer beteiligten Mikroorganismen in räumlicher Nähe befinden. Solange MPB393 in dichten Aggregaten vorliegt, ist SRB393 nicht in der Lage, den von MPB393 gebildeten Wasserstoff zu verwerten. Erst nach beginnender Disaggregation von MPB393 (durch Sulfid initiiert ?) steht der bei der Methanolverwertung gebildete Wasserstoff auch für SRB393 zur Verfügung. Dieser ist dadurch in der Lage, Sulfat zu reduzieren, Energie zu konservieren und in unmittelbarer Nähe von MPB393 zu wachsen, was zu weiterer Disaggregation von MPB393 führt (positive Rückkopplung).

Leider blieben Versuche zur spezifischen Färbung von MBP393 und SRB393 erfolglos, so daß sich die enge räumliche Assoziation der beiden Spezies nicht direkt nachweisen ließ. Das Vorkommen von FeS-Präzipitaten an und in MPB393-Aggregaten (vgl. Abbildung 16, Seite 53) läßt sich jedoch nur durch die Aktivität von SRB393 in unmittelbarer Nähe des Wasserstoffproduzenten erklären.

Indirekt könnte die Veränderung des Mediums aufgrund der Aktivität des Sulfatreduzierers SRB393 einen Einfluß auf den Aggregationszustand haben. Wenn Sulfat zu Sulfid reduziert wird, findet in SRM eine Umfällung von Eisenphosphat zu Eisensulfid statt. Versuche zum Einfluß diverser anorganischer Sedimente (SiO_2 , AlPO_4 , FeS) auf Wasserstofftransfer und Sulfatreduktion blieben jedoch ohne eindeutiges Ergebnis und werden daher hier nicht diskutiert.

Für den Einsatz der Kultur MPB393/SRB939 in einem Prozeß zur Sulfatreduktion ist die Disaggregation von MPB393 unbedingte Voraussetzung. Welche Faktoren die

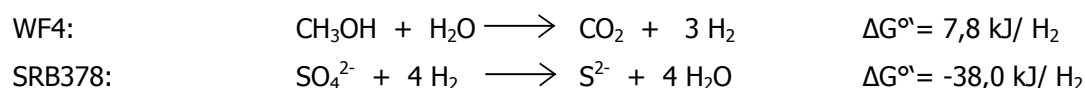
Disaggregation initiieren, konnte nicht ermittelt werden; es liegt jedoch folgender Ablauf nahe: Bei gemeinsamer Vorkultivierung von MPB393/SRB393 auf Lactat beginnt die Disaggregation von MPB393, wodurch der während der Methanolverwertung gebildete Wasserstoff für SRB393 zugänglich wird. SRB393 steht nun ein Substrat für weitere Sulfatreduktion zur Verfügung, welche nahe oder auch im Inneren der noch bestehenden MPB393-Aggregate stattfindet und somit eine weitere Dissaggregation befördert.

4.4.2 Biomasseverhältnis der Partner und Energiegewinn

Bei der Inkubation von WF4 und SRB378 in unterschiedlichen Verhältnissen (gemessen anhand des Proteingehaltes) auf Methanol und Sulfat zeigten sich Unterschiede sowohl in der stationären Wasserstoffkonzentrationen (vgl. Abbildung 32, Seite 64) als auch im Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol (vgl. Abbildung 33, Seite 65). In allen Ansätzen wurde ein wesentlich höheres Verhältnis von red. Sulfat/Methanol (0,38-0,68 mol/mol) als bei Versuchen zu Wachstum und Vermehrung (0,21-0,27 mol/mol) gemessen. Im Versuch zum Einfluß des Biomasseverhältnisses wurde mit Zellsuspensionen gearbeitet, die hohe Zelldichte (Proteinkonzentration im Ansatz: 400 mg/L) scheint also – unabhängig vom Verhältnis WF4:SRB378 – den Wasserstofftransfer zwischen beiden Spezies zu begünstigen. Bei einem Verhältnis von WF4 zu SRB378 wie 1:10 wurden ca. 0,68 mol Sulfat je mol Methanol reduziert, was einem Elektronentransfer von 92 % entspricht. Bei diesem (experimentell eingestellten) Verhältnis wird Methanol effizient zur Sulfatreduktion genutzt. Es ist jedoch zweifelhaft, ob eine kontinuierliche Vermehrung der Mischkultur bei diesem Zellverhältnis möglich ist.

Das Wachstum einer Spezies in der Mischkultur hängt u.a. vom Energiebetrag ab, der bei Bildung oder Verwertung des ETI (Wasserstoff) bereitgestellt werden kann. In Abbildung 35 sind die freien Reaktionsenthalpien für die Wasserstoffbildungsreaktion (WF4) und den Verbrauch von Wasserstoff (SRB378) in Abhängigkeit von der Wasserstoffkonzentration aufgetragen. Die gemessenen stationären Wasserstoffkonzentrationen (senkrechte Linien) lagen dabei in dem Bereich, der die Konservierung eines etwa gleich hohen Energiebetrages²⁵ für beide

²⁵ Die Berechnung wurde aufgrund folgender Annahmen durchgeführt:



Partner erlaubt. Dies läßt die Vermutung zu, daß sich beide Partner in einem konstanten Verhältnis²⁶ vermehren lassen.

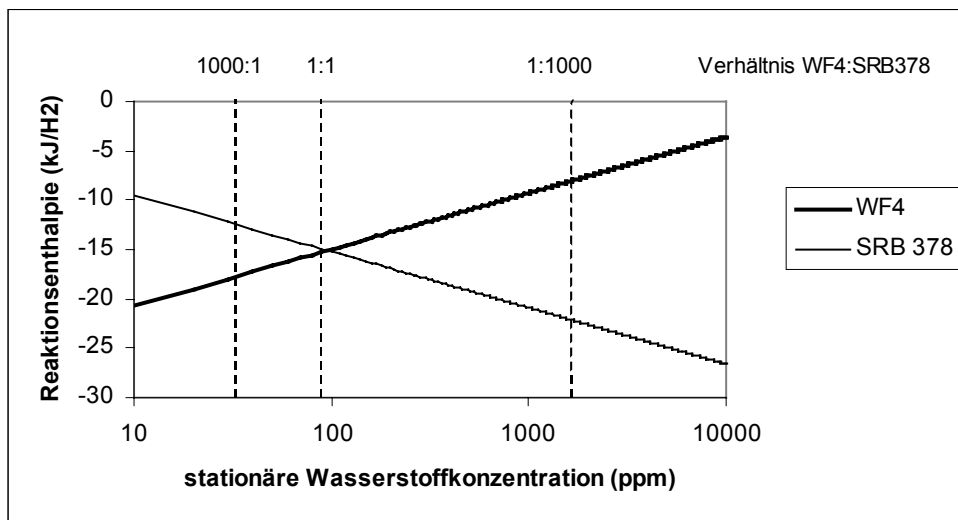


Abbildung 35: Bei Wasserstoffbildung (WF4) und Wasserstoffverbrauch (SRB378) maximal konservierbare Energiebeträge in Abhängigkeit von der stationären Wasserstoffkonzentration (logarithmische Skalierung). Die senkrechten Linien kennzeichnen die bei unterschiedlichen WF4:SRB378-Verhältnissen gemessenen stationären Wasserstoffkonzentrationen.

Allerdings ist bei WF4:SRB378 Verhältnissen ungleich 1:1 der konservierbare Energiebetrag zwar gleich groß für die Populationen WF4 und SRB378, nicht jedoch für eine einzelne Spezies der Population. So ist beispielsweise bei einem WF4:SRB378 Verhältnis wie 100:1 der für WF4 und SRB378 konservierbare Energiebetrag annähernd gleich groß. Den einzelnen Individuen von WF4 steht allerdings nur 1/100 des Energiebetrages zu Verfügung, der von den Individuen von SRB378 maximal konserviert werden könnte, was wiederum Einfluß auf das Wachstum der Population und damit das Biomasseverhältnis hat.

Es wären weitere Versuche zur kontinuierlichen Kultivierung bei unterschiedlichen Biomasseverhältnissen notwendig gewesen. Auf eine Bearbeitung mußte jedoch verzichtet werden, da auch hier Probleme bei der differenzierten Biomassebestimmung auftraten (siehe Seite 79).

Die Effizienz der Methanolverwertung kann durch die Einstellung des Biomasseverhältnisses erheblich gesteigert werden, so daß das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol fast dem einer methylophen sulfatreduzierenden Reinkultur entspricht. Da jedoch das Verhältnis der Spezies in einer Mischkultur in

²⁶ Voraussetzung dafür ist ein für beide Organismen gleiches Verhältnis von gebildeter Biomasse je ATP.

einem kontinuierlichen Prozeß nur schwer beeinflussbar ist, bietet diese Erkenntnis keine auf der Hand liegende Möglichkeit zur Optimierung eines Prozesses zur mikrobiellen Sulfatreduktion.

4.4.3 Abiotische Einflüsse – Möglichkeiten der Steuerung für einen Prozeß

Die bisher beschriebenen Einflüsse auf den Wasserstofftransfer bieten keine Gestaltungsmöglichkeit für ein Verfahren zur mikrobiellen Dekontamination sulfathaltiger Wässer. Im Gegensatz dazu können Substratkonzentration und pH-Wert in einem technischen Prozeß gesteuert werden. Es wurde daher der Einfluß dieser Parameter auf das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol untersucht. Bei kontinuierlicher Kultivierung der Kultur MPB393/SRB393 war das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu Methanol unabhängig von der Methanolkonzentration im Zulauf (vgl. Tabelle 21, Seite 68). Im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Beispielen (Isa *et al.*, 1986; Zhou u. Fang, 1998) hatte die Substratkonzentration also keinen Einfluß auf den Wasserstofftransfer, vielmehr wurde eine der Substratkonzentration proportionale Menge Sulfat reduziert. Dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, daß die wasserstoffproduzierende Hydrogenase von MPB393 unterhalb ihrer maximalen Kapazität arbeitet und stets „überschüssig“ gebildete Redoxäquivalente reduziert (vgl. Abschnitt 4.3.1), so daß ein der Methanolkonzentration proportionaler Anteil an Wasserstoff gebildet wird.

Es wurde zunächst angenommen, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen die Wasserstoffkonzentration so niedrig ist, daß nur Sulfatreduktion, nicht jedoch Methanogenese thermodynamisch begünstigt ist (Schwellenwertmodell, vgl. Abschnitt 1.6.2, Seite 14). Wahrscheinlich waren die gewählten Substratkonzentrationen zu hoch, so daß die Konzentration des gebildeten Wasserstoffes oberhalb der für die Methanogenese notwendigen Schwellenwertkonzentration lag. Niedrigere Substratkonzentrationen wären jedoch aufgrund der Sulfatkonzentration im Zulauf (18 mM) nicht praktikabel gewesen, da die Abnahme der Sulfatkonzentration zu gering gewesen wäre, um als Differenz großer Werte ($\text{Sulfatkonzentration}_{\text{Zulauf}} - \text{Sulfatkonzentration}_{\text{Ablauf}}$) noch sicher gemessen werden zu können.

In einem technischen Prozeß muß Methanol ohnehin in einer Konzentration eingesetzt werden, die Sulfatreduktion in einer angemessenen Verweilzeit im Reaktor erlaubt. Wenn die Methanolkonzentration also einen Einfluß auf die effiziente Nutzung des Substrates zur Sulfatreduktion hat, dann nur bei niedrigen Werten (< 300 mg/L), die für einen technischen Prozeß nicht relevant sind.

Auch der pH-Wert des Zulaufes beeinflusste das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol nur in geringem Maße (vgl. Tabelle 20, Seite 66). Die Kultur MPB393/SRB393 war in der Lage, das zulaufende Medium (pH 5,5-7,5) zu neutralisieren, so daß – unabhängig vom pH_{Zulauf} – ein pH-Wert von 6,8-7,4 der Reaktorflüssigkeit gemessen wurde. Bei einem pH-Wert des Zulaufs von 8,5 fand keine Neutralisation statt, dafür wurde mehr Sulfat je Methanol reduziert als bei neutralem pH-Wert. Die Fähigkeit zur Neutralisation ist wichtig für ein technisches Verfahren zur Dekontamination schwefelsaurer Wässer, verringert jedoch den Einfluß des pH_{Zulauf} auf die Effizienz der Methanolverwertung.

Bei der *batch*-Kultivierung von WF4/SRB378 bei verschiedenen pH-Werten zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses von reduziertem Sulfat je Methanol (vgl. Abbildung 34, Seite 67). Da diese Versuche in schwach gepuffertem SRM durchgeführt wurden, blieb der pH-Wert aufgrund des gebildeten Acetates nicht konstant, sondern sank um 0,3-0,8 Einheiten, wodurch dieser Versuch nur bedingt aussagekräftig ist. Der Versuch wurde in HEPES-gepuffertem Mineralsalzmedium wiederholt, wo bei einem pH-Wert von 8,5 das höchste Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol gemessen wurde; ähnlich wie bei dem Versuch in SRM war dieses Verhältnis bei neutralem pH-Wert am kleinsten.

Bezüglich des Einflusses des pH-Wertes auf Methanoxidation und Sulfatreduktion in der Mischkultur sind verschiedene Faktoren zu beachten:

- Der pH-Wert hat Einfluß auf den Dissoziationsgrad der Stoffwechselprodukte Kohlendioxid/Kohlensäure, Schwefelwasserstoff und Essigsäure (bei WF4/SRB378). Die undissoziierten Spezies H₂S und CH₃COOH können bei sauren pH-Werten toxisch bzw. entkoppelnd wirken.
- Da für *Desulfovibrio*-Arten periplasmatische Hydrogenasen beschrieben wurden (Bell *et al.*, 1974; van der Westen, 1977), kann zumindest für die wasserstoffverwertende Reaktion ein Einfluß auf das Hydrogenase-Gleichgewicht nicht ausgeschlossen werden.
- Für die Energiekonservierung durch Protonentranslokation ist bei hohen pH-Werten ein geringerer Energiebetrag nötig, dafür steigt der Energiebetrag für die ATP-Synthese durch protonentranslozierende ATPasen (Thauer *et al.*, 1977).
- Der für das Wachstum methanogener Bakterien optimale pH-Wert liegt im Neutralbereich (Jones *et al.*, 1987), wobei in sauren Wässern Methanogenese noch bei pH-Werten von 3 beobachtet wurde (Williams u. Crawford, 1984).
- Ausbeute und Wachstumsrate bei der Kultivierung von *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) auf Wasserstoff und Sulfat waren bei einem pH-Wert von 6,8 am höchsten (Badziong u. Thauer, 1978).

- In einem Reaktor zur Behandlung sauren Bergbauwassers konnte Sulfatreduktion bei einem pH-Wert von 3 beobachtet werden (Elliot *et al.*, 1998).

Die Stoffwechselaktivität der Mischkultur hat ihrerseits Einfluß auf den pH-Wert:

- Gebildetes Carbonat fungiert als Puffer im neutralen ($pK_{S1} = 6,37$) bis basischen ($pK_{S2} = 10,2$) Bereich.
- Durch die Reduktion von Sulfat verschwindet eine starke Säure ($pK_{S2} = 1,92$) aus dem System; der gebildete Schwefelwasserstoff ist bei niedrigen pH-Werten flüchtig, was zu einer Anhebung des pH-Wertes im System führt.
- Das durch die Kultur WF4/SRB378 gebildete Acetat senkt den pH-Wert im System.

Aufgrund der Stoffwechselaktivität ist also die Neutralisation sowohl saurer als auch basischer Wässer möglich, dadurch verringern sich pH-abhängige Effekte auf Wasserstoffbildung, -transfer und -verwertung. Allerdings war bei neutralem pH-Wert das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol am geringsten (Versuch WF4/SRB378). Aufgrund dessen muß in einem technischen Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion mit einer geringen Effizienz der Methanolverwertung gerechnet werden.

4.5 Methanol als Substrat für ein technisches Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion

Methanol bietet sich aufgrund seines Preises, der einfachen Transport- und Lagermöglichkeiten und guten Mischbarkeit mit Wasser (Dosierung) als Substrat in mikrobiellen Verfahren an. Für ein Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion wurde zunächst der Einsatz methylotropher Sulfatreduzierer in Betracht gezogen.

Da es jedoch nicht gelang, Mikroorganismen mit diesen Fähigkeiten zu isolieren, wurden Versuche mit Mischkulturen durchgeführt, in denen ein methylotropher Partner die im Methanol „enthaltenen“ Elektronen dem Sulfatreduzierer in Form von Wasserstoff zur Verfügung stellt. Dabei treten andere Reduktionsreaktionen (Methanogenese, Acetogenese) in Konkurrenz zur Sulfatreduktion, so daß nicht alle bei der Methanoxidation frei werdenden Elektronen zur Sulfatreduktion verwendet werden.

Bei der vollständigen Oxidation von Methanol und Nutzung aller dabei frei werdenden Elektronen zur Sulfatreduktion wäre die Reduktion von 0,75 mol Sulfat je mol Methanol zu erwarten. Dieser maximal mögliche Wert wird jedoch durch die Verwertung von Methanol als Kohlenstoffquelle und weitere Faktoren (s. Abschnitt 4.1.1) verringert. Bei der Methanolverwertung durch WF4/SRB378 wurden 0,21-0,26 mol Sulfat je mol Methanol reduziert; in der Kultur MPB393/SRB393 betrug dieser Wert 0,09-0,13 mol/mol.

Zwar läßt sich der Elektronentransfer beispielsweise durch die Wahl des Biomasseverhältnisses zwischen methanolverwertendem und sulfatreduzierendem Bakterien begünstigen; der Einfluß der bei einem Prozeß steuerbaren Parameter (Substratkonzentration, pH-Wert) ist jedoch gering.

Methanol wird also nicht mehr effizient, sondern lediglich zu 12-33 % zur Sulfatreduktion genutzt. Zudem werden unerwünschte Nebenprodukte (Acetat, Methan) gebildet.

Es mußte abgeschätzt werden, ob unter diesen Bedingungen die oben genannten Vorteile beim Einsatz von Methanol noch gegeben sind. Dazu wurde Methanol mit verschiedenen Substraten (Acetat, Ethanol, Glucose, Lactat) hinsichtlich des „Elektronengehaltes“, d.h. der zur Reduktion eines Äquivalentes Sulfat benötigten Menge Substrates, verglichen (Tabelle 23). Dabei müssen die Effizienzen der Stoffwandlungen berücksichtigt werden (Spalte 4), welche der Literatur entnommen wurden (Barnes *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1998).

Tabelle 23: Vergleich verschiedener Substrate hinsichtlich der zur Sulfatreduktion benötigten Menge. Die theoretischen Werte (Spalte 3) ergeben sich aus der Reaktionsgleichung. Die Werte in Spalte 4 (Effizienz der Nutzung der Substrate zur Sulfatreduktion) wurden der Literatur entnommen.

Substrat	Benötigtes Substrat je Sulfat (mol/mol)	Benötigtes Substrat je Sulfat (g/g) _{theoretisch}	Effizienz	Benötigtes Substrat je Sulfat (g/g)	Referenz
Methanol	1,3	0,44	12-33%	1,3-3,7	diese Arbeit
Ethanol	0,67	0,32	63%	0,5	Barnes <i>et al.</i> , 1992
Lactat	0,67	0,63	21%	3,0	Barnes <i>et al.</i> , 1992
			66%	1,0	Song <i>et al.</i> , 1998
Acetat	1	0,63	51%	1,2	Song <i>et al.</i> , 1998
Glucose	0,33	0,63	46%	1,4	Song <i>et al.</i> , 1998

Lactat kann vollständig oder unvollständig (unter Acetatbildung) oxidiert werden, was die deutlich verschiedenen Effizienzwerte erklärt. Sowohl in von Christensen *et al.* (1996) als auch von el Bayoumy *et al.* (1998) beschriebenen Versuchen zur Sulfatreduktion mit Lactat als Substrat wurde die unerwünschte Akkumulation von Acetat bei höheren Durchflußraten beschrieben, da Sulfatreduzierer, die zur Acetatoxidation befähigt sind, aus dem Reaktor ausgewaschen wurden. Unvollständige Oxidation kann auch beim Einsatz von Glucose als Substrat nicht ausgeschlossen werden.

Verglichen mit anderen Substraten, wird Methanol ineffizient zur Sulfatreduktion genutzt. Aufgrund der niedrigeren Oxidationszahl des Kohlenstoffs ist die theoretisch zur Reduktion eines Äquivalentes Sulfat benötigte Menge Methanol jedoch geringer als die anderer Substrate (außer Ethanol). Die in einem Verfahren einzusetzende Menge Methanol liegt dadurch in einem Bereich, der auch für Lactat, Acetat und Glucose zu erwarten wäre, vor allem wenn Glucose oder Lactat nur unvollständig oxidiert werden. Unter Berücksichtigung sowohl der theoretisch benötigten Menge als auch der Effizienz kann lediglich Ethanol ein deutlicher Vorzug gegenüber Methanol

und den weiteren Substraten gegeben werden. Der Preis von Methanol (770,-... 1250,- DM/t) liegt deutlich unter dem von Essigsäure (1300...1960 DM/t), Ethanol (2150 DM/t), Milchsäure (4900 DM/t; Händleranfragen²⁷ Juni 2001) und Glucose, wodurch der Einsatz von Methanol im Vergleich zu anderen Substraten selbst bei ineffizienter Verwertung noch als kostengünstig erachtet werden kann.

Für die Wahl eines Substrates zur mikrobiellen Sulfatreduktion müssen sowohl die theoretisch benötigte Menge als auch die Effizienz der Nutzung zur Sulfatreduktion berücksichtigt werden. Unter weiterer Beachtung der anfangs genannten Vorteile kann der Einsatz von Methanol trotz der ineffizienten Nutzung zumindest dem von Acetat, Lactat und Glucose vorgezogen werden.

²⁷ Bei telefonischer Anfrage wiesen die Anbieter stets auf große saisonale und regionale Preisschwankungen hin, so daß die Angaben lediglich als Richtwert zu verstehen sind.

5. Zusammenfassung

Unter der Voraussetzung, daß Methanol als Elektronendonator in einem Verfahren zur mikrobiellen Sulfatreduktion dienen soll, wurden 2 methylo trope sulfatreduzierende Kulturen, B378 und B393 untersucht.

- Aus den Anreicherungskulturen wurden die sulfatreduzierenden Bakterien SRB378 und SRB393 isoliert, die nicht in der Lage waren, Methanol als Elektronendonator oder Kohlenstoffquelle zu nutzen. Dieses Ergebnis deckt sich mit Literaturangaben, in denen die Fähigkeit zur Methanolverwertung nur für wenige sulfatreduzierende Spezies beschrieben ist.

- Durch Kokultur der sulfatreduzierenden Isolate mit ebenfalls aus den Anreicherungskulturen isolierten methylo trophen Bakterien wurde Sulfat mit Methanol als Elektronendonator reduziert. Bei den methylo trophen Bakterien handelt es sich um das aus der Kultur B378 stammende homoacetogene Isolat WF4 und das aus B393 isolierte methanogene Bakterium MPB393. Anhand physiologischer und morphologischer Eigenschaften sowie Analyse der 16S rDNA-Sequenz konnten die Isolate folgenden Gattungen zugeordnet werden:

SRB378 und SRB393: *Desulfovibrio* sp.

WF4: *Acetobacterium* sp.

MPB393: *Methanosarcina* sp.

- Die Isolate WF4 und SRB378 konnten nicht einzeln, sondern nur gemeinsam mit Methanol und Sulfat kultiviert werden, dabei war neben der Sulfatreduktion (0,21-0,26 mol red. Sulfat je mol Methanol) Acetatbildung zu beobachten. Bei der Acetatbildung aus Methanol gebildete Redoxäquivalente werden von WF4 in Form eines elektronenübertragenden Intermediates (ETI) abgegeben, welches von SRB378 zur Sulfatreduktion genutzt wird (syntrophe Sulfatreduktion). Bei Kultivierung von WF4/SRB378 auf Sulfat und Carbonat wurde kein Sulfat reduziert, sondern nur Acetat (0,72 mol Acetat je mol Methanol) gebildet.

- In der Kultur MPB393/SRB393 wurde Sulfat nur reduziert, wenn das methylo trope Isolat MPB393 nicht, wie in Reinkultur, in bis zu 2 mm großen Zellaggregaten, sondern als Einzelzellen oder in 4-10 Zellaggregaten vorlag. Der Aggregationszustand von MPB393 wurde von der Stoffwechselaktivität des Sulfatreduzierers SRB393 beeinflusst. Die Disaggregation von MPB393 trat ein, wenn

SRB393 entweder bei Kultivierung auf Lactat oder bei kontinuierlicher Kultivierung der Mischkultur auf Methanol Sulfat reduzierte. Die in und an MPB393-Zellaggregaten beobachteten Sulfidpräzipitate weisen auf die räumliche Nähe von Methanolverwertung und Sulfatreduktion hin.

Da MPB393 bei der Methanogenese mit Methanol nicht auf einen Elektronenakzeptor angewiesen ist, ist die Sulfatreduktion durch SRB393 (0,09-0,13 mol red. Sulfat je mol Methanol) mit dem von MPB393 gebildeten ETI eine Konkurrenzreaktion zur energiekonservierenden Reaktion von MPB393 (Methanogenese).

- Wasserstoff ist in den Assoziationen WF4/SRB378 und MPB393/SRB393 das elektronenübertragende Intermediat. WF4 und MPB393 (mechanisch disaggregiert) bilden bei der Verwertung von Methanol Wasserstoff. SRB378 und SRB393 sind beide in der Lage, Wasserstoff als Elektronendonator für die Sulfatreduktion zu nutzen, zeigen jedoch Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses von gebildeter Biomasse je reduziertem Sulfat (Kohlendioxid/Acetat als Kohlenstoffquelle).
- Bei der Sulfatreduktion mit Methanol durch die Mischkulturen WF4/SRB378 und MPB393/SRB393 wird Methanol nicht vollständig zur Sulfatreduktion genutzt. Die Bildung von Acetat und Methan erlaubt den Isolat WF4 bzw. MPB393 einen höheren Betrag konservierbarer Energie als die komplette Oxidation von Methanol und Wasserstofftransfer an die sulfatreduzierenden Isolate. Acetogenese und Methanogenese verringern dadurch die Effizienz der Sulfatreduktion mit Methanol.
- Das Verhältnis von reduziertem Sulfat zu verbrauchtem Methanol läßt sich durch die Verbesserung des Wasserstofftransfers steigern. Einen großen Effekt auf den Elektronenfluß haben beispielsweise die Zelldichte und das Verhältnis von methanoxidierendem (WF4) zu sulfatreduzierendem (SRB378) Partner. Bei einem Verhältnis von WF4:SRB378 wie 1:10 (gemessen anhand des Proteingehaltes) werden 0,68 mol Sulfat je mol Methanol reduziert.
- Die für eine Prozeßsteuerung relevanten Parameter Substratkonzentration und pH-Wert des Zulaufes hatten dagegen nur geringen Einfluß auf das Verhältnis von reduziertem Sulfat je verbrauchtem Methanol. Die Kultur MPB393/SRB393 war in der Lage, Medium mit einem pH-Wert bis zu 5,5 zu neutralisieren. Wie Versuche mit der Kultur WF4/SRB378 zeigten, war jedoch bei pH-Werten von 7,0-7,5 das Verhältnis von reduziertem Sulfat je Methanol geringer als bei sauren (6,5) oder basischen (8,5) pH-Werten.
- Die in einem Prozeß zur mikrobiellen Sulfatreduktion einzusetzende Menge Methanol wurde mit in der Literatur angegebenen Werten für Acetat, Ethanol,

Glucose und Lactat verglichen. Zur Reduktion eines Äquivalentes Sulfat wird theoretisch weniger Methanol (0,44 g/g) als Lactat, Acetat oder Glucose (0,63 g/g) benötigt; Methanol wird jedoch ineffizient (12-33%) genutzt, so daß die einzusetzende Menge für diese Substrate etwa gleich hoch ist. Lediglich bei Ethanol ist sowohl hinsichtlich des theoretisch benötigten Wertes als auch der Effizienz ein deutlicher Vorteil gegenüber Methanol gegeben.

6. Literatur

- Abram, J. W., Nedwell, D. B. (1978a) Hydrogen as a Substrate for Methanogenesis and Sulphate Reduction in Anaerobic Saltmarsh Sediment Arch Microbiol **117**, 93-97
- Abram, J. W., Nedwell, D. B. (1978b) Inhibition of Methanogenesis by Sulphate Reducing Bacteria Competing for Transferred Hydrogen Arch Microbiol **117**, 89-92
- Achtnich, C., Schuhmann, A., Wind, T., Conrad, R. (1995) Role of interspecies H₂ transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil FEMS Microbiol. Ecol. **16**, 61-70
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs Nucleic Acids Res. **25**, 3389-3402
- Andreesen, J. R., Gottschalk, G., Schlegel, H. (1970) *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. Isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum* Arch. Mikrobiol. **72**, 154-174
- Babel, W. (1987) Methanol als Substrat für biotechnische Prozesse Z. Chem. **27**, 49-56
- Badziong, W., Thauer, R. K. (1978) Growth Yields and Growth Rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) Growing on Hydrogen Sulfate and Hydrogen plus Thiosulfate as the Sole Energy Sources Arch Microbiol **117**, 209-214
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. (1979) Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group Microbiol. Rev. **43**, 260-296
- Balch, W. E., Scherberth, S., Tanner, R. S., Wolfe, R. S. (1977) *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria Int. J. Syst. Bacteriol. **27**, 355-361
- Barker, H. A. (1940) Studies upon methane fermentation. IV The isolation and culture of *Methanobacillus omelanskii* Antonie v. Leeuwenhoek **6**, 201-220

- Barnes, R. O., Goldberg, E. D. (1976) Methane production and consumption in anoxic marine sediments
Geology **4**, 297-300
- Bäumer, S., Murakami, E., Brodersen, J., Gottschalk, G., Ragsdale, S. W., Deppenmeier, U. (1998) The $F_{420}H_2$:heterodisulfide oxidoreductase system from *Methanosarcina* species
2-Hydroxyphenazine mediates electron transfer from $F_{420}H_2$ dehydrogenase to heterodisulfide reductase
FEBS Letters **428**, 295-298
- Bell, G. R., Le Gall, J., Peck, H. D. (1974) Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in *Desulfovibrio gigas*
J. Bacteriol. **120**, 994-997
- Blotevogel, K.-H., Fisher, U., Mocha, M., Jannsen, S. (1985) *Methanobacterium thermoalcaliphilum* spec. nov., a new moderately alkaliphilic and thermophilic autotrophic methanogen
Arch Microbiol **142**, 211-217
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U., Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane
Nature **407**, 623-626
- Boone, D. R., Johnson, R. L., Liu, Y. (1989) Diffusion of the Interspecies Electron Carriers H_2 and Formate in Methanogenic Ecosystems and Its Implications in the Measurement of K_m for H_2 or Formate Uptake
Appl. Environ. Microbiol. **55**, 1735-1741
- Boone, D. R., Menaia, J. A. G. F., Boone, J. E., Mah, R.A. (1987) Effects of hydrogen pressure during growth and effects of pregrowth with hydrogen on acetate degradation by *Methanosarcina* species
Appl. Environ. Microbiol. **53**, 83-87
- Bradford, M. (1978) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- Brauman, A., Kane, M. D., Labat, M., Breznak, J. A. (1992) Genesis of Acetate and Methane by Gut Bacteria of Nutritionally Diverse Termites
Science **257**, 1384-1386
- Braun M., Stolp H. (1985) Degradation of methanol by a sulfate reducing bacterium
Arch Microbiol **142**, 77-80

- Braun, K., Gottschalk, G. (1981) Effect of Molecular Hydrogen and Carbon Dioxide on Chemo-Organotrophic Growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*
Arch Microbiol **128**, 294-298
- Breznak, J. A., Kane, M. D. (1990) Microbial H₂/CO₂ acetogenesis in animal guts: nature and nutritional significance
FEMS Microbiol. Rev. **87**, 309-314
- Brugna, M., Nitschke, W., Toci, R., Bruschi, M., Giudici-Ortoni, M.-T. (1999) First evidence for the Presence of a Hydrogenase in the Sulfur-Reducing Bacterium *Desulfuromonas acetoxidans*
J. Bacteriol. **181**, 5505-5508
- Brune, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors
TIBTECH **16**, 16-21
- Brune, A., Friedrich, M. (2000) Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale
Curr. Opin. Microbiol. **3**, 263-269
- Bryant, M. P., Boone, D. R. (1987) Emended Description of Strain MS^T (DSM 800^T), the Type Strain of *Methanosarcina barkeri*
Int. J. Syst. Bacteriol. **37**, 169-170
- Bryant, M. P., Campbell, L. L., Reddy, C. A., Crabill, M. R. (1977) Growth of *Desulfovibrio* on lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria
Appl. Environ. Microbiol. **33**, 1162-1168
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfes, R. S. (1967) *Methanobacillus omelanskii*, a Symbiotic Association of Two Species of Bacteria
Arch. Mikrobiol. **59**, 20-31
- Cappenberg, T. E. (1974a) Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. I. Field observations
Antonie v. Leeuwenhoek **40**, 285-295
- Cappenberg, T. E. (1974b) Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. Inhibition Experiments
Antonie v. Leeuwenhoek **40**, 297-306
- Chang, I. S., Shin, P. K., Kim, B. H. (2000) Biological treatment of acid mine drainage under sulphate-reducing conditions with solid waste materials as substrate
Wat. Res. **34**, 1269-1277

- Colleran, E., Finnegan, S., O'Keeffe, R. B. (1994) Anaerobic Digestion of High-Sulphate-Content Wastewater from the Industrial Production of Citric Acid
Wat. Sci. Tech. **12**, 263-273
- Conrad, R., Wetter, B. (1990) Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria
Arch Microbiol **155**, 94-98
- Cord-Ruwisch, R., Lovley, D. R., Schink, B. (1998) Growth of *Geobacter sulfurreducens* with Acetate in Syntrophic Cooperation with Hydrogen-Oxidizing Anaerobic Partners
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2232-2236
- Cord-Ruwisch, R., Ollivier, B. (1986) Interspecies hydrogen transfer during methanol degradation by *Sporomusa acidovorans* and hydrogenophilic anaerobes
Arch Microbiol **144**, 163-165
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., Conrad, R. (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor
Arch Microbiol **149**, 350-357
- Cypionka, H., Dilling, W. (1986) Intracellular localization of the hydrogenase in *Desulfotomaculum orientis*
FEMS Microbiol. Lett. **36**, 257-260
- Daniel, R., Warnecke, F., Potekhina, J. S., Gottschalk, G. (1999) Identification of the syntrophic partners in a coculture coupling anaerobic methanol oxidation to the Fe (III) reduction
FEMS Microbiol. Lett. **180**, 197-203
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W., Cypionka, H. (1992) Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria
Arch Microbiol **185**, 93-99
- Deppenmeier, U., Müller, V., Gottschalk, G. (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea
Arch Microbiol, **165**, 149-163
- Diekert, G., Wohlfahrt, G. (1994) Metabolism of homoacetogens
Antonie v. Leeuwenhoek **66**, 209-221
- Doré, J., Pochart, P., Bernalier, A., Goderel, I., Morvan, B., Rambaud, J. C. (1995) Enumeration of H₂-utilizing methanogenic archaea, acetogenic and sulfate-reducing bacteria from human feces
FEMS Microbiol. Ecol. **17**, 279-284

- Eichler, B., Schink, B. (1984) Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic bacterium
Arch Microbiol **140**, 147-152
- Elliot, P., Ragusa, S., Catcheside, D. (1998) Growth of sulfate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage
Wat. Res. **32**, 3724-3730
- Eschemann, A., Kühl, M., Cypionka, H. (1999) Aerotaxis in *Desulfovibrio*
Environ. Microbiol. **1**, 489-494
- Fang, H. H. P., Liu, Y. (1997) Effect of sulphate on anaerobic degradation of benzoate in UASB reactors
J. Environ. Eng. **123**, 320-328
- Fauque, G., Peck, H. D. Jr., Moura, J. J. , Huynh, B. H., Berlier, Y., DerVartanian, D. V., Teixeira, M., Przybyla, A. E., Lespinat, P. A., Moura, I., Le Gall, J. (1988) The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*
FEMS Microbiol. Rev. **54**, 299-344
- Fitz, R. M., Cypionka, H. (1991) Generation of a proton gradient in *Desulfovibrio vulgaris*
Arch Microbiol **155**, 444-448
- Foucher, S., Battaglia-Brunet, F., Ignatiadis, I., Morin, D. (2001) Treatment by sulfate reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery
Chem. Eng. Sci. **56**, 1639-1745
- Fukui, M., Suh, J.-I., Urushigawa, Y. (2000) *In situ* substrates for sulfidogens and methanogens in municipal anaerobic sewage digesters with different levels of sulfate
Wat. Res. **34**, 1515-1524
- Fukui, M., Teske, A., Aßmus, B., Muyzer, G., Widdel, F. (1999) Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*)
Arch Microbiol **172**, 193-203
- Garcia, J.-L., Patel, B. K. C., Ollivier, B. (2000) Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*
Anaerobe **6**, 205-226
- Gottschalk, G., Peinemann, S. (1991) The Anaerobic Way of Life
In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.) The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology,

Isolation, Identification, Applications, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 300-311

- Govind, R., Yang, W. (1999) Biotreatment and recovery of metals from acid mine drainage
In Situ and On-Site Bioremediation, The Fifth International Symposium, San Diego, California
- Guyot, J.-P., Brauman, A. (1986) Methane Production from Formate by Syntrophic Association of *Methanobacterium bryantii* and *Desulfovibrio vulgaris* JJ Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1436-1437
- Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. D., Hall, G., Pickup, R. W., Saunders, J. R. (1996) Isolation and Identification of Methanogen-Specific DNA from Blanket Bog Peat by PCR Amplification and Sequence Analysis
Appl. Environ. Microbiol. **62**, 668-675
- Hamlet, N. V., Baylock, B. A. (1969) Synthesis of acetate from Methanol Bacteriol. Proc. **207**
- Hanselmann, K. W., Kaiser, J. P., Wenk, M., Schön, R., Bachofen, R. (1995) Growth on methanol and conversion of methoxylated aromatic substrates by *Desulfotomaculum orientis* in the presence and absence of sulfate Microbiol. Res. **150**, 387-401
- Hansen, L. B., Finster, F., Fossing, H., Iversen, N. (1998) Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate additions
Aquat. Microb. Ecol. **14**, 195-204
- Harder, J. (1997) Anaerobic methane oxidation by bacteria employing ^{14}C -methane uncontaminated with ^{14}C -carbon monoxide
Mar. Geol. **137**, 13-23
- Heal, K. V., Salt, C. A. (1999) Treatment of acidic metal-rich drainage from reclaimed ironstone mine spoil
Wat. Sci. Tech. **39**, 141-148
- Heijthusen, J. H. F. G., Hansen, T. A. (1986) Interspecies hydrogen transfer in co-cultures of methanol-utilizing acidogens and sulfate-reducing or methanogenic bacteria
FEMS Microbiol. Ecol. **38**, 57-64
- Heijthusen, J. H. F. G., Hansen, T. A. (1989) Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains
Arch Microbiol **152**, 393-396
- Hensgens, C. M. H., Vonck, J., van Beeumen, J., van Bruggen, E. F. J., Hansen, T. A. (1993) Purification and characterization of an Oxygen-Labile, NAD-

Dependent Alcohol Dehydrogenase from *Desulfivibrio gigas*

J. Bacteriol. **175**, 2859-2863

- Himes, R. H., Rabinowitz, J. C. (1962) Formyltetrahydrofolate synthetase. II. Characteristics of the enzyme and enzymatic reaction
J. Biol. Chem. **237**, 2903-2914
- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., Martens, C. S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment: Evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium
Global Biogeochem Cycles **8**, 451-463
- Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., Martens, C. S. (1998) Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments
Geochem. Cosmochem. Acta **62**, 1745-1756
- Hoh, C. Y., Cord-Ruwisch, R. (1996) A Practical Kinetic Model that Considers Endproduct Inhibition in Anaerobic Digestion Processes by Including the Equilibrium Constant
Biotechnol. Bioeng. **51**, 597-604
- Hoppe-Seyler, F. (1886) Ueber die Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. II Der Zerfall der Cellulose durch die Gährung unter Bildung von Methan und Kohlensäure und die Erscheinungen, welche dieser Process veranlasst
Z. Physiol. Chem. **10**, 401-440
- Hungate, R.E. (1967) Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation
Arch. Mikrobiol. **59**, 158-164
- Ianotti, E., Kafkewitz, D., Wolin, M. J., Bryant, M. P. (1973) Glucose Fermentation Products of *Ruminococcus albus* Grown in Continuous Culture with *Vibrio succinogenes*: Changes Caused by Interspecies Transfer of H₂
J. Bacteriol. **114**, 1231-1240
- Isa, Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. (1986) Sulfate Reduction Relative to Methane Production in High-Rate Anaerobic Digestion: Microbiological Aspects
Appl. Environ. Microbiol. **51**, 580-587
- Jansen, K. Fuchs, G., Thauer, R. K. (1985) Autotrophic CO₂ fixation by *Desulfovibrio baarsii*: demonstration of enzyme activities characteristic for the acetyl-CoA pathway
FEMS Microbiol. Lett. **28**, 311-315
- Jansen, K., Thauer, R. K., Widdel, F., Fuchs, G. (1984) Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*
Arch Microbiol **138**, 257-262

- Jansen, M., Hansen, T.A. (1998) Tetrahydrofolate serves as a methyl acceptor in the demethylation of dimethylsulfoniopropionate in cell extracts of sulfate-reducing bacteria
Arch Microbiol **169**, 84-87
- Johnson, M. S., Zhulin, I. B., Gapuzan, M. R., Taylor, B. L. (1997) Oxygen-Dependent Growth of the Obligate Anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough J. Bacteriol. **179**, 5598-5601
- Jones, W. J., Nagle, D. P Jr., Whitman, W. B. (1987) Methanogens and the Diversity of Archaeobacteria
Microbiol. Rev. **51**, 135-177
- Kaesler, B., Schönheit, P. (1989) The role of sodium ions in methanogenesis - formaldehyde oxidation to CO₂ and H₂ in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na⁺-translocation at a stoichiometry of 2-3 Na⁺/CO₂
Eur. J. Biochem. **184**, 223-232
- Kerby, R., Niemczura, W., Zeikus, J. G. (1983) Single-carbon metabolism in acetogens: Analysis of carbon flow in *Acetobacterium woodii* and *Butyribacterium methylotrophicum* by fermentation and ¹³C nuclear magnetic resonance measurement
J. Bacteriol. **155**, 1208-1218
- Kjeltjens, J. T., Vogels, G. D. (1993) Conversion of Methanol and Methylamine to Methane and Carbon Dioxide
In: Ferry, J. G. (Hrsg.) Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics, Chapman & Hall, Inc., New York, 253-303
- Kleerebezem, R., Stams, A. J. M. (2000) Kinetics of Syntrophic Cultures: A Theoretical Treatise on Butyrate Fermentation
Biotechnol. Bioeng. **67**, 529-543
- Klemps, R., Cypionka, H., Widdel, F., Pfennig, N. (1985) Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species
Arch Microbiol **143**, 203-208
- Kotsyurbenko, O. R., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N., Zhilina T. N., Bolotina, N. P., Lysenko, A. M., Osipov, G. A. (1995) New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov.
Arch Microbiol **163**, 29-34
- Krekeler, D., Teske, A., Cypionka, H. (1998) Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat
FEMS Microbiol. Ecol. **25**, 89-96

- Kristjansson, J. K., Schönheit, P., Thauer, R. K. (1982) Different K_s Values for Hydrogen of Methanogenic Bacteria and Sulfate Reducing Bacteria: An Explanation for the Apparent Inhibition of Methanogenesis by Sulfate Arch Microbiol **131**, 278-282
- Krylova, N. I., Janssen, P. H., Conrad, R. (1997) Turnover of propionate in methanogenic paddy soil FEMS Microbiol. Ecol. **23**, 107-117
- Krzycki, J. A., Morgan, J. B., Conrad, R., Zeikus, J. G. (1987) Hydrogen metabolism during methanogenesis from acetate by *Methanosarcina barkeri* FEMS Microbiol. Lett. **40**, 193-198
- Kühn, W., Gottschalk, G. (1983) Characterisation of the cytochromes occurring in *Methanosarcina* species Eur. J. Biochem. **135**, 89-94
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **82**, 6955-6959.
- Länge, S., Scholtz, R., Fuchs, G. (1989) Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. 1. Characterization and metabolic function of the cellular tetrahydropterin Arch Microbiol **151**, 77-83
- Le Gall, J., Fauque, G. (1988) Dissimilatory reduction of sulfur components in: Zehnder, A. J. B. (Hrsg.) Biology of Anaerobic Microorganisms, Wiley, New York, 587-639
- Lee, M. J., Zinder, S. H. (1988) Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on H_2 - CO_2 Appl. Environ. Microbiol. **54**, 1471-1461
- Liu, Y., Boone, D. R., Sleat, R., Mah, R. A. (1985) *Methanosarcina mazei* LYC, a New Methanogenic Isolate Which Produces a Disaggregating Enzyme Appl. Environ. Microbiol. **49**, 608-613
- Ljungdahl, L. G. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria Ann. Rev. Microbiol. **40**, 415-450
- López-García, P., Moreira, D. (1999) Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes TIBS **24**, 88-93

- Lovley, D. R., Goodwin, S. (1988) Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments
Geochem. Cosmochem. Acta **52**, 2993-3003
- Lovley, D. R., Dwyer, D. F., Klug, M. J. (1982) Kinetic analysis of competition between sulfate reducers and methanogens for hydrogen in sediments
Appl. Environ. Microbiol. **43**, 1373-1379
- Lovley, D. R., Fraga, J. L., Blunt-Harris, E. L., Hayes, L. A., Phillips, E. J. P., Coates, J. D. (1998) Humic Substances as a Mediator for Microbially Catalyzed Metal Reduction
Acta Hydrochim. Hydrobiol. **26**, 152-157
- Lovley, D.R., Ferry, J. G. (1984) Production and consumption of H₂ during growth of *Methanosarcina* ssp. on acetate
Appl. Environ. Microbiol. **49**, 247-249
- Lowe, S. E., Jain, M. K., Zeikus, J. G. (1993) Biology, Ecology, and Biotechnological Applications of Anaerobic Bacteria Adapted to Environmental Stresses in Temperature, pH, Salinity, or Substrates
Microbiol. Rev. **57**, 451-509
- Mackie, R. I., Bryant, M. P. (1994) Acetogenesis and the Rumen: Syntrophic Relationships
In: Drake, H. L. (Hrsg.) Acetogenesis, Chapman & Hall, New York, 331-364
- Maestrojuán, G. M., Boone, J. E., Mah, R. A., José, A. G. F., Menaia, M. S., Sachs, M. S., Boone, D. R. (1992) Taxonomy and Halotolerance of Mesophilic *Methanosarcina* Strains, Assignment of Strains to species, and Synonymy of *Methanosarcina mazei* and *Methanosarcina frisia*
Int. J. Syst. Bacteriol. **42**, 561-567
- Mah, R. A. (1980) Isolation and characterization of *Methanococcus mazei*
Curr. Microbiol. **3**, 321-326
- Mah, R. A., Kuhn, D. A. (1984) Transfer of the Type Species of the Genus *Methanococcus* to the Genus *Methanosarcina*, Naming it *Methanosarcina mazei* (Barker, 1936) comb. Nov. et emend. and Conservation of the Genus *Methanococcus* (Approved Lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (Approved Lists 1980) as the Type Species
Int. J. Syst. Bacteriol. **34**, 263-265
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R., Szewzyk, U. (1998) Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides
FEMS Microbiol. Ecol. **25**, 43-61

- Maree, J. P., du Plessis, P. (1994) Neutralization of acid mine water with calcium carbonate
Wat. Sci Tech. **29**, 285-296
- Martens, C. S., Berner, R. A. (1974) Methane Production in the Interstitial Waters of Sulfate-Depleted Marine Sediments
Science **27**, 1167-1169
- Martin, M., Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote
Nature **392**, 37-41
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Hespell, R. B., Costerton, J. W. (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium
Appl. Environ. Microbiol. **41**, 1029-1039
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Pfennig, N. (1979) Anaerobic Bacterium that Degrades Fatty Acids in Syntrophic Association with Methanogens
Arch Microbiol **122**, 129-135
- Mechals, B. J., Rittenberg, S. C. (1960) Energy Coupling in *Desulfovibrio desulfuricans*
J. Bacteriol. **80**, 501-507
- Miller, T. L., Wolin, M. J. (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen
Arch Microbiol **141**, 116-122
- Mizuno, O., Li, Y. Y., Noike, T. (1998) The behaviour of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion
Wat. Res. **32**, 1626-1634
- Möller, B., Ossmer, R., Howard, B. H., Gottschalk, G., Hippe H. (1984) *Sporomusa*, a new genus of Gram negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. Nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov.
Arch Microbiol **139**, 388-396
- Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Fonty G., Gouet, P. (1996) In vitro Interactions between Rumen H₂-Producing Cellulolytic Microorganisms and H₂-Utilizing Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria
Anaerobe **2**, 175-180
- Müller, R. H., Jorks, S., Kleinstaub S., Babel., W. (1999) *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA
Microbiol. Res. **154**, 241-246

- Müller, V., Blaut, M., Gottschalk, G. (1993) Bioenergetics of Methanogenesis In: Ferry, J. G. (Hrsg.) Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics, Chapman & Hall, Inc., New York, 360-406
- Muralidharan, V., Rinker, K. D., Hirsh, I. S., Bouwer, E. J., Kelly, R. M. (1997) Hydrogen Transfer Between Methanogens and Fermentative Heterotrophs in Hyperthermophilic Cocultures
Biotechnol. Bioeng **56**, 268-278
- Nanninga, H. J., Gottschalk J. C. (1986) Isolation of a sulfate-reducing bacterium growing with methanol
FEMS Microbiol. Ecol. **38**, 125-130
- Nanninga, H. J., Gottschalk, J. C. (1987) Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and Other Sulfate-Reducing Bacteria Isolated from an Anaerobic-Purification Plant
Appl. Environ. Microbiol. **53**, 802-809
- Newmann, D. K., Kolter, R. (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer
Nature **405**, 94-97
- Noguera D. R., Brusseau, G. A., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1998) A Unified Model Describing the Role of Hydrogen in the Growth of *Desulfovibrio vulgaris* under Different Environmental Conditions
Biotech. Bioeng. **59**, 734-745
- O'Brien, J. M., Wolkin, R. H., Moench, T. T., Morgan, J. B., Zeikus, J. G. (1984) Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide
J. Bacteriol. **158**, 373-375
- O'Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B., Colleran, E. (1998) Long-term competition between sulphate-reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater
Wat. Res. **32**, 815-825
- Odom, J. M., Peck, H. D. (1984) Hydrogenase, electrontransfer proteins and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*
Ann. Rev. Microbiol. **38**, 551-592
- Pereira, I. A. C., Romão, C. V., Xavier, A., V., Teixeira, M. (1998) Electron transfer between hydrogenases and mono- and multiheme cytochromes in *Desulfovibrio* spp.
JBIC **3**, 494-498
- Phelps, T. J., Conrad, R., Zeikus, J. G. (1985) Sulfate-Dependent Interspecies H₂ Transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during

Coculture Metabolism of Acetate or Methanol

Appl. Environ. Microbiol. **50**, 589-594

- Postgate, J. R. (1984) Genus *Desulfovibrio* Kluyver and van Niel 1936, 397AL
In: Krieg, N. R., Holt, H. G. (Hrsg.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, 666-672
- Qatibi, A. I., Niviere, V., Garcia, J. L. (1991) *Desulfovibrio alcoholvorans* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol
Arch Microbiol **155**, 143-148
- Raskin, L., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1996) Competition and Coexistence of Sulfate-Reducing and Methanogenic Populations in Anaerobic Biofilms
Appl. Environ. Microbiol. **62**, 3847-3857
- Redburn, A. C., Patel, B. K. (1993) Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA
FEMS Microbiol. Lett. **113**, 81-86
- Robinson J. A., Tiedje, J. M. (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions
Arch Microbiol **137**, 26-32
- Robinson, J. A., Tiedje, J. M. (1982) Kinetics of Hydrogen Consumption by Rumen Fluid, Anaerobic Digestor Sludge, and Sediment
Appl. Environ. Microbiol. **44**, 1374-1384
- Robinson, R. W. (1986) Life Cycles in the Methanogenic Archaeobacterium *Methanosarcina mazei*
Appl. Environ. Microbiol. **52**, 17-27
- Rocheleau, S., Greer, C. W., Lawrence, J. R., Cantin, C., Laramée, L., Guiot, S. R. (1999) Differentiation of *Methanosaeta concilii* and *Methanosarcina barkeri* in Anaerobic Mesophilic Granular Sludge by Fluorescent In Situ Hybridization and Confocal Scanning Laser Microscopy
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 2222-2229
- Santegoeds, C. M., Damgaard, L. R., Hesselink, G., Zopfi, J., Lens, P., Muyzer, G., de Beer, D. (1999) Distribution of Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria in Anaerobic Aggregates Determined by Microsensor and Molecular Analyses
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 4618-4629
- Sass, H., Cypionka, H., Babenzien, H.-D. (1997) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin
FEMS Microbiol. Ecol. **22**, 245-255

- Schauder R., Preuß, A., Jetten, M., Fuchs, G. (1989) Oxidative and reductive acetyl CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. 2. Demonstration of the enzymes of the pathway and comparison of CO dehydrogenase
Arch Microbiol **151**, 84-89
- Schauder, R., Widdel, F., Fuchs, G. (1987) Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*
Arch Microbiol **148**, 218-225
- Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, R. K., Widdel, F., Fuchs, G. (1986) Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle
Arch Microbiol **145**, 162-172
- Schink, B. (1992) Syntrophism among Prokaryotes
In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.), The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 267-299
- Schink, B., Friedrich, M. (1995) Energetics of syntrophic fatty acid oxidation
FEMS Microbiol. Rev. **15**, 85-94
- Schink, B., Zeikus, J. G. (1980) Microbial Methanol Formation: A Major End Product of Pectin Metabolism
Curr. Microbiol. **4**, 378-389
- Seeliger, S., Cord-Ruwisch, R., Schink, B. (1998) A Periplasmic and Extracellular *c*-Type Cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* Acts as a Ferric Iron Reductase and as an Electron Carrier to Other Acceptors or to Partner Bacteria
J. Bacteriol. **180**, 3686-3691
- Song, Y.-C., Piak, B.-C., Shin, H.-S., La, S.-J. (1998) Influence of electron donor and toxic materials on the activity of sulfate reducing bacteria for the treatment of electroplating wastewater
Wat. Sci. Tech. **38**, 187-194
- Smith, R. L., Klug, M. J. (1981) Electron Donors Utilized by Sulfate-Reducing Bacteria in Eutrophic Lake Sediments
Appl. Environ. Microbiol. **42**, 116-121
- Smith, M. R., Mah, R. A. (1980) Acetate as Sole Carbon and Energy Source for Growth of *Methanosarcina* Strain 227
Appl. Environ. Microbiol. **39**, 993-999

- Sowers, K. R., Noll, K. M. (1995) Techniques for Anaerobic Growth
In: Robb, F. T., Place, A. R., Sowers, K. R., Schreier, H. J., DasSarma, S., Fleischmann, E. M. (Hrsg.) *Archaea: A Laboratory Manual (Methanogens)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 15-48
- Speece, R. E. (1983) Anaerobic biotechnology for the industrial wastewater treatment
Environ. Sci. Tech. **17**, 416-427
- Stupperich, E. (1991) Corrinoid-Dependent Mechanism of Acetogenesis from Methanol
In: Drake, H. L. (Hrsg.) *Acetogenesis*; Chapman & Hall; New York, 180-196
- Stupperich, E., Aulkemeyer, P., Eckerskorn, C. (1992) Purification and characterization of a methanol-induced cobamide-containing protein from *Sporomusa ovata*
Arch Microbiol **158**, 370-373
- Stupperich, E., Konle, R. (1993) Corrinoid-Dependent Methyl Transfer Reactions Are Involved in Methanol and 3,4-Dimethoxybenzoate Metabolism by *Sporomusa ovata*
Appl. Env. Microbiol. **59**, 3110-3116
- Sunamura, M., Koga, Y., Ohwada, K. (1999) Biomass Measurement of Methanogens in the Sediments of Tokyo Bay Using Archaeol Lipids
Mar. Biotechnol. **1**, 562-568
- Szewzyk, R., Pfennig, N. (1987) Complete oxidation of catechol by the strictly anaerobic sulfate-reducing *Desulfobacterium catecholicum* sp. nov.
Arch Microbiol **147**, 163-168
- Taylor, B. F., Oremland, R. S. (1979) Depletion of adenosine triphosphate in *Desulfovibrio* by oxyanions of Group VI elements
Curr. Microbiol. **3**, 101-110
- Thauer, R. K., Hedderich, R., Fischer, R. (1993) Reactions and Enzymes Involved in Methanogenesis from CO₂ and H₂
In: Ferry, J. G. (Hrsg.) *Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*, Chapman & Hall, Inc., New York, 207-252
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977) Energy conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria
Bacteriol. Rev. **41**, 100-180
- Thauer, R. K., Möller-Zinkhan, D., Spormann, A. M. (1989) Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic bacteria
Annu. Rev. Microbiol. **43**, 43-67

- Thiele, J. H., Wu, W.-M., Jain, M. K., Zeikus, J. G. (1990) Ecoengineering High Rate Anaerobic Digestion Systems: Analysis of Improved Syntrophic Biomethanation Catalysts
Biotechnol. Bioeng. **35**, 990-999
- Thiele, J. H., Zeikus, J. G. (1988) Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic digestion: Significance of Formate Transfer versus Hydrogen Transfer during Syntrophic Methanogenesis in Flocs
App. Environ. Microbiol. **54**, 20-29
- Tholen, A., Brune, A. (1999) Localization and In Situ Activities of Homoacetogenic Bacteria in the Highly Compartmentalized Hindgut of Soil-Feeding Higher Termites (*Cubitermes* spp.)
Appl. Environ. Microbiol. **65**, 4497-4505
- Traore, A. S., Fardeau, M.-L., Hatchikian, C. E., Le Gall, J., Belaich, J.-P. (1983) Energetics of Growth of a Defined Mixed Culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Interspecies Hydrogen Transfer in Batch and Continuous Cultures
Appl. Environ. Microbiol. **46**, 1152-1156
- Tsuji, K., Yagi, T. (1980) Significance of Hydrogen Burst from Growing Cultures of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki, and the Role of Hydrogenase and Cytochrome c_3 in Energy Production System
Arch Microbiol **125**, 35-42
- Tuttle, J. H., Dugan, P. R., Randles, C. I. (1969) Microbial Sulfate Reduction and Its Potential Utility as an Acid Mine Water Pollution Abatement Procedure
Appl. Microbiol. **17**, 297-302
- Vainshtein, M., Hippe, H., Kroppenstedt, R. M. (1992) Cellular Fatty Acid Composition of *Desulfovibrio* Species and Its Use in Classification of Sulfate-Reducing Bacteria
System. Appl. Microbiol. **15**, 554-566
- Van der Maarel, M. J. E. C., Jansen, M., Haanstra, R., Meijer, W. G., Hansen, T. A. (1996) Demethylation of Dimethylsulfoniopropionate to 3-*S*-Methylmercaptopropionate by Marine Sulfate-Reducing Bacteria
Appl. Environ. Microbiol. **62**, 3978-3984
- Van der Meijden P., van der Drift, C., Vogels, G. D. (1984a) Methanol conversion in *Eubacterium limosum*
Arch Microbiol **138**, 360-364
- Van der Meijden, P., Heythuisen, H. J., Pouwels, A., Houwen, F. P., van der Drift, C., Vogels, G. D. (1983) Methyltransferases involved in methanol conversion

by *Methanosarcina barkeri*

Arch Microbiol **134**, 238-242

- Van der Meijden, P., te Brömmelstroet, B. W., Poirot, C. M., van der Drift, C., Vogels, G. D. (1984b) Purification and Properties of Methanol:5-Hydroxybenzimidazolylcobamide Methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* J. Bacteriol. **160**, 629-635
- van der Westen, H. M., Mayhew, S. G., Veeger, C. (1978) Separation of hydrogenases from intact cells of *Desulfovibrio vulgaris* FEBS Lett. **86**, 122-126
- Van Houten, R. T., Oude Elferink, S. J. W. H., van Hamel, S. E., Hulshoff Pol, L. W., Lettinga, G. (1995) Sulphate reduction by aggregates of sulphate-reducing bacteria and homo-acetogenic bacteria in a lab-scale gas-lift reactor Biores. Technol. **54**, 73-79
- Voordouw, G. (1995) The Genus *Desulfovibrio*: The Centennial Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2813-2819
- Wakao, N., Takahashi, T., Sakurai, Y., Shiota, H. (1979) A Treatment of Acid mine Water using Sulfate-reducing Bacteria J. Ferment. Technol. **57**, 445-452
- Wallrabenstein, C., Schink, B. (1994) Evidence of reversed electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophomonas buswellii* Arch Microbiol **162**, 136-142
- Watson, J. H. P., Ellwood, D. C. (1999) Removal of heavy metals from water systems with novel adsorbents produced by microorganisms In Situ and On-Site Bioremediation, The Fifth International Symposium, San Diego, California
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., Boone, D. R., (1992) The Methanogenic Bacteria In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.) The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 719-767
- Widdel, F., Bak, F. (1992) Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Hrsg.) The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 3357-3378

- Widdel, F., Pfennig, N. (1984) Dissimilatory Sulfate- or Sulfur-reducing Bacteria
In: N. R. Krieg, J. G. Holt (Hrsg.) Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, 666-672
- Wiegel, J., Braun, M., Gottschalk, G. (1981) *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide
Curr. Microbiol. **5**, 255-260
- Wiegel, J., Garrison, R. (1985) Utilization of methanol by *Clostridium thermoaceticum*
Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. **1115**, 165
- Williams, R. T., Crawford, R. L. (1984) Methane production in Minnesota peatlands
Appl. Environ. Microbiol. **47**, 1260-1271
- Winters, D. K., Ljungdahl, L. G. (1989) PQQ-Dependent Methanol Dehydrogenase from *Clostridium thermoautotrophicum*
In: Jongejans, J. A., Duine, J. A. (Hrsg.) PQQ and Quinoproteins, Kluwer Academic Publishers, 35-39
- Wolin, M. J., Miller, T. I. (1982) Interspecies Hydrogen Transfer: 15 Years Later
ASM News **48**, 561-565
- Wood, H. G., Ragsdale, S. W., Pezacka, E. (1986) The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth
FEMS Microbiol. Rev. **39**, 345-362
- Wu, W.-M., Hickey, R. F., Zeikus, J. G. (1991) Characterization of Metabolic Performance of Methanogenic Granules Treating Brewery Wastewater: Role of Sulfate-Reducing Bacteria
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 3438-3449
- Xun, L., Boone, D. R., Mah, R. (1988) Control of the Life Cycle of *Methanosarcina mazei* S-6 by Manipulation of Growth Conditions
Appl. Environ. Microbiol. **54**, 2064-2068
- Zaluski, M., Foote, M., Manchester, K., Canty, M., Willis, M., Consort, J., Trudnowski, J., Johnson, M., Harrington-Baker, M. A. (1999)
Design and construction of bioreactors with sulfate-reducing bacteria for acid mine drainage control
In Situ and On-Site Bioremediation, The Fifth International Symposium, San Diego, California
- Zehnder, A. J. B. (1978) Ecology of methane formation
In: Mitchell, R., (Hrsg.) Water pollution microbiology Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., New York, 349-376

- Zehnder, A. J. B., Brock, T. D. (1980) Anaerobic Methane Oxidation: Occurrence and Ecology
Appl. Environ. Microbiol. **39**, 194-204
- Zeikus, J. G., Weimer, P. J., Nelson, D. R., Daniels, L. (1975) Bacterial Methanogenesis: Acetate as a Methane Precursor in Pure Culture
Arch Microbiol **104**, 129-134
- Zellner, G., Messner, P., Kneifel, H., Winter, J. (1989) *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester
Arch Microbiol **152**, 329-334
- Zhao, Y., Zhang, H., Boone, D. R., Mah, R. A. (1986) Isolation and characterization of a fast-growing, thermophilic *Methanobacterium* species
Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1227-1229
- Zhilina, T. N. (1975) Biotypes of *Methanosarcina*
Mikrobiologiya **45**, 481-489
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A. (1978) Cyst formation by *Methanosarcina*
Mikrobiologiya **48**, 451-456
- Zinder, S. H. (1993) Physiological Ecology of Methanogens
In: Ferry, J. G. (Hrsg.) Methanogenesis Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics, Chapman & Hall, Inc., New York, 128-206
- Zinder, S. H., Koch, M. (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: Acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture
Arch Microbiol **138**, 263-272

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Babel (UFZ) möchte ich danken für den Vorschlag des interessanten Themas und die Hilfe bei der Beantragung eines Promotionsstipendiums der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, welcher ich nicht nur finanzielle Förderung, sondern auch interdisziplinäre Anregungen bei den Stipendiatentreffen verdanke. Prof. Dr. Babel hat mich darüber hinaus mit wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und dem Interesse am Fortgang meiner Arbeit unterstützt.

Meinen Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern gebührt der Dank für zahlreiche Gespräche, die mir nicht nur theoretische und praktische Anregungen, sondern auch Motivation und Beharrlichkeit vermittelten.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer und Herrn Dr. R. Hedderich sowie weiteren Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für terrestrische Mikrobiologie in Marburg möchte ich für den Arbeitsaufenthalt an ihrem Institut und die interessanten fachlichen Gespräche danken.

Dieser Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. B. Schink und Herrn Dr. A. S. Galushko (Universität Konstanz), insbesondere für die Möglichkeit, Versuche zur Wasserstoffmessung durchzuführen und die dabei erfahrene Unterstützung.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. M. Beck (Sektion Sanierungsforschung) und Frau R. Remer (Sektion Umweltmikrobiologie) für die Analyse der Gas- bzw. Sulfatproben, Herrn S. Jorks für die 16S rDNA-Sequenzierung der Isolate SRB378 und WF4 sowie Herrn Dr. T. R. Neu und Frau U. Kuhlicke (Sektion Gewässerforschung) für die Laserscanningmikroskop-Aufnahmen.

Zahlreiche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Sektion Umweltmikrobiologie ermöglichten mir die Aneignung verschiedener analytischer, mikroskopischer und molekularbiologischer Methoden. Hierfür danke ich besonders Herrn Dr. C. Vogt, Herrn Dr. A. Alfreider, Frau A. Heidtmann, Frau C. Süring sowie Frau Dr. G. Mothes und Frau I. Skinfill (Fa. SIAB).

Ich danke A. Becker, S. S. Walther, Dr. M. P. E. Walther, I. Schwentek, Dr. R. I. J. v. Fircks, G. E. Walther, S. Haupt und allen anderen, von denen ich Zuspruch und Beistand erfuhr.

Lebenslauf

Christina Sophia Margarete Walther
Lilienstraße 14
04315 Leipzig

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 15.02.1973
Geburtsort: Dresden
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1979-1987 Polytechnische Oberschule, Dresden
1987-1989 Spezialschule mathematisch-naturwissenschaftlich technischer
Richtung Martin-Andersen-Nexö, Dresden
1989-1991 EOS Kreuzschule, Dresden
1991 Abitur

Studium

1991/1992 Studiengang Chemie, TU Dresden
1992-1997 Studiengang Biochemie, Universität Leipzig
1994/1995 Auslandsstudium am University College Cork, Irland
1996/1997 Diplomarbeit: "Zum Mechanismus der Auseinandersetzung von
sulfatreduzierenden Bakterien mit Aluminium in schwefelsauren
Wässern", unter Anleitung von Prof. Dr. W. Babel
1997 Abschluß als Diplom-Biochemikerin

Promotion

Seit 1998 Doktorandin in der Sektion Umweltmikrobiologie,
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH (1998-2000
gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt)
Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit zum Thema
„Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle
Dekontamination sulfathaltiger Wässer“ unter Anleitung von
Prof. Dr. Wolfgang Babel

Christina Walther

Lilienstraße 14

04315 Leipzig

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig bekannt ist und von mir anerkannt wird.

Ich habe die vorliegende Arbeit „Methanol als Elektronendonator für die mikrobielle Dekontamination sulfathaltiger Wässer“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt. Die aus den Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen.

Diese Arbeit wurde keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt.

Zudem erkläre ich, daß ich bisher keinen Antrag auf die Durchführung eines Promotionsverfahrens gestellt habe.

Leipzig, den 22.06.2001

Christina Walther