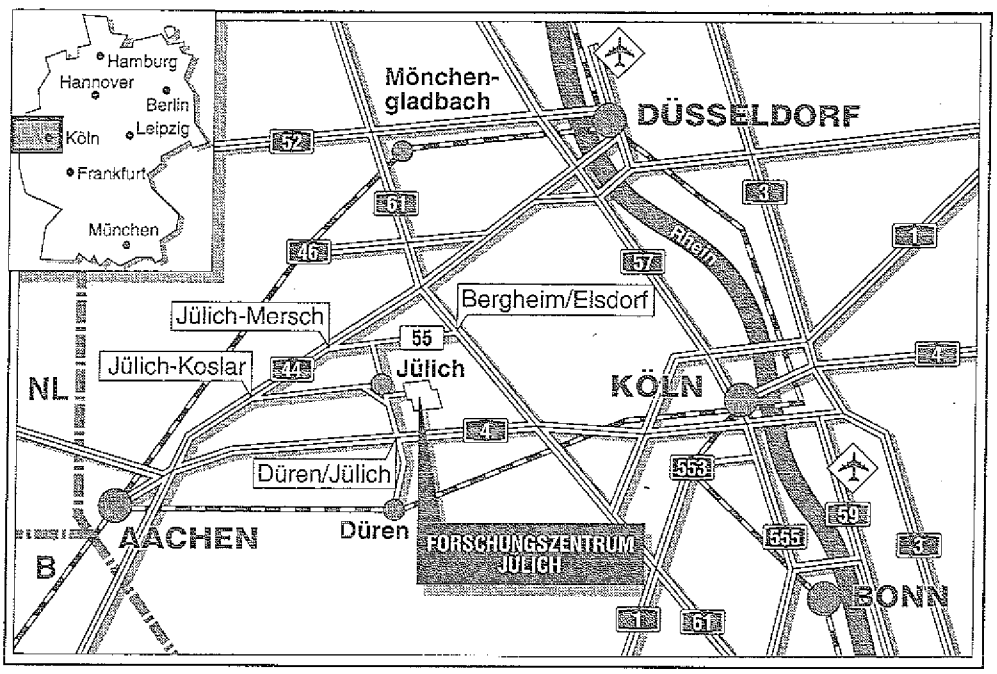
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biotechnologie

Untersuchungen zum mikrobiellen anaeroben Abbau von 3-Chlorbenzoesäure

Michael Bock



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2616
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2616
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Untersuchungen zum mikrobiellen anaeroben Abbau von 3-Chlorbenzoesäure

Michael Bock

1. Einleitung

In der Natur kommen Halogenaromaten in der Regel nur in sehr geringen Konzentrationen z. B. als Pheromone bei Zecken (Sonenshein et al. 1985), als menschliches Schilddrüsenhormon Tyroxin (Hager 1981) oder als Antibiotika (Griseofulvin und Aureomycin) vor. King (1986) beschrieb, daß 2,4-Dibromphenol jedoch auch in Konzentrationen von 70 nmol/g in den Gangwänden des marinen Haemichordaten *Saccoglossus kowalewskii* vorkommt.

Ferner werden chlorierte aromatische Verbindungen industriell hergestellt, da sie sowohl für technische Anwendungen als auch als Umweltchemikalien verwendet werden. So werden polychlorierte Biphenyle aufgrund ihrer thermischen Stabilität als Kühl- und Schmiermittel sowie als Hydrauliköle eingesetzt (Durfee et al. 1976, Reineke und Knackmuss 1988). Da polychlorierte Phenole Mikroorganismen bereits bei Konzentrationen von 4 $\mu mmol \cdot l^{-1}$ hemmen (Ruckdeschel et al. 1987), werden sie als Holzschutzmittel eingesetzt. Auch eine Vielzahl von Herbiziden und Insektiziden enthalten halogenierte aromatische Verbindungen (Lal und Saxena 1982).

Weiterhin stellen chlorierte Aromaten wichtige Ausgangssubstanzen für industrielle Synthesen von Pharmazeutika, Schädlingsbekämpfungsmitteln und Farbstoffen dar, wobei geschätzt wird, daß 1 - 2% der eingesetzten Mengen als Verluste in die Produktionsabwässer gelangen (Reineke und Knackmuss 1988). Neben diesen industriellen Abwässern enthalten auch Deponiesickerwässer (Johnson et al. 1985, Reineke und Knackmuss 1988) und Bleichereiabwässer (Lindsström und Osterberg 1984) halogenierte aromatische Verbindungen. Thom und Agg (1975) vermuteten von polychlorierten Biphenylen, Pentachlorphenol und chlorierten Benzoesäuren, daß sie in biologischen Abwasserreinigungsanlagen nicht abgebaut würden und so in die Umwelt gelangten, wo sie sich in biologischen Systemen teilweise um den Faktor 10^6 anreicherten (Ghisalba 1983). Deshalb wurden 1979 eine Reihe chlorierter Phenole und Biphenyle von der "US Environmental Protection Agency" unter den 129 wichtigsten Umweltschadstoffen aufgelistet (Patterson und Kodukala 1981).

Für die Reinigung industrieller Abwässer werden überwiegend aerobe Verfahren eingesetzt. Die anaerobe Abwasserreinigung hat jedoch gegenüber aeroben Verfahren die Vorteile, daß der energieaufwendige Sauerstoffeintrag entfällt, geringere Mengen an Überschußschlamm gebildet werden und das entstehende Biogas zur Energiegewinnung genutzt werden kann (Sahm 1984, Sahm 1988). Für einen effizienten Einsatz anaerober Abwasserreinigungsverfahren mußten jedoch in den letzten Jahren Verfahren zur Biomasserückhaltung entwickelt werden, um die relativ langen Generationszeiten anaerober Mikroorganismen durch effiziente Biomasserückhaltung auszugleichen. Dazu werden im Wirbelschicht-Verfahren (Heijnen et al. 1985), im anaeroben Filter (Young und McCarty 1969) oder im Festbettumlaufreaktor (Aivasidis 1984) unterschiedliche Trägermaterialien eingesetzt, auf denen die Mikroorganismen aufwachsen und so im Reaktor zurückgehalten werden.

Als Trägermaterialien werden dabei so unterschiedliche Materialien wie Sinterglas (Aivasidis 1989), Sand (Beeftink et al. 1988), Kohle oder Polyurethanschäume (Pascik 1988) eingesetzt. Bei Untersuchungen zur Besiedelung von Trägermaterialien durch Mikroorganismen wurde eine Reihe von Parametern untersucht. So fanden Verrier et al. (1988), daß methanogene Bakterien auf hydrophoben Polymeroberflächen besser wuchsen, als auf hydrophilen. Huysman et al. (1983) konnten außerdem zeigen, daß Polyurethan durch methanogene Bakterien mit steigender Porosität zunehmend schneller und stärker besiedelt wurde. Neben den Oberflächeneigenschaften der Trägermaterialien wurden auch Einflüsse der Substratkonzentration und der Substratzusammensetzung (Gorris et al. 1988a), sowie der Konzentration an doppelt geladenen Anionen oder des pH-Wertes des Mediums (Mozes et al. 1987) auf die Adsorption von Mikroorganismen beschrieben.

Für den Abbau halogenierter Aromaten stellt die Abspaltung des Halogenatoms den kritischen Schritt dar. Im aeroben Milieu kann diese Reaktion entweder direkt am aromatischen Ring durch reduktive , hydrolytische und oxidative Dehalogenierung oder nach der oxidativen Ringöffnung durch spontane Hydrolyse oder Hydrogen-Halid-β-Elimination erfolgen (Reinecke und Knackmuss 1988). Die

Ringöffnung wird durch die Bildung eines Catecholderivates mit Hilfe einer molekularen Sauerstoff benötigenden Dioxygenase eingeleitet. Halogenaromaten mineralisierende aerobe Isolate gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Arthrobacter* und *Alcaligenes*, in denen die beteiligten Enzyme häufig auf Plasmiden codiert sind (Sangodkar et al. 1989). Die Vielzahl von Arbeiten über den aeroben Abbau chlorierter Aromaten wurde kürzlich in den Reviews von Sahasrabudhe und Modi (1987), Reineke und Knackmuss (1988), Morgan und Watkinson (1989), Häggblom (1990) und Chaudry (1991) zusammengefaßt.

Während aus aeroben Ökosystemen auf Halogenaromaten wachsende Reinkulturen isoliert werden konnten, werden diese Substanzen unter Ausschluß von Sauerstoff durch anaerobe Nahrungsketten abgebaut, die erst seit einigen Jahren zunehmend untersucht werden. Die Abbildung 1.1 zeigt exemplarisch den Abbau von 3-Chlorbenzoesäure in methanogenen Mischkulturen, wie er von Dolfing und Tiedje (1986) und Brunner (1987) beschrieben wurde. Zunächst spalteten

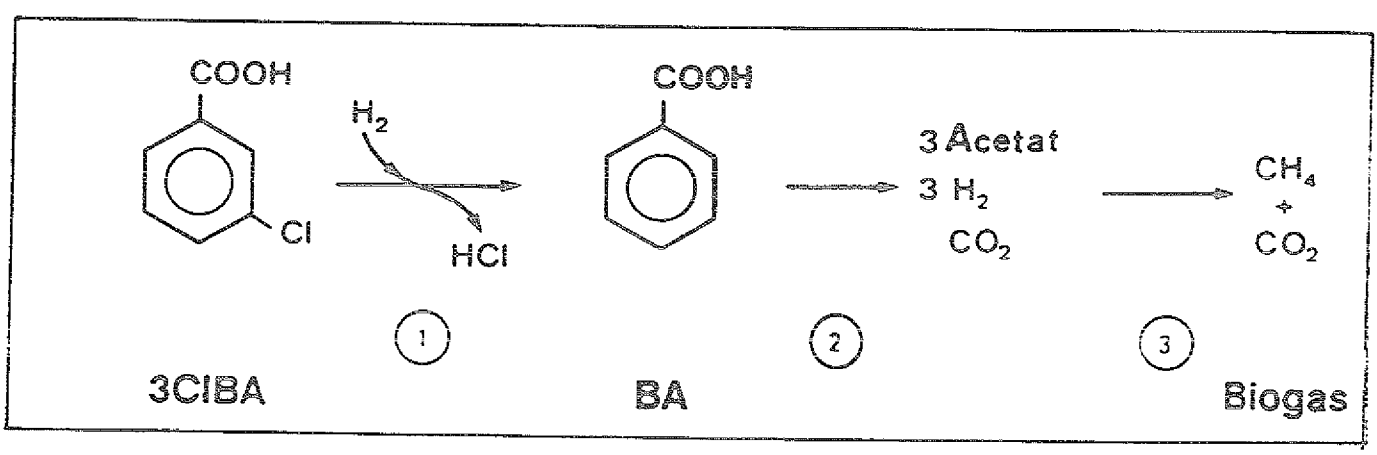


Abbildung 1.1: Schema des anaeroben Abbaus von 3-Chlorbenzoesäure in einer anaeroben Nahrungskette aus dehalogenierendem (1) und Benzoesäure abbauendem Bakterium (2) sowie Methanbakterien (3) (nach Dolfing und Tiedje 1986 und Brunner 1987).

dehalogenierende Bakterien das Chloratom von dem aromatischen Ring ab (1). Die entstandene Benzoesäure wurde von einer weiteren Bakteriengruppe zu Acetat, Wasserstoff und CO_2 umgesetzt (2) und die Produkte des Benzoesäureabbaus von 2 Methanbakteriengruppen (3) weiter zu Methan und CO_2 umgewandelt.

Der anaerobe Abbau chlorierter Aromaten wird durch die reduktive Dehalogenierung eingeleitet, wobei während des Abbaus polyhaolgenierter Aromaten in der Regel geringer halogenierte Zwischenprodukte nachgewiesen werden können. Gibson und Suflita (1990) berichteten über den anaeroben Abbau von 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, wobei 2,4- und 2,5-Dichlorophenoxyessigsäure neben Monochlorphenoxyessigsäuren und Mono- und Dichlorophenolen als Zwischenprodukte auftraten. Zhang und Wiegel (1990) berichteten über das intermediäre Auftreten von 4-Chlorphenol während des Abbaus von 2,4-Dichlrophenol, und Kuhn und Suflita (1989) fanden 2,3,5-Trichlor- und 3,5-Dichloranilin als Metabolite des 2,3,4,5-Tetrachloranilinabbaus. Nach Berechnungen von Brown et al. (1987) ist die Dehalogenierung eines polychlorierten Aromaten stärker exergonisch, als die Dehalogenierung des monochlorierten Rings. Dies erklärt, warum während des Abbaus polychlorierter Aromaten die Dehalogenierung des monochlorierten Intermediates häufig geschwindigkeitslimitierend ist (Suflita et al. 1983, Mikesell und Boyd 1985, Zhang und Wiegel 1990, Kuhn und Suflita 1989).

Unter anaeroben Bedingungen erfolgt die Dehalogenierung reduktiv, wobei das Halogenid durch ein Hydridion ersetzt wird und Halogenwasserstoff freigesetzt wird. Die dehalogenierenden Enzyme sind spezifisch für verschiedene Positionen des Halogenatoms am aromatischen Ring. So beschrieben Sharak Genthner et al. (1989b), daß Anreicherungskulturen auf allen Monochlorphenol- und Monochlorbenzoesäureisomeren nur ihre jeweiligen Anreicherungssubstrate metabolisieren konnten; lediglich 2-Chlorphenol konnte auch von den Anreicherungen auf 3-Chlorphenol und 3-Chlorbenzoesäure umgesetzt werden. Für das Halogen scheinen die Enzyme nicht spezifisch zu sein, da Anreicherungskulturen auf 3-Chlor-Benzoesäure auch auf 3-Jod- und 3-Brom-Benzoesäure wachsen konnten.

Obwohl auch Kulturen angereichert werden konnten, die Halogenaromaten unter Sulfat reduzierenden Bedingungen abbauten (Häggblom und Young 1990, Sharak Genthner et al. 1989a, Kohring et al. 1989), scheinen anorganische Elektronenakzeptoren wie Nitrat oder Sulfat die reduktive Dehalogenierung zu inhibieren. So fanden Sharak Genthner et al. (1989a) bei ihren Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Monochlorphenolen und Monochlorbenzoesäuren, daß diese Substanzen in 18 methanogenen, 12 denitrifizierenden und 7 sulfidogenen von jeweils 30 Anreicherungskulturen abgebaut wurden. Adrian und Suflita (1990) berichteten, daß das Herbizid Bromacil (5-Brom-3-sec-Butyl-6-Methyluracil) anaerob nur unter methanogenen, nicht aber unter sulfatreduzierenden oder denitrifizierenden Bedingungen abgebaut wurde. Die Inhibierung des anaeroben Abbaus durch Sulfat wurde bei Chloranilinen (Kuhn und Suflita 1989) und 2,4,5-Trichlorphenoxessigsäure (Gibson und Suflita (1990) beobachtet und eine Verlangsamung des anaeroben Abbaus halogenierter Aromaten durch Zusatz von Sulfat beschrieben Brunner (1987) und Kuhn et al. (1990). Dagegen fanden eine Reihe von Autoren bei Anreicherungsversuchen für Halogenaromaten abbauende Kulturen, daß der Zusatz kurzkettiger organischer Säuren und Alkohole den Abbau oder die Dehalogenierung beschleunigte (Gibson und Suflita 1990, Kuhn und Suflita 1990) oder überhaupt erst ermöglichte (Nies und Vogel 1990).

Bislang wurden einige Bakterien isoliert, die halogenierte Aliphaten reduktiv dehalogenieren können. Ohisa et al. (1980) zeigten die reduktive Dehalogenierung von Hexachlorcyclohexan in zellfreien Extrakten aus *Clostridium rectum* und Gälli und McCarty (1989a und 1989b) isolierten einen weiteren *Clostridium* Stamm, der 1,1,1-Trichlorethan zu 1,1-Dichlorethan sowie Trichlormethan und Tetrachlorkohlenstoff zu Dichlormethan reduktiv dechlorierte. Tsuchiya und Yamaha (1984) isolierten *Staphylococcus epidermidis* Stämme, die 1,2,4-Trichlorbenzoesäure reduktiv unter einer H_2-Atmosphäre dehalogenieren konnten. Auch *Methanosarcina mazei* ist in der Lage Perchlorethylen zu Trichlorethylen (Fathepure und Boyd 1988) zu dehalogenieren und *Methanobacterium sp* dechlorierte 1,2-Dichlorethan zu Ethen (Egli et al. 1987). Eine Reihe weiterer chlorierter und bromierter aliphatischer Verbindungen wurden in

der Untersuchung von Belay und Daniels (1987) durch *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus deltae* und *Methanococcus thermolithotrophicus* zu Ethan, Ethylen und Acetylen dehalogeniert.

Aus einer methanogenen, Halogenaromaten abbauenden Kultur konnte bisher jedoch erst ein dehalogenierendes Bakterium isoliert werden (Shelton und Tiedje 1984). Dieser Organismus, *Desulfomonile tiedjei* (DeWeerd et al. 1990), ist ein sulfidogenes Bakterium, das 3-Chlorbenzoesäure nur während des Wachstums auf Pyruvat und in Abwesenheit von oxidierten Schwefelverbindungen reduktiv dehalogeniert, wobei Benzoesäure als Dehalogenierungsprodukt in das Medium ausgeschieden wird. Die für die reduktive Dehalogenierung benötigten Elektronen scheinen über eine membrangebundene Elektronentransportkette zu laufen, die auch an der Sulfitreduktion beteiligt ist. Die Dehalogenierung wird durch Sulfitreduktion kompetitiv gehemmt und beide Reaktionen sind durch die selben respiratorischen Hemmstoffe inhibierbar (DeWeerd und Suflita 1990, DeWeerd et al. 1991). Die reduktive Dehalogenierung wird von *D. tiedjei* zur Gewinnung von ATP (Dolfing 1990, Mohn und Tiedje 1990) genutzt. Weiterhin konnten Kamal und Wyndham (1990) einen *Rhodopseudomonas palustris* Stamm isolieren, der auf 3-Chlorbenzoesäure anaerob unter Licht wachsen kann.

Nach der Dehalogenierung wird der aromatische Ring anaerob durch acetogene Bakterien zu Essigsäure, H_2 und CO_2 abgebaut. Bisher wurden fermentierende (Patel et al. 1981, Schink und Pfennig 1982, Schnell et al. 1991), obligat syntrophe (Mountfort und Bryant 1982, Mountfort et al. 1984, Shelton und Tiedje 1984, Brunner 1987, Dolfing et al. 1990), phototrophe (Harwood und Gibson 1988, Rahalkar et al. 1991), sulfidogene (Widdel 1980, Bak und Widdel 1986, Schnell et al. 1989, Tasaki et al. 1991), Nitrat reduzierende (Kuhn et al. 1988, Dolfing et al. 1990, Evans et al. 1991, Seyfried et al. 1991) und Eisen reduzierende (Lovley und Lonergan 1990) Bakterien isoliert, die auf einer Vielzahl von Phenol- und Benzoesäurederivaten anaerob wachsen können. Scholz-Muramatsu et al. (1990) beschrieben, daß der anaerobe Abbau von Benzoesäure in einer Mischkultur auch an die reduktive Dehalogenierung von Tetrachlorethylen gekoppelt werden konnte.

Seit einigen Jahren wird der anaerobe Abbau monocyclischer Aromaten intensiv untersucht (Berry et al. 1987, Schink und Tschech 1988, Evans und Fuchs 1988, Tschech 1989). Dabei erscheint Benzoyl-Coenzym A als zentrales Stoffwechselprodukt des anaeroben Abbaus von Phenol (Tschech und Fuchs 1989, Knoll und Winter 1987, Knooll und Winter 1989, Zhang et al. 1990)), 4-Hydroxybenzoesäure (Glöckler et al. 1989), p-Cresol (Rudolphi et al. 1991), Phenyles

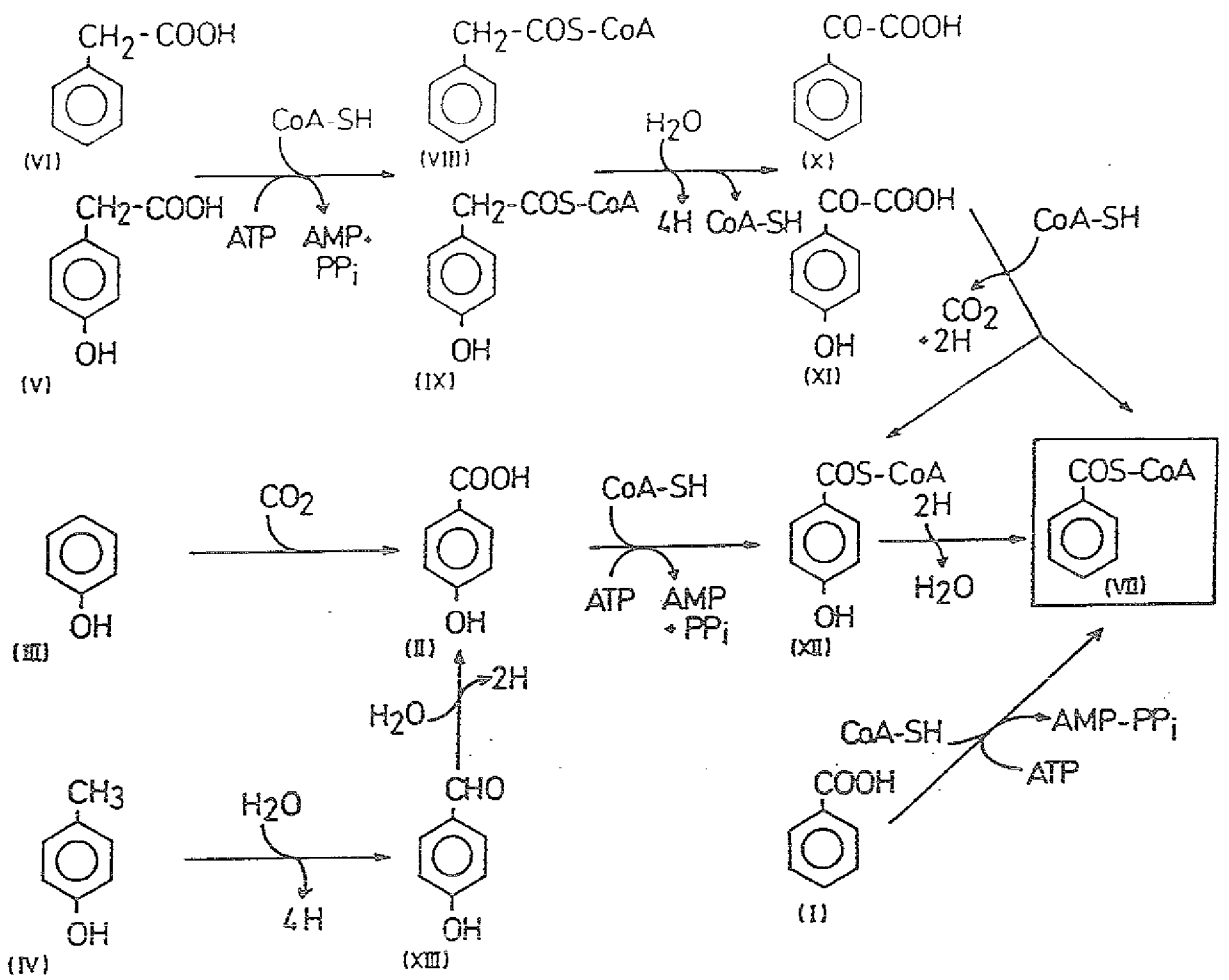


Abbildung 1.2: Bildung von Benzoyl-CoA (VII) aus Benzoesäure (I), 4-Hydroxybenzoesäure (II), Phenylessigsäure (VI), 4-Hydroxyphenylessigsäure (V), Phenol (III) und p-Cresol (IV) in Pseudomonas K 172 unter anaeroben Bedingungen (nach Dangel et al. 1991). Als Intermediate treten dabei auf: Phenylacetyl-CoA (VIII), 4-Hydroxyphenylacetyl-CoA (IX), Phenylglyoxylat (X), 4-Hydroxyphenylglyoxylat (XI), 4-Hydoxybenzoyl-CoA (XII) und 4-Hydroxybenzaldehyd (XIII).

sigsäure und 4-Hydroxyphenylessigsäure (Seyfried et al. 1991). Die Carboxylgruppe kann dabei auf drei unterschiedlichen Wegen gebildet werden: durch Carboxylierung phenolischer Verbindungen (I, II), durch anaerobe Hydroxylierung aromatischer Methylgruppen in para-Stellung zu phenolischen Hydroxylgruppen (IV, XII, II) und durch α-Oxydation der Acetylseitenketten von Phenylessigsäuren (V bis XII) (Abb. 1.1 nach Dangel et al. 1991). Der aromatische Ring der Benzoesäure wird dann zu 1-Cyclohexen- oder Cyclohexan-Carboxylat reduziert und anschließend zu Heptanoat gespalten (Kobayashi et al. 1989). Dagegen fanden Kluge et al. (1990) die Bildung von 1,3-Cyclohexandion aus 2,4- und 2,6-Dihydroxybenzoat mit anschließender Spaltung zu 5-Oxocaproat in einer Mischkultur aus *Clostridium* sp. und einem denitrifizierenden Isolat.

Der Abbau von Benzoesäure unter anaeroben Bedingungen ist nur dann exergon, wenn der entstehende Wasserstoff sofort verbraucht und so ein niedriger Wasserstoffpartialdruck erhalten wird (Ferry und Wolfe 1976, Mountford und Bryant 1982). In syntrophen methanogenen Mischkulturen dient CO_2 als terminaler Elektronenakzeptor, wozu der Wasserstoff von den Aromaten abbauenden auf die methanogenen Bakterien übertragen werden muß.

Die morphologisch heterogenen Methanbakterien gehören zu den Archaebakterien (Mah und Smith 1981, Woese 1987, Jones et al. 1987), da sie sich aufgrund zahlreicher biochemischer Merkmale wie Aufbau der Zellwand und der Zellmembran, Zusammensetzung der ribosomalen 16S-RNA und einiger Cofaktoren von den Eubakterien unterscheiden. Typischerweise enthalten Methanbakterien unter anderem den Cofaktor F 420 (Gorris und v. d. Drift 1986, Gorris et al. 1988b), der ihnen im UV-Licht ihre grüngelbe Fluoreszenz verleiht. Sie benötigen zum Wachstum ein strikt anaerobes Milieu mit einem Redoxpotential unter -300 mV (Bryant 1979) und mit Ausnahme der Gattungen *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanolobus*, *Methanococcoides*, *Halomethanococcus* und einigen taxonomisch nicht eingeordneten Isolaten (Jarrell und Kalmokoff 1988) wachsen alle Methanbakterien auf H_2 und CO_2. Acetat, ein weiteres Produkt des anaeroben Aromatenabbaus stimuliert das Wachstum vieler Methanbakterien, doch nur *Methanosaeta*- (Patel und Sprott 1990) und *Methanosarcina*-Arten sind

in der Lage, auf Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Erst durch neuere Untersuchungen wurde bekannt, daß methanogene Bakterien neben H_2 auch Ethanol (Frimmer und Widdel 1989) und sekundäre Alkohole wie 2-Propanol (Lalitha und Krishnan 1991), 2-Butanol und 2-Cyclopentanol (Zellner et el. 1990) als Elektronendonatoren verwerten können. Belay und Daniels (1990) zeigten, daß methanogene Bakterien CO_2 auch mit elementaren Metallen als Elektronendonoren zu Methan reduzieren können.

Die Wasserstoffübertragung von den aromatenabbauenden auf die methanogenen Bakterien via "interspecies hydrogen transfer" wird durch den direkten Kontakt der Zellen erleichtert (Conrad et al. 1985, Conrad et al. 1989). Dies begünstigt syntrophe Bakterien, die mit methanogenen Bakterien Flocken bilden können und reichert sie in syntrophen Mischkulturen an. Solche flockulierenden Kulturen besiedeln auch gut die in der anaeroben Abwasserreinigung eingesetzten Trägermaterialien, da sowohl bei der Flockenbildung als auch bei der Biofilmbildung auf festen Oberflächen die selben Mechanismen wie z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte und Bildung von Biopolymeren auf der Zelloberfläche wirksam sind (v. Loosdrecht et al. 1987a und 1987b).

In der vorliegenden Arbeit sollte der kontinuierliche anaerobe Abbau eines 3-Chlorbenzoesäure enthaltenden Modellabwassers in Festbettumlaufreaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob alle am anaeroben Abbau von 3-Chlorbenzoesäure beteiligten Bakteriengruppen an den Trägern adsorbierten und ob sich die Zusammensetzung der Biofilme in den Festbettumlaufreaktoren von den Batch-Kulturen unterschied. Weiterhin sollten Mikroorganismen isoliert und charakterisiert werden, die 3-Chlorbenzoesäure anaerob umsetzen können. Die physiologische Bedeutung der Umsetzung von 3-Chlorbenzoesäure in diesen Isolaten sollte dann geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.A. und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Aldrich (Steinheim) bezogen.

2.2. Organismen

Für die Untersuchungen zum anaeroben Abbau von 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) in Festbettumlaufreaktoren wurde eine im Institut für Biotechnologie-1 der KFA Jülich GmbH angereicherte Mischkultur verwendet. Diese strikt anaerobe Mischkultur wuchs auf 3-CBA als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Eigenschaften der Kultur wurden von Brunner (1987), Brunner et al. (1987) und Schoberth et al. (1988) beschrieben.

2.3. Medien und deren Herstellung

2.3.1 Medienzusammensetzung

Foldendes Grundmedium wurde für alle Versuche, soweit nicht anders angegeben, verwendet:

a.) Grundmedium (Widdel, 1980)

NaCl	20,0 $mmol \cdot l^{-1}$
MgCl	1,5 $mmol \cdot l^{-1}$
KCl	4,0 $mmol \cdot l^{-1}$
$CaCl_2$	1,0 $mmol \cdot l^{-1}$
NH_4Cl	5,0 $mmol \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	1,5 $mmol \cdot l^{-1}$
Resazurin (0,1%)	1,0 $ml \cdot l^{-1}$

Die einzelnen Medienbestandteile wurden aus 1 M Stammlösungen zusammenpipettiert. Für die Stammhaltung des isolierten sulfatreduzierenden Bakteriums wurden dem Medium 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Sulfat zugegeben. Weiterhin enthielt das Grundmedium die folgenden Komponenten:

b.) Vitaminlösung nach Balch et al. (1979):

Biotin	2 $mg \cdot l^{-1}$
Folsäure	2 $mg \cdot l^{-1}$
Pyridoxal-HCl	10 $mg \cdot l^{-1}$
Thiamin-HCl	5 $mg \cdot l^{-1}$
Riboflavin	5 $mg \cdot l^{-1}$
Nikotinsäure	5 $mg \cdot l^{-1}$
Vitamin B 12 (Cobalamin)	2 $mg \cdot l^{-1}$
p-Aminobenzoesäure	5 $mg \cdot l^{-1}$
Liponsäure	1 $mg \cdot l^{-1}$
Ca-Panthotenat	5 $mg \cdot l^{-1}$

Anwendung: 10 $ml \cdot l_{Medium}^{-1}$

c.) Spurenelemente SL 10 nach Immhoff-Stuckle et al. (1983):

HCl (7,7 M)	10 $ml \cdot l^{-1}$
$FeCl_2$	1500 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	70 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2$	100 $mg \cdot l^{-1}$
H_3BO_3	6 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2$	190 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2$	2 $mg \cdot l^{-1}$
$NiCl_2$	24 $mg \cdot l^{-1}$
Na_2MoO_4	36 $mg \cdot l^{-1}$

Anwendung: 1 $ml \cdot l_{Medium}^{-1}$

d.) Wolfram-Selen-Lösung:

$Na_2SeO_3 \cdot 5\ H_2O$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2WO_3 \cdot 2\ H_2O$	4 $mg \cdot l^{-1}$
NaOH	0,5 $g \cdot l^{-1}$

Anwendung: 1 $ml \cdot l_{Medium}^{-1}$

e.) Na_2S-Lösung (0,5 M), anaerob:

Um die Oxidationsschicht zu entfernen wurden die Na_2S-Kristalle mit H_2O gewaschen, abgetrocknet, gewogen und in anaerobisiertem H_2O gelöst. Die 0,5 M Lösung wurde unter N_2/CO_2 (80/20) in verschlossenen Gefäßen autoklaviert.

Anwendung: 3 $ml \cdot l_{Medium}^{-1}$

Der pH-Wert der Medien wurde mit 1,3 $g \cdot l^{-1}$ kristallinem $NaHCO_3$ unter Begasung mit N_2/CO_2 (80/20) eingestellt.

2.3.2. Herstellen von strikt anaeroben Medien

Zur Isolierung und Kultivierung von strikt anaeroben Mikroorganismen wurde die von Hungate (1950, 1969) entwickelte und von Miller und Wolin (1974) abgewandelte Anaerobtechnik eingesetzt. Ausführliche Beschreibungen finden sich bei Latham und Wolin (1978), Ljungdahl und Wiegel (1986) und Widdel (1980). Zum Entfernen des gelösten Sauerstoffes wurden die Medien einige Minuten aufgekocht und dann unter Begasung mit sauerstoffreiem Schutzgas im Eisbad abgekühlt. Mit kristallinem $NaHCO_3$ wurde der pH Wert unter ständiger Begasung mit N_2/CO_2 (80/20) auf 6,7 eingestellt. Die Lösung wurde mit 1,5 mM Na_2S reduziert und in zuvor mit Schutzgas gefüllte Gefäße abgefüllt. Damit sich die Stopfen während des Autoklavierens nicht lösten, wurden die Gefäße in eine Presse eingespannt oder die Stopfen mit Aluminiumkappen befestigt. Nach dem Autoklavieren wurden die Medien über Nacht stehengelassen, damit

sich das CO_2 zurücklösen konnte. Weitere Komponenten konnten mit anaerobisierten, sterilen Spritzen durch die Butylgummistopfen zugegeben werden.

Da sich die substituierten Aromaten nur schlecht in Wasser lösen, wurden die Stammlösungen mit 1 M NaOH bis zur vollständigen Lösung versetzt und anschließend auf das Endvolumen verdünnt. Der pH Wert dieser Stammlösungen lag dann zwischen 7 und 7,5.

Für die Batch-Versuche wurden mit schwarzen Butylgummistopfen (Bellco) verschlossene Kulturgefäße verwendet. Als Kulturgefäße dienten 25 ml Reagenzgläser (Bellco Nr. 2), 100 ml Serumkappen-Flaschen mit Serumstopfen (Bellco Glass, USA) sowie 500 ml Infusionsflaschen (B. Braun, Melsungen) mit Bellco Nr. 4 Stopfen und Schraubverschlüssen.

Die anaerobisierten und reduzierten Medien wurden unter N_2/CO_2 (80/20) aufbewahrt, das über einer Säule mit 220°C heißem Kupferkatalysator (Actimet 13, Dodduco Chemie, Sinsheim/Elsenz) von Resten an Sauerstoff gereinigt wurde. Zur Equilibrierung des Hydrogencarbonates der Medien mit dem CO_2 der Gasphase wurde das Schutzgas mit umgebogenen Kanülen über eine mit Watte gestopfte Spritze mehrere Minuten lang in die Flüssigkeit eingeleitet.

2.3.3. Anaerobes Überimpfen und Probenentnahme

Für steriles Überimpfen der Kulturen wurde das Schutzgas über sterile Watte durch ausgeglühte Kanülen in sterile Spritzen geleitet. In die geschlossenen Gefäße wurde vor der Entnahme von Kulturflüssigkeit das gleiche Volumen an Schutzgas gegeben um die Entstehung von Unterdruck zu verhindern.

Zur Bestimmung gasförmiger Metabolite oder des Wasserstoffverbrauches wurden die Kulturen zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Über etwa zur Hälfte mit dem entsprechenden Schutzgas gefüllte sterile Glasspritzen wurde ein Druckausgleich herbeigeführt und die Volumendifferenz bestimmt. Gasförmige Proben wurden bei

unsterilen Ansätzen direkt entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Da die hierzu verwendeten Hamiltonspritzen nicht autoklavierbar waren, wurden aus Reinkulturen 3 - 5 ml Gasproben mit sterilen Glasspritzen entnommen und kurzzeitig in pneumatischen Wannen mit Sperrflüssigkeit nach D'Ans und Lax (1967) aufbewahrt. Alle Gasmessungen wurden auf 20°C und 760 Torr bezogen.

2.3.4. Festbettumlaufreaktoren im Labormaßstab

Die Versuche zum kontinuierlichen anaeroben Abbau von 3-CBA wurden in Festbettumlaufreaktoren mit einem Flüssigkeitsvolumen von 330 ml durchgeführt (Abbildung 2.1). Alle Reaktoren wurden aus einem Vorratsgefäß mit anaerobem Nährmedium beschickt. Das Substrat wurde dem Umlauf zudosiert, der dem Substratfluß 10fach überlagert war und so für eine sofortige homogene Durchmischung der flüssigen Reaktorphase sorgte. Um ein Absinken des pH-Wertes durch entstehende HCl und Kohlensäure zu verhindern wurde der pH-Wert des Mediums mit steigenden 3-CBA-Konzentrationen durch größere Mengen Hydrogencarbonat erhöht. Dadurch konnte der pH-Wert in den Reaktoren in dem Bereich zwischen 6,6 und 6,8 gehalten werden. Die Biogasbildung wurde über eine Bürette gemessen, die mit Sperrflüssigkeit nach D'Ans und Lax (1967) gefüllt war.

2.3.5. Verwendete Trägermaterialien

Sowohl für die Untersuchungen zum kontinuierlichen Abbau von 3-CBA in Festbettumlaufreaktoren, als auch für die Untersuchungen zur Bindung der Mischkultur wurden die folgenden beschichteten Polyurethanschaumstoffe (PUR-Schaumstoffe) der Fa. Bayer (Leverkusen) verwendet:

PUR : PUR-Schaumstoff

PUR-B : mit Bindemittel beschichteter PUR-Schaumstoff

PUR-B 4,8%: mit Bindemittel und ca. 4,8% Kohle beschichteter PUR-Schaumstoff

PUR-B 33% : mit Bindemittel und ca 33% Kohle beschichteter PUR-Schaumstoff

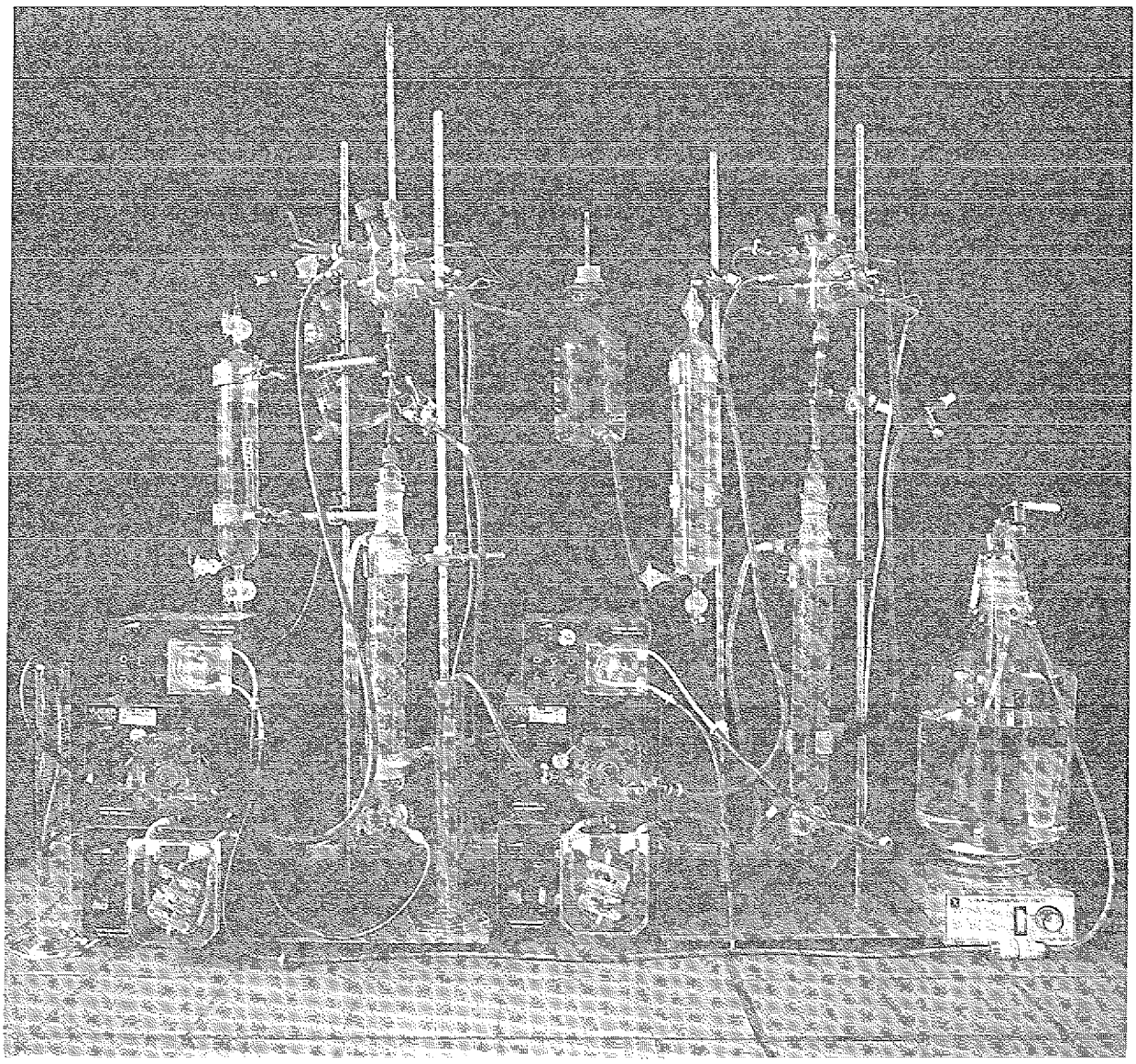


Abbildung 2.1: Zwei parallel betriebene Festbettumlaufreaktoren mit einem Flüssigkeitsvolumen von 330 ml.

Die etwa 0,5 cm^3 großen Schaumstoffstücke hatten Porengrößen von 0,05 bis 0,5 mm. Als Vergleichsmaterialien dienten Sinterglasringe (SG) der Fa. Schott (Mainz) und kommerzieller Braunkohlestaub (BKS, Kohlegehalt 93%), mit dem auch die PUR-Schaumstoffe teilweise beschichtet waren.

2.3.6. Isolierung anaerober Mikroorganismen

Die Isolierung von Einzelkolonien anaerober Bakterien erfolgte aus Agarrollröhrchen (Hungate 1969, Ljungdahl und Wiegel 1986). Dazu wurden die Röhrchen unter anaerober Begasung geöffnet, die Kolonien mit an der Spitze etwa 5 mm rechtwinklig umgeschmolzenen sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und in 1 ml flüssigem Medium suspendiert. Aus diesen Flüssigkulturen wurden sofort Verdünnungsreihen hergestellt, aus denen neue Rollröhrchen angeimpft wurden, um die Isolate auf Reinheit zu überprüfen.

2.3.7. Bestimmung von Lebendzellzahlen

Lebendzellzahlen wurden sowohl mit der Agarrollröhrchen-Methode (Hungate 1969, Ljungdahl und Wiegel 1986), als auch mit der "Most Probable Number" Methode (MPN, Cochran 1950) bestimmt. Nach Inkubation wurden die Kolonien in den Rollröhrchen ausgezählt und die bewachsenen Flüssigkulturen (Substratabnahme oder Bildung von Metaboliten) nach den von Haas (1989) berechneten Tabellen ausgewertet.

2.3.8. Anaerobe Dichtegradientenzentrifugation der Mischkultur

Die Anreicherung 3-CBA verwertender Bakterien durch Dichtegradientenzentrifugation erfolgte nach Scherer (1983). Dazu wurde die Mischkultur mit zuvor anaerobisiertem und reduziertem Percoll mit 0,21 M NaCl in einem Verhältnis von 30:70 gemischt und unter Schutzgas in Ultrazentrifugenröhrchen (Fa. Beckmann, No. 342 413) gefüllt, die anschließend zugeschweißt wurden. Die Röhrchen wurden in einem Ti 50 Rotor 30 min bei 25 TRpm, entsprechend 40.000 g in einer Beckmann L7-55 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Spitze des Zentrifugenröhrchens abgeschnitten und mit N_2/CO_2 (80/20) begast. Zur Entnahme der Bakterien wurde das Zentrifugenröhrchen seitlich unterhalb der Bakterienschicht mit einer sterilen anaerobisierten Spritze angestochen und die Bakterien entnommen. Um die Zerstörung des Dichtegradienten zu

verhindern, wurden die Bakterienbanden von oben beginnend entnommen. Die in Percoll suspendierten Bakterien wurden dann in anaerobem Medium verdünnt und in Rollröhrchen vereinzelt. Die Bestimmung der Dichte der Bakterienbanden erfolgte über den Vergleich mit Dichtemarkern die einem mitzentrifugierten Vergleichsröhrchen zugegeben worden waren.

2.4. Analysen- und Meßmethoden

2.4.1. Bestimmung organischer Substanzen

Methanol, Ethanol, Acetat und Propionat wurden in einem Hewlett Packart 5840 A Gaschromatographen mit einem Flammionisationsdetektor (FID) quantitativ bestimmt. Dazu wurden die abzentrifugierten Proben 1:1 mit 20 mM Iso-Butanol in 0,2 M HCl als internem Standard versetzt. Die Probenflasche wurde verschlossen und 1 µl dieses Gemisches in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Betriebsbedingungen waren (Holdeman et al. 1977):

Säule	:	Glas 2 m x 2 mm i. D. (Werner Günther Analysentechnik, Düsseldorf)
Säulenmaterial	:	Porapak QS, 80 - 100 mesh
Ofentemperatur	:	170°C
Injektortemperatur	:	230°C
Detektortemperatur	:	230°C
Trägergas	:	N_2; 30 $ml \cdot l^{-1}$

Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 0,2 und 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$.

Die Bestimmung nichtflüchtiger organischer Säuren wie Pyruvat, Laktat, Fumarat und Succinat erfolgte ebenfalls gaschromatographisch. Dazu mußten die betreffenden Säuren erst in ihre Methylester überführt werden. 1 ml der abzentrifugierten Proben wurde mit 2 ml Methanol, 0,4 ml 50% H_2SO_4 und 0,1 ml einer 55 mM Malonsäurelösung als internem Standard versetzt und an-

schließend für 30 min. bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Nach etwa 10 minütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 ml H_2O und 0,5 ml Chloroform zugesetzt und die Methylester durch leichtes Schütteln aus der Wasserphase extrahiert (Laanbroek 1982). Mit einer Mikroliterspritze wurde am nächsten Tag ein Aliquot der Chloroformphase direkt in den Gaschromatographen injiziert und bei folgenden Bedingungen analysiert (Holdeman et al. 1977):

Gaschromatograph	: Varian 3700
Säule	: Chromosorb WAW 10% P 1000 3% H_3PO_4
Säulentemperatur	: 120°C
Injektortemperatur	: 210 °C
Detektortemperatur (FID)	: 250°C
Trägergas	: N_2 (30 ml/min.)
Injektionsvolumen	: 1 µl

Die Nachweisgrenzen für alle Substanzen lagen zwischen 0,05 und 0,1 mM.

Der Methangehalt der Gasphase wurde bestimmt, indem nach Druckausgleich mittels einer Hilfskanüle eine Mikroliterspritze (25 µl, Hamilton) durch den Stopfen gestochen, eine Gasprobe entnommen und in den Gaschromatographen injiziert wurde. Da die verwendeten Mikroliterspritzen nicht autoklavierbar waren, wurde bei sterilen Ansätzen eine definierte größere Menge (10-50 ml) Gases entnommen und in ein Reagenzglas injiziert. Das Glas war oben mit einem Butylgummistopfen verschlossen und unten offen. Es stand in einem Erlenmeyerkolben mit Sperrflüssigkeit und war blasenfrei mit dieser gefüllt, so daß das eingespritzte Gas in seiner Zusammensetzung nicht verändert wurde. Wie oben beschrieben, wurden daraus Proben gezogen und in einem Gaschromatographen bei folgenden Betriebsbedingungen auf den Methangehalt analysiert (Belay und Daniels 1987):

Gaschromatograph	: Packard 428/603
Säule	: Glas 1m x 2mm i.D.
-	(WGA,Düsseldorf)
Säulenmaterial	: Porapack QS, 80-100 mesh
Säulentemperatur	: 145 °C
Injektortemperatur	: 130 °C
Detektortemperatur (FID)	: 160 °C
Trägergas	: Stickstoff 30 ml/min
Probenvolumen	: 10 µl
Verstärkung	: 64/128

Die Bestimmung von CH_4, CO_2, N_2, H_2 und H_2S im Gasraum der Kulturgefäße erfolgte in einem Gaschromatographen mit Kapillarsäulen und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) unter folgenden Bedingungen (Ney et al. 1990):

Gaschromatograph	: Chrompack 438 A
Säulen	: Poraplot Q FS 25 m x 0,32 mm i.D.
	Molsieve 5 Å 25 m x 0,32 mm i.D.
Säulentemperatur	: 30 °C
Injektortemperatur	: 25 °C
Detektortemperatur	: 120 °C
Filamenttemparatur	: 200 °C
Trägergas	: Helium (10ml/min; Split 1:2,5)
	: Stickstoff (40 ml/min Split 1:10)

Mit Helium als Trägergas war es möglich, Wasserstoffkonzentrationen ≥ 5 ppm (0,0005%) in Gasproben nachzuweisen. Die Eichung erfolgte mit Eichgasen (Stimotron, Garmisch). Bei einem Injektionsvolumen von 1 ml war die Eichkurve für die Messungen mit der 5 Å Molsieve-Analysensäule von 0,0005%-100% Wasserstoff linear. Kohlendioxid, Methan, Schwefelwasserstoff und Stickstoff wurden auf der Analysensäule Poraplot Q mit einem Injektionsvolumen von 250 µl bestimmt. Die Nachweisgrenzen waren für Methan 0,01%, Kohlendioxid 0,1% und Schwefelwasserstoff 0,1%. Die Eichung für Methan und Kohlendioxid erfolgte mit Gasen von Messer-Griesheim. Schwefelwasserstoff wurde durch Ansäuern einer gesättigten Na_2S-Lösung in einem blasenfrei gefüllten und verschlossenen Reaktionsglas erzeugt

(Hollemann und Wiberg 1956) und mit einer Glasspritze aufgefangen. Vor jeder Injektion wurde der Schwefelwasserstoff auf die entsprechende Konzentration mit Argon verdünnt. Zum Nachweis von höheren Konzentrationen (> 1%) an H_2, CO_2 und CH_4 wurde anstelle von Helium Stickstoff als Trägergas verwendet.

Substituierte Benzoesäuren und substituierte Benzylalkohole wurden mit einer HPLC quantitativ bestimmt. Die zentrifugierten und sterilfiltrierten Proben wurden in Probenflaschen abgefüllt, die mit Aluminiumkappen verschlossen wurden. Die Messung erfolgte in einer HPLC-Anlage der Firma Merck (Darmstadt) mit einer Gradientenpumpe und UV-Detektor. Die Analysenbedingungen für die routinemäßige Bestimmung von BOH, BA, 3-CBOH und 3-CBA waren (Folkerts et al 1989):

Laufmittel A	:	95% Methanol in H_2O
Laufmittel B	:	0,1% Phosphorsäure
Mischungsverhältnis	:	40 zu 60, isokratisch
Fluß	:	0,75 $ml \cdot l^{-1}$
Detektionswellenlänge	:	210 nm
Säule	:	125 mm Länge, 4 mm i.D.
Säulenmaterial	:	Sphaerisorb 5, ODS 1 (CS-Chromatographie Service, Langerwehe)
Injektionsvolumen	:	10 µl

Die unteren Nachweisgrenzen lagen bei 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Konzentrationen oberhalb 5 - 8 $mmol \cdot l^{-1}$ konnten nicht mehr bestimmt werden. Die Bestimmung weiterer substituierter Benzoesäuren erfolgte mit ansonsten unveränderten Bedingungen in einem Gradienten von 100% 0,1%iger Phosphorsäure zu 100% 95%igem Methanol in 30 min (Zellner et al. 1990).

2.4.2. Bestimmung anorganischer Ionen

Die Bestimmung von H_2S in Fermentationsproben erfolgte nach der Methode von Pachmayr (1960). Hierbei wird aus N,N-Dimethyl-p-phenylendiammonium und H_2S Leukomethylenblau gebildet, das durch

Fe^{3+}-Ionen zu Methylenblau oxidiert wird und photometrisch erfaßbar ist.

Benötigte Reagenzien:

Lösung A:	Zn-Acetat	2,0 g
	H_2O	ad 100 ml
Lösung B:	NaOH	4 g
	H_2O	ad 100 ml
Lösung C:	N,N-Dimethyl-p-phenylen-diammounium-dichlorid	2 g
	H_2SO_4, konz.	200 ml
	H_2O	ad 1000 ml
Lösung D:	Eisen (III)-ammonium-sulfat x 12 H_2O	10 g
	H_2SO_4, konz.	2 ml
	H_2O	ad 100 ml

Nachdem in einen 50 ml Meßkolben 30 ml H_2O, 0,5 ml Lösung A und 1 ml Lösung B gemischt worden waren, wurde ein Probenvolumen von 0,1 bis 1 ml (je nach Sulfidgehalt) zugegeben. Nach Zugabe von 5 ml Lösung C, Mischen und Hinzufügen von 0,25 ml Lösung D, wurde der Ansatz mit H_2O auf 50 ml aufgefüllt. Nach 5 min. Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 670 nm gegen einen Leerwert ohne Sulfid gemessen. Die Eichgrade wurde mit einer Natriumsulfid-Standardlösung erstellt und war über den Bereich von 0,1 - 1,2 $\mu mol_{Sulfid} \cdot l^{-1}$ im Testansatz linear.

Die Bestimmung von gelöstem Sulfit erfolgte ebenfalls nach Pachmayr (1960). Fuchsin reagiert dabei in schwefelsauerer Lösung spezifisch mit den Sulfitionen und bildet einen roten Farbkomplex der photometrisch erfaßt werden kann.

Benötigte Reagenzien:

Fuchsin Reagenz:	Fuchsin	400 mg
	2,4 M H_2SO_4	ad 1 l
Formaldehyd :	Formaldehyd, 37%	74,8 ml
	H_2O	ad 100 ml

In einem 100 ml Meßkolben wurden 10 ml Fuchsin Reagenz mit 70 ml H_2O und einem entsprechenden Probenvolumen (10-160 µg SO_3^{--}/ Ansatz) gemischt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml der Formaldehydlösung (10 M) wurde der Ansatz mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt und nach weiteren 10 min. Reaktionszeit die Extinktion bei 570 nm gegen einen Reagentienleerwert bestimmt. Mit Na_2SO_3 wurde eine Eichkurve erstellt, die im Bereich von 10 - 160 µg SO_3^{--}/ Ansatz linear war.

Sulfationen bilden im salzsauren Medium mit Barium einen unlöslichen Niederschlag, der als Trübung im Photometer erfaßt werden kann (Deutsches Einheitsverfahren 1987). Folgende Reagenzien wurden dazu benötigt:

Konditionsreagenz:	Glycerin	50 ml
	HCl konz.	30 ml
	NaCl	75 g
	Ethanol	100 ml
	H_2O	300 ml

Bei den Bestimmungen wurden zunächst 2 ml einer zentrifugierten Probe mit 0,1 ml Konditionsreagenz versetzt und gemischt. Nach der Zugabe einer Spatelspitze $BaCl_2$ und 1 minütigem Mischen auf dem Whirlmix wurde im Photometer die Trübung bei 420 nm bestimmt. Eine mit Na_2SO_4 aufgenommene Eichkurve war in dem Konzentrationsbereich von 0 - 1 mM Sulfat linear. Über eine Kontrolle ohne $BaCl_2$ konnten störende Einflüsse durch gefärbte Proben korrigiert werden.

2.5. Biomassebestimmungen

2.5.1. Trübungsmessungen an Bakterienkulturen

Das Wachstum in Reagenzgläsern wurde direkt im Photometer (Milton Roy, Spectronic 301) durch Messung der Extinktion bei 660 nm bestimmt (Koch 1981). Auf den Röhrchen wurde die Position minimaler Absorption markiert und alle Messungen in dieser Position durchgeführt. Bei anderen Kulturgefäßen wurde die optische Dichte von

Proben in einer 1 ml-Küvette bei 660 nm gegen Wasser bestimmt.

2.5.2. Trockengewichtsbestimmung

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden zunächst Aluminiumschälchen über Nacht bei 105 °C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Dann wurden 20 ml Probe abzentrifugiert (20 min., 12000 x g). Das Pellet wurde dann mit Ammoniumacetatpuffer (50 $mmol \cdot l^{-1}$ pH 7,0) gewaschen und abzentrifugiert, sodann in wenig Wasser aufgenommen, in die Aluminiumschälchen überführt und bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen (Gerhardt 1981).

2.5.3. Proteinbestimmung

Je 1 ml Kulturprobe wurde mit einer Tischzentrifuge (10 min., 13000 Rpm, Fa. Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,5 ml 1 N NaOH resuspendiert, 15 min bei Zimmertemperatur und anschließend fest verschlossen 5 min bei 96 °C inkubiert (Inkubator für Eppendorf Reaktionsgefäße). Nach 5 min. Abkühlen im Eisbad wurde abermals abzentrifugiert. Der Überstand wurde im folgenden Test eingesetzt. In einem Reagenzglas wurden auf 100 µl dieses Überstandes je 5 ml Bradford-Reagenz (40 mg Serva Blau G + 80 ml Ethanol + 100 ml 85% ige Phosphorsäure, $H_2O_{Bidest.}$ ad 1l, nach Bradford (1976)) zugemischt und nach 1 min. die Extinktion bei 578 nm mit einem Photometer (Shimadzu UV 160 A) bestimmt. Der Blindwert wurde mit Wasser bestimmt. Für die Auswertung wurde dieser Blindwert von den Extinktionswerten subtrahiert. Die Eichkurve mit Rinderserumalbumin war im Konzentrationsbereich von 0-50 $mg_{Protein} \cdot l^{-1}$ linear.

2.5.4. Aktivitätsbestimmungen

Da die maximalen Umsatzaktivitäten der trophischen Gruppen in der Mischkultur nur sehr gering waren, wurden die Aktivitätsmessungen mit wachsenden Kulturen durchgeführt, um Meßungenauigkeiten auszugleichen (Dolfing und Bloemen 1983, Gorris und v. d.

Drift 1986). Für die Messungen wurden Kulturröhrchen mit den Substraten der trophischen Gruppen angeimpft und in regelmäßigen Abständen die abgebaute Substratmenge, bzw. die zwischen den Meßpunkten gebildete Methanmenge bestimmt. Die zwischen den Bestimmungen umgesetzte Substratmenge wurde durch die Zeit zwischen den Meßpunkten geteilt und die so errechneten Umsatzraten wurden als Maß für die Biomasse der entsprechenden trophischen Gruppen in diesem Zeitintervall angesehen. Nach Linearisierung durch halblogarithmische Auftragung wurden die resultierenden Geraden zur Ordinate verlängert, um die Aktivität der trophischen Gruppe in der Probe zum Zeitpunkt des Beginns der Messung zu ermitteln. Unterbrechungen des Wachstums wurden verhindert, indem alle Transfers im Brutraum bei 30°C und mit vorgewärmten Kulturröhrchen durchgeführt wurden. Methanbildungsraten wurden in Acetat- und Wasserstoffverbrauchsraten umgerechnet. Unter der Vorraussetzung, daß alle Zellen gleich aktiv waren, wurden die so errechneten Abbau-und Methanbildungsraten als Maß für die Anzahl der aktiven Zellen der jeweiligen physiologischen Gruppe in der Kultur angesehen.

Für die Bestimmungen der Umsatzaktivitäten in den Festbettumlaufreaktoren wurde der Zulauf gestoppt, die entsprechenden Substrate der zu messenden trophischen Gruppen zugegeben und deren Abbau verfolgt (Kaspar und Wuhrmann 1987). Die Substratkonzentrationen in den Reaktoren wurden über der Zeit aufgetragen und die maximalen Umsatzraten aus den linearen Anteilen der Abbaukurven berechnet, in denen Substratsättigung der Bakterien vorlag. Folgende Substratkonzentrationen wurden eingesetzt:

3-CBA	3,5 $mmol \cdot l^{-1}$
BA	8,0 $mmol \cdot l^{-1}$
Acetat	20 $mmol \cdot l^{-1}$

Die zugesetzten Substratmengen wurden in jeweils 6 - 8 h umgesetzt und die erwarteten Methanmengen wurden zu 95 - 108% gefunden. Zur Bestimmung der maximalen Wasserstoffverbrauchsrate wurde der Gasraum mit H_2/CO_2 gespült und das Gas mit dem Umlauf durch die Flüssigphase des Reaktors gepumpt. An der Bürette konnte die verbrauchte Gasmenge abgelesen werden. Der Gasverbrauch über der Zeit war bis zu einer Methankonzentration von 35

- 40 %, entsprechend einer Wasserstoffkonzentration von 50% in der Gasphase linear und sank bei höheren Methankonzentrationen ab.

2.5.5. DNA Bestimmung

Die Bestimmung der Gesamtmenge an DNA in der Mischkultur erfolgte nach der Methode nach Burton (1956), bei der DNA mit Diphenylamin in essigsaurer Schwefelsäure einen Komplex bildet, der bei 600 nm im Photometer erfaßt werden kann.

Zunächst wurden die Zellen geerntet und in eisgekühltem Saline-Citrat-Puffer aufgenommen. Bewachsene Trägerstücke wurden direkt in eiskalten Saline-Citrat Puffer überführt und mit 1/10 des Volumens eiskalter 2,5 N Perchlorsäure versetzt. Nach 30 min im Eisbad wurde 10 min bei 10.000·g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml 0,5 N Perchlorsäure resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min unter gelegentlichem Mischen auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abzentrifugieren (10 min, 5.000·g) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in 4 ml 0,5 N Perchlorsäure extrahiert. Die beiden Extrakte wurden vereinigt und das Volumen bestimmt.

Zwei ml der vereinigten Extrakte wurden mit 4 ml Diphenylamin-Acetaldehyd-Lösung versetzt und 20 h bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden trübe Ansätze abzentrifugiert (15 min., 10.000·g) und die Extinktion der Überstände bei 600 nm bestimmt. Für die Durchführung wurden folgende Reagenzien benötigt:

Perchlorsäure		0,5 N
Perchlorsäure		1,0 N
Perchlorsäure		2,5 N
Diphenylamin Reagenz	Diphenylamin	1,5 g
	Essigsäure abs.	100 ml
	Schwefelsäure konz.	1,5 ml
Saline-Citrat Lösung	NaCl	8,8 g
	NaCitrat	4,4 g
	H_2Obidest.	ad 1000 ml
	pH	7

Acetaldehyd Lösung	Acetaldehyd	1	ml
	$H_2O_{bidest.}$	49	ml
Diphenylamin Gebrauchslösung: am Tag der Bestimmung herzustellen			
	Acetaldehyd Lösung	1	ml
	Diphenylamin Reagenz	200	ml
DNA-Stammlösung	DNA	4	mg
	NaOH 5mM	10	ml

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde die DNA Stammlösung 1:1 mit 1 N Perchlorsäure versetzt und 15 min auf 70 °C erhitzt. Aus der hitzebehandelten DNA-Lösung wurden Verdünnungen (5 - 100 µg/ml) mit 0,5 N Perchlorsäure hergestellt und im Photometer bestimmt.

2.6. Mikroskopische Untersuchungen

2.6.1. Lichtmikroskop

Zur mikroskopischen Untersuchung der Organismen diente ein Photomikroskop III (Zeiss, Oberkochen), das mit einer Phasenkontrasteinrichtung und einem Fluoreszenz-Auflicht-Kondensor III RS (Zeiss, Oberkochen) ausgerüstet war. Die Anregungswellenlänge lag bei 390 - 440 nm. Um die zu photographierenden Organismen möglichst in eine Schärfenebene zu bringen, wurden agarbeschichtete Objektträger benutzt (Brunner 1987).

2.6.2. Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Proben wurden über Nacht in 2,5%iger Glutaraldehydlösung fixiert, mit H_2O gewaschen und in einer aufsteigenden Acetonreihe getrocknet. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Kohlendioxid nach der Methode von Anderson (1951) gefriergetrocknet (sog. Kritische-Punkt-Trocknung), auf den Objekthalter mit Klebeband aufgeklebt und mit Gold gesputtert. Die REM-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Els (Institut für Reaktorwerkstoffe, KFA Jülich) mit einem Leitz AMX REM-Mikroskop durchgeführt.

2.6.3. Färbungen

Für die Färbungen wurden die zu untersuchenden Bakterien zunächst auf Objektträgern hitzefixiert. Die Gramfärbung wurde mit der von Drews (1983) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Geißelfärbung erfolgte nach der von Doetsch (1981) beschriebenen Methode nach Leifson.

2.7. Bestimmung des GC-Gehaltes der Bakterien-DNA

2.7.1. Extraktion der Bakterien-DNA

Die Extraktion der Bakterien-DNA erfolgte nach einer von Skyring (1972) beschriebenen Modifikation der Methode von Marmur (1961). Dazu wurden die folgenden Lösungen benötigt:

Saline/EDTA	NaCl	4,4	g
	EDTA	16,4	g
	pH	8	
	$H_2O_{bidest.}$	ad 1000	ml
SDS-Lösung	SDS	2,5	g
	$H_2O_{bidest.}$	10	ml
Perchlorat	$NaClO_4$	14	g
	$H_2O_{bidest.}$	20	ml
Chloroform/Butanol	Chloroform	400	ml
	Iso-Butanol	100	ml
Saline/Citrat-Puffer (10fach konzentriert)			
10·SSC	NaCl	17,5	g
	$Na_3Citrat \cdot 2H_2O$	4,4	g
	pH	7	
	$H_2O_{bidest.}$	ad 100	ml

Diese Lösung wurde 1:10 (SSC) und 1:100 (1/10 SSC) verdünnt.

Acetat/EDTA	$NaAcetat \cdot 3H_2O$	4,1	g
	EDTA	0,003	g
	pH	7	
	$H_2O_{bidest.}$	ad 10	ml

RNAse	Ribonuclease	1	mg
	H_2Obidest.	1	ml
	Diese Lösung wurde 10 min. auf 80°C erhitzt, um eventuell vorhandene DNAse Aktivitäten zu zerstören		
Proteinase	Proteinase K	2,5	mg
	Saline/EDTA	1	ml
Isopropanol			
Ethanol 96%			

Etwa 2 g (Feuchtgewicht) Zellen wurden in 10 ml Saline/EDTA suspendiert und in der French Pressure Cell (Fa. Aminco No. 8408057) bei 1000 psi (Zelldruck 16.000 psi) aufgeschlossen. Anschließend wurde mit Saline/EDTA auf 25 ml aufgefüllt und mit 1 ml der SDS Lösung eine Endkonzentration von 1% SDS eingestellt. Nach 10 minütigem Erhitzen auf 60°C und Abkühlung im Eisbad wurde mit Perchlorat eine Endkonzentration von 1 M Perchlorat eingestellt. Diese Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform/Butanol versetzt und 30 min. leicht geschüttelt, bis sich eine Emulsion gebildet hatte. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 17.000·g) getrennt und die wäßrige Oberphase erneut extrahiert, bis kein Proteinniederschlag mehr erkennbar wurde.

Die wäßrige Phase mit der darin gelösten DNA wurde abgekühlt und mit kaltem Ethanol (-20°C) versetzt. Das entstehehnde DNA-Präzipitat wurde auf einen Glasstab aufgewickelt, an der Luft getrocknet und erneut in 20 ml 1/10 SSC gelöst. Nach Zugabe von 1ml RNAse-Lösung und 0,5 ml Proteinase Lösung wurde über Nacht bei 30°C inkubiert und am nächsten Morgen mit 2,2 ml 10fach konzentrierter SSC auf einfache SSC Konzentration eingestellt.

Nach einer weiteren Chloroform/Butanol Extraktion wurde die DNA erneut mit eiskaltem Ethanol gefällt und in 9 ml 1/10 SSC gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Acetat/EDTA wurden tropfenweise 5,4 ml Isopropanol zugegeben, wobei die entstehenden DNA-Fäden auf einen Glasstab aufgewickelt wurden. Diese DNA-Präparation wurde in 5 ml SSC gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2. Bestimmung des %GC-Gehaltes der DNA

Bei Erwärmung schmilzt doppelsträngige DNA, was sich in einer Extinktionszunahme bei 260 nm darstellt und im Photometer gut erfaßbar ist. Die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA geschmolzen ist, ist von dem GC%-Gehalt der DNA abhängig und wird als Schmelzpunkt bezeichnet.

Da die Schmelztemperatur von der Ionenstärke des verwendeten Puffers abhängt, wurden alle DNA Präparationen und die Standardlösungen 14 h gegen SSC dialysiert (Johnson 1981). Die dialysierten Proben wurden mit dem selben Ansatz SSC auf Extinktionen von 0,1 verdünnt und in einem Zeiss Photometer ZM 4, das an ein mit Ethylenglycol gefülltes Wasserbad angeschlossen war, schrittweise erhitzt. Die Temperaturmesssung erfolte mit einem wärmeisolierten elektrischen Temperaturfühler.

Die Schmelzpunkte wurden graphisch ermittelt und nach den Gleichungen von DeLey (1972) in %GC der DNA umgerechnet. Zur Korrektur des Faktors wurden die Schmelzpunkte von DNA aus E. coli und dem Phagen lambda bestimmt.

2.8. Nachweis von Desulfoviridin

Desulfoviridin ist die für einige Gattungen der Sulfat reduzierenden Bakterien charakteristische Sulfitreduktase und läßt sich nach alkalischem Aufschluß der Zellen unter UV-Licht nachweisen (Postgate 1959, 1984). Dazu wurden 10 ml Kulturflüsssigkeit abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Saline aufgenommen. Nach Zugabe eines Tropfens 20% NaOH konnte vorhandenes Desulfoviridin an der roten Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht bei 365 nm erkannt werden.

2.9. Enzymatische Bestimmungen

2.9.1. Herstellung zellfreier Extrakte

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten wurde der isolierte *Desulfovibrio vulgaris* Stamm Pyl auf 50 mM Pyruvat mit 5 mM Sulfit angezogen. Wenn das Pyruvat nahezu vollständig verbraucht war, wurden die Zellen unter einer Argon Gasphase in einer Beckman Zentrifuge (Modell J-21-C, JA 10 Rotor, 8000 x g 4 ^{o}C) abzentrifugiert. Die folgende Herstellung zellfreier Extrakte unter anaeroben Bedingungen wurde nach Ljungdahl und Andreesen (1978) durchgeführt. Etwa 1 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 5 ml Puffer folgender Zusammensetzung resuspendiert:

50	mM	Phosphat-Puffer (pH 6,8)
2	mM	Na-Dithionit
0,1	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
1	µg/ml	DNase I

Die Zellen wurden unter Argonbegasung mit einer vorgekühlten French Pressure Cell (No. 8408057, Fa. Aminco) bei einem Druck von 1000 psi (Zelldruck 16000 psi) aufgeschlossen. Nach mikroskopischer Kontrolle des Lysegrades (80-90%), wurde das Homogenat 20 min bei 14000 · g unter anaeroben Bedingungen abzentrifugiert. Der klare Überstand (Rohextrakt) diente für die sich sofort anschließenden enzymatischen Bestimmungen.

Die Abtrennung der Membranfraktion aus den Rohextrakten erfogte durch 1stündige Ultrazentrifugation in einem Ti 50 Rotor bei 40000·g und 4°C. Die pelletierten Membranen wurden in anaerobem Puffer unter Schutzbegasung resuspendiert und gewaschen.

Zur Herstellung anaerober Bedingungen wurden sämtliche verwendeten Pufferlösungen mit vorher ausgekochtem und unter Argon-Begasung abgekühltem H_2O angesetzt. Die verwendeten Testgefäße wurden vor Versuchsbeginn mit einem Gummistopfen verschlossen und 10 min. mit Argon oder Wasserstoff durchspült. Vor der Zugabe des Rohextraktes wurden 10 - 15 µl einer 0,2 M Na-Dithionitlösung durch den Stopfen

in die Küvette injiziert, so daß sich der Farbstoff Methylviologen leicht blau färbte und ein Redoxpotential unter -400 mV anzeigte. Sämtliche Testreagentien wurden mit gasdichten, Argon gespülten Mikroliterspritzen (Fa. Hamilton, Darmstadt) in die Küvette überführt. Alle enzymatischen Bestimmungen wurden bei 37°C durchgeführt.

2.9.2. Hydrogenase

Die Hydrogenase-Aktivität wurde über die Oxidation reduzierten Methylviologens (MV) gemessen. Die Oxidation konnte photometrisch über die Extinktionsabnahme bei 578 nm (Σ_{578} = 9000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) verfolgt werden. Die Bestimmung erfolgte bei 37 °C in modifizierter Form nach Schauder (1986). Nach Beendigung der Reaktion konnte im Gasraum der Küvette Wasserstoff nachgewiesen werden.

Testansatz			Konzentration im Test
0,9	ml	0,05 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,8	45 mM
0,02	ml	0,05 M Methylviologen	1 mM
0,04	ml	50 mM Dithiothreit	2 mM
10	µl	0,1 M $MgCl_2$	1 mM
		einige Körnchen Na-Dithionit bis der Küvetteninhalt eine Extinktion von 0,75 bis 1,0 hatte	
10 - 30	µl	Rohextrakt	

2.9.3. Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase

Die Bestimmung der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase erfolgte ebenfalls nach Schauder (1986) in demselben Testansatz wie die Bestimmung der Hydrogenase mit Methylviologen als Elektronenakzeptor. Nachdem die Extinktion auf etwa 0,1 bis 0,2 abgesunken war, wurden Coenzym A und Pyruvat zugesetzt und die Reduktion des Methylviologens bei 578 nm im Photometer verfolgt.

Testansatz		Konzentration im Test
0,9 ml	0,05 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,8;	45 mM
0,02 ml	0,05 M Methylviologen	1 mM
0,04 ml	50 mM Dithiothreit	2 mM
10 µl	0,1 M $MgCl_2$	1 mM
20 µl	Coenzym A	1 mM
10 µl	0,5 M Pyruvat	5 mM
10 - 30 µl	Rohextrakt	

2.9.4. 3-Chlorbenzoesäure Reduktase

Die Bestimmung der 3-Chlorbenzoesäure Reduktase erfolgte über die Bestimmung des gebildeten 3-Chlorbenzylalkohols. Dazu wurde der Testansatz unter Wasserstoff über Nacht inkubiert und der gebildete 3-Chlorbenzylalkohol nach Ende der Inkubation mit einer HPLC bestimmt. Die während der Reaktion oxidierten Elektronenüberträger wurden durch die vorhandene Hydrogenase durch Wasserstoff regeneriert. Der Test erfolgte in modifizierter Form nach White et al. (1989) und Fraisse et al. (1988).

Testansatz		Konzentration im Test
0,9 ml	0,05 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,35	45 mM
0,02 ml	0,05 M Methylviologen	1 mM
0,04 ml	0,25 mM Dithiothreit	10 mM
10 - 30 µl	Rohextrakt	

Die Inkubation erfolgte unter Wasserstoff auf einem Rundschüttelgerät (New Brunswick) bei 200 Rpm im Brutraum.

Soweit nicht anders angegeben, wurde in allen Tests Wasserstoff als Elektronendonor eingesetzt. Für die Koppelung der Reduktion von 3-CBA an die Oxidation von Pyruvat zu Acetat und CO_2 wurden dem Test zusätzlich folgende Substanzen zugesetzt:

10 µl	0,1 M $MgCl_2$	1 mM
20 µl	Coenzym A	1 mM
10 µl	0,5 M Pyruvat	5 mM
unter Argon		

2.9.5. 3-Chlorbenzaldehyd Dehydrogenase

Mit Methylviologen als Elektronenakzeptor konnte die Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd zu 3-Chlorbenzoesäure im Photometer bei 578 nm verfolgt werden. Die Bestimmung erfolgte nach White et al. (1989) und Fraisse et al. (1988). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Aldehyds gestartet.

Testansatz		Konzentration im Test
0,95 ml	0,1 M Tris-HCL-Puffer pH 9,0	95 mM
0,02 ml	0,05 M Methylviologen	1 mM
0,02 ml	10 mM 3-Chlorbenzaldehyd	0,2 mM
10 - 30 µl	Rohextrakt	

3. Ergebnisse

3.1 Bindung der Mikroorganismen an die Trägermaterialien

3.1.1. Einfluß der Trägermaterialien auf die Methanbildung aus 3-Chlorbenzoesäure

Es ist bekannt, daß Aktivkohle organische Substanzen adsorbiert (McKay und Bino 1988). Der für die Beschichtung der Trägermaterialien verwendete Braunkohlestaub adsorbierte jedoch die 3-Chlorbenzoesäure nicht. Um zu überprüfen, ob die Trägermaterialien die Methanbildung aus 3-Chlorbenzoesäure durch die anaerobe

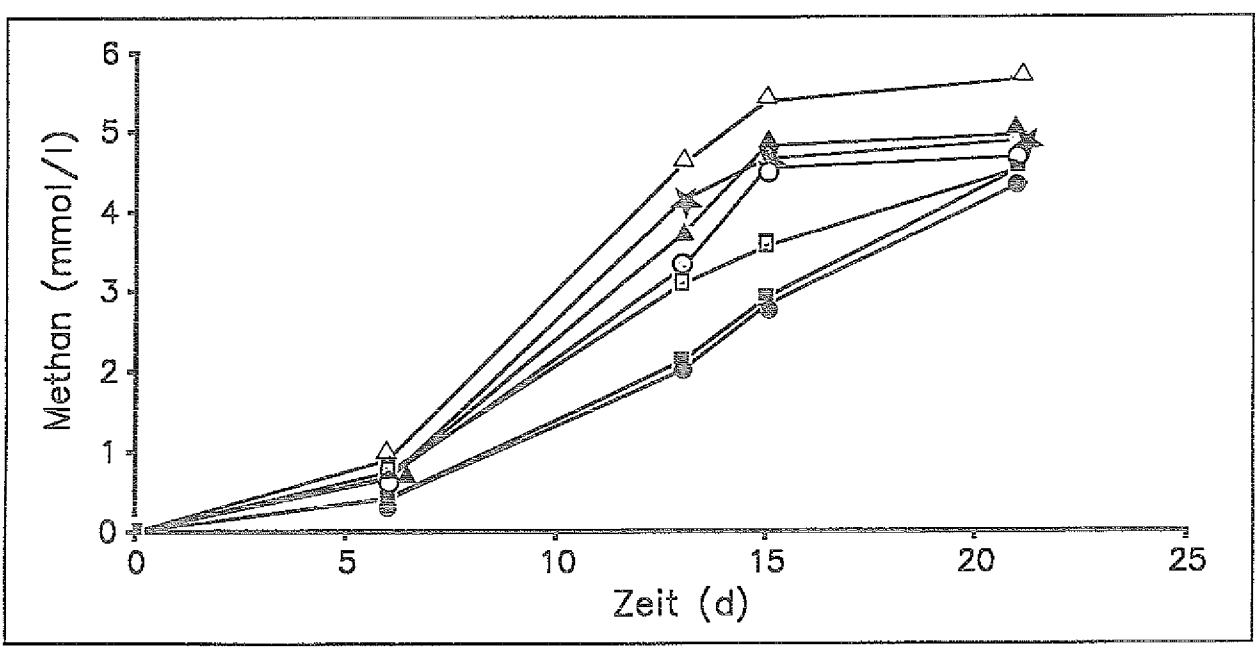


Abbildung 3.1: Methanbildung ($mmol \cdot l^{-1}$) aus 1,5 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1}$ während der Inkubation der Mischkultur mit den Trägermaterialien bei pH 6,7 und 30°C. Die eingesetzten Träger waren Sinterglas (■), Schaumstoff PUR (□), beschichteter Schaumstoff PUR-B (△), mit 4,8% Kohle beschichteter Schaumstoff PUR-B 4,8% (★), mit 33% Kohle beschichteter Schaumstoff PUR-B 33% (▲) und Braunkohlestaub (○). Die Kontrolle (●) wurde ohne Trägermaterial bebrütet.

Mischkultur hemmten, wurden die Trägermaterialien mit der Kultur inkubiert und die Methanbildung verfolgt (Abbildung 3.1). In den Kulturen, die mit den Trägermaterialien PUR-B, PUR-B 4,8% und, PUR-B 33% inkubiert wurden, war die Methanbildung aus 1,5 mM 3-CBA etwa 5 Tage eher abgeschlossen als in der Vergleichskultur und den Kulturen mit den Trägern PUR und BKS. In keinem der Ansätze wurde das Substrat langsamer zu Biogas umgesetzt als in der Kontrolle ohne Träger. Die beschleunigte Methanbildung deutete bereits darauf hin, daß die beschichteten PUR-Schaumstoffe während der Inkubation besiedelt und so die Diffusionswege der Intermediate verkürzt wurden.

3.1.2. Bestimmung adsorbierter Biomasse

Um zu ermitteln, wieviel Biomasse auf den Trägermaterialien immobilisiert wurde, mußte hierfür zunächst eine Methode entwikkelt werden. Bei den Versuchen, Bakterienprotein in Gegenwart der kohlebeschichteten Trägermaterialien zu bestimmen, wurden durch den Zellaufschluß mit kochender 1 N NaOH aus der Kohle Verbindungen extrahiert, die Proteinbestimmungen nach Bradford, Lowry und Biuret stark störten. Auch ein Zellaufschluß mit dem Detergens SDS wie in der Methode nach Markwell et al. (1978) führte zu starken Störungen.

Auch die Schwankungen des Trockengewichtes, des Stickstoffgehaltes und des Phosphatgehaltes lagen zu hoch, um geringe Bakterienmengen pro Träger zu erfassen. Die Ergebnisse der Messungen sowie die Meßschwankungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Um die geringe Biomasse auf den Trägern sicher nachzuweisen, wie sie am Ende eines Bindungsexperimentes erwartet wurden, waren die Schwankungen des Trockengewichtes mit 12,9 bis 30,9 mg und die Schwankungen des Proteingehaltes mit 1,1 bis 1,5 mg Protein pro Träger zu hoch. Auch die Schwankungen des Stickstoff- und Phosphatgehaltes ließen mit 1,1 bis 2,3 mg N pro g Träger und 0,25 bis 0,16 nmol Phosphat pro mg Asche eine sichere Quantifizierung geringer Bakterienmengen nicht zu. Mit keiner der untersuchten Methoden ließen sich die als Kontrolle zugege-

benen Proteinmengen sicher bestimmen, wie sie am Ende eines Bindungsexperimentes auf den Trägern erwartet wurden.

Tabelle 3.1: Untersuchung der beiden kohlebeschichteten Trägermaterialien PUR-B 4,8% und PUR-B 33% auf Störreaktionen und Meßschwankungen bei der Bestimmung von Trockengewicht, Proteingehalt, Gesamtstickstoff und -Phosphat.

Träger	Trockengew. (mg)	Protein (mg/g)	N (mg/g)	Phosphat (nmol/mg Asche)
PUR-B 4,8%	78,1 ± 12,9	5,2 ± 1,1	42,3 ± 1,1	1,68 ± 0,25
PUR-B 33%	1145 ± 30,9	7,0 ± 1,5	30,6 ± 2,3	0,66 ± 0,16

Da Biomassebestimmungen über Summenparameter wie Protein, Trokkengewicht, Gesamtstickstoff und Gesamtphosphat nicht anwendbar waren, wurde eine Methode zur indirekten Bestimmung der Biomasse über Aktivitätsmessungen entwickelt. Die Messung von maximalen Umsatzaktivitäten unter Substratsättigung wurde bereits von Dolfing und Bloemen (1985), Kaspar und Wuhrmann (1978) und Gorris et al. (1989) zur Bestimmung von Teilpopulationen in methanogenen Bioreaktoren eingesetzt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mußte die Methode für Batch-Kulturen mit geringer Biomasse adaptiert werden. Die Bestimmung maximaler Umsatzaktivitäten hatte die Vorteile, nur aktive Biomasse zu erfassen und zwischen den trophischen Gruppen der Mischkultur zu differenzieren. An die Träger adsorbierte Biomasse konnte über die Differenz der Umsatzaktivitäten in der Kulturflüssigkeit vor und nach Inkubation der Mischkultur mit den Trägern bestimmt werden.

Zur Überprüfung der Methode wurden in 4 Kulturen die spezifischen Umsatzaktivitäten bestimmt und in relative Aktivitäten, bezogen auf die Umsatzrate von 3-CBA umgerechnet (Tabelle 3.2). Mit 8,1 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ wiesen die dehalogenierenden Bakte-

rien in allen Kulturen die niedrigste spezifische Aktivität auf. Die spezifischen Umsatzraten der Benzoesäure abbauenden Bakterien lagen mit 12,1 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ nur geringfügig höher, während die Methanbakterien um den Faktor 3,6, bzw. 21,6 höhere spezifische Aktivitäten in der Mischkultur hatten, als die dehalogenierenden Bakterien.

Die Zusammensetzung der Mischkultur aus den trophischen Gruppen war in den 4 untersuchten Kulturen konstant, da sich die spezifischen Umsatzaktivitäten der Teilpopulationen in den untersuchten Kulturen nur um 10 - 20% unterschieden. Die dehalogenierenden Bakterien zeigten die niedrigsten spezifischen Umsatzraten, was zeigt, daß diese den geschwindigkeitslimitierenden Schritt des anaeroben Abbaus von 3-CBA zu CH_4 und CO_2 katalysieren.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Mischkultur aus den 4 trophischen Gruppen. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen ($mmol_{Substrat} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ pro $mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) und der spezifischen Umsatzaktivitäten ($\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$) in 4 batch-Kulturen .

Substrat		relative Umsatzakt.	spez. Umsatzakt.
3-CBA	:	1,0 ± 0,0	8,1 ± 2,4
BA	:	1,3 ± 0,2	12,1 ± 0,8
Acetat	:	3,8 ± 0,6	25,3 ± 4,9
H_2	:	21,6 ± 3,6	163,1 ± 12,9

Um Lebendzellzahlen mit Umsatzaktivitäten korrelieren zu können, wurden in zwei dieser Mischkulturen die Gesamtzellzahl im Mikroskop ausgezählt, sowie die Lebendzellzahlen mit Agarrollröhrchen und der "Most-Probable-Number" Methode (MPN) auf den Substraten Pyruvat, Benzoesäure, Acetat und H_2/CO_2 bestimmt. Pyruvat wurde eingesetzt, da es das einzige bekannte Substrat war, auf dem das dehalogenierende Bakterium in der Mischkultur wachsen konnte (Brunner 1987). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle

3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Zellzahlbestimmungen und spezifische Umsatzraten ($\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$) der 4 trophischen Gruppen in 2 auf 3-CBA wachsenden anaeroben Mischkulturen. Die Lebendzellzahlen ($Zellen \cdot ml^{-1}$) wurden sowohl mit Agarrollröhrchen, als auch mit der "Most-Probable-Number" Methode bestimmt.

Gesamtzellzahl	:	$4,5 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^7$
Proteingehalt	:	$43,6$ mg l^{-1}	$24,4$ mg l^{-1}
spezifische Umsatzraten für die Substrate:			
- 3-CBA	:	6,9	11,1
- BA	:	n.b	11,5
- Acetat	:	22,0	24,6
- H_2/CO_2	:	152,8	182,8
Lebendzellzahlen mit Agarrollröhrchen bestimmt auf:			
- Pyruvat unter N_2	:	$1,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$
- Pyruvat unter H_2	:	$6,6 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$
- Pyruvat unter H_2 + CH_2Cl_2	:	$5,4 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$
- BA	:	$9,0 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^5$
- Acetat	:	$5,4 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$
- H_2/CO_2	:	$6,6 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^5$
Lebendzellzahlen mit der "Most-Probable-Number" Methode bestimmt			
- Pyruvat unter N_2	:		
Methanbildung	:	$4,3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Acetatbildung	:	$2,3 \cdot 10^5$	$7,5 \cdot 10^4$
Dehalogenierung	:	n.b.	$2,1 \cdot 10^4$
- BA	:		
Methanbildung	:	$9,3 \cdot 10^4$	$9,3 \cdot 10^4$
Acetatbildung	:	$9,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$
BA-Abbau	:	$1,5 \cdot 10^3$	$9,3 \cdot 10^4$
- Acetat	:	$1,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$
- H_2/CO_2	:	$2,0 \cdot 10^5$	$9,3 \cdot 10^5$

Bei der mikroskopischen Auszählung zeigte sich, daß die Mischkultur Flocken bildete, die zwar zerkleinert, aber nicht vollständig aufgelöst werden konnten. Die verbleibenden Aggregate von maximal 20 Zellen konnten im Mikroskop einzeln erfaßt werden, nicht jedoch bei der Bestimmung von Lebendzellzahlen. Darauf ist zurückzuführen, daß die Summen der Lebendzellzahlen mit Agarrollröhrchen um etwa den Faktor 2 und mit "MPN" umd den Faktor 10 - 20 niedriger lagen als die mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl. Die Ursache für die unterschiedlichen Lebendzellzahlen aus den Bestimmungen mit Agarrollröhrchen und "MPN" konnte nicht ermittelt werden. Eine Korrelation der Lebendzellzahlen mit den Ergebnissen der Aktivitätsmessungen war nicht erkennbar.

3.1.3. Vergleich der Trägermaterialien

Um zu überprüfen, ob die Mischkultur die Trägerstücke besiedelte, wurden zunächst alle Trägermaterialien mit Ausnahme des Kohlestaubes in einem Ansatz mit der Kultur inkubiert. Nachdem 3 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1}$ abgebaut und die Methanbildung abgeschlossen war, wurden die Trägermaterialien mit den darauf immobilisierten Mikroorganismen voneinander getrennt und in frisches Medium überführt. In den Kulturen, die mit den in der Vorkultur am dichtesten bewachsenen Trägern angeimpft wurden, sollte die Methanbildung aufgrund der höheren Animpfdichte am schnellsten erfolgen. Die Abbildung 3.2 zeigt die Methanbildung aus 3-CBA in diesen mit bewachsenen Trägern angeimpften Kulturen. Die Methanbildung war in den mit kohlebeschichteten PUR-Trägern inokulierten Ansätzen bereits abgeschlossen, als die mit bewachsenem Sinterglas inokulierte Kultur gerade erst begann Methan zu bilden. Im Überstand der Vorkultur mit allen Trägern gemeinsam und in der mit reinem Schaumstoff inokulierten Kultur erfolgte die Methanbildung am langsamsten. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß die kohlebeschichteten Träger während der Vorinkubation stärker besiedelt wurden als die Vergleichsmaterialien.

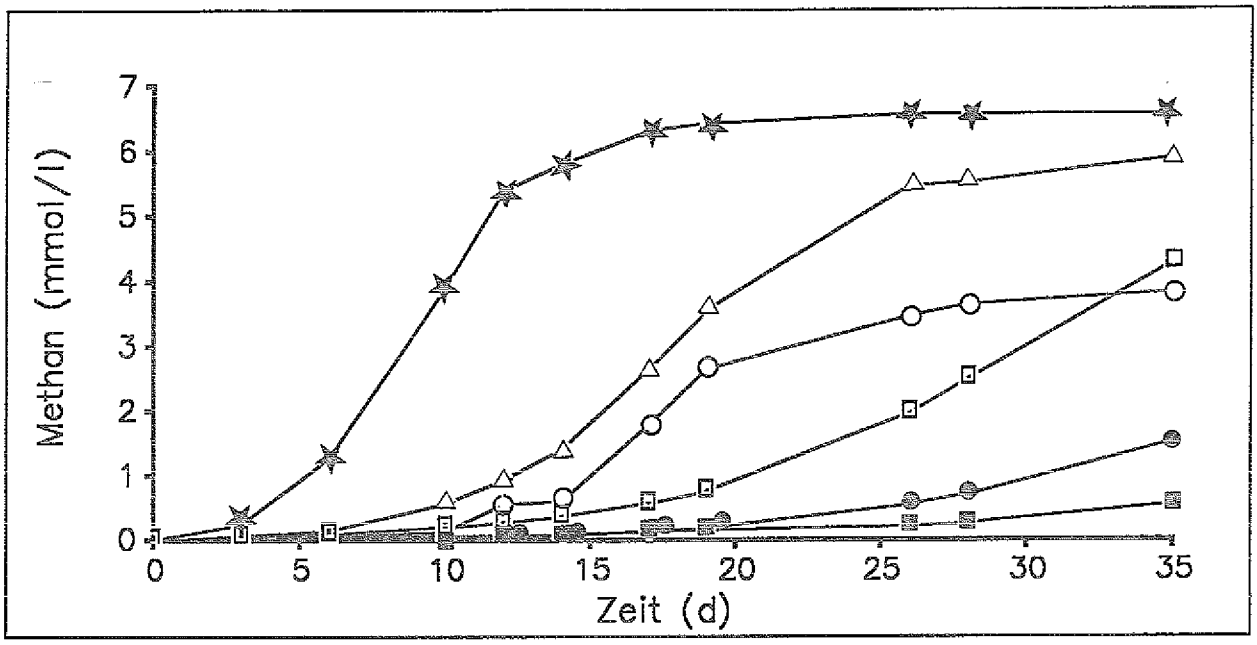


Abbildung 3.2: Methanbildung ($mmol \cdot l^{-1}$) aus 1,5 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1}$ in Kulturen, die mit bewachsenen Trägermaterialien inokuliert wurden. Die Trägermaterialien wurden zuvor gemeinsam mit der Mischkultur inkubiert und anschließend getrennt. Als Vergleich (●) diente der Überstand der Vorkultur. Die eingesetzten Träger waren Sinterglas (□), Schaumstoff (■), beschichteter Schaumstoff PUR-B (○), mit 4,8% Kohle beschichteter Schaumstoff PUR-B 4,8% (△) und mit 33% Kohle beschichteter Schaumstoff PUR-B 33% (★).

Mit der Methode zur Bestimmung der Umsatzaktivitäten wurde untersucht, ob alle trophischen Gruppen an die Träger adsorbiert wurden. Um den Einfluß der Kohlebeschichtung besser zu erkennen, wurde in diesem Versuch außer den oben genannten Trägermaterialien auch der Träger PUR-B 50% mit einem Kohleanteil von 50% untersucht. Jedes Trägermaterial wurde in 2 parallelen Ansätzen für jede trophische Gruppe getrennt mit 10 ml der Mischkultur inkubiert. Nach 4 Stunden wurde wurde aus jedem Testansatz die Hälfte des Überstandes abgezogen und die Umsatzaktivitäten sowohl im Kulturüberstand alleine, als auch im Kulturüberstand plus Träger ermittelt. Tabelle 3.4 zeigt die ermittelten Umsatzaktivitäten der trophischen Gruppen in mmol $Substrat \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$.

Tabelle 3.4: Bindung der trophischen Gruppen an die Trägermaterialien. Angegeben sind die maximalen Umsatzraten ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) der trophischen Gruppen im Substratsättigungsbereich nach 4 h Inkubation der Mischkultur mit den Trägermaterialien. Alle Angaben sind Mittelwerte aus 2 parallelen Ansätzen.

Träger-material	Kohle-gehalt	Protein-gehalt des Überstandes	Umsatzaktivitäten für die Substrate											
			H_2			Acetat			Benzoesäure			3-ChlorBS.		
			Ü[a]	T[b]	G[c]	Ü[a]	T[b]	G[c]	Ü[a]	T[b]	G[c]	Ü[a]	T[b]	G[c]
ohne	0%	24,7 mg/l	3,44	-	34,4	0,57	-	5,7	0,21	-	2,1	0,14	-	1,4
Sinterglas	0%	23,7 mg/l	1,96	5,40	36,8	0,54	0,41	4,8	0,21	0,24	2,3	0,12	0,14	1,3
PUR	0%	19,9 mg/l	2,00	5,76	38,8	0,49	0,42	4,6	0,15	0,24	2,0	0,13	0,15	1,4
PUR-B	0%	21,9 mg/l	1,64	3,28	24,6	0,34	0,41	3,8	0,13	0,31	2,2	0,11	0,17	1,4
PUR.B 4,8%	4,8%	20,3 mg/l	2,56	5,40	39,8	0,25	0,51	3,8	0,12	0,27	2,0	0,12	0,17	1,5
PUR.B 33%	33%	19,8 mg/l	1,92	5,76	38,4	0,30	0,23	2,7	0,15	0,25	2,2	0,12	0,18	1,5
PUR.B 50%	50%	17,6 mg/l	1,52	6,84	41,8	0,29	0,30	3,0	0,21	0,23	2,2	0,15	0,15	1,5

[a] = Kulturflüssigkeit (Überstand) nach 4 h Inkubation mit dem Träger ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$).

[b] = Kulturflüssigkeit plus Träger ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$).

[c] = Gesamtaktivität; Summe der Umsatzaktivitäten im Überstand plus Überstand mit Träger nach der Inkubation ($\mu mol \cdot d^{-1}$)

Nach 4 Stunden Inkubation hatten die Umsatzaktivitäten für die Substrate H_2, Benzoesäure und 3-CBA im Kulturüberstand abgenommen, während bei den Ansätzen mit Träger eine Zunahme der Umsatzaktivitäten beobachtet wurde. Die Gesamtumsatzaktivitäten die Substrate 3-CBA, BA und H_2 konstant. Dies zeigt, daß auch die Gesamtmenge der aktiven Bakterien in den beiden Ansätzen konstant blieb, die Bakterien jedoch während der 4stündigen Inkubation teilweise auf den Trägern immobilisiert wurden. Die Differenzen aus den Gesamtumsatzaktivitäten und den Umsatzaktivitäten in den Kulturüberständen waren also adhäsiv an die Träger gebunden (Tabelle 3.5). Während die hydrogenotrophen Methanbakterien mit zunehmendem Kohlegehalt der Trägermaterialien in höherem Maße adsorbiert wurden, nahm die Menge der immobilisierten dehalogenierenden und BA abbauenden Bakterien bei Kohlegehalten oberhalb 33% wieder ab. Die acetoclastischen Methanbakterien wurden durch die Kohlebeschichtung inhibiert, da ihre Gesamtumsatzaktivität mit zunehmendem Kohlegehalt der Träger auf 50% des Kontrollwertes absank.

Tabelle 3.5: An die Trägermaterialien adsorbierte aktive Biomasse der trophischen Gruppen nach 4stündiger Inkubation der Mischkultur mit den Trägermaterialien. Bestimmt wurden die maximalen Umsatzaktivitäten ($\mu mol \cdot d^{-1}$ pro Träger) im Substratsättigungsbereich (Mittelwerte aus 2 Parallelen)

Träger-material	Umsatzaktivitäten $\mu mol \cdot d^{-1}$ pro Träger		
	3-CBA	BA	H_2
SG	0,1	0,15	17,2
PUR	0,1	0,45	18,8
PUR-B	0,3	0,9	8,2
PUR-B 4,8%	0,25	0,75	14,2
PURB 33%	0,3	0,5	19,2
PUR-B 50%	0	0,01	26,6

3.1.4. Geschwindigkeit der adhäsiven Bindung der Bakterien an die Trägermaterialien

Um zu überprüfen, wie schnell die adhäsive Bindung der Mikroorganismen an die Träger erfolgte, wurden die im Überstand verbliebenen Umsatzaktivitäten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der Kultur mit dem Trägermaterial PUR-B 4,8% bestimmt. Die Differenz der Umsatzaktivitäten zu dem jeweiligen Kontrollwert vor Inkubation mit Träger gab den Anteil der Biomasse an, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme an den Träger adsorbiert war. Die stärkste Abnahme der Umsatzaktivitäten erfolgte in den ersten 60 Minuten und nach etwa 120 min. hatten sich Gleichgewichte zwischen gebundenen und nicht gebundenen Bakterien eingestellt. Abbildung 3.3 zeigt, daß die Umsatzaktivitäten aller trophischer Gruppen im Kulturüberstand während der Inkubation mit dem Trägermaterial abnahm.

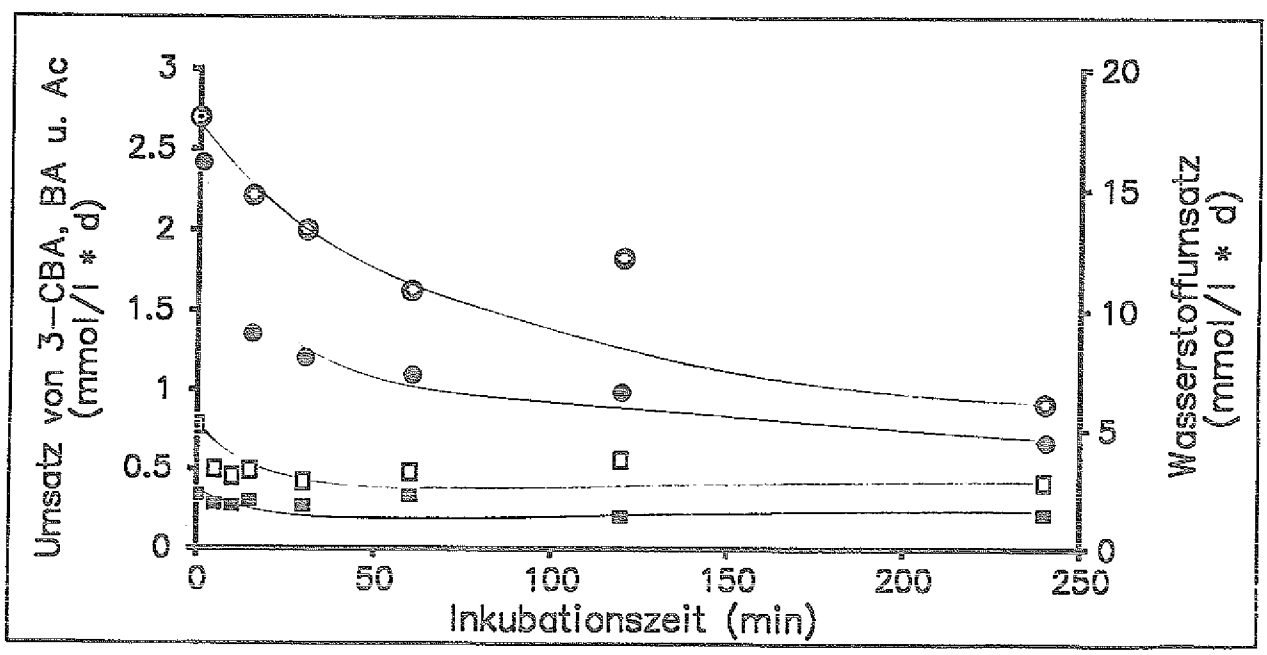


Abbildung 3.3: Abnahme der Umsatzaktivitäten ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) der trophischen Gruppen in der Kulturflüssigkeit während Inkubation mit dem Träger PUR-B 4,8% bei pH 6,7 und 30°C. Alle Angaben sind Mittelwerte aus 2 Parallelen. Dargestellt sind 3-CBA-Dehalogenierung (■), BA-Abbau (□), Methanbildung aus Acetat (●) und Wasserstoffverbrauch durch Methanbakterien (O).

3.2. Kontinuierliche Kulturen in Festbettumlaufreaktoren

3.2.1. Startphase

Nachdem gezeigt werden konnte, daß alle für die Umsetzung von 3-CBA zu CH_4 und CO_2 notwendigen trophischen Gruppen an die kohlebeschichteten Trägermaterialien adsorbiert wurden, sollte die Eignung der 6 untersuchten Trägermaterialien für die Biomasserückhaltung in Festbettumlaufreaktorenen untersucht werden. In dem mit Braunkohlestaub gefüllten Bioreaktor traten aufgrund der geringen Teilchengröße bereits während des Aufbaus und der Pumpenprobeläufe häufig Verstopfungen auf, woraufhin in den weiteren Untersuchungen auf dieses Trägermaterial verzichtet wurde.

Die Reaktoren wurden mit einer Kultur aus der logarithmischen Wachstumsphase angeimpft und bei pH 6,7 und 34°C vorinkubiert. Als nach 12 Tagen in allen Reaktoren der Abbau von 3-CBA nachweisbar war, wurde der Zulauf auf Verdünnungsraten zwischen $0{,}33 \cdot d^{-1}$ und $0{,}36 \cdot d^{-1}$ eingeschaltet. Die Verdünnungsraten lagen damit um den Faktor 2 über der Verdoppelungsrate der Mischkultur, wodurch nur immobilisierte Bakterien in den Reaktoren zurückgehalten wurden. In der Startphase stiegen die 3-CBA Konzentrationen in allen Reaktoren zunächst an. In den Reaktoren PUR-B 4,8% und PUR-B 33% begann die 3-CBA Konzentration jedoch nach 7 Tagen zu sinken, bis nach weiteren 2 Wochen keine 3-CBA mehr in den Reaktoren nachweisbar war (Abb. 3.4). In den Reaktoren SG (Abb. 3.4) und PUR-B wurde 3-CBA nicht abgebaut, da in diesen Reaktoren die 3-CBA Konzentration mit 3 $mmol \cdot l^{-1}$ nach etwa 10 Tagen den Wert des Zulaufes erreicht hatte und dort konstant blieb. In dem Reaktor PUR kam es zu periodischen Auswaschungen der Bakterien, was sich in starken Schwankungen der 3-CBA Konzentration im Auslauf des Reaktors darstellte.

Da nur in den Reaktoren PUR-B 4,8% und PUR-B 33% der Abbau von 3-CBA erfolgte, wurden alle weiteren Untersuchungen auf diese Reaktoren beschränkt. Nachdem in den Reaktorausläufen keine 3-CBA mehr nachweisbar war, wurden in beiden Reaktoren aus dem Abbau von 1 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ zunächst 2,2 - 2,4 $mmol_{Acetat}$

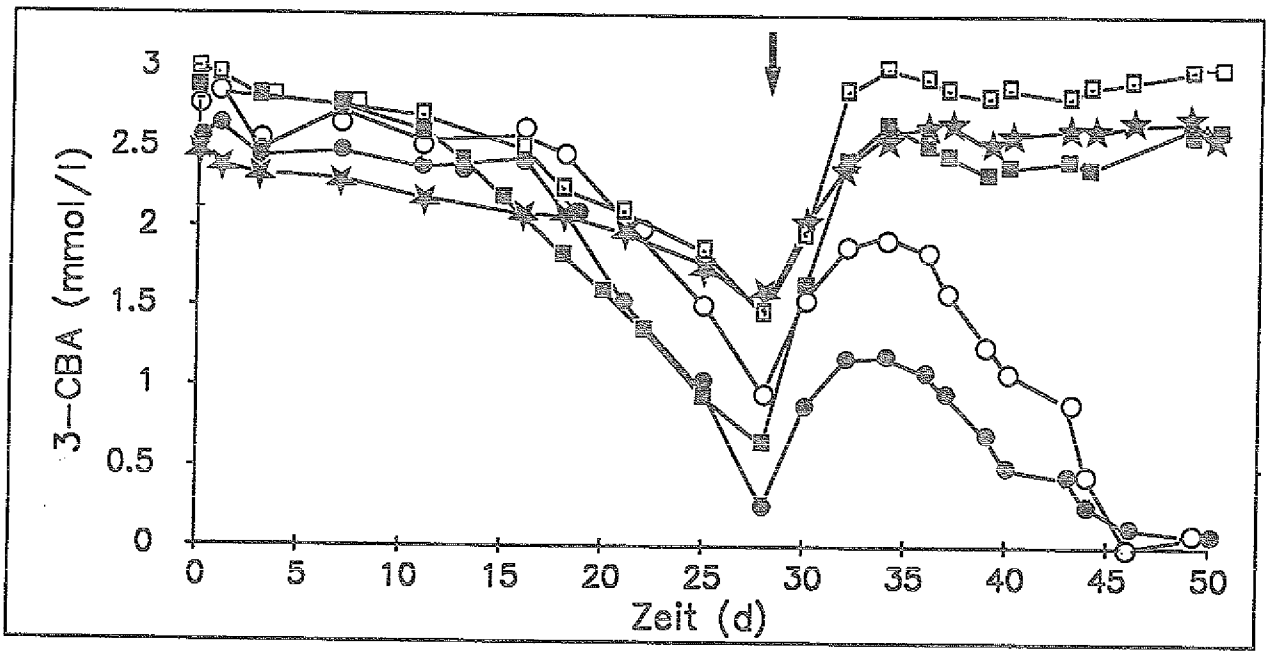


Abbildung 3.4: 3-CBA Konzentrationen während der Startphase der Reaktoren PUR (★), PUR-B (□), PUR-B 4,8% (●), PUR-B 33% (○) und SG (■). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, als die Verdünnungsrate von 0 auf $0{,}34 \cdot d^{-1}$ umgestellt wurde.

$l^{-1} \cdot d^{-1}$ gebildet. Daneben wurden in dem mit PUR-B 4,8% gefüllten Reaktor 0,01 $mmol_{Methan} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ und in dem Reaktor mit PUR-B 33% 0,13 $mmol_{Methan} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ gebildet.

Um das Nachwachsen der acetatverwertenden Methanbakterien zu ermöglichen, wurde der Zufluß der Reaktoren für etwa 1 Monat gestoppt, wonach auch die Methanbildung aus Acetat eingesetzt hatte und in den folgenden Versuchen auch bei steigenden Raumbelastungen und sinkenden Verweilzeiten weiter erfolgte. Dabei wurde die abgebaute 3-CBA weitgehend quantitativ zu CO_2 und CH_4 umgesetzt, ohne daß Acetat in den Reaktorausläufen nachzuweisen war.

3.2.2. 3-Chlorbenzoesäureabbau bei steigenden Raumbelastungen

In den folgenden Versuchen wurden die Verweilzeiten des Mediums in den Reaktoren verkürzt und die Raumbelastungen erhöht. Dabei betrug die kürzeste Verweilzeit, bei der 3-CBA über längere Zeit abgebaut wurde einen Tag. Die höchste Raumbelastung war 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$, bei der die zugeführte 3-CBA mit Umsatzraten von 10,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ in dem Reaktor PUR-B 4,8% und 10,4 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ in dem Reaktor PUR-B 33% abgebaut wurden (Tabelle 3.6), was Abbaugraden von etwa 90% entspricht.

Mit steigenden Raumbelastungen stieg die 3-CBA Auslaufkonzentration in dem Reaktor PUR-B 33% langsamer an als in dem Reaktor PUR-B 4,8% (Abbildung 3.5). Bei gleichen Raumbelastungen waren die Abbaugrade in dem Reaktor mit PUR-B 33% stets um etwa 2% höher als in dem Reaktor mit PUR-B 4,8%. Dies zeigt an, daß auf dem Trägermaterial mit dem höheren Kohleanteil auch größere Mengen an Biomasse im Reaktor zurückgehalten wurde. Dies wurde durch eine Biomassebestimmung bei einer Raumbelastung von 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ bestätigt, bei der in dem Reaktor PUR-B 33% 4200 $mg_{Protein} \cdot l^{-1}$ gegenüber 3900 $mg_{Protein} \cdot l^{-1}$ in dem Reaktor PUR-B 4,8% nachgewiesen wurden. Die Biomasse in den Reaktoren wurde dabei über die an die Träger immobilisierte Menge bakterieller DNA bestimmt, die über einen aus 7 unabhängigen Bestimmungen ermittelten Faktor von 0,034 ± 0,002 $mg_{DNA} \cdot mg_{Protein}^{-1}$ in Proteingehalt umgerechnet wurden. Auch Aktivitätsbestimmungen bei Raumbelastungen von 5,7 und 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ zeigten maximale Umsatzaktivitäten der 3-CBA dehalogenierenden Bakterien von 9,9 und 23,3 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ in dem Reaktor PUR-B 33% gegenüber 8,7 und 21,6 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ in dem Reaktor PUR-B 4,8. Da die maximalen Umsatzaktivitäten höher als die Raumbelastungen und Umsatzraten in den Reaktoren waren, muß angenommen werden, daß die Auslaufkonzentrationen unter der 3-CBA Konzentration lagen, bei der die dehalogenierenden Bakterien ihr Substrat mit maximaler Rate umsetzen.

Tabelle 3.6: Anaerober Abbau eines 3-CBA enthaltenden Modellabwassers bei unterschiedlichen Raumbelastungen und Verweilzeiten in den Reaktoren PUR-B 4,8% und PUR-B 33%. Die Reaktoren wurden bei pH 6,7 und 34°C betrieben.

Raumbelastung ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$):	1,0	1,90	3,65	5,72	8,39	11,2
Verdünnungsrate (d^{-1}) :	0,34	0,6	0,63	0,94	0,94	0,93
Zulauf ($mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1}$):	3,03	3,01	5,88	6,12	9,12	12,0
Auslauf ($mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1}$)						
PUR-B 4,8%:	<0,01	0,27	0,54	0,83	1,02	1,12
PUR-B 33,0%:	<0,01	0,24	0,48	0,63	0,78	0,85
3-CBA Abbaugrad (%)						
PUR-B 4,8%:	99,9	90,9	90,7	86,3	89,8	90,7
PUR-B 33,0%:	99,9	92,0	91,8	89,7	91,4	92,9

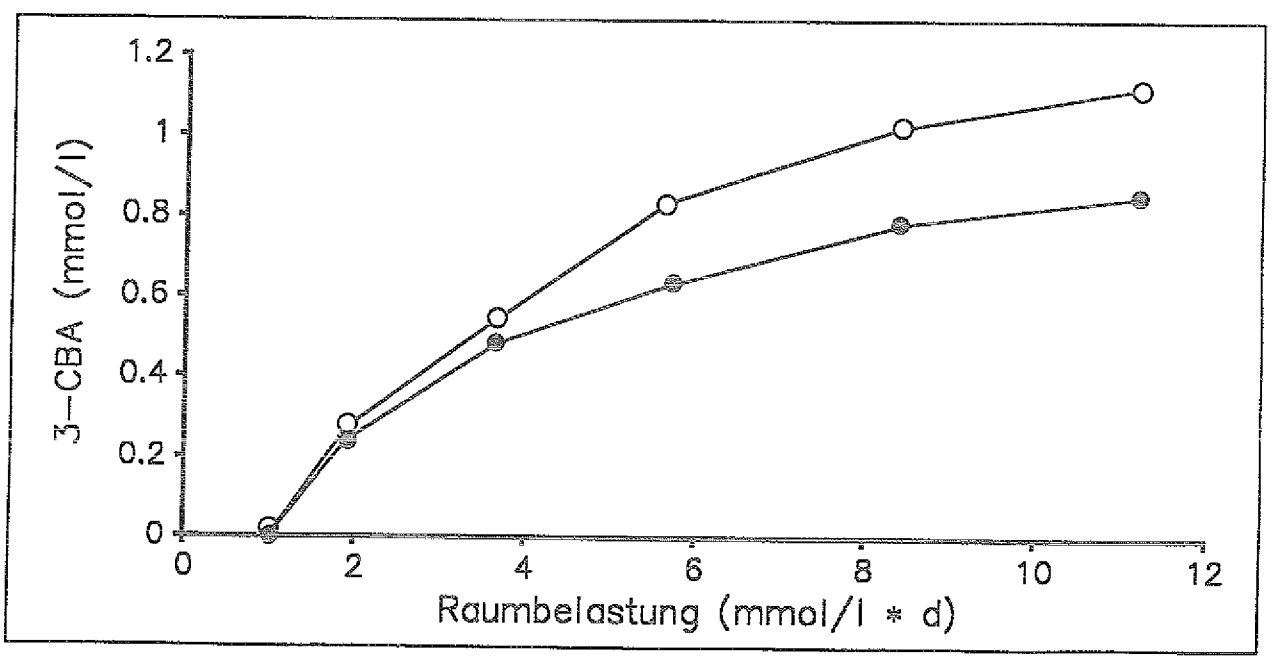


Abbildung 3.5: 3-CBA-Restkonzentrationen ($mmol \cdot l^{-1}$) in den Reaktoren mit PUR-B 4,8% (○) und PUR-B 33% (●) bei steigenden Raumbelastungen.

3.2.3. Zusammensetzung der Biofilme in den Festbettumlaufreaktoren

Nachdem in Batch-Kulturen die Zusammensetzung der Mischkultur aus den trophischen Gruppen über Aktivitätsmessungen untersucht worden war, sollte auch die Zusammensetzung der Biofilme in den Reaktoren in ähnlicher Weise untersucht werden. Dazu wurden analog zu den Bestimmungen in den Batch-Kulturen die maximalen Umsatzaktivitäten der trophischen Gruppen mit der Methode von Kaspar und Wuhrmann (1978) bestimmt. Die Messungen wurden 3 Wochen nach Erhöhung der Raumbelastung von 3,65 auf 5,72 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ begonnen. Die Ergebnisse von 6 über einen Zeitraum von 90 Tagen verteilten Messungen sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Maximale Umsatzraten ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) der trophischen Gruppen in den mit PUR-B 33% und PUR-B 4,8% gefüllten Reaktoren. Die erste Messung erfolgte 19 Tage nach Erhöhung der Raumbelastung von 3,65 auf 5,72 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$.

Meßzeit	PUR-B 33% Umsatz in $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$				PUR-B 4,8% Umsatz in $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$			
in Tagen	3-CBA	BA	Ac	H_2	3-CBA	BA	Ac	H_2
19 - 21	11,5	27,5	70,1	202	7,3	25,4	55,4	176
31 - 33	9,6	25,6	73,4	160	8,7	23,1	66,5	142
47 - 49	8,6	31,9	109,0	137	3,1*	27,2	65,1	103*
60 - 63	10,8	32,9	93,7	140	1,2	21,9	71,8	112
87 - 90	9,1	30,8	77,8	162	1,3	18,1	60,2	162
102 - 109	10,7	36,6	103,0	174	2,1	20,0	60,3	158

* Am Tag vor dem Beginn der Messung kam es zu einer Störung in dem mit PUR-B 4,8% gefüllten Reaktor, die jedoch hauptsächlich die dehalogenierenden und die hydrogenotrophen methanogenen Bakterien traf.

In dem Reaktor PUR-B 33% blieben die maximalen Umsatzraten aller

trophischer Gruppen in dem Zeitraum von 47 Tagen nach Erhöhung der Raumbelastung bis zum Ende der Messungen konstant. Die dehalogenierenden Bakterien wiesen mit 9,8 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ die niedrigsten maximalen Umsatzraten auf, während die Benzoesäure abbauenden Mikroorganismen maximal 33,1 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ umsetzen konnten. Die höchsten maximalen Umsatzraten zeigten die Methanbakterien mit 91,5 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ für Acetat und 153,3 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ für Wasserstoff. Die daraus errechneten relativen Umsatzraten lagen für die Benzoesäure- und die Acetat- umsetzenden Bakterien 3,4 $mmol_{BA} \cdot mmol_{3\text{-}CBA}^{-1}$ und 9,3 $mmol_{Acetat} \cdot mmol_{3\text{-}CBA}^{-1}$ um etwa den Faktor 3 höher als in den Batch-Kulturen (1,3 $mmol_{BA} \cdot mmol_{3\text{-}CBA}^{-1}$ und 3,6 $mmol_{Acetat} \cdot mmol_{3\text{-}CBA}^{-1}$). Dagegen wiesen die hydrogenotrophen Methanbakterien mit 15,6 gegenüber 21,6 $mmol_{Wasserst.} \cdot mmol_{3\text{-}CBA}^{-1}$ in den Batch-Kulturen leicht erniedrigte relative Umsatzraten auf.

In dem Reaktor mit dem Trägermaterial PUR-B 4,8% kam es nach 45 Tagen zu einer Störung, die eine Abnahme der dehalogenierenden Aktivität bewirkte. Um toxische Konzentrationen an 3-CBA im Reaktor zu verhindern wurde die Raumbelastung auf 3 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ gesenkt und nach 110 Tagen erneut auf 5,7 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ erhöht. Trotz vermindertem C-Fluß blieben jedoch die Abbauaktivitäten für BA, Acetat und H_2/CO_2 im Reaktor erhalten.

Nach Verdoppelung der Raumbelastung von 5,7 auf 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ verdoppelten sich auch die maximalen Umsatzraten der trophischen Gruppen (Tabelle 3.8). Die Anteile der trophischen Gruppen an der Biomasse, ermittelt aus dem Verhältnis der Umsatzaktivitäten der trophischen Gruppen zueinander, blieben dabei konstant.

Bei der Bestimmung der Umsatzraten von H_2/CO_2 zu Methan wurde beobachtet, daß die sedimentierte und nur lose an die Träger gebundene Biomasse durch aufsteigende Gasblasen aufgewirbelt und in der flüssigen Phase verteilt wurde. Deshalb wurden bei einer Messung die Umsatzraten im Reaktorüberstand vor und nach dem Einleiten des H_2/CO_2 Gasgemisches bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.8: Maximale Umsatzraten der trophischen Gruppen in den Reaktoren mit den Trägermaterialien PUR-B 4,8% und PUR-B 33% bei unterschiedlichen Raumbelastungen.

Raumbelastung in $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$	Kohlegehalt der Träger in %	Umsatzraten in $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ für die Substrate			
		3-CBA	BA	Acetat	H_2/CO_2
5,7	33	9,9	30,9	91,5	153
	4,8	8,7	23,1	66,5	142
11,2	33	23,3	54,8	186	337
	4,8	21,6	48,6	148	268

Zu Beginn des Experimentes waren in beiden Reaktoren nur 0,3% bis 1% der maximalen Umsatzaktivitäten in der Flüssigkeit nachweisbar. Die Umsatzaktivitäten der hydrogenotrophen Methanbakterien in der flüssigen Phase stiegen durch die Scherbelastung in beiden Reaktoren auf das 40 - 50fache, während sich die Umsatzaktivitäten für die dehalogenierenden und BA abbauenden Bakterien nur um den Faktor 5 - 7 erhöhten. Die Umsatzaktivitäten für Acetat stiegen in dem Reaktor mit PUR-B 4,8% um den Faktor 12, in dem Reaktor mit PUR-B 33% jedoch nur auf das 6,5fache. Insgesamt waren jedoch auch nach der erhöhten Scherbelastung noch 80 bis 90% der hydrogenotrophen und mehr als 90% der dehalogenierenden und Benzoesäure bzw. Acetat abbauenden Bakterien auf den Träger immobilisiert.

Um den Anteil nicht aktiver Biomasse in den Reaktoren abschätzen zu können, wurden die spezifischen Umsatzraten der Biofilme auf den Trägern bestimmt. Die auf den Trägern immobilisierte Biomasse wurde dabei mit DNA-Bestimmungen nach Burton (1956) ermittelt. Die Tabelle 3.10 zeigt die spezifischen Umsatzraten der trophischen Gruppen in den Reaktoren bei einer Raumbelastung von 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ im Vergleich zu Batch-Kulturen. In dem Reaktor PUR-B 33% wurde mit 4200 $mg \cdot l^{-1}$ eine um 300 $mg \cdot l^{-1}$ höhere Proteinkonzentration gemessen, als in dem Reaktor PUR-B 4,8%. Da in

Tabelle 3.9: Ablösung der Biofilme durch aufsteigende Gasblasen. Bestimmt wurde der Anteil der suspendierten an den Gesamtumsatzaktivtäten ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) der trophischen Gruppen in den in den Reaktoren mit den Trägermaterialien PUR-B 33% und PUR-B 4,8% vor und nach Wasserstoffeinleitung am unteren Ende der Reaktoren. Die Werte in Klammern geben den prozentualen Anteil an der im Gesamtraktor vorhandenen maximalen Umsatzaktivität an.

Substrat	Umsatz im Gesamtreaktor ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	Umsatz im Überstand ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	Umsatz im Überstand nach Scherbelastung ($mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)
Reaktor mit PUR-B 33%:			
3-CBA	9,6	0,045 (0,5)	0,27 (2,8)
BA	25,1	0,12 (0,5)	0,89 (3,5)
Acetat	73,4	0,76 (1,0)	5,0 (6,8)
H_2	160	0,56 (0,4)	31,2 (19,5)
Reaktor mit PUR-B 4,8%:			
3-CBA.	8,7	0,047 (0,5)	0,29 (3,3)
BA	23,1	0,17 (0,7)	0,85 (3,6)
Acetat	66,5	0,37 (0,6)	4,5 (6,8)
H_2/CO_2	142	0,38 (0,3)	16,0 (11,3)

dem Reaktor PUR-B 33% ebenfalls höhere maximale Umsatzaktivitäten bestimmt wurden, ergaben sich für die Biofilme in beiden Reaktoren etwa gleich hohe spezifische Aktivitäten aller trophischer Gruppen. Im Vergleich zu den Batch-Kulturen zeigten sich jedoch Verschiebungen bei den Methanbakterien, während die spezifischen Aktivitäten der dehalogenierenden und BA abbauenden Bakterien sowohl in den Batch-Kulturen als auch in den Reaktoren etwa gleich hoch waren. In den Biofilmen der Reaktoren wurden Acetat umsetzende Methanbakterien angereichert, was sich in den höheren spezifischen Aktivitäten gegenüber den Batch-Kulturen zeigte. Die spezifischen Aktivitäten der hydrogenotrophen Methanbakterien waren gegenüber den Batch-Kulturen auf etwa die Hälfte verringert, da diese aus den Biofilmen leichter herausgelöst und so stärker ausgewaschen wurden, als die dehalogenieren-

den und Benzoesäure bzw. Acetat abbauenden Bakterien.

Tabelle 3.10: Spezifische Umsatzraten ($\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$) für die Substrate 3-CBA, BA, Acetat und H_2/CO_2, bezogen auf den Proteingehalt der Gesamtmischkultur.

	spezifische Umsatzraten ($\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$)		
Substrat	Batch-Kulturen	Reaktor mit PUR-B 33%	Reaktor mit Pur-B 4,8%
CBA	8,1	5,5	5,5
BA	12,1	13,0	12,5
Acetat	25,3	44,2	37,9
H_2/CO_2	163	80,4	68,8

Raumbelastung der Reaktoren: 11,2 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$
Proteingehalt der Reaktoren gefüllt mit:
PUR-B 33% : 4200 $mg \cdot l^{-1}$
PUR-B 4,8% : 3900 $mg \cdot l^{-1}$

3.2.4. Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde untersucht, ob das gesamte Volumen der Träger in gleichem Umfang bewachsen war und, ob die Biomasse in den Poren der Schaumstoffträger zurückgehalten wurde. Auf den Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen waren keine Unterschiede zwischen den Biofilmen auf den Trägermaterialien PUR-B 4,8% und PUR-B 33% sichtbar. Daher stammen alle in Abbildung 3.6 zusammengefaßten Aufnahmen von dem selben Trägerstück PUR-B 4,8%, das gegen Ende der Aktivitätsmessungen bei einer Raumbelastung von 5,72 $mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1}\ d^{-1}$ aus dem Reaktor PUR-B 4,8% entnommen wurde.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Träger auf der Außenseite bis in etwa 1 mm Tiefe am dichtesten bewachsen waren. In Bild 1

ist ein aufgeschnittenes Trägerstück mit Blick auf eine Schnittseite dargestellt. Oben ist die ehemalige Außenseite und am linken Bildrand eine weitere Schnittseite zu erkennen, wodurch der auf der Außenseite stärkeren Bewuchs deutlich wird. Bild 2 stellt die stark bewachsene Außenfläche dem Inneren eines aufgeschnittenen Trägerstückes in Bild 3 gegenüber. Auf der Außenseite war von der Schaumstoffstruktur nur mehr wenig zu erkennen, während im Inneren noch große, unbewachsene Hohlräume vorhanden waren. Obwohl sich ein dichter Bakterienrasen bildete, wuchsen die Poren des Trägermaterials auf der Außenseite nicht vollständig zu. Die Bilder 4 und 5 zeigen Ausschnittvergrößerungen, die die Bakterien in den Biofilmen erkennbar machen. Beide Bilder zeigen, daß die Biofilme zu einem hohen Anteil aus fädigen Bakterien bestanden, die dem acetatverwertenden Methanbakterium *Methanosaeta* morphologisch sehr ähnlich waren. Auf Bild 5 ist ein Steg des Schaumstoffes in verschiedenen Stadien des Bewuchses gezeigt. Während auf der linken Bildseite noch die Oberfläche des Schaumstoffes zwischen einzelnen Bakterien und kleinen Zellaggregaten erkennbar ist, hat sich auf der rechten Bildseite bereits ein dichter Bakterienrasen gebildet.

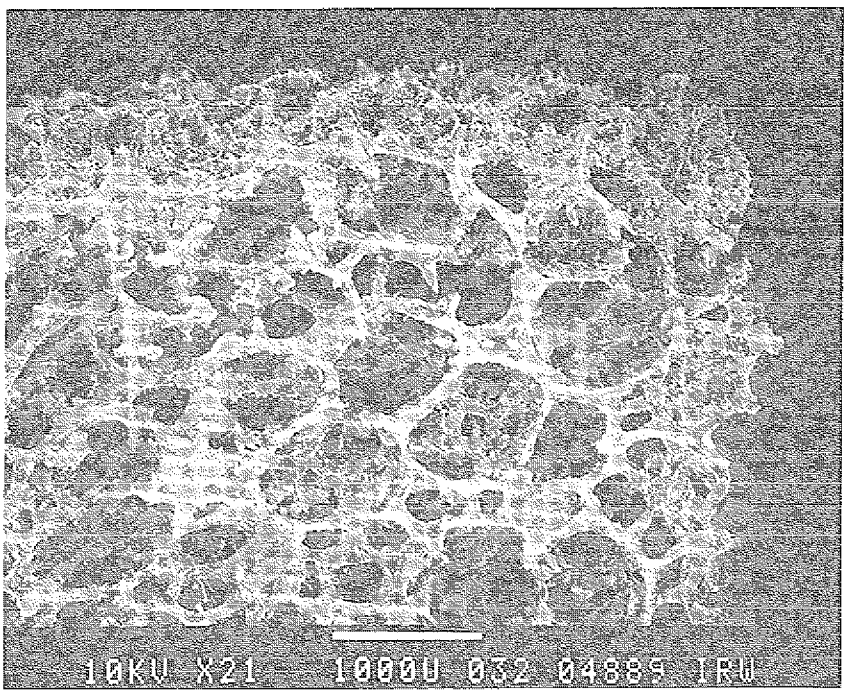


Abbildung 3.6; Bild 1: REM Aufnahme eines aufgeschnittenen, mit 3-CBA abbauenden Bakterien bewachsenen PUR-B 4,8% Trägerstückes. Maßstab = 1000 µm

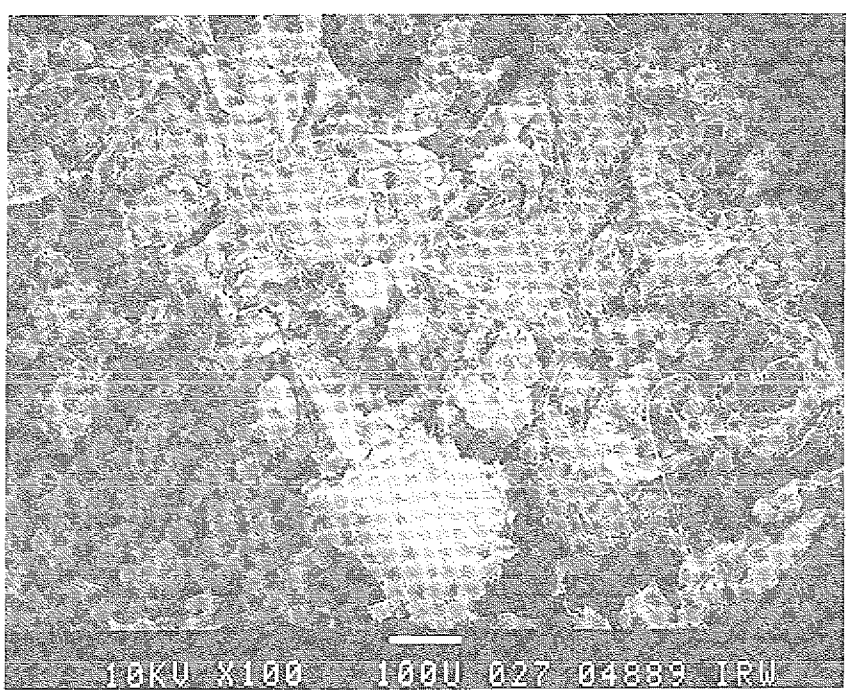


Abbildung 3.6; Bild 2: REM Aufnahme des 3-CBA abbauenden Biofilmes auf der Außenseite eines bewachsenen PUR-B 4,8% Trägerstückes. 100fache Vergrößerung: Maßstab = 100 µm

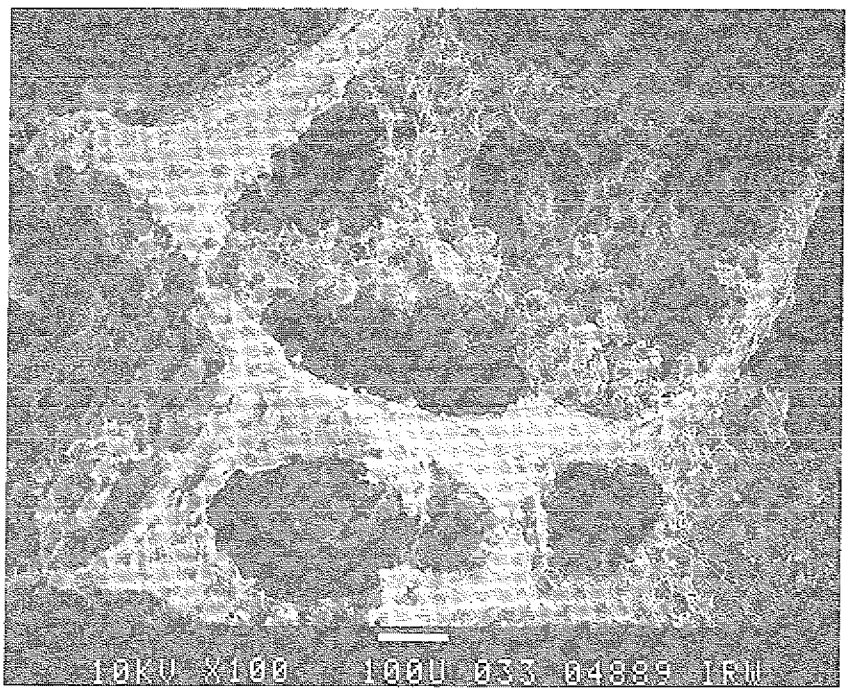


Abbildung 3.6; Bild 3: REM Aufnahme des 3-CBA abbauenden Biofilmes im Inneren eines bewachsenen PUR-B 4,8% Trägerstückes. Maßstab = 100 µm

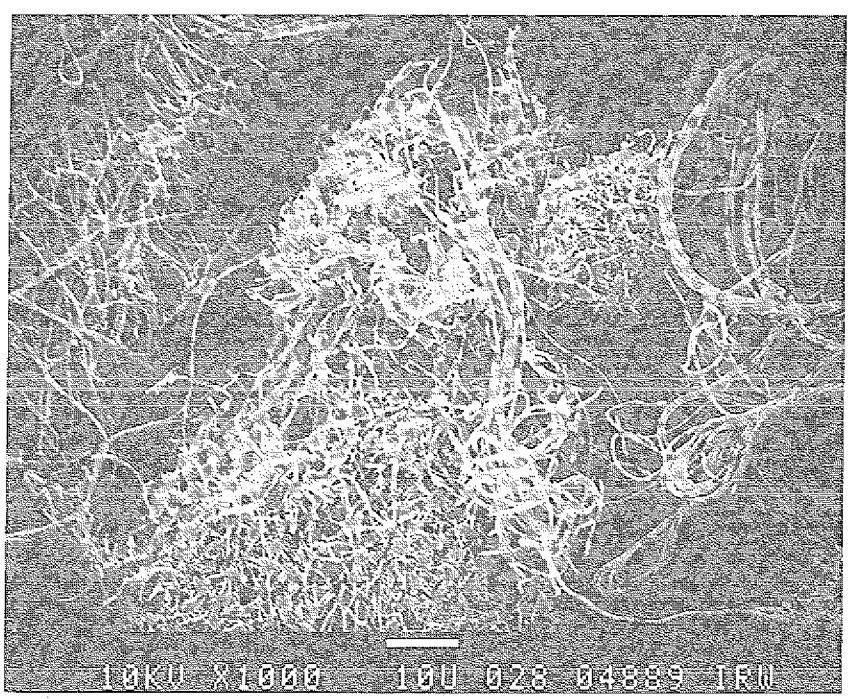


Abbildung 3.6; Bild 4: REM Aufnahme des 3-CBA abbauenden Biofilmes auf der Außenseite eines bewachsenen PUR-B 4,8% Trägerstückes. Maßstab = 10 µm

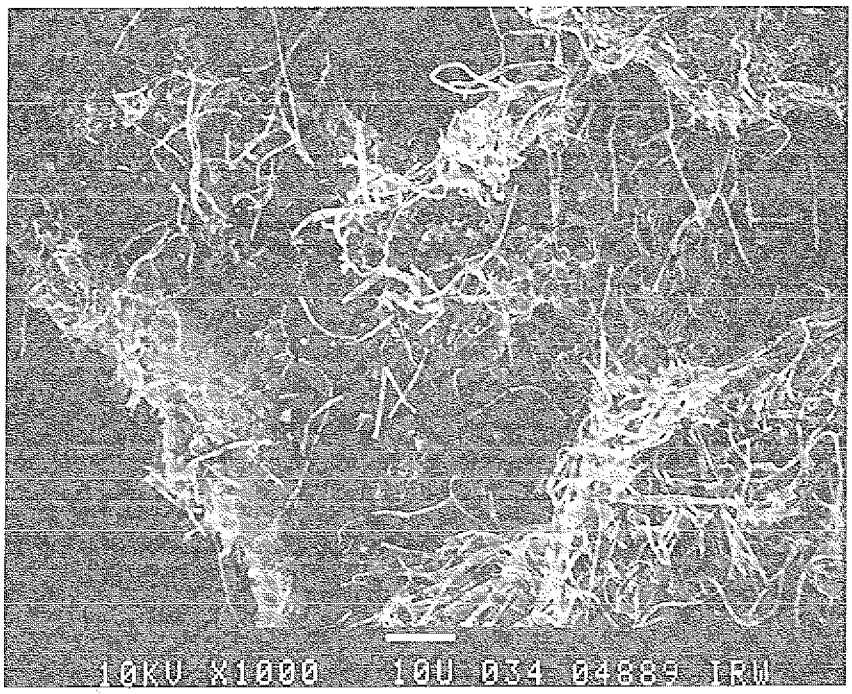


Abbildung 3.6; Bild 5: REM Aufnahme des 3-CBA abbauenden Biofilmes im Inneren eines bewachsenen PUR-B 4,8% Trägerstückes. Maßstab = 10 µm

3.3. Isolierung eines 3-Chlorbenzoesäure verwertenden Bakteriums

Da mit *Desulfomonile tiedjei* (DeWeerd et al. 1990) bisher nur ein strikt anaerobes 3-CBA verwertendes Bakterium bekannt war, sollte versucht werden, aus der Mischkultur 3-CBA umsetzende Bakterien zu isolieren. Pyruvat war das einzige bekannte Substrat, das zu beschleunigtem Wachstum der 3-CBA verwertenden Bakterien in der Mischkultur führte (Brunner 1987). Anreicherungskulturen auf Pyruvat führten jedoch zu verstärktem Wachstum der Begleitflora, so daß die spezifische 3-CBA Umsatzaktivität in der Mischkultur abnahm (Brunner 1987). Versuche, 3-CBA verwertende Bakterien mit Pyruvat als C-Quelle direkt aus der Mischkultur zu isolieren blieben erfolglos.

Die Mischkultur konnte durch eine anaerobe Dichtegradientenzentrifugation in 5 Banden fraktioniert werden, die Dichten von 1,030 bis 1,095 $g \cdot ml^{-1}$ hatten (Abbildung 3.7). Alle Banden wurden ein-

zeln abgezogen und in Medium mit den Substraten Pyruvat und 3-CBA überführt. Aus diesen Flüssigkulturen wurden sofort Verdünnungsreihen hergestellt, mit denen Rollröhrchen angeimpft wurden. Während der Inkubation wurden die Flüssigkulturen auf 3-CBA Verbrauch untersucht, wobei sich zeigte, daß nur die Bakterien 3-CBA umsetzen konnten, die in der Bande mit einer Dichte von 1,095 $g \cdot ml^{-1}$ angereichert wurden. Von den 100 Isolaten aus dieser Bande setzten 5 3-CBA um. Da 2 dieser 3-CBA umsetzenden Isolate Mischkulturen waren und sich die übrigen 3 als identisch erwiesen, sind im folgenden nur die Ergebnisse aus den Untersuchnungen eines der 3-CBA verwertenden Isolate (PY1) dargestellt.

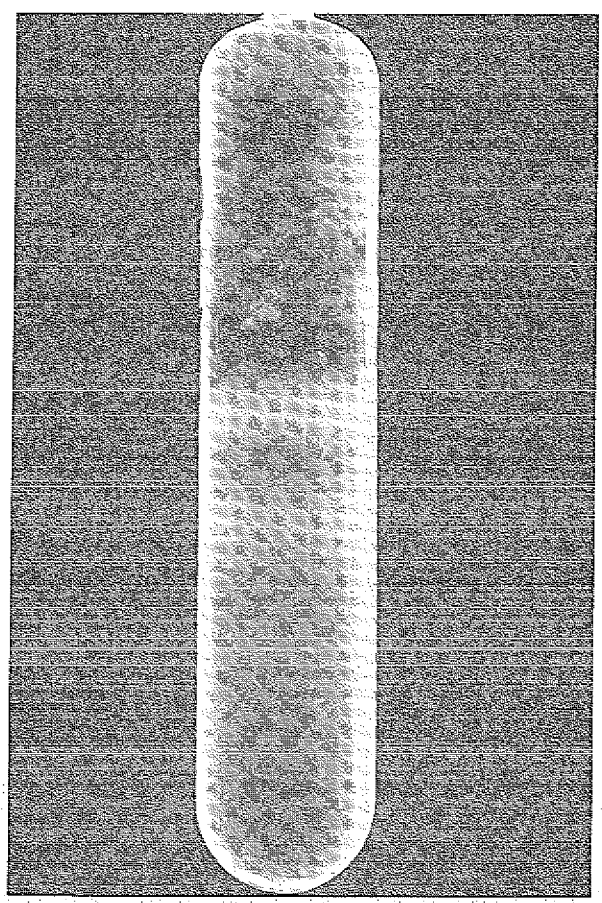


Abbildung 3.7: Zentrifugenröhrchen mit 5 Bakterienbanden unterschiedlicher Dichte nach der Dichtegradientenzentrifugation der Mischkultur in anaerobisiertem Percoll.

3.3.1. Charakterisierung des 3-Chlorbenzoesäure umsetzenden Organismus

Der isolierte Organismus PY1 war ein gram⁻, bewegliches, gekrümmtes Stäbchen mit polarer monotricher Begeißelung. Die Länge des Organismus schwankte zwischen 1,5 und 5 µm mit einer von 1 bis 10 schwankenden Anzahl von Krümmungen (Abbildung 3.8). Sulfat steigerte sowohl die Wachstumsrate, als auch den Wachstumsertrag auf Pyruvat, das das einzige untersuchte Substrat war, auf dem PY1 in Abwesenheit reduzierbarer Schwefelverbindungen wachsen konnte.

Aufgrund des wachstumssteigernden Einflusses von Sulfat, der Morphologie und des positiven Nachweises von Desulfoviridin (Tabelle 3.11) wurde das Isolat PY1 als Mitglied der Gattung *Desulfovibrio* identifiziert (Postgate 1984 und Widdel 1988). Das Substratspektrum (Tabelle 3.12) stimmte weitgehend mit den Literaturdaten für *Desulfovibrio vulgaris* und *D. desulfuricans* überein, die sich nur durch das Wachstum von *D. desulfuricans* auf Cholin unterscheiden. Die Einstufung des Isolates als *D. vulgaris* Stamm PY1 und die Unterscheidung von *D. desulfuricans* erfolgte aufgrund des nicht vorhandenen Wachstums auf Cholin. Dies wurde durch die Bestimmung des GC-Gehaltes der DNA mit 64% GC bestätigt, was mit dem GC-Gehalt der DNA von *D. vulgaris* (65%) übereinstimmt und deutlich höher liegt, als der GC-Gehalt der DNA von *D. desulfuricans* mit 59%.

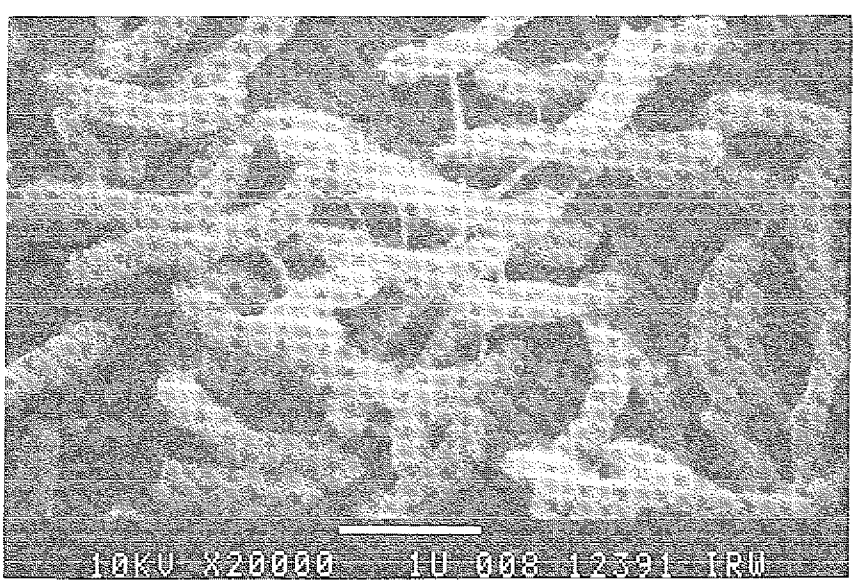


Abbildung 3.8: REM Aufnahme des 3-CBA umsetzenden Isolates PY1 aus der 3-CBA abbauenden Mischkultur. Maßstab = 1 µm

Tabelle 3.11: Vergleich der morphologischen Eigenschaften des 3-CBA umsetzenden Bakteriums PY1 mit *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfovibrio desulfuricans*.

	Py1	*D. vulgaris*	*D. desulfuricans*
Form	Vibrio	Vibrio	Vibrio
Begeißelung	polar, monotrich	polar, monotrich	polar, monotrich
Länge in µm	1,5 - 5	1,5 - 4	1,5 - 4
Dicke in µm	0,5	0,5 - 0,8	0,5 - 0,8
Gramfärbung	-	-	-
Temperaturoptimum	37°C	30 - 36°C	30 - 36°C
pH Optimum	6,3 - 7,5	neutral	neutral
Sporenbildung	-	-	-
Desulfoviridin	+	+	+
GC-Gehalt der DNA	64%	65%	59%

Als Produkte des Wachstums auf Pyruvat mit Sulfat oder Sulfit wurden Acetat, CO_2 und Sulfid nachgewiesen (Abbildung 3.9). Während des Wachstums auf Pyruvat ohne reduzierbare Schwefelverbindungen als Elektronenakzeptor wurden zusätzlich Wasserstoff, Ethanol und Succinat gefunden (Abbildung 3.10).

Tabelle 3.12: Vergleich der von *Desulfovibrio vulgaris* Stamm PY1 zum Wachstum genutzten Substrate und Elektronenakzeptoren mit Literaturdaten von *D. vulgaris* und *D. desulfuricans*.

C-Quelle ($2,2\ g \cdot l^{-1}$)	Elektronenakzeptor (10 mM)	Py1	*D. vulgaris*	*D. desulfuricans*
Pyruvat	Sulfat	+	+	+
Laktat	Sulfat	+	+	+
Malat	Sulfat	+	+	+
Formiat	Sulfat	+	+	+
Fumarat	Sulfat	+	+	+
Ethanol	Sulfat	+	+	+
Acetat + H_2	Sulfat	+	+	+
Acetat	Sulfat	-	-	-
BA	Sulfat	-	-	-
Cholin	Sulfat	-	-	+
H_2/CO_2	Sulfat	-	-	-
Pyruvat	-	+	+	+
Fumarat	-	-	n. b.[a]	n. b.
Laktat	-	-	n. b.	n. b.
Malat	-	-	n. b.	n. b.
Formiat	-	-	n. b.	n. b.
BA	-	-	n. b.	-
Cholin	-	-	-	+
Laktat	Sulfit	+	+	+
Laktat	Thiosulfat	+	+	+
Laktat	Disulfit	+	+	+
Laktat	Schwefel	-	-	-
Laktat	Nitrat	-	-	-
Laktat	Fumarat	-	n. b.	n. b.

[a] = nicht beschrieben

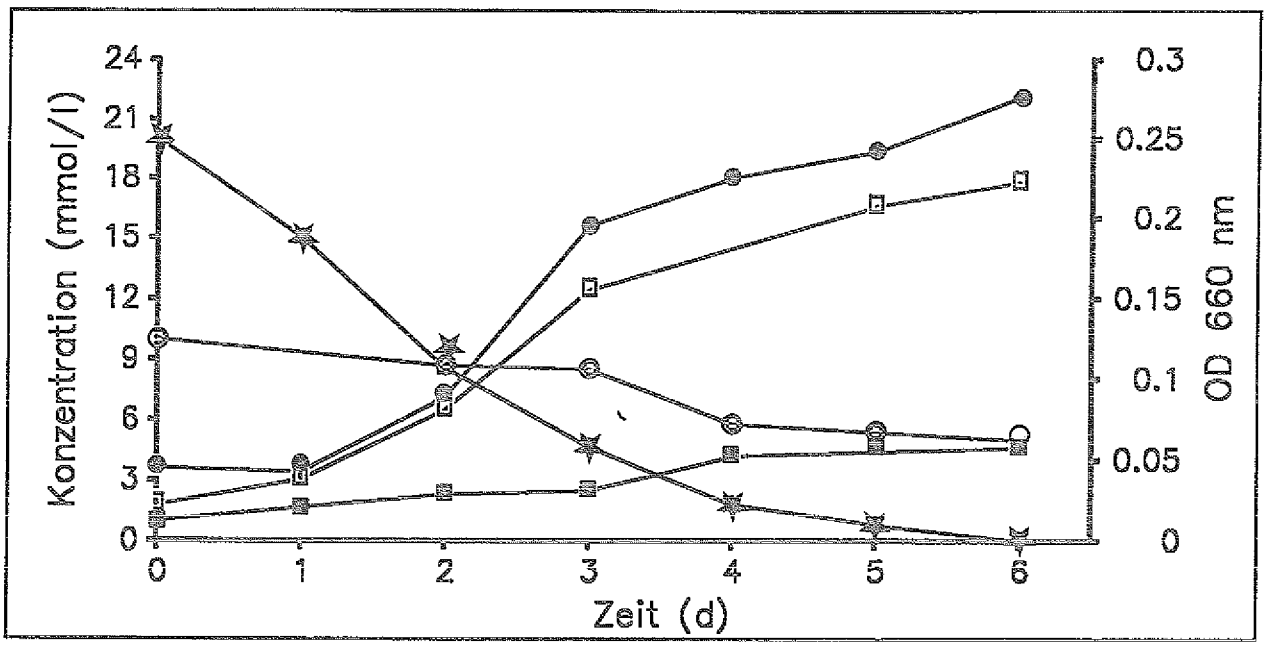


Abbildung 3.9: Bildung von Acetat (□), CO_2 ( ) und H_2S (■) während des Wachstums (●) von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf 20 mM Pyruvat (✱) mit Sulfat (○) als Elektronenakzeptor (alle Angaben in $mmol \cdot l^{-1}$).

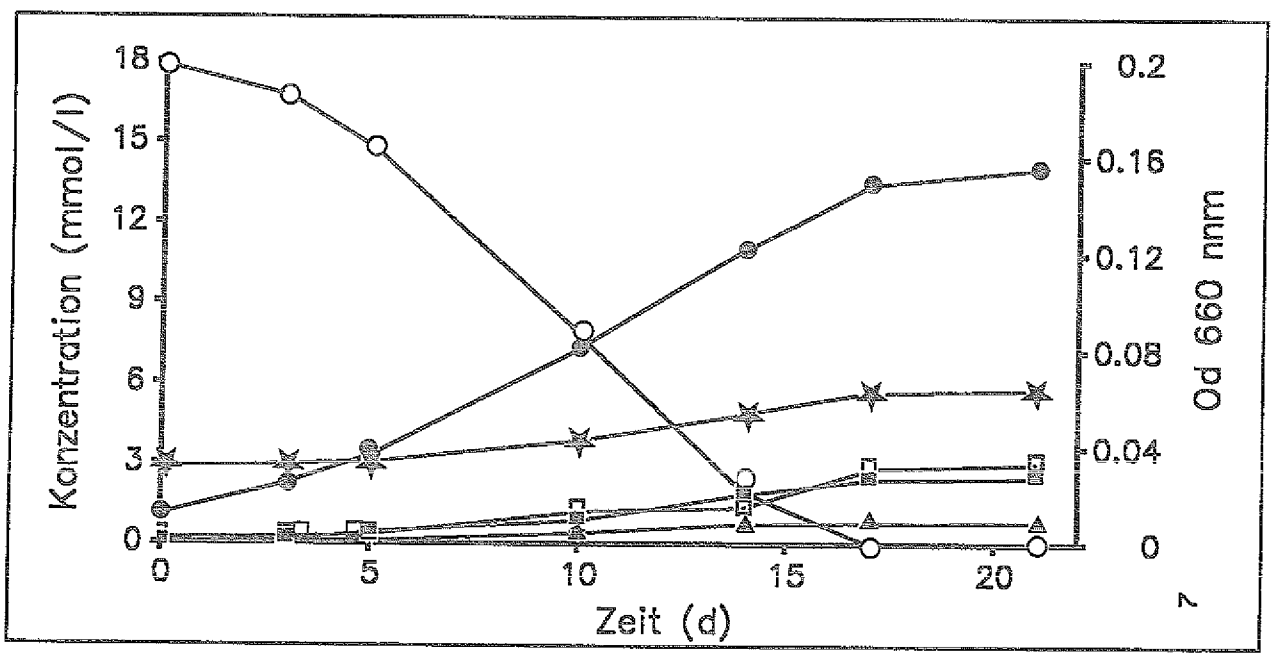


Abbildung 3.10: Bildung von Acetat (●), Ethanol (□), Succinat (▲) und Wasserstoff (■) während des Wachstums (✱) von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf 20 mM Pyruvat (○) ohne Sulfat als Elektronenakzeptor (alle Angaben in $mmol \cdot l^{-1}$).

3.3.2. Umsetzung substituierter Benzoesäuren

Die bisher einzige bekannte anaerobe Umsetzung von 3-CBA war die Dehalogenierung zu Benzoesäure (Tiedje et al. 1987). Da in den Kulturen keine Benzoesäure nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, welche Produkte der isolierte Organismus *D. vulgaris* Stamm PY1 aus 3-CBA bildete. Dabei wurde 3-Chlorbenzylalkohol (3-CBOH) über GC-MS als einziges Produkt der 3-CBA Umsetzung nachgewiesen. Die Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH erfolgte quantitativ ohne die Bildung von Zwischenprodukten und endete, nachdem das Substrat Pyruvat verbraucht war (Abbildung 3.11).

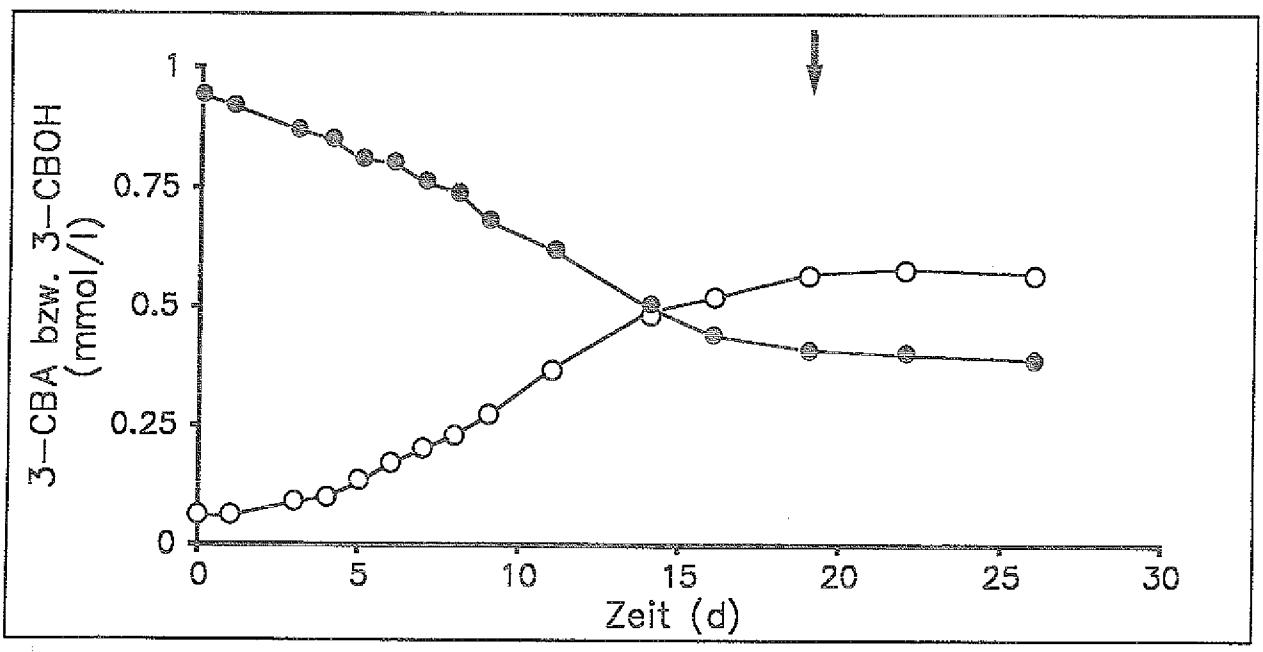


Abbildung 3.11: Bildung von 3-CBOH (○) aus 3-CBA (●) durch *D. vulgaris* Stamm PY1 während des Wachstums auf 18 mM Pyruvat bei pH 6,7 und 37 °C in Abwesenheit von Sulfat (Angaben in $mmol \cdot l^{-1}$). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, als in der Kultur kein Pyruvat mehr nachweisbar war.

Neben 3-CBA konnte *D. vulgaris* Stamm PY1 noch eine Reihe weiterer substituierter Benzoesäuren während des Wachstums auf 20 mM Pyru-

Tabelle 3.13: Umsetzung unterschiedlich substituierter Benzoesäuren (Anfangskonzentration: 500 $\mu mol \cdot l^{-1}$) durch *D. vulgaris* Stamm PY1 während des Wachstums mit 20 mmol Pyruvat$\cdot l^{-1}$ bei 37 °C und pH 6,3. Alle Angaben sind Mittelwerte aus 4 Parallelen.

	Umgesetzte Menge $\mu mol \cdot l^{-1}$
Benzoesäure	440 ± 12
2-Cl-Benzoesäure	15 ± 26
2-Br-Benzoesäure	15 ± 24
2-OH-Benzoesäure	10 ± 13
3-F-Benzoesäure	317 ± 17
3-Cl-Benzoesäure	425 ± 28
3-Br-Benzoesäure	378 ± 39
3-J-Benzoesäure	318 ± 46
3-OH-Benzoesäure	-10 ± 32
3-Amino-Benzoesäure	400 ± 32
4-F-Benzoesäure	220 ± 22
4-Cl-Benzoesäure	385 ± 19
4-Br-Benzoesäure	340 ± 17
4-OH-Benzoesäure	-10 ± 8
2,3-Cl-Benzoesäure	8 ± 26
2,4-Cl-Benzoesäure	150 ± 23
2,5-Cl-Benzoesäure	100 ± 36
2,6-Cl-Benzoesäure	13 ± 17
2-OH,5-Cl-Benzoesäure	18 ± 17
3,4-Cl-Benzoesäure	330 ± 27
3,5-Cl-Benzoesäure	152 ± 55
3,5-OH-Benzoesäure	-20 ± 29

vat reduzieren (Tabelle 3.13). Während der 30 tägigen Inkubation bei pH 6,3 und 37°C nahm die Konzentration aller zur Carboxylgruppe in meta- und para-Position monohalogenierter Benzoesäuren um 220 bis 430 $\mu mol \cdot l^{-1}$ ab. Dabei hatte die Art des Halogenatoms Ein-

fluß auf die umgesetzte Menge. Die chlorierten Benzoesäuren wurden mit etwa 400 $\mu mol \cdot l^{-1}$ in annähernd dem gleichen Umfang umgesetzt wie Benzoesäure, während die umgesetzte Menge bromierter, fluorierter und jodierter Benzoesäuren in dieser Reihenfolge abnahm. Hydroxylierte und in ortho-Stellung halogenierte Benzoesäuren konnte *D. vulgaris* Stamm PY1 nicht umsetzen.

Neben den aromatischen Carbonsäuren konnte *D. vulgaris* Stamm PY1 auch aliphatische Carbonsäuren reduzieren. Dabei wurde die Bildung von Propanol, iso- und n-Butanol sowie von n-Amylalkohol aus den entsprechenden Säuren nachgewiesen.

Bei der Reduktion von organischen Säuren zu Alkoholen wird Wasserstoff fixiert. *D. vulgaris* Stamm PY1 konnte auf Wasserstoff und Sulfat als Energiequelle mit Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen (Tab. 3.12). Deshalb wurde untersucht, ob *D. vulgaris* Stamm PY1 auch den im 3-CBOH fixierten Wasserstoff mit Sulfat zur Energiegewinnung nutzen konnte. Während der 1monatigen Inkubation konnte in den Kulturen mit Acetat als C-Quelle jedoch weder die Bildung von 3-CBA aus 3-CBOH, noch eine Zunahme der Biomasse beobachtet werden.

3.3.3. Einfluß von Kulturparametern auf die Reduktion von 3-Chlorbenzoesäure

Der Einfluß von Kulturparametern auf die Umsetzung von 3-CBA durch *D. vulgaris* PY1 wurde untersucht, um das Wachstum und die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Bei der Untersuchung des Einflußes unterschiedlicher Sulfatkonzentrationen begann in der Kontrollkultur ohne Sulfat die Reduktion von 3-CBA sofort und endete nachdem kein Pyruvat mehr nachweisbar war (Abbildung 3.12). In der Kultur mit 1 mM Sulfat begann die Umsetzung von 3-CBA erst nach 5 Tagen, als kein Sulfat aber noch Pyruvat vorhanden war. In dieser Kultur wurde mit 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ gegenüber 0,7 $mmol \cdot l^{-1}$ in der Kontrollkultur um etwa den Faktor 2 weniger 3-CBA reduziert, während in der Kultur mit 6 mM Sulfat keine Abnahme der 3-CBA Konzentration beobachtet wurde.

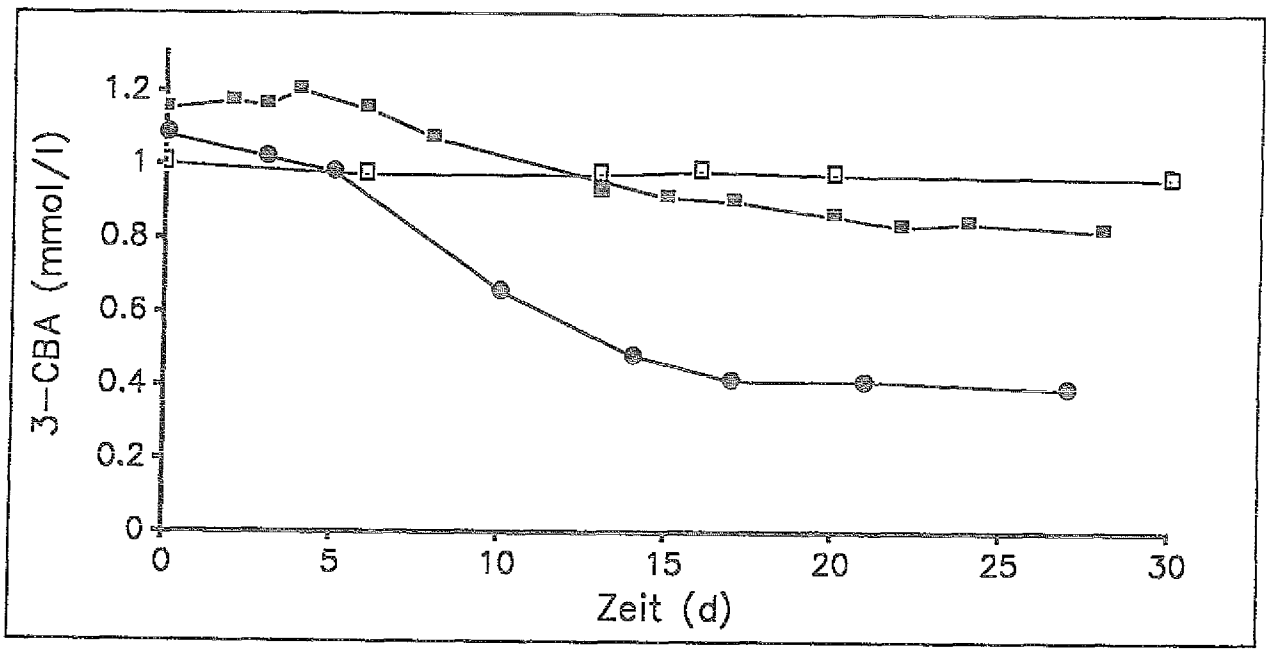


Abbildung 3.12: Umsetzung von 3-CBA in Kulturen mit unterschiedlichem Sulfatgehalt bei pH 6,7 und 37°C. Die Sulfatanfangskonzentrationen waren 0 $mmol \cdot l^{-1}$ (●), 1 $mmol \cdot l^{-1}$ (■) und 6 $mmol \cdot l^{-1}$ (□).

Neben Sulfat inhibierten auch Sulfit, Disulfit und Thiosulfat die Reduktion von 3-CBA (Tabelle 3.14). Mit molekularem Schwefel und Nitrat im Medium wurde während des Wachstums auf Pyruvat mit etwa 800 $\mu mol \cdot l^{-1}$ die gleiche Menge 3-CBOH gebildet, wie in der Kontrolle.

Um zu klären, ob die Hemmung der 3-CBA Reduktion durch reduzierbare Schwefelverbindungen kompetitiv erfolgte, wurden zu 3-CBA reduzierenden Kulturen unterschiedliche Mengen Sulfat zugegeben. Nach der Sulfatzugabe setzte sofort erhöhtes Wachstum ein (Abbildung 3.13a), während die Reduktion von 3-CBA mit unveränderter Geschwindigkeit erfolgte (Abbildung 3.13b). Mit zunehmender Sul-

Tabelle 3.14: Bildung von 3-CBOH aus 1 mmol·l^{-1} 3-CBA während des Wachstums von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf Pyruvat mit verschiedenen anorganischen Elektronenakzeptoren (10 mM).

Elektronenakzeptor	3-CBOH (µmol·l^{-1})
Kontrolle (-)	868 ± 14
Nitrat	808 ± 37
Schwefel	782 ± 10
Sulfat	22 ± 4
Sulfit	6 ± 8
Thiosulfat	35 ± 15
Disulfit	19 ± 20

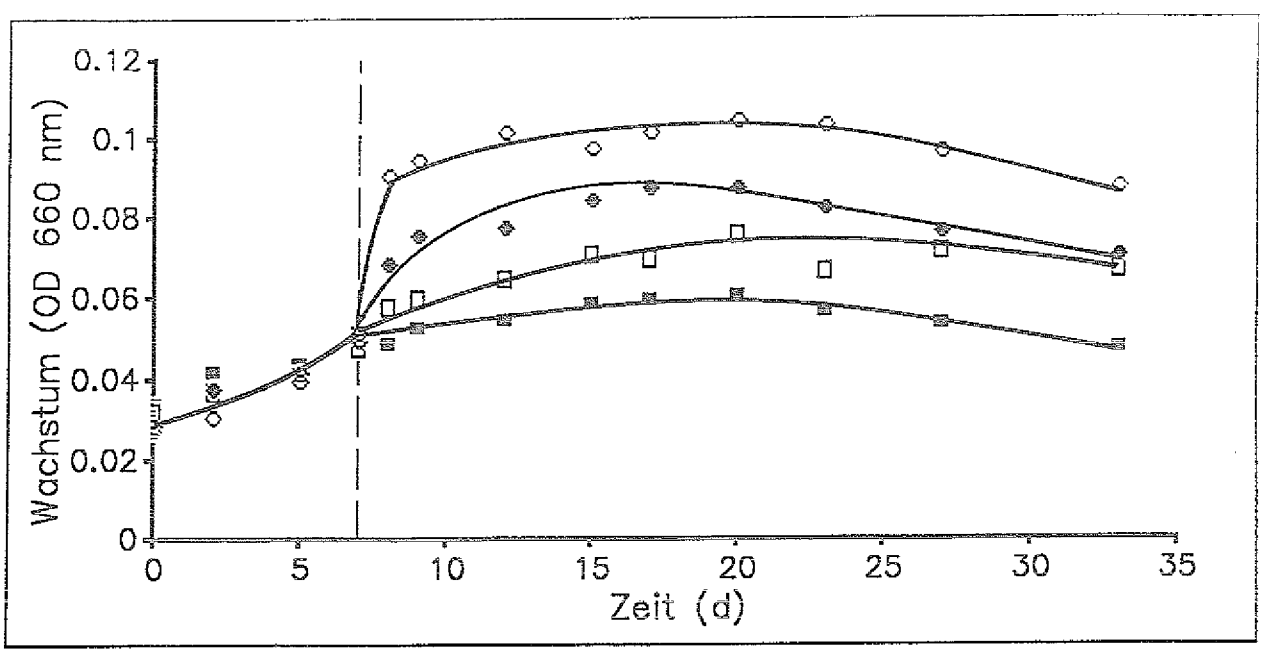


Abbildung 3.13a: Wachstum von *D. vulgaris* PY1 bei nachträglicher Zugabe unterschiedlicher Sulfatmengen während des Wachstums auf 20 mmol Pyruvat·l^{-1} bei pH 6,7 und 37°C. Die nachträglich zugegebenen Sulfatmengen waren 0 (■), 0,1 (□), 0,5 (●) und 1 mmol·l^{-1} (○).

fatmenge sank jedoch die während des Wachstums reduzierte Menge 3-CBA, da Pyruvat schneller verbraucht wurde und die entstehenden reduzierten Reduktionsäquivalente durch die Sulfidbildung regeneriert werden konnten. Da keine Verringerung der 3-CBA Reduktionsrate beobachtet wurde, konnte eine kompetitive Hemmung durch Sulfat ausgeschlossen werden.

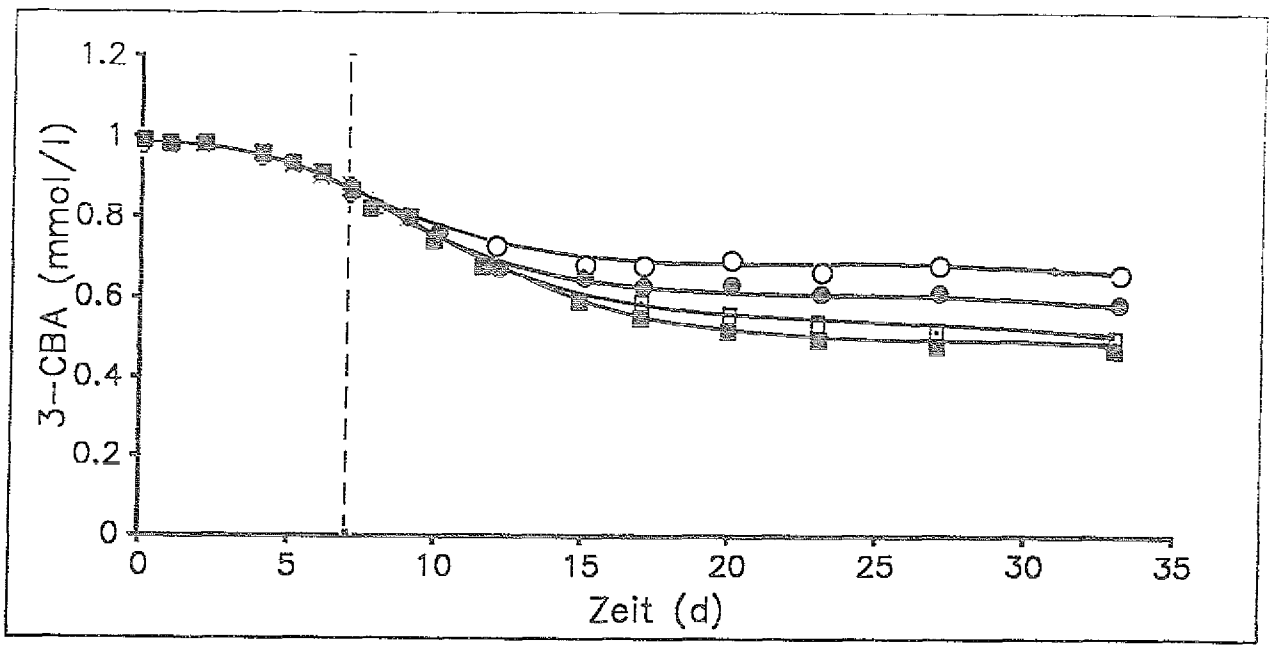


Abbildung 3.13b: 3-CBA-Verbrauch durch *D. vulgaris* PY1 bei nachträglicher Zugabe unterschiedlicher Sulfatmengen während des Wachstums auf 20 $mmol_{Pyruvat} \cdot l^{-1}$ bei pH 6,7 und 37°C. Die nachträglich zugegebenen Sulfatmengen waren 0 (■), 0,1 (□), 0,5 (●) und 1 $mmol \cdot l^{-1}$ (○).

Da Sulfat zwar das Wachstum stimulierte, aber die während des Wachstums reduzierte Menge 3-CBA verringerte, wurde versucht, das Wachstum und die Reduktion von 3-CBA durch Veränderungen des pH-Wertes zu steigern. Für die Bestimmung der pH-Optima des Wachstums mit und ohne Sulfat wurde das Medium in dem pH-Bereich von 6 - 7,5 mit Carbonat und von pH 7,5 - 8,2 mit Tris-HCl gepuffert. Während des Wachstums sank der pH-Wert um etwa 0,1 pH-Einheiten ab. Abbildung 3.14 zeigt, daß *D. vulgaris* PY1 auf 20 mM Pyruvat mit 10 mM Sulfat in dem Bereich von pH 6,3 bis 7,5 mit einer konstanten

Wachstumsrate von 0,075 - 0,08 h^{-1} wuchs. Dies entsprach einer Verdoppelungszeit von 8,7 Stunden. Bei pH-Werten unter pH 6,0 und über pH 8,0 wuchs *D. vulgaris* PY1 nicht.

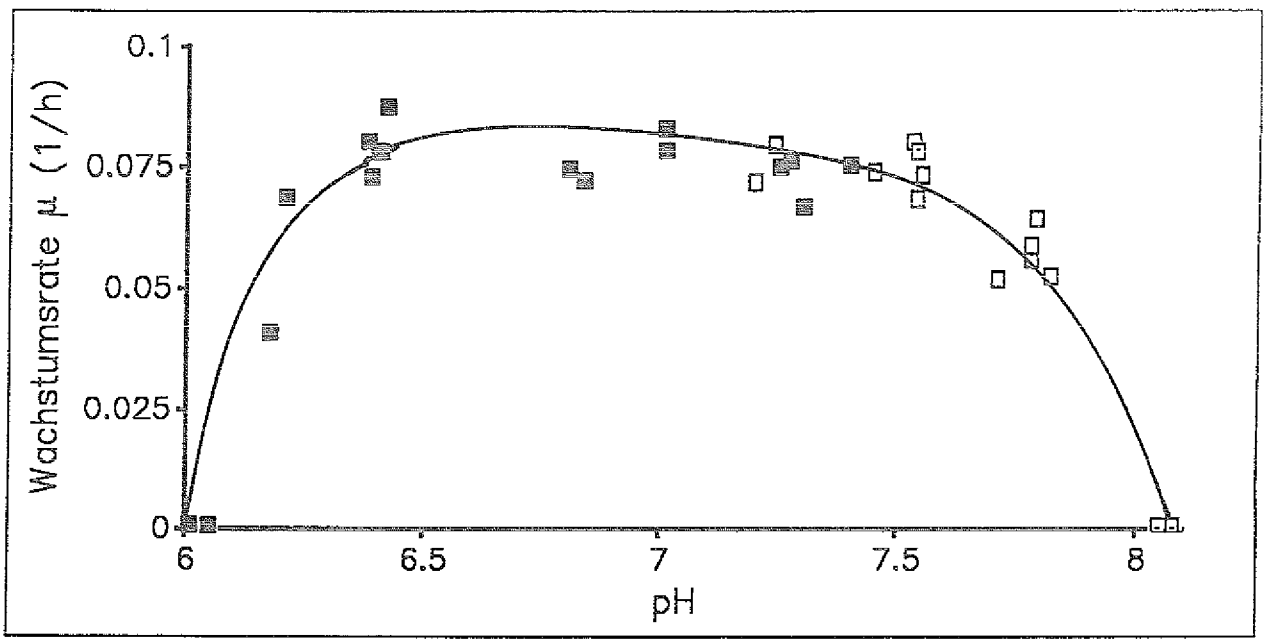


Abbildung 3.14: Wachstumsraten von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf Pyruvat plus Sulfat in Abhängigkeit vom pH-Wert in Carbonat- (■) und Tris-HCl (□) gepuffertem Medium.

Auch auf Pyruvat ohne Sulfat wuchs der Organismus über den gesamten pH-Bereich von 6,3 bis 7,6 mit Wachstumsraten von 0,16 bis 0,18 d^{-1} etwa gleich schnell. Damit war das Wachstum gegenüber Kulturen mit Sulfat um den Faktor 10 verlangsamt. Die während des Wachstums auf 20 mM Pyruvat reduzierte 3-CBA-Menge nahm jedoch mit sinkendem pH-Wert von 0,17 $mmol \cdot l^{-1}$ bei pH 7,6 auf 0,87 $mmol \cdot l^{-1}$ bei pH 6,3 zu (Abbildung 3.15).

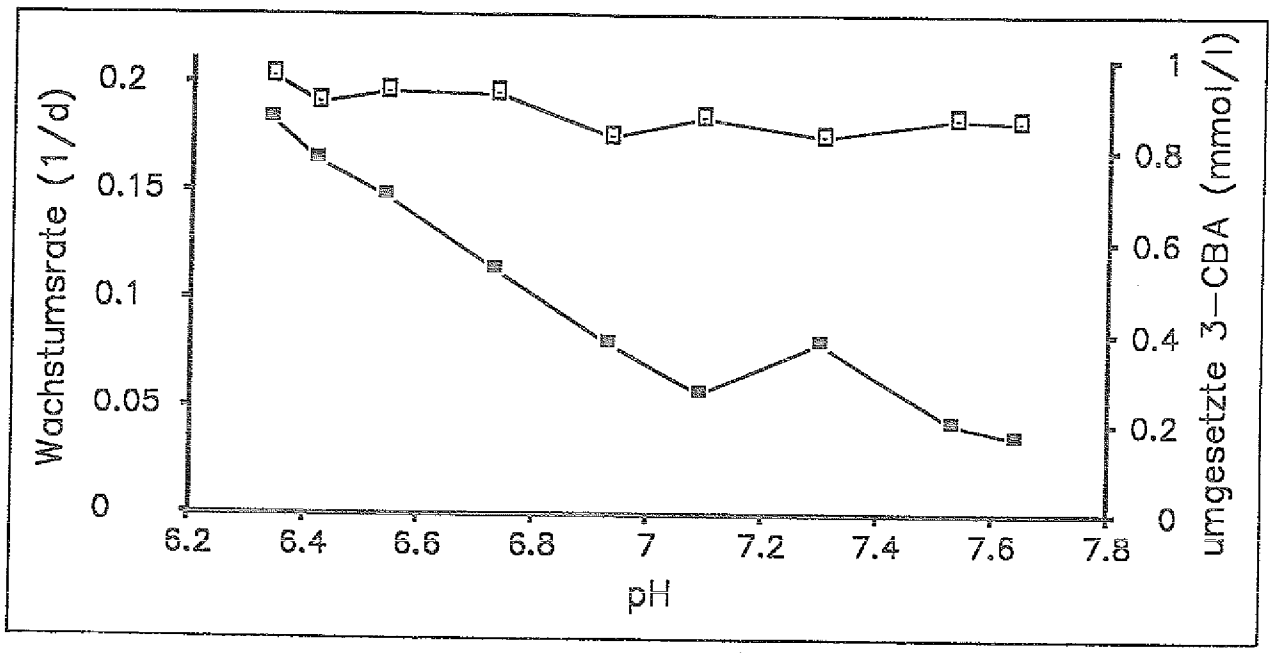


Abbildung 3.15: Bildung von 3-CBOH ($mmol \cdot l^{-1}$) (■) und Wachstumsraten (□) mit Pyruvat als Substrat bei unterschiedlichen pH-Werten 37°C.

Das Isolat *D. vulgaris* Stamm PY1 war auf demselben Mineralsalzmedium isoliert worden, auf dem auch die Mischkultur wuchs. Dieses Medium enthielt jedoch Vitamine, die für methanogene Bakterien und Mischkulturen optimiert waren (Balch et al. 1979). Deshalb sollte untersucht werden, ob *D. vulgaris* PY1 diese Vitamine, sowie die zugesetzten Spurenelemente und Vitamine zum Wachstum und zur Reduktion von 3-CBA benötigte. Dazu wurde *D. vulgaris* Stamm PY1 auf Pyruvat ohne anorganische Elektronenakzeptoren mit variierenden Konzentrationen dieser Medienzusätze angezogen. Nach 21tägiger Inkubation wurden nicht metabolisiertes Pyruvat, 3-CBA Verbrauch und Zunahme der Optischen Dichte bei 660 nm bestimmt (Tabelle 3.15). Im Vergleich zu der Kontrolle wurden nur in den Ansätzen ohne Eisen und Molybdän um den Faktor 2 - 3 geringere Zunahmen der optischen Dichte und um den Faktor 2 erhöhte Pyruvatkonzentrationen beobachtet. In den Kulturen mit doppelten Gaben Spurenelementlösung oder Wolfram-Selen-Lösung, sowie in der Kultur ohne Selen wurden kein Pyruvat und leicht erhöhte OD-Werte gefunden. In allen Kulturen wurden etwa 0,9 $mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1}$ reduziert. Lediglich in den Kulturen ohne Eisen und Wolfram wurden nur 0,46 bzw 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$

3-CBA umgesetzt. Die mit dem Inokulum eingetragenen übrigen Spurenelemente und Vitamine reichten also aus, das Wachstum von *D. vulgaris* Stamm PY1 zu unterstützen.

Tabelle 3.15: Einfluß von Vitamin- und Spurenelementmangel auf das Wachstum von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf 50 $mmol_{Pyruvat} \cdot l^{-1}$ bei pH 6.4 und 37°C. Angegeben sind die Endwerte nach 21 Tagen Inkubation.

	OD660nm	Restpyruvat ($mmol \cdot l^{-1}$)	3-CBA Verbrauch ($mmol \cdot l^{-1}$)
Kontrolle	0,061	11,9	0,94
2·SL 10	0,064	---	0,90
2·W-SE-Lsg.	0,069	---	0,83
- Vitamine	0,064	19,7	0,78
- Fe	0,021	39,7	0,46
- Ni	0,051	15,4	0,89
- Zn	0,060	4,1	0,91
- W	0,058	15,3	0,80
- Se	0,072	---	0,95
- Mn	0,056	15,5	0,90
- Cu	0,049	14,8	0,91
- Co	0,057	17,8	0,91
- Mo	0,030	37,2	0,30
- H_3BO_3	0,057	14,3	0,91

3.3.4. Einfluß variierender Aromatenkonzentrationen auf das Wachstum mit Pyruvat

Nach der Optimierung der Kulturparameter für das Wachstum auf Pyruvat ohne Sulfat und die Reduktion von 3-CBA wurde untersucht, ob die Reduktion von BA oder 3-CBA einen Wachstumsvorteil für *D. vulgaris* PY1 auf Pyruvat ohne Sulfat darstellte. 3-Chlorbenzoesäure in Konzentrationen von wenigen $mmol \cdot l^{-1}$ hemmte jedoch die Mischkultur, aus der *D. vulgaris* PY1 isoliert worden war (K_i-Wert: 12

mM, Brunner 1987) und das Wachstum von Desulfomonile tiedjei bei 1 $mmol \cdot l^{-1}$ (Shelton et al. 1984). Daher wurden zunächst die K_i-Werte für BA und 3-CBA bei Wachstum auf Pyruvat mit Sulfat bestimmt, um so über die Auswahl des geeigneten aromatischen Cosubstrates in den folgenden Versuchen eine Wachstumsinhibierung durch hohe Aromatenkonzentrationen auszuschließen.

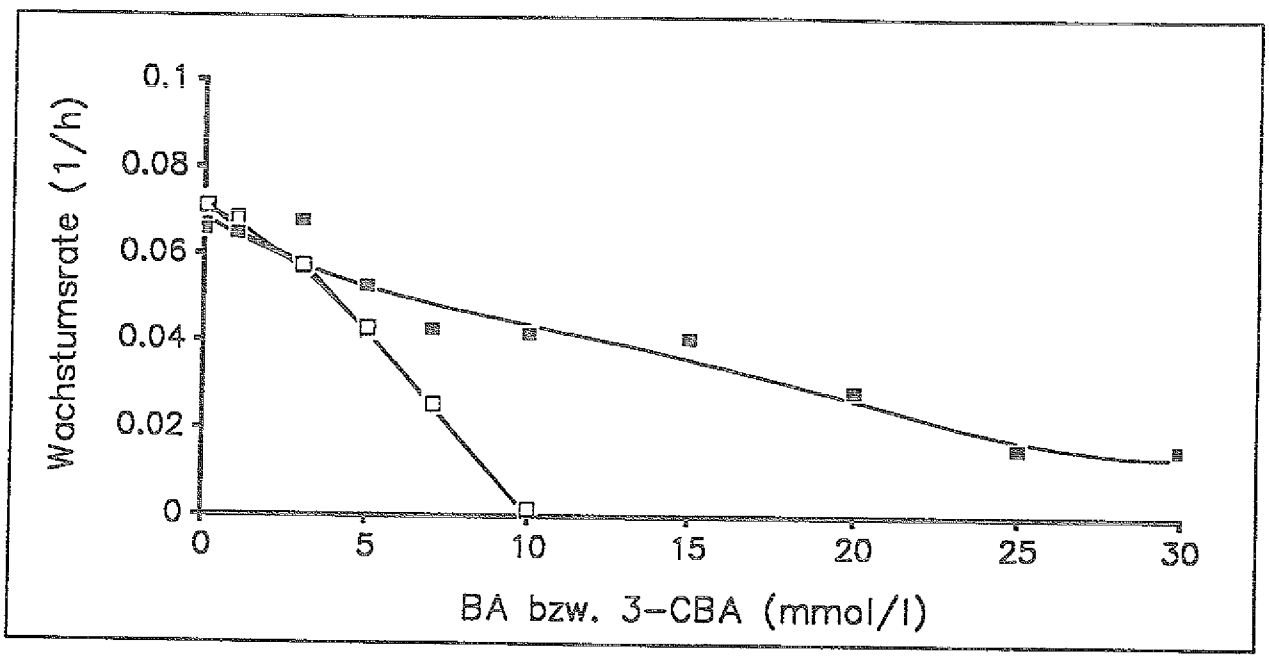


Abbildung 3.16: Wachstrumsraten *D. vulgaris* PY1 auf 20 mmol Pyruvat$\cdot l^{-1}$ plus 10 mmol Sulfat$\cdot l^{-1}$ bei unterschiedlichen BA- (■) und 3-CBA-Konzentrationen (□).

Der K_i-Wert für 3-CBA wurde mit 6 $mmol \cdot l^{-1}$ und für BA mit 17 $mmol \cdot l^{-1}$ ermittelt. Bei einer Anfangskonzentration von 10 $mmol_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1}$ wuchs *D. vulgaris* PY1 nicht, während bei 30 $mmol_{BA} \cdot l^{-1}$ noch stark verlangsamtes Wachstum von PY1 beobachtet wurde. (Abbildung 3.16). Die Inhibierung des Wachstums war bereits bei 3 $mmol \cdot l^{-1}$ 3-CBA deutlich erkennbar, während 3 $mmol_{BA} \cdot l^{-1}$ die Wachstumsrate nicht verringerten.

Da BA das Wachstum von *D. vulgaris* Stamm PY1 weniger stark verlangsamte als 3-CBA, wurde der Einfluß steigender Aromatenkonzentrationen auf das Wachstum ohne Sulfat mit BA als Cosubstrat untersucht. Dabei wurde in Kulturen mit 2 $mmol \cdot l^{-1}$ Benzoesäure eine Wachstumsrate von 0,1 pro Tag beobachtet, während in der Kultur mit 0,05 $mmol_{BA} \cdot l^{-1}$ eine um den Faktor 2 niedrigere Wachstumsrate von 0,049 pro Tag gemessen wurde. In dem Bereich von 2 bis 5 $mmol_{BA} \cdot l^{-1}$ trat keine weitere Erhöhung der Wachstumsrate auf (Abbildung 3.17). In allen Kulturen wurden 25 mg $Protein \cdot l^{-1}$ gebildet.

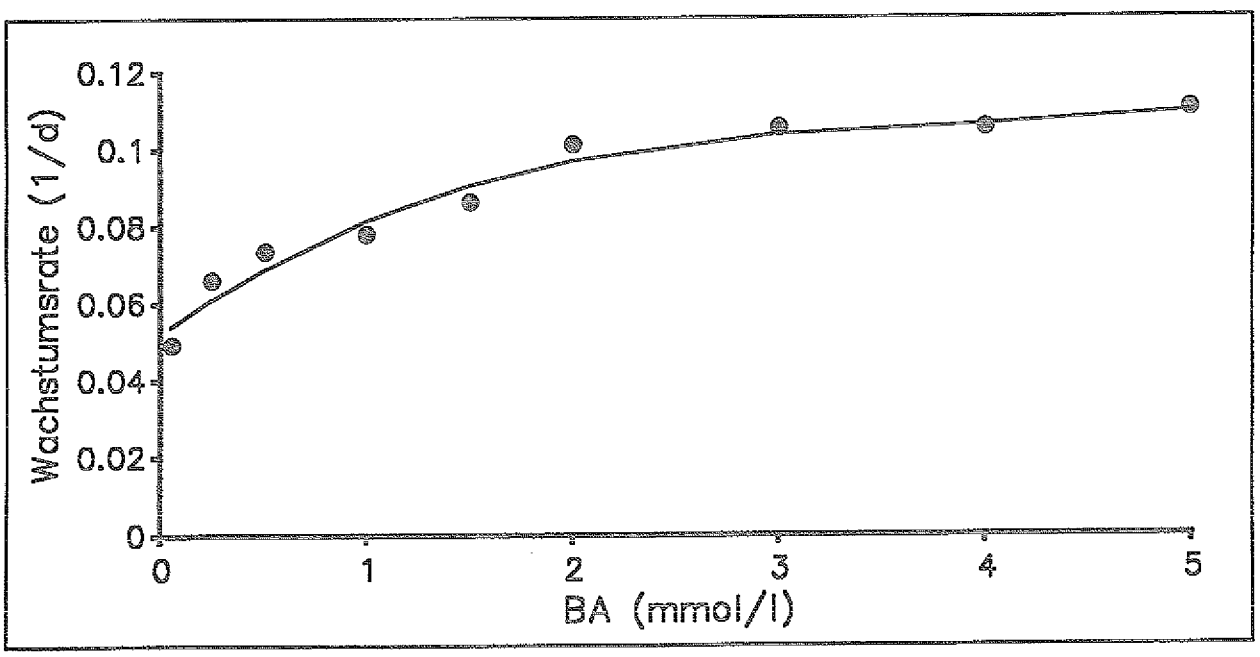


Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Benzoesäurekonzentration. *D. vulgaris* PY1 wuchs auf 20 mmol $Pyruvat \cdot l^{-1}$ ohne Sulfat bei pH 6,3 und 37°C.

Neben der Wachstumsrate beeinflußte Benzoesäure auch die Produkte des Pyruvatstoffwechsels. In Tabelle 3.16 sind die Produkte des Wachstums auf 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Pyruvat ohne Sulfat mit 2 $mmol \cdot l^{-1}$ BA und ohne BA dargestellt. Durch die Reduktion von 0,8 $mmol \cdot l^{-1}$ BA wurden 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Laktat, 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Succinat

und 1,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Ethanol gebildet. Bei gleicher Ausbeute an Acetat, wurden jedoch in der Kultur mit BA etwa 3 $mmol \cdot l^{-1}$ CO_2 mehr gebildet als in der Kultur ohne BA. Die Kohlenstoffbilanz in beiden Kulturen lag bei etwa 97%, während die nach Gottschalk (1988) berechnete Wasserstoffbilanz in der mit BA gewachsenen Kultur etwa 5% niedriger lag als in der Vergleichskultur. Der Versuch zeigte einen quantitativen Zusammmenhang zwischen der Bildung von Benzylalkohol, Succinat und Laktat, und machte deutlich, daß die Funktion der 3-CBA Reduktion in der Regenerierung von Elektronenüberträgern lag, die während des Wachstums auf Pyruvat reduziert wurden.

Tabelle 3.16: Produkte des Wachstums auf 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Pyruvat ohne Sulfat bei pH 6,4 und 37°C mit Zusatz von 2 $mmol \cdot l^{-1}$ Benzoesäure und Vergleichskultur ohne Benzoesäure (Angaben der Konzentrationen in $mmol \cdot l^{-1}$, Bilanzen in %).

Substrate	Pyruvat	20	20
	BA	--	2
Produkte	Acetat	15,7	15,6
	Ethanol	4,5	3,2
	Succinat	1,05	0,7
	H_2	4,3	3,6
	CO_2	13,8	17,0
	Laktat	0,3	--
	BOH	--	0,8
	BA	--	1,2
Bilanzen	Kohlenstoff	97,2	96,5
	Wasserstoff	99,8	93,6

3.3.5. Funktion des Isolates in der Mischkultur

Da das Isolat PY1 über 4 Jahre der Kultivierung mit 3-CBA als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in der Begleitflora der

Mischkultur erhalten blieb, wurde überprüft, ob 3-CBOH ein Zwischenprodukt des 3-CBA Abbaus in der Mischkultur darstellte. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde die Mischkultur mit 3-CBOH als Substrat inkubiert und der Abbau mit regelmäßigen HPLC Analysen verfolgt. Erst nach einer 15tägigen Adaptationsphase begann die 3-CBOH Konzentration zu sinken, wobei 3-CBA als Intermediat des Abbaus von 3-CBOH auftrat (Abbildung 3.18). Auch unter einer Wasserstoffatmosphäre, die den weiteren Abbau von BA verhindert und die Dehalogenierung stimuliert, konnte nur BA als Dehalogenierungsprodukt nachgewiesen werden, jedoch wurde weder BOH gebildet, noch wurde 3-CBOH abgebaut.

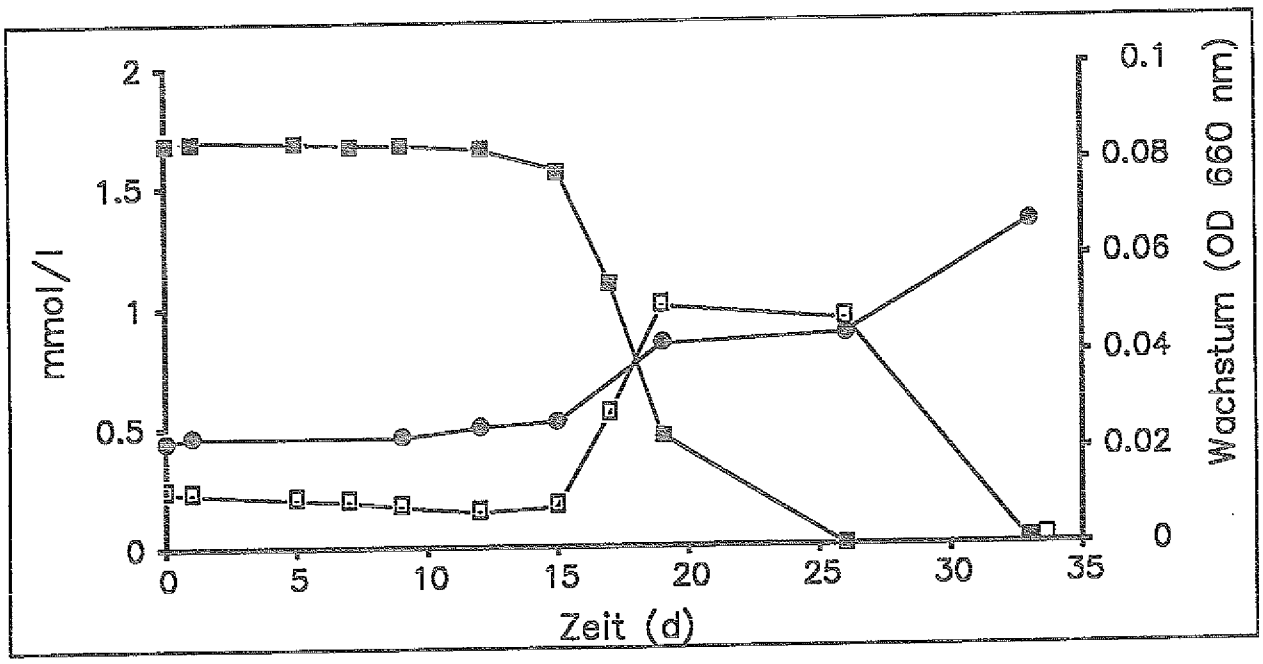


Abbildung 3.18: Abbau von 3-CBOH (▩) und Wachstum (●) der Mischkultur mit intermediärer Bildung von 3-CBA (□) bei 37°C und pH 6,7.

3.4. Reduktion von 3-Chlorbenzoesäure durch Rohextrakte

In enzymatischen Untersuchungen sollten die an der Reduktion von 3-CBA beteiligten Enzyme charakterisiert und ein Modell für die Funktion dieser Enzyme während des Wachstums ohne oxidierte Schwefelverbindungen entwickelt werden. Da keine Informationen über die natürlichen Elektronenüberträger der Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH

verfügbar waren, wurde der Enzymtest zunächst mit Methylviologen als Elektronenüberträger entwickelt. Reduziertes Methylviologen wird jedoch durch in *Desulfovibrio vulgaris* mit hohen Aktivitäten vorkommende Hydrogenasen unter Freisetzung von Wasserstoff oxidiert (Lissolo et al. 1986). Da diese Reaktion reversibel ist wurden die Untersuchungen unter Wasserstoffatmosphäre durchgeführt, um das eingesetzte Methylviologen im reduzierten Zustand zu halten. Neben Wasserstoff konnte auch Pyruvat als Elektronendonor eingesetzt werden, um Methylviologen zu reduzieren. Diesen Ansätzen mußte neben Pyruvat auch Coenzym A und Magnesium zugesetzt werden, da die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase diese Cofaktoren benötigt (Schauder et al. 1986). Sowohl die Hydrogenasen als auch die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase waren bei pH 6,35 mit spezifischen Aktivitäten von 0,025 und 0,011 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ aktiv, obwohl die Aktivitätsmaxima mit 0,046 und 0,074 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ bei pH 7,8 lagen.

Bei den Bestimmungen von Enzymaktivitäten zeigte sich, daß die spezifischen Aktivitäten der 3-CBA reduzierenden Enzyme sehr gering waren und die Testansätze über mehrere Stunden inkubiert werden mußten. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Reaktion über die lange Inkubationszeit linear war. Die spezifische Bildungsrate von 3-CBOH aus 3-CBA war über einen Zeitraum von 25 Stunden konstant (Abbildung 3.19). Daraufhin wurden in den weiteren Untersuchungen nur noch die Endkonzentrationen an gebildetem 3-CBOH nach 18 - 25 Stunden Inkubation bestimmt.

Während in den Ansätzen ohne Rohextrakt keine Bildung von 3-CBOH nachgewiesen werden konnte, stieg mit zunehmender Menge Rohextrakt auch die Geschwindigkeit der Alkoholbildung proportional an. Die spezifischen Aktivitäten in allen Ansätzen lagen zwischen 5,1 und 5,5 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ (Abbildung 3.20). Da die Bildung von 3-CBOH durch Rohextrakte aus *D. vulgaris* PY1 durch Autoklavieren der Rohextrakte inaktiviert werden konnte, war die Umsetzung von 3-CBA enzymatisch katalysiert.

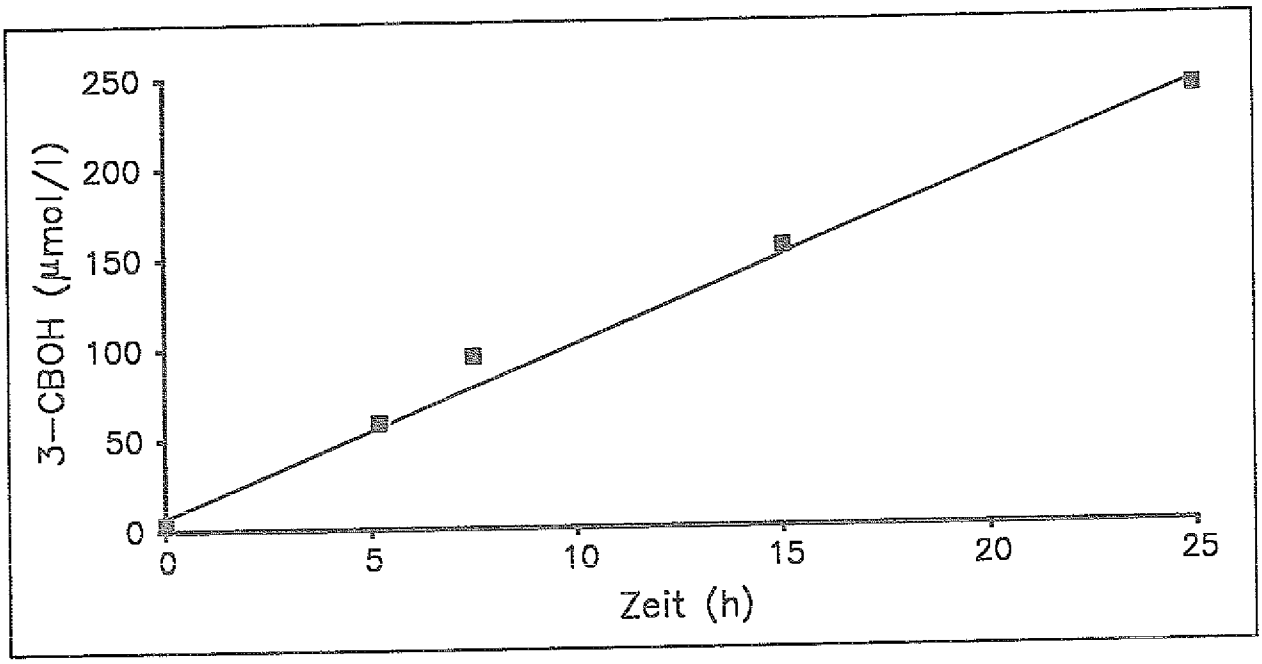


Abbildung 3.19: Bildung von 3-Chlorbenzylalkohol aus 3-Chlorbenzoesäure durch Rohextrakt im enzymatischen Test.

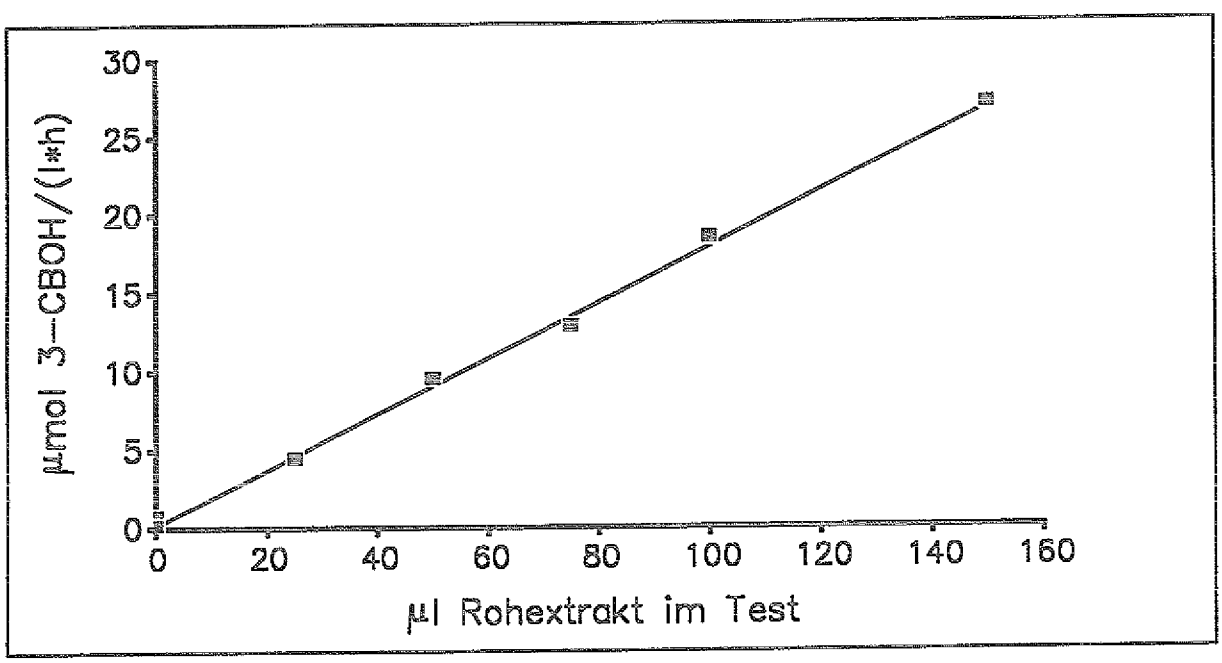


Abbildung 3.20: 3-Chlorbenzylalkoholbildungsraten bei variierenden Mengen Rohextrakt im enzymatischen Test mit Wasserstoff als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenüberträger bei pH 6,35 und 37°C.

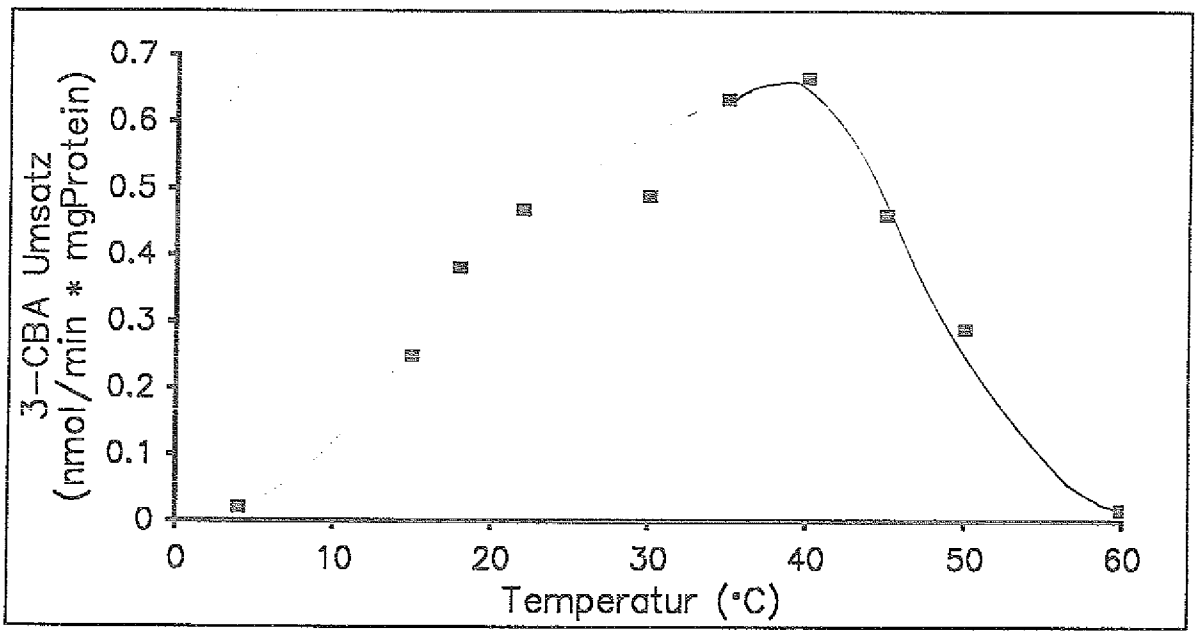


Abbildung 3.21: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die spezifische Aktivität in einem Rohextrakt aus *D. vulgaris* PY1 bei pH 6,35 mit Wasserstoff als Elektonendonator und Methylviologen als Elektronenüberträger.

Die optimale Temperatur der enzymatischen Reduktion von 3-CBA lag mit 0,66 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ bei 40°C (Abbildung 3.21). Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten zwischen pH 6 und 6,7 mit 0,48 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ gemessen (Abbildung 3.22). Jedoch wurden auch bei pH 4 und pH 8 noch schwache Aktivitäten von 0,03 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ nachgewiesen.

Alle weiteren Messungen erfolgten in den Aktivitätsmaxima bei pH 6,35 und 37°C. Das Temperaturoptimum der enzymatischen Messung stimmte mit dem Optimum für das Wachstum (37°C) überein. Die Enzyme zeigten jedoch ein breiteres pH-Optimum als es für die Umsetzung mit wachsenden Zellen gefunden wurde.

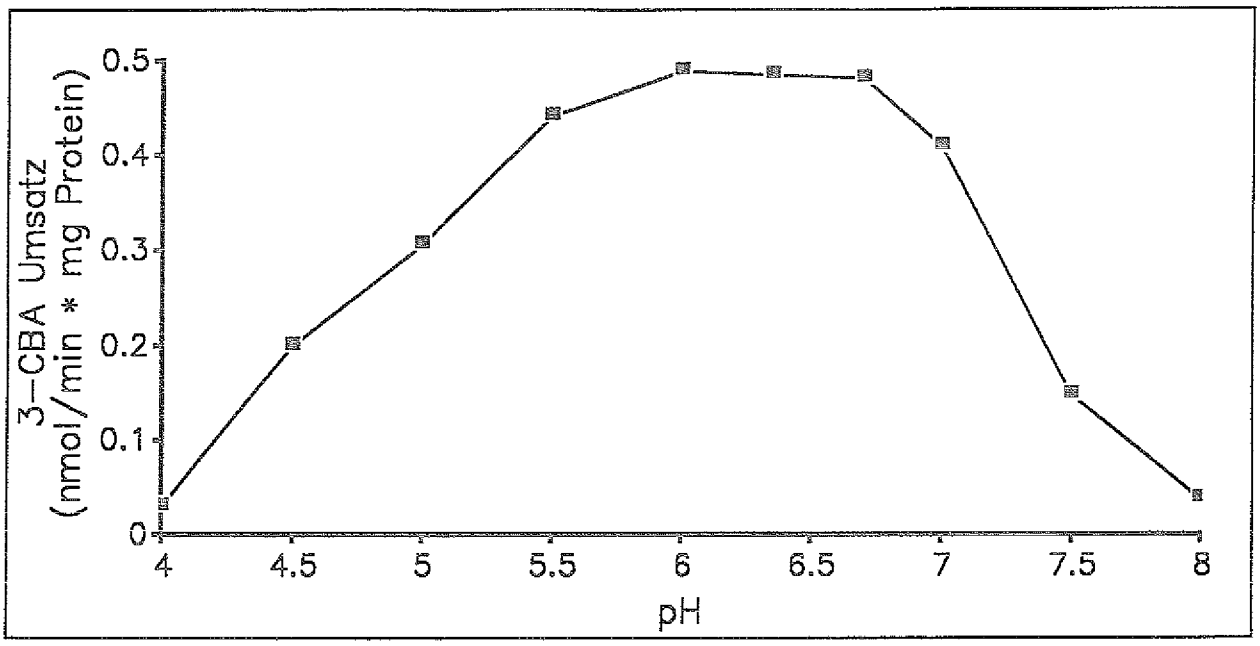


Abbildung 3.22: Einfluß des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität in einem Rohextrakt aus *D. vulgaris* PY1 bei 37°C mit Wasserstoff als Elektonendonator und Methylviologen als Elektronenüberträger.

3.4.1. Charakterisierung der 3-CBA reduzierenden Enzyme

Da die natürlichen Elektronenüberträger für die 3-CBA Reduktion nicht bekannt waren, wurde untersucht, ob neben Methylviologen auch Ferredoxin, FAD, FMN, NAD und NADP zur Bildung von 3-CBOH durch Rohextrakte führten. Dabei wurde Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* verwendet, da es wie das Ferredoxin in *D. vulgaris* ein reaktives Zentrum vom Typ 4Fe-4S besitzt (Odom und Peck 1984). Die untersuchten Elektronenüberträger wurden sowohl mit Wassserstoff, als auch mit Pyruvat als Elektronendonator getestet. Die Cofaktoren Ferredoxin, FAD und FMN führten mit beiden Elektronendonoren zur Bildung von 3-CBOH mit spezifischen Aktivitäten von 0,25 bis 0,8 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ (Tabelle 3.17). Die im Vergleich zu Methylviologen erniedrigte spez. Aktivität mit Ferredoxin kann auf die niedrigere Konzentration im Test zurückzuführen sein. Mit NAD und NADP erfolgte die Reduktion von 3-Chlorbenzoesäure im enzymatischen Test etwa 10fach langsamer als mit Methylviologen (Tabelle 3.17). In der Oxidation von FAD und FMN

deutete sich bereits die Funktion der 3-CBA reduzierenden Enzyme während des Wachstums ohne reduzierbare Schwefelverbindungen an, da das Redoxpotential dieser Elektronenüberträger mit etwa -200 mV zu hoch ist, um Wasserstoff freizusetzen.

Tabelle 3.17: Einfluß der Elektronenüberträger auf die spezifische 3-CBA Reduktionsrate in einem Rohextrakt aus *D. vulgaris* PY1. Die Ansätze mit Pyruvat als Elektronendonator enthielten 1 mM CoA und 1 mM $MgCl_2$ als Cofaktoren.

e^- Donator	e^-Überträger	$\frac{\text{nmol 3-CBOH}}{\text{min} * mg_{Protein}}$
Pyruvat	Methylviologen	0,86
	FAD	0,60
	FMN	0,27
	Ferredoxin	0,69
	NAD	<0,01
	NADP	0,02
	---	<0,01
Wasserstoff	Methylviologen	0,62
	FAD	0,47
	FMN	0,35
	Ferredoxin	0,25
	NAD	0,05
	NADP	0,04
	---	<0,01

Die Bestimmung der k_M-Werte für BA und 3-CBA erfolgte mit Methylviologen und Wasserstoff als Elektronendonor. Der k_M-Wert für Benzoesäure wurde mit 8,6 mM und für 3-Chlorbenzoesäure mit 3,8 mM bestimmt. Höhere 3-CBA Konzentrationen als 10 mM führten zu einer Inhibierung der Enzyme, während mit BA erst ab etwa 50 mM die Substratinhibierung einsetzte. Die maximale Umsatzrate für 3-CBA wurde mit 1,09 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ ermittelt (Abbildung 3.23).

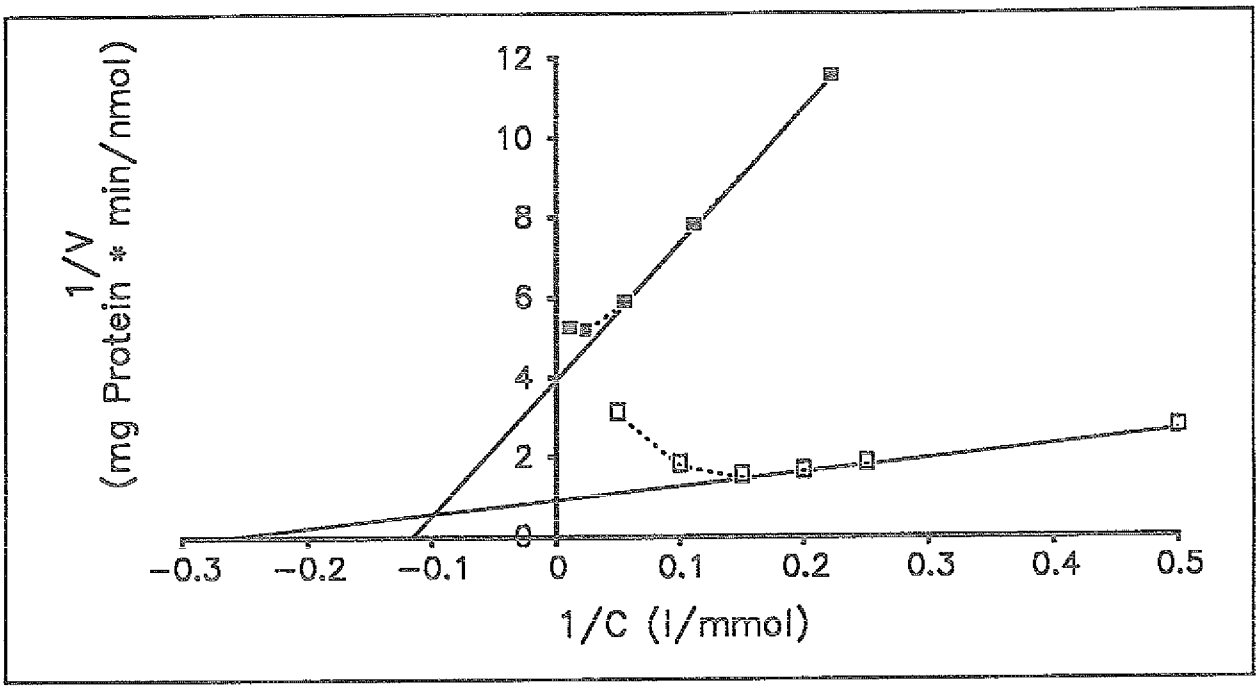


Abbildung 3.23: Bestimmung der k_M-Werte für die Reduktion von Benzoesäure (■) und 3-Chlorbenzoesäure (□) durch Rohextrakte aus *D. vulgaris* PY1 mit Wasserstoff als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenüberträger (Lineveawer-Burk Darstellung).

Um zu ermitteln, ob die 3-CBA reduzierenden Enzyme im Cytoplasma oder in den Membranen lokalisiert sind, wurden in einem Rohextrakt zunächst die Membranen in einer 1stündigen Ultrazentrifugation bei 40.000 g abgetrennt. Bei den anschließenden enzymatischen Messungen wurden in der löslichen Fraktion mit 0,464 $nmol_{3\text{-}CBOH} \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ etwa 85% der spezifischen Aktivität des Rohextraktes gefunden, während die Membranfraktion mit 0,027 $nmol_{3\text{-}CBOH} \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ nur 5% der spezifischen Aktivität des Rohextraktes von 0,545 $nmol_{3\text{-}CBOH} \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ aufwies. Die Enzyme sind also im Cytoplasma der Zellen lokalisiert.

Bei den Untersuchungen zur Sauerstoffempfindlichkeit der Enzyme (Abbildung 3.24) zeigte sich, daß bereits nach 7 min Exposition unter Luftsauerstoff nur noch 50% der anfänglichen Aktivität des Rohextraktes vorhanden waren. Nach 30 min war die spezifische Aktivität auf 5% der Aktivität des Rohextraktes vor Inkubation an

Luft abgesunken. Die Schädigung der Enzyme war irreversibel und die Reduktion des Rohextraktes durch 1 mM Dithionit nach der Sauerstoffexposition führte nicht zu einer Rekonstitution der 3-CBA reduzierenden Aktivität.

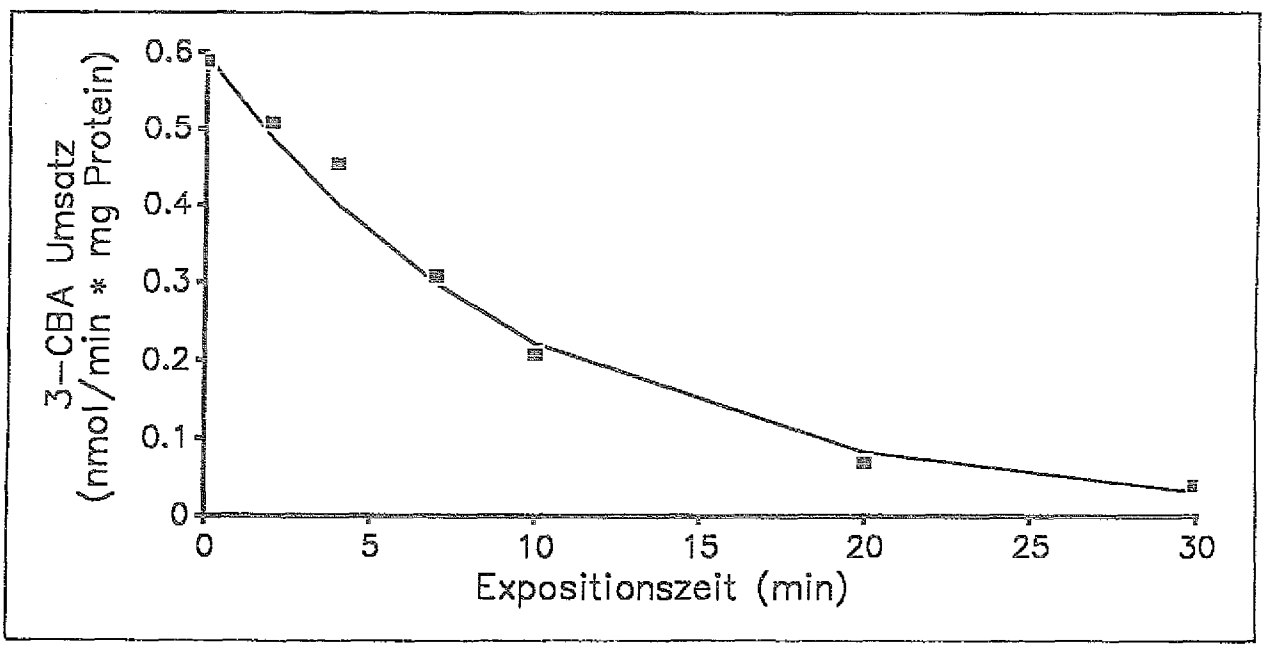


Abbildung 3.24: Einfluß von Luftsauerstoff auf die spezifische Aktivität der 3-CBA reduzierenden Enzyme in einem Rohextrakt aus *D. vulgaris* PY1 mit Wasserstoff als Elektronendonator und Methylviologen als Elektronenüberträger. Der Rohextrakt wurde bei Raumtemperatur unter Luft gerührt.

3.4.2. Einfluß von oxidierten Schwefelverbindungen auf die Reduktion von 3-CBA durch Rohextrakte

Zusätze von Sulfat, Sulfit oder Dithionit zu den Testansätzen zeigten keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität. Sowohl in der Kontrolle, als auch in den Ansätzen mit jeweils 5 mM Sulfat,

Sulfit oder Dithionit wurden spezifische Aktivitäten von 0,57 bis 0,71 $nmol_{3\text{-}CBOH} \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ beobachtet. Dadurch konnte eine Inhibierung der reduzierenden Enzyme durch diese Zusätze ausgeschlossen werden. Die Menge an reduzierten Elektronenüberträgern war also ausreichend, beide Reaktionen parallel ablaufen zu lassen.

Da aber während des Wachstums auf Pyruvat mit oxidierten Schwefelverbindungen kein 3-CBOH aus 3-CBA gebildet wurde, sollte nun geklärt werden, ob unter diesen Wachstumsbedingungen weniger aktive Enzyme gebildet werden. Die Rohextrakte aus solchen Zellen hatten mit 0,13 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ nur etwa 20% der spezifischen Aktivität des Vergleichsrohextraktes (Tabelle 3.17).

Auch in *Clostridium thermoaceticum* wurden von White et al. (1989) um 98% verminderte spezifische Aktivitäten der Carbonsäure-Reduktase gemessen, wenn der Organismus nur mit Sulfat als Schwefelquelle oder ohne Wolfram angezogen wurde. Durch erhöhte Wolframgaben zum Wachstumsmedium konnte die kompetitive Hemmung der Wolframaufnahme durch Sulfat aufgehoben werden (White et al. 1989). Um zu überprüfen, ob auch in *D. vulgaris* Stamm PY1 die verminderte spezifische Aktivität der 3-CBA reduzierenden Enzyme auf den Mangel an Anionen der Gruppe VIIa zurückzuführen sei, wurde PY1 mit 20 mM Sulfat und unterschiedlichen Wolfram- und Molybdatkonzentrationen im Medium angezogen. In allen Ansätzen ohne oder mit erhöhten Konzentrationen an Molybdat oder Wolframat wuchs *D. vulgaris* PY1 langsamer und zu niedrigeren Zelldichten als in den Vergleichskulturen. Nur in dem Rohextrakt aus den Zellen ohne Molybdat betrug die spezifische Aktivität der 3-CBA reduzierenden Enzyme mit 0,02 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ nur etwa 10% der übrigen Rohextrakte aus mit Sulfat gewachsenen Zellen (Tabelle 3.18). Bei Molybdatkonzentrationen von 10 µM und höher wuchs *D. vulgaris* Stamm PY1 aufgrund der wachstumshemmenden Wirkung von Molybdat auf sulfatreduzierende Bakterien nicht mehr (Newport und Nedwell 1988). Die höchste spezifische Aktivität hatte der Rohextrakt aus Zellen mit 5 mM Sulfit im Medium, was nicht ausreichte, um die aus dem Metabolismus von 50 mM Pyruvat anfallenden Elektronen abzuziehen.

Tabelle 3.18: Einfluß verschiedener Schwefeloxyanionen-, Wolframat und Molybdatkonzentrationen während des Wachstums auf 50 mM Pyruvat auf die spezifische Aktivität in Rohextrakten.

Sulfat mM	Sulfit mM	Molybdat mM	Wolframat mM	nmol 3-CBOH / min * $mg_{Protein}$
---	5	0,15	0,012	0,58 *
---	20	0,15	0,012	0,13
20	---	0,15	0,012	0,13
20	---	---	0,012	0,02
20	---	1,0	0,012	0,13
20	---	0,15	---	0,11
20	---	0,15	0,1	0,1
20	---	0,15	1,0	0,12
20	---	0,15	10,0	0,17
20	---	0,15	100,0	0,15

* Diese Kultur wurde nach Verbrauch des zugesetzten Sulfites weiter inkubiert, um die 3-CBA reduzierenden Enzyme zu induzieren.

3.4.3. Aktivierung der 3-Chlorbenzoesäure

In Bakterien, die anaerob auf Benzoesäure wachsen können, wird die Benzoesäure durch die Bildung des Thioesters mit Coenzym A aktiviert (Dangel et al. 1991). Um zu klären, ob die Bildung des 3-CBA-CoA-Thioesters die Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH einleitet, wurden zwei Experimente durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden ganze Zellen in phosphatfreiem Puffer gewaschen um die Synthese von ATP zu unterbinden. Die spezifischen Aktivitäten wurden dann in phosphatfreiem Puffer mit Zusatz von Sulfit oder Phosphat unter Wasserstoff bestimmt. Die Reduktion des Sulfits mit Wasserstoff sollte es den Zellen zusammen mit Phosphat ermöglichen ATP zu synthetisieren (Odom und Peck 1984) und so die Stoffwechselenergie für eine etwa notwendige Aktivierung der 3-CBA zu gewinnen. Es ergaben sich jedoch in allen Ansätzen gleich hohe spezifische Aktivitäten von 0,26 bis 0,29 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$,

ohne daß die Energetisierung der Zellen die Umsatzaktivität steigerte.

In einem weiteren Experiment wurden aus einem Rohextrakt über eine G-25 Gelfiltrationssäule etwa 95% aller Bestandteile mit einem Molekulargewicht niedriger als 5.000 D entfernt. Das Gelfiltrat ohne Coenzym A und ATP zeigte etwa 78% der spezifischen Aktivität des Rohextraktes. Auch die Zugabe von Coenzym A zusammen mit ATP und Magnesium führte weder in dem Rohextrakt noch in dem Gelfiltrat zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität (Tabelle 3.19).

Tabelle 3.19: Spezifische 3-CBA Reduktionsraten mit Wasserstoff als Elektronendonor in einem Rohextrakt sowie in dem Gelfiltrat mit und ohne Zusatz von ATP, Coenzym A oder Magnesium.

	Zusatz	Konzentration	$\frac{\text{nmol 3-CBOH}}{\text{min} * \text{mg}_{\text{Protein}}}$
Rohextrakt	Ohne	---	0,63
	Mg^{++}	2 mM	0,64
	Coenzym A,	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,58
	ATP	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,53
	ATP	1 mM	
	Coenzym A,	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,66
Gelfiltrat	Ohne	---	0,49
	Mg^{++}	2 mM	0,64
	Coenzym A,	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,62
	ATP	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,61
	ATP	1 mM	
	Coenzym A,	1 mM	
	+ Mg^{++}	2 mM	0,73

In beiden Experimenten führte der Zusatz von Stoffwechselenergie nicht zu einer erhöhten Umsatzrate der 3-CBA. Damit konnte die Aktivierung der 3-CBA durch eine Bindung an Phosphat, Coenzym A oder Nucleosidphosphaten ausgeschlossen werden.

3.4.4. Untersuchungen zur Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd zu 3-CBA in Rohextrakten

Während der Reinigung der Carbonsäure-Reduktase aus *Clostridium thermoaceticum* wurde parallel eine Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität angereichert, wobei das Verhältnis der Aktivitäten (Aldehyd-Dehydrogenase/Carbonsäure-Reduktase) bei etwa 20 konstant blieb (White et al. 1989). Deshalb wurde untersucht, ob eine 3-Chlorbenzaldehyd-Dehydrogenase Aktivität auch in den Rohextrakten von PY1 nachzuweisen war. In 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) mit Methylviologen als Elektronenakzeptor katalysierte der Rohextrakt auch die Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd zu 3-CBA (Abbildung 3.25), wobei das Endprodukt der Reaktion mit der HPLC nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion verlief mit etwa 450 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ so schnell, daß sie über die Reduktion von Methylviologen im Photometer verfolgt werden konnte. Die Oxidation des Aldehyds erfolgte damit um etwa den Faktor 700 schneller als die Reduktion der Säure zum Alkohol. Der k_M-Wert der Enzyme wurde auf 0,21 mM 3-Chlorbenzaldehyd bestimmt, etwa 20fach niedriger als der k_M-Wert der 3-CBA reduzierenden Enzyme. Die sowohl höhere Umsatzaktivität, als auch der niedrigere K_M-Wert gegenüber den 3-CBA reduzierenden Enzymen erklären, daß weder in den Kulturen noch in den enzymatischen Tests 3-Chlorbenzaldehyd als Zwischenprodukt der 3-CBA Reduktion nachweisbar war, da dieses sofort in der Rückreaktion zu 3-CBA reoxidiert worden wäre.

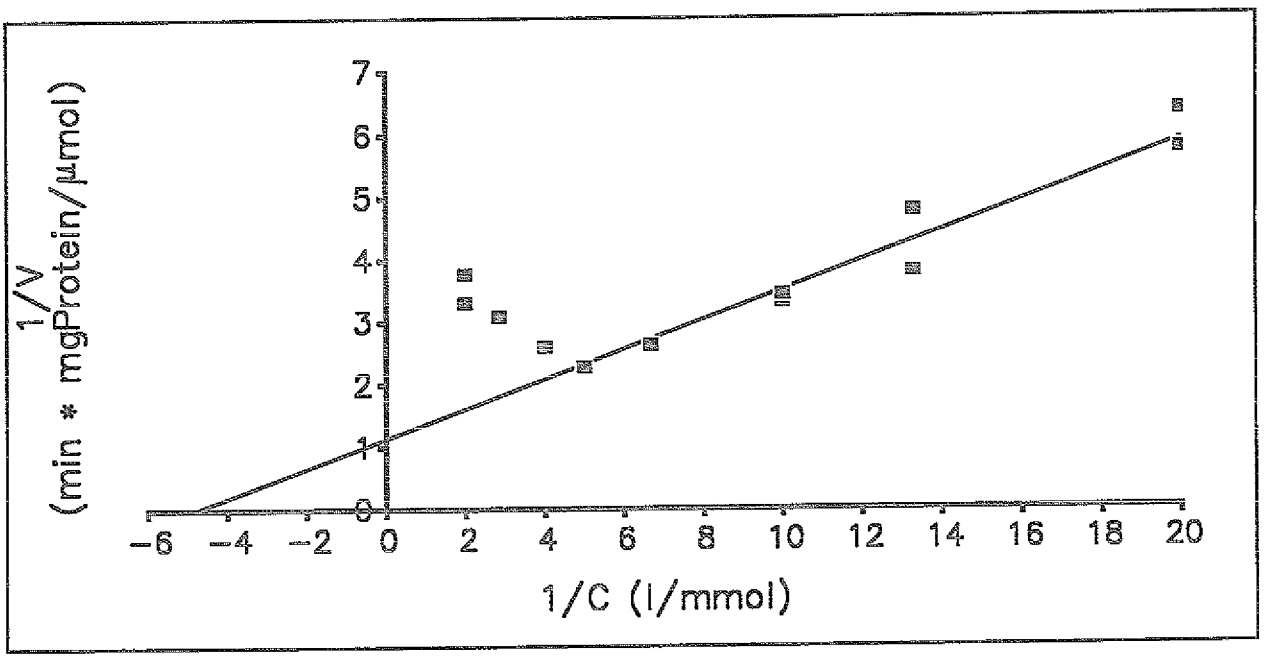


Abbildung 3.25: Bestimmung des k_M-Wertes für die Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd zu 3-CBA durch einen Rohextrakt aus *D. vulgaris* PY1 mit Methylviologen als Elektronenakzeptor (Lineveawer-Burk Darstellung).

4. Diskussion

Der anaerobe Abbau halogenierter Aromaten durch methanogene Mischkulturen war seit einigen Jahren Gegenstand umfangreicher Forschungsarbeiten. Der überwiegende Anteil der Arbeiten beschäftigte sich jedoch mit der Anreicherung von Mischkulturen aus unterschiedlichen ökologischen Habitaten oder mit Untersuchungen zum Abbau von Aromaten mit variierenden Substituenten in Batch-Kulturen (Tiedje et al. 1987, Reinecke und Knackmuss 1988, Häggblom 1990). Untersuchungen zum kontinuierlichen anaeroben Abbau halogenierter Aromaten lagen kaum vor (Hakulinen et al. 1982, Brunner et al. 1987, Krumme et al. 1988). Obwohl über die Mikrobiologie und Physiologie des anaeroben Aromatenabbaus umfangreiche Kenntnisse existierten (Evans und Fuchs 1988, Berry et al. 1987), war jedoch nur ein strikt anaerober Organismus isoliert worden, der halogenierte Aromaten unter methanogenen Bedingungen umsetzen konnte. Die von diesem Organismus durchgeführte Dehalogenierung war die einzige bisher beobachtete Umsetzung von halogenierten Benzoesäuren unter anaeroben Bedingungen.

Die Bestimmung maximaler methanogener Aktivitäten wurde auch in früheren Arbeiten von Dolfing und Bloemen (1985) und Gorris et al. (1989) zur Quantifizierung methanogener Biomasse in Bioreaktoren eingesetzt. Zum ersten Mal wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit auch die maximalen Umsatzaktivitäten acidogener und acetogener Bakterien bestimmt, und die maximalen Umsatzraten aller Mitglieder einer syntrophen Nahrungskette miteinander in Zusammenhang gesetzt. Dabei ergaben sich in 4 getrennten Kulturen konstante Verhältnisse zwischen den maximalen Umsatzraten der trophischen Gruppen. In allen untersuchten Kulturen zeigten die dehalogenierenden Bakterien die geringsten Umsatzaktivitäten, wodurch die Befunde von Brunner (1987) bestätigt wurden, daß diese den geschwindigkeitslimitierenden Schritt im anaeroben 3-CBA Abbau darstellen.

Die ermittelten spezifischen Umsatzaktivitäten lagen in den Batch-Kulturen und in den Biofilmen der Festbettumlaufreaktoren in der gleichen Größenordnung. Auch Ahring und Westermann (1987) fanden bei ihren kinetischen Untersuchungen einer Butyrat abbauenden me-

thanogenen Mischkultur nur geringe Unterschiede der maximalen Umsatzraten in Batch- und Chemostat-Kulturen.

Die spezifischen maximalen Aktivitäten der Methanbakterien (in $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$) waren mit 40 - 50 (Acetat) und 70 - 160 (H_2) in der selben Größenordnung wie sie auch von Dolfing und Bloemen (1985) sowie von Gorris et al. (1989) gefunden wurden. Mit einem Umrechnungsfaktor von etwa 2 $mg_{VSS} \cdot mg_{Protein}^{-1}$ (Dolfing et al. 1985) lassen sich für die Methanbakterien spezifische maximale Umsatzaktivitäten (ebenfalls in $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$) von 3 - 47 (Acetat) und von 58 - 179 (H_2) aus den Daten von Dolfing und Bloemen (1985) errechnen. Mit dem selben Umrechnungsfaktor ergaben sich aus den Daten von Gorris et al. (1989) maximale spezifische methanogene Aktivitäten von 37 - 109 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ für Acetat und und von 4 - 62 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ für H_2.

Zur Umsetzung von 1 Mol 3-Chlorbenzoesäure zu Biogas ohne intermediäre Bildung von Zwischenprodukten mußten mindestens 1 Mol Benzoesäure, 3 Mol Acetat und 2 Mol H_2 in der selben Zeiteinheit verbraucht werden. Da in den Mischkulturen keine Zwischenprodukte gefunden wurden ergaben sich Mindestwerte der relativen Umsatzaktivitäten von 1 für Benzoesäure, 3 für Acetat und 2 für H_2. Während die relativen Umsatzaktivitäten für Benzoesäure und Acetat mit 1,3 und 6 die theoretischen Mindestwerte nur um 30% bzw 100% überschritten, lag die relative Umsatzaktivität der hydrogenotrophen Methanbakterien mit 21,6 um den Faktor 10 über dem theoretischen Mindestwert. Daraus ergibt sich, daß etwa 50% der acetoclastischen und nur 9,3% der hydrogenotrophen maximalen Methanbildungsaktivitäten während des Abbaus von 3-CBA zu Biogas genutzt wurden. Die hohen Überschußaktivitäten der hydrogenotrophen Methanbakterien bei Wasserstoffsättigung verhindern ein Ansteigen des Wasserstoffpartialdruckes in den Kulturen, wodurch die Umsetzung der Benzoesäure zu H_2, CO_2 und Acetat zum Erliegen käme, da sie unter Standardbedingungen mit 89,7 $KJ \cdot Mol^{-1}$ endergon ist (Ferry und Wolfe 1976). So zeigten Mountfort und Bryant (1982) sowie Mountfort und Asher (1986) an strikt anaeroben Isolaten, daß diese nur syntroph mit Wasserstoff zehrenden Sulfatreduzierern oder Methanbakterien auf Aromaten wuchsen und, daß das Wachstum dieser defi-

nierten Mischkulturen durch hohe Wasserstoffpartialdrücke inhibiert wurde.

Hohe Überschußaktivitäten der hydrogenotrophen im Vergleich zu den acetoclastischen Methanbakterien wurden in methanogenen Reaktoren mit unterschiedlichen Substraten auch von anderen Arbeitsgruppen gefunden. So bestimmten Dolfing und Bloemen (1985) die Methanbildungsaktivitäten aus Propionsäure, H_2/CO_2 und Acetat in 6 Modellreaktoren für die anaerobe Abwasserreinigung, die mit unterschiedlichen, teilweise komplexen Substraten betrieben wurden. Die maximalen Methanbildungsaktivitäten aus H_2/CO_2 lagen um den Faktor 5,2 bis 12,2 über dem für die Methanbildungsaktivitäten aus Propionsäure berechneten Mindestwerten, während die Methanbildungsaktivitäten aus Acetat die theoretischen Mindestwerte nur um den Faktor 1,1 bis 4 übertrafen. Auch Gorris et al. (1988b) fanden bei ihren Untersuchungen zur Methanbildung aus Butyrat das 1,1 bis 4fache der theoretischen Mindestaktivität der Acetat umsetzenden Methanbakterien, die sich aus den beobachteten maximalen Methanbildungsaktivitäten aus Butyrat ergaben. Die von Gorris et al (1988b) bestimmten maximalen Methanbildungaktivitäten aus H_2 lagen jedoch teilweise unter den theoretischen Mindestwerten. Auch die von Ahring und Westermann (1987) aus kinetischen Daten errechneten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der hydrogenotrophen Methanbakterien überstiegen den für die beobachtete Methanbildung aus Butyrat nötigen Mindestwert um den Faktor 13,5. Die maximale Methanbildungsaktivität aus Acetat betrug jedoch nur 83% der errechneten Mindestaktivität.

Obwohl diskutiert wird, ob Wasserstoff oder Formiat als Elektronenüberträger in syntrophen Mischkulturen fungiert (Thiele und Zeikus 1988b, Ozturk et al. 1988), ist sicher, daß beide Elektronenüberträger von der selben Gruppe der Methanbakterien oxidiert werden, deren maximale Aktivität mit H_2/CO_2 bestimmt werden kann. Wasserstoff löst sich jedoch nur in geringem Umfang und langsam, wodurch bei Aktivitätsbestimmungen die Wasserstoffkonzentration in der Flüssigkeit bei hohen Biomassekonzentrationen häufig geschwindigkeitslimitierend ist (Dolfing und Bloemen 1985, Boone et al. 1989). Da in den Reaktoren bei verdoppelter Raumbelastung auch

eine verdoppelte maximale Methanbildungsaktivität aus H_2/CO_2 bestimmt wurde und die Daten gut mit den Literaturwerten übereinstimmen, scheint während der beschriebenen Experimente aber nicht die Wasserstoffkonzentration in der Flüssigkeit, sondern die Biomasse geschwindigkeitslimitierend gewesen zu sein.

Die in den Bioreaktoren erreichten Raumbelastungen und Umsatzraten von 10,4 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ (1759 $mg_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) sind höher als die aus der Literatur bekannten Werte für den anaeroben, kontuinuierlichen Abbau von Halogenaromaten. So berichteten Dietrich und Winter (1990) über den kontinuierlichen Abbau von 375 $mg_{2\text{-}Chlorphenol} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ mit auf Liapor immobilisierten Anreicherungskulturen und 180 $mg_{2\text{-}Chlorphenol} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ mit kontinuierlichen Suspensionskulturen. In der Untersuchung zum kontinuierlichen anaeroben Abbau von 3-Chlorphenol von Krumme und Boyd (1988) wurden dagegen nur 20 $mg_{3\text{-}Chlorphenol} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ in einem "Upflow" Bioreaktor zu CH_4 und CO_2 umgesetzt. Der kontinuierliche anaerobe Abbau halogenierter Aromaten erfolgt außer durch Anreicherungskulturen unter selektiven Bedingungen auch parallel zur Umsetzung leicht abbaubarer Substanzen in anaeroben Abwasserreinigungsanlagen. Dies konnten Hakulinen und Salkinoja-Salonen (1982) an einem mit Bleichereiabwasser betriebenen anaeroben Wirbelschichtreaktor zeigen, in dem unter anderem auch 16 $mg_{Chlorpenole} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ abgebaut wurden.

Gegenüber der Untersuchung von Brunner et al. (1987) konnte in der vorliegenden Arbeit die Verweilzeit durch den Austausch des Trägermaterials gegen kohlebeschichteten Polyurethanschaumstoff von zehn auf einen Tag gesenkt und die Raumbelastung um den Faktor 3 von 550 auf 1759 $mg_{3\text{-}CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ erhöht werden. Die erreichte Raumbelastung entsprach dabei einer CSB-Belastung von 2,5 kg $CSB \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$. Dies zeigt, daß auch ananaerobe Reinigungsanlagen für den Abbau persistenter Substanzen in Industrieabwässern geeignet sind.

Sowohl in den Experimenten zur Adhäsion der Mischkultur, als auch in den Bioreaktoren wurden auf den Trägern mit hohem Kohleanteil größere Mengen an Biomasse immobilisiert. Dies muß auf die durch die Kohlebeschichtung veränderten Oberflächeneigenschaften der Träger zurückgeführt werden, da sich durch die Beschichtung die

Porengröße nur geringfügig veränderte. Mit zunehmendem Kohleanteil nahm die Oberflächenladung der Träger zu und die Oberflächen wurden zunehmend hydrophober (Fa. Bayer, pers. Mitteilung). Auch Verrier et al. (1988) fanden, daß methanogene Biofilme auf hydrophoben Polymeroberflächen besser wuchsen, als auf hydrophilen. Inwieweit die poröse Struktur der Träger die Biofilmbildung beeinflußte, wurde nicht untersucht, jedoch berechneten Wang und Wang (1989), daß für die Immobilisierung von Bakterien in Poren ein Verhältnis der Porendurchmesser zu Bakteriengröße von 2,5 optimal sei. In den verwendeten Trägern waren die Poren jedoch mit 50 bis 500 µm zu groß, um einzelne Bakterien zurückzuhalten, so daß die Poren strömungsberuhigte Zonen darstellten, in denen die auf der Oberfläche adsorbierten Bakterien geringeren hydrodynamischen Kräften ausgesetzt waren.

Mit Ausnahme der Untersuchungen an dem dehalogenierenden Bakterium *Desulfomonile tiedjei* beschrieben alle bisherigen Arbeiten anaerobe Umsetzungen halogenierter Aromaten durch Mischkulturen, die auf diesen Substanzen wuchsen. Daher war wenig über Mikroorganismen bekannt, die diese Substanzen umsetzen können. Mit *D. vulgaris* Stamm PY1 liegt nun das zweite strikt anaerobe Isolat aus einer methanogenen, auf 3-CBA wachsenden Mischkultur vor, das 3-CBA während des Wachstums auf Pyruvat umsetzt. Die Einstufung des Isolates als *Desulfovibrio vulgaris* und die Unterscheidung von *D. desulfuricans* erfolgte in Ergänzung der physiologischen Daten hauptsächlich aufgrund des GC-Gehaltes der DNA (Skyring und Jones 1972), da sich *D. vulgaris* und *D. desulfuricans* in ihren physiologischen Eigenschaften nur geringfügig unterscheiden (Postgate 1984, Widdel 1988).

Zwischen den beiden bisher isolierten strikt anaeroben, 3-CBA umsetzenden Organismen bestehen eine Reihe von Gemeinsamkeiten. Beide Organismen setzen 3-CBA nur während des Wachstums auf Pyruvat um, und die Umsetzung wird durch oxidierte Schwefelverbindungen unterdrückt, die beide Organismen unter Energiegewinn reduzieren können (DeWeerd 1990). Während des Wachstums auf Pyruvat ist die Umsetzung von 3-CBA für beide Organismen vorteilhaft, da sie bei *D. tiejei* den Wachstumsertrag (Mohn und Tiedje 1990) durch die

Koppelung der Dehalogenierung an die ATP-Synthese erhöht (Dolfing 1990) und die Wachstumsrate bei *D. vulgaris* Stamm PY1 steigert.

Sowohl in den Biofilmen, als auch in der Mischkultur war die Dehalogenierung die einzige nachgewiesene Umsetzung der 3-CBA. Mit *D. vulgaris* Stamm PY1 konnte jedoch aus dieser Mischkultur ein strikt anaerobes Bakterium isoliert werden, das die bis dato unbekannte Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH durchführte. Zwar konnten Neilson et al. (1988) die Bildung von halogenierten Benzylalkoholen aus halogenierten aromatischen Aldehyden durch Anreicherungskulturen zeigen, jedoch wurden weder Reinkulturen isoliert, noch wurde die Reduktion von Benzoesäurederivaten nachgewiesen. Die Untersuchungen an *D. vulgaris* Stamm PY1 zeigen nicht nur die Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH, sondern lassen auch vermuten, daß 3-Chlorbenzaldehyd als Intermediat der Reduktion nicht auftritt, weil es aufgrund der hohen spezifischen Umsatzrate des Aldehyds sofort in der Rückreaktion zu 3-CBA reoxidiert würde.

Thermodynamische Berechnungen nach Thauer et al. (1977) zeigen, daß bei der Reduktion der undissoziierten Benzoesäure zu Benzylalkohol 22,9 $kJ \cdot Mol^{-1}$ (Gleichung 1) frei werden, während bei der Reduktion der dissoziierten Form Benzoat 17,1 $kJ \cdot Mol^{-1}$ (Gleichung 2) aufgewendet werden müssen. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß die aus der Reduktion freiwerdende Energie von maximal 22,9 $kJ \cdot Mol^{-1}$ von *D. vulgaris* Stamm PY1 an die Synthese von ATP gekoppelt ist, da eine Ertragssteigerung durch die Reduktion von Benzoesäurederivaten nicht nachgewiesen werden konnte, wie es Mohn und Tiedje (1990) für die Dehalogenierung durch *D. tiedjei* zeigten. Bei einem pK_a-Wert der Benzoesäure von 4,2 liegen von 2 $mmol \cdot l^{-1}$ bei pH 6,3 etwa 3,2 $\mu mol \cdot l^{-1}$ in der undissoziierten Form vor und bei pH 7,3 nur noch 0,32 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Dies kann erklären, warum *D. vulgaris* PY1 bei pH 6,3 gegenüber pH 7,3 die 5fache Menge an BA reduziert, da die undissoziierte Form leichter reduziert werden kann.

$$\text{Benzoesäure} + 2\ H_2 \quad \text{----->} \quad \text{Benzylalkohol} + H_2O \qquad (1)$$
$$G^{\circ\prime} = -22{,}9\ \text{KJ/mol}$$
$$\text{Benzoat}^- + H^+ + 2\ H_2 \quad \text{----->} \quad \text{Benzylalkohol} + H_2O \qquad (2)$$
$$G^{\circ\prime} = +17{,}1\ \text{KJ/mol}$$

Neben den oben aufgeführten physiologischen Gemeinsamkeiten zwischen *Desulfomonile tiedjei* und *D. vulgaris* PY1 ergaben die enzymatischen Untersuchungen jedoch auch Unterschiede zwischen den Organismen. Während die Dehalogenierung in *D. tiedjei* membrangebunden ist (DeWeerd et al. 1990) und vermutet wird, daß die Reaktion an Elektronentransport über die Membran gekoppelt ist (DeWeerd et al 1991) wurde die 3-CBA reduzierende Aktivität der Rohextrakte aus *D. vulgaris* PY1 in der löslichen Fraktion nachgewiesen. Auch eine Hemmung der 3-CBA Reduktion durch Sulfat oder Sulfit wie sie DeWeerd et al. (1991) für die Dehalogenierung beschrieben, konnte in *D. vulgaris* PY1 nicht nachgewiesen werden.

In *Clostridien* wurden jedoch Carbonsäure Reduktasen nachgewiesen (White et al. 1989, Fraisse und Simon 1988), die eine Reihe von Eigenschaften mit den untersuchten Enzymen in *D. vulgaris* Stamm PY1 gemeinsam haben. So konnten White et al. (1989) zeigen, daß bei der Reinigung einer Aldehyd Dehydrogenase aus *C. thermoaceticum* auch eine Carbonsäurereduktase Aktivität angereichert wurde, deren Aktivität etwa 20fach niedriger war als die der Aldehyd Dehydrogenase. Auch in den Rohextrakten aus *D. vulgaris* Stamm PY1 konnte eine 3-Chlorbenzaldehyd Dehydrogenase nachgewiesen werden, wobei deren Aktivität ebenfalls wesentlich höher war als die 3-CBA Reduktase Aktivität. Auch Zellner et al. (1990) zeigten in 3 *D. vulgaris* Stämmen die Bildung von 4-Hydroxy-, 4-Hydroxy-3-Methoxy-, 2-Methoxy- und 3,4,5-Trimethoxy-Benzoesäure aus den korrespondierenden Benzaldehyden. Auf CO_2 als Kohlenstoffquelle konnten diese *D. vulgaris* Stämme mit Sulfat als Elektronenakzeptor und den Benzaldehydderivaten als Elektronendonator wachsen, nicht jedoch auf den Benzoesäurederivaten.

Die Carbonsäure Reduktase aus C. thermoaceticum enthält Wolfram (White et al. 1989). Für *D. vulgaris* PY1 kann hingegen vermutet werden, daß in den 3-CBA reduzierenden Enzymen Molybdän enthalten

ist, da Molybdatmangel in den entsprechenden Rohextrakten aus *D. vulgaris* PY1 zu einer Verminderung der Enzymaktivität um den Faktor 6 führte und das Wachstum auf Pyruvat ohne Sulfat unter Molybdatmangel bei gleichzeitig verminderter 3-CBA Reduktion verlangsamt war. Molybdän enthaltende Enzyme wurden bisher ebenfalls in *Desulfovibrio africanus* Stamm Benghazi, *D. salexigens* Stamm British Guaiana, *D. desulfuricans* Stamm Berre-Sol und ATCC 27774 sowie in *D. gigas* beschrieben (LeGall und Fauque 1988). In *D. gigas* konnte eine Aldehyd Oxidase Aktivität des Molybdän enthaltenden Enzyms nachgewiesen werden (Turner et al. 1987).

Eine weitere Übereinstimmung zwischen den untersuchten 3-CBA reduzierenden Enzymen in *D. vulgaris* Stamm PY1 und Carbonsäure Reduktasen aus *Clostridium thermoaceticum* (Simon et al. 1987) und *C. formicoaceticum* (Fraisse und Simon 1988) besteht darin, daß die Säuren vor der Reduktion zum Alkohol nicht aktiviert wurden. Bei allen erwähnten Organismen waren sowohl ruhende, ganze Zellen in phosphatfreiem Puffer, als auch gelfiltrierte Rohextrakte in der Lage, die Reaktion zu katalysieren. Auch die K_M-Werte der reduzierenden Enzyme lagen in vergleichbaren Größenordnungen. Für die Reduktion von Propionat zu Propanol bestimmten Fraisse und Simon (1988) einen K_M-Wert von 3,5 mM, während für die Enzyme aus *D. vulgaris* Stamm PY1 K_M-Werte von 3,8 mM für 3-CBA und 8,6 mM für BA gefunden wurden. Die natürlichen Elektronenakzeptoren der Carbonsäurereduktasen in *Clostridien* sind nicht bekannt, jedoch zeigten Rafii et al. (1991), daß ein nicht näher charakterisiertes Isolat der Gattung *Clostridium* FAD zur Reduktion nitroaromatischer Substanzen zu aromatischen Aminen benötigte.

In *D. vulgaris* Stamm PY1 wurde während des Wachstums mit Sulfat als Elektronenakzeptor um den Faktor 5 geringere spezifische Aktivitäten der 3-CBA reduzierenden Enzyme gebildet. Auch in *C. thermoaceticum* wurden von White et al. (1989) mit Sulfat als einziger Schwefelquelle etwa 100fach niedrigere Enzymaktivtäten der Aldehyddehydrogenase gefunden, was auf die durch Sulfat kompetitiv gehemmte Wolframaufnahme während des Wachstums zurückzuführen war. Mit erhöhten Wolframkonzentrationen im Medium oder mit Dithionit als alternativer Schwefelquelle wurden keine verminderten spezifi-

schen Enzymaktivitäten gefunden. Dem Medium von *D. vulgaris* Stamm PY1 wurden jedoch routinemäßig 1,5 mM Sulfid sowie Spuren an Dithionit zur Reduktion des Mediums zugesetzt und auch erhöhte Wolfram- oder Molybdänkonzentrationen konnten die Verminderung der Enzymaktivitäten nicht aufheben. In *D. vulgaris* Stamm PY1 muß also ein anderer Mechanismus die verminderten Enzymaktivitäten bewirken als die Hemmung der Molybdänaufnahme.

Ein Erklärungsmodell (Tabelle 4.1) für die Steigerung der Wachstumsrate auf Pyruvat ohne Sulfat durch die Reduktion von Benzoesäurederivaten wurde aufgrund folgender Befunde entwickelt:

A.) FAD und FMN können als Elektronenüberträger für die Reduktion von 3-CBA zu 3-CBOH im enzymatischen Test eingesetzt werden.

B.) Durch die Reduktion von Benzoesäure wurde weniger Ethanol, Succinat und Laktat aus Pyruvat gebildet als in der Vergleichskultur ohne Benzoesäure.

C.) Nur während des Wachstums ohne oxydierte Schwefelverbindungen als Elektronenakzeptoren wurde 3-CBOH gebildet, obwohl die Enzyme auch während des Wachstums mit Sulfat oder Sulfit gebildet wurden.

Weiterhin wurde vermutet, daß die Wachstumsrate während des Wachstums auf Pyruvat ohne reduzierbare Schwefelberbindungen durch die Regenerationgeschwindigkeit reduzierter Elektronenüberträger limitiert war. Dies erscheint sinnvoll, da das durch die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreductase reduzierte Ferredoxin über die Bildung molekularen Wasserstoffes durch eine im Cytoplasma sulfatreduzierender Bakterien vorhandene Hydrogenase reoxidiert werden kann (Odom und Peck 1984, Lupton et al. 1984, Moodie und Ingledew 1990), diese Reaktion aber durch hohe Wasserstoffpartialdrücke erschwert wird. Mit Sulfat im Medium bleibt der Wasserstoffpartialdruck jedoch niedrig, da der gebildete Wasserstoff entweder durch die periplasmatische Hydrogenase oxidiert wird und die Elektronen über eine Elektronentransportkette auf Sulfat übertragen werden (Odom und Peck 1984) oder reduziertes Ferredoxin direkt durch Sulfatreduktion reoxidiert wird (Lupton et al. 1984). Ohne reduzierbare Schwefelverbindungen kann zwar aufgrund des niedrigen Potentials

des Ferredoxins von etwa -420 mV (Odom und Peck 1984) Wasserstoff freigesetzt werden, jedoch liegt ein höherer Anteil des Ferredoxins in reduzierter Form vor, so daß die Elektronen auch auf andere Elektronenüberträger mit höherer Elektronegativität abfließen. So wiesen Möller-Zinkhan und Thauer (1988) eine Ferredoxin:NADP Oxidoreductase in *Desulfobacter postgatei* nach und Uyeda und Rabinowitz (1971) zeigten, daß die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreductase aus *Clostridium acidi-urici* auch FAD und FMN reduziert, nicht jedoch Pyridin-Nucleotide.

Tabelle 4.1: Modell der Regeneration reduzierter Elektronenüberträger durch die Reduktion organischer Säuren während des Wachstums von D. vulgaris PY1 auf Pyruvat ohne Sulfat.

Redox-potential	Elektronen-überträger	Elektronen-akzeptor	Produkt
-420 mV	Ferredoxin	H^+	H_2
-320 mV	NAD/NADP	Acetat	Ethanol
-190 mV	FAD/FMN	Benzoesäure	Benzylalkohol
		Pyruvat	Laktat
		Fumarat	Succinat

Reduzierte Nicotin-Adenin-Dinucleotide mit einer Elektronegativität von etwa -320 mV können dann durch die Bildung von Ethanol aus Acetat reoxidiert werden (Gottschalk 1988). Die Oxidation von FADH und FMNH bei etwa -190 mV kann durch die Bildung von Succinat (+30 mV) aus der Reduktion von Fumarat oder durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat (- 190 mV) erfolgen. Da die enzymatischen Untersuchungen ergaben, daß auch 3-Chlorbenzoesäure mit FADH oder FMNH zu 3-CBOH reduziert werden kann, ergab sich durch die Zugabe von 3-CBA oder BA ein dritter Weg zur Oxidation reduzierten FADs oder FMNs, was deren Regenerationsrate erhöhte. Da ein annähernder quantitativer Zusammenhang zwischen der Bildung von Laktat und

Succinat einerseits und 3-CBOH andererseits gefunden wurde, kann angenommen werden, daß der die Wachstumsrate limitierende "Flaschenhals" in der Oxidationsgeschwindigkeit von FADH oder FMNH lag, der durch die Möglichkeit zur Bildung von 3-CBOH aus 3-CBA geweitet wurde und so ein schnelleres Wachstum ermöglichte.

Das vorgestellte Modell bietet eine Erklärung für die Steigerung der Wachstumsrate, ohne daß auch eine Steigerung der Energieausbeute des Pyruvatstoffwechsel impliziert ist. Dies hätte auch eine Steigerung des Wachstumsertrages bedeutet, die aber nicht gefunden wurde.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der anaerobe Abbau von 3-Chlorbenzoesäure durch eine strikt anaerobe Mischkultur untersucht, die eine anaerobe Nahrungskette aus dehalogenierenden und Benzeosäure abbauenden Bakterien sowie hydrogenotrophen und acetotrophen Methanbakterien darstellte.

Die quantitative Zusammensetzung der anaeroben Mischkultur aus den 4 trophischen Gruppen wurde über Aktivitätsmessungen im Substratsättigungsbereich bestimmt, wobei die dehalogenierenden Bakterien mit 8,1 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ die niedrigsten spezifischen Umsatzaktivitäten aufwiesen und die hydrogenotrophen Methanbakterien mit 163 $\mu mol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot d^{-1}$ die höchsten. Damit lagen die maximalen Umsatzaktivitäten der hydrogenotrophen Methanbakterien um den Faktor 10 über dem theoretischen Mindestwert für die Umsetzung von 3-CBA zu Biogas ohne Bildung von Zwischenprodukten. Die Zusammensetzung der Mischkultur in Batch-Kulturen und in den Biofilmen der Festbettumlaufreaktoren mit den Trägermaterialien PUR-B 4,8% und PUR-B 33% unterschieden sich nur geringfügig.

Bei einer Verweilzeit von einem Tag und einer Raumbelastung von 11,2 $mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ wurden in den Festbettumlaufreaktoren Umsatzraten von 10,4 $mmol_{3-CBA} \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ erreicht, was einem Abbaugrad von 90% entspricht. Bei Verdoppelung der Raumbelastung verdoppelten sich auch die maximalen Umsatzaktivitäten der trophischen Gruppen, was die Verdoppelung der in den Reaktoren immobilisierten Biomasse anzeigte.

Aus der Mischkultur wurde über eine Dichtegradientenzentrifugation *ein D. vulgaris* Stamm isoliert, der während des Wachstums auf Pyruvat ohne Sulfat 3-Chlorbenzoesäure zu 3-Chlorbenzylalkohol reduzierte. *D. vulgaris* Stamm PY1 stellt das zweite strikt anaerobe Bakterium in Reinkultur dar, das 3-Chlorbenzoesäure umsetzt.

Die Reduktion von Benzoesäure zu Benzylalkohol steigerte die Wachstumsrate von *D. vulgaris* Stamm PY1 auf Pyruvat ohne Sulfat von 0,05 auf 0,1 d^{-1} gegenüber Vergleichskulturen ohne Benzoesäure, während gleichzeitig 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Laktat, 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Succinat und 1,3 $mmol \cdot l^{-1}$ weniger Ethanol gebildet wurden.

In Rohextrakten aus mit Sulfat gewachsenen Zellen wurden mit 0,13 $nmol \cdot mg_{Protein}^{-1} \cdot min^{-1}$ um den Faktor 4 geringere spezifische Aktivitäten nachgewiesen als in Rohextrakten aus Zellen, die ohne Sulfat gewachsen waren. Als natürliche Elektronenüberträger der Enzyme wurden FAD, FMN und Ferredoxin nachgewiesen. Eine Aktivierung der 3-Chlorbenzoesäure durch Bindung an Coenzym A, Phosphat oder Nucleosidphosphaten erfolgt nicht.

6. Literaturverzeichnis

Adrian, N. R.; Suflita, J. M. (1990): Reductive dehalogenation of a nitrogen heterocyclic herbicide in anoxic aquifer slurries. Appl. Environ. Microbiol. 56, 292 - 294

Ahring, B. K.; Westermann, P. (1987): Kinetics of butyrate, acetate, and hydrogen metabolism in a thermophilic, anaerobic, butyrate-degrading triculture. Appl. Environ. Microbiol. 53, 434 - 439

Aivasidis, A. (1984): Scale-up of a new fixed-bed loop reactor for anaerobic digestion. Third European Congress on Biotechnology, Munich, FRG. Band III, 51-60

Aivasidis, A. (1989): Process development for anaerobic waste water treatment using porous carriers for microbial colonization. Bioprocess Engineering 4, 19 - 25

Anderson, T. F. (1951): Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans NY Acad.Sci. 13, 130 - 134

Bak, F.; Widdel, F. (1986): Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov.. Arch. Microbiol. 146, 177 - 180

Balch, W.E.; Fox, G.E.; Magrum, L.J.; Woese, C.R.; Wolfe, R.S. (1979): Methanogenesis: Reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Reviews 43, 260 - 296

Beeftink, H. H.; v. Dillen, M.; v. d. Heuvel, J. C. (1988): Formation of bacterial aggregates in a continous-flow reactor: influence of carrier availability. Biotechnol. Lett. 10, 171 - 176

Belay, N.; Daniels, L. (1987): Production of ethane, ethylene, and acetylene from halogenated hydrocarbons by methanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1604 - 1610

Belay, N.; Daniels, L. (1990): Elemental metals as electron sources for biological methane formation from CO_2. Ant. V. Leeuwenhoek 57, 1 - 7

Berry, D. F.; Francis, A. J.; Bollag, J.-M. (1987): Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. Microbiol. Rev. 51, 43 - 59

Boone, D. R.; Johnson, R. L.; Liu, Y. (1989): Diffusion of 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

Bradford, M. (1976): 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

Brown, J.F.; Wagner, R.E.; Feng, H.; Bedard, D. L.; Brennan, M. J.; Carnahan, J. C.; May, R. J. (1987): Envirtonmental dechlorination of PCBs. J. Environ. Toxicol. Chem. 6, 579 - 593

Brunner, M. (1987): Anaerober mikrobieller Abbau von 3-Chlor-Benzoesäure zu Biogas. Dissertation, Universität Düsseldorf

Brunner, M.; Schoberth, S.M.; Sahm, H. (1987): Anaerober mikrobieller Abbau von haslogenierten Aromaten zu Biogas. Chem.-Ing.-Tech. 59(1), 55 - 57

Bryant, M.P. (1979): Microbial methane production - theoretical aspects. J. Animal Science 48, 193-201

Burton, K. (1956): A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315 - 323

Chaudry, G. R.; Chapalamadugu, S. (1991): Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiological Reviews 55, 59 - 79

Cochran, W. G. (1950): Estimation of bacterial densities by means of the "most probable nunmber". Biometrics 6, 105 - 116

Conrad, R.; Phelps, T. J.; Zeikus, J. G. (1985): Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. Appl. Environ. Microbiol. 50, 595 - 601

Conrad, R.; Babbel, M. (1989): Effect of dilution on methanogenesis, hydrogen turnover and interspecies hydrogen transfer in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 62, 21 - 28

Dangel, W.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1988): Anaerobic metabolism of cyclohexanol by denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 150, 358 - 362

Dangel, W.; Brackmann, R.; Lack, A.; Mohamed, M.; Koch, J.; Oswald, B.; Seyfried, B.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1991): Differential expression of enzyme activities in anoxic metabolism of various aromatic compounds via benzoyl-CoA. Arch. Microbiol. 155, 256 - 262

D'Ans, L.; Lax, E. (1967): Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer Verlag, Berlin

DeLey, J. (1970): Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. J. Bact. 101, 738 - 754

Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser- und Schlammuntersuchung 1987, Verlag Chemie, Weinheim

DeWeerd, K. A.; Suflita, J. M.; Linkfield, T.; Tiedje, J. M.; Pritchard, P. H. (1986): The relationship between reductive dehalogenation and other aryl substituent removal reactions catalysed by anaerobes. FEMS Microbiol. Ecol. 38, 331 - 339

DeWeerd, K. A.; Suflita, J. M. (1990): Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of "Desulfomonile tiedjei". Appl. Environ. Microbiol. 56, 2999 - 3005

DeWeerd, K. A.; Mandelco, L.; Tanner, R. S.; Woese, C. R.; Suflita, J. M. (1990): *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. 154, 23 - 30

DeWeerd, K. A.; Concannon, F.; Suflita, J. M. (1991): Relationship between hydrogen consumption, dehalogenation, and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tiedjei*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1929 - 1934

Dietrich, G.; Winter, J. (1990): Anaerobic degradation of chlorophenol by an enrichment culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 253 - 258

Doetsch, R. N. (1981): Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R. G. E. et al. (eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, 21 - 33

Dolfing, J.; Griffioen, A.; v. Neerven, A. R. W.; Zevenhuizen, L. P. T. M. (1985): Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. Can. J. Microbiol. 31, 744 - 750

Dolfing, J.; Bloemen, W. G. B. M. (1985): Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. J. Micrbiol. Methods 4, 1 - 12

Dolfing, J.; Tiedje, J. M. (1986): Hydrogen cycling in a three-tiered fod web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. FEMS Microbiol. Ecol. 38, 293 - 298

Dolfing, J. (1990): Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. Arch. Microbiol. 153, 264 - 266

Dolfing, J.; Zeyer, P.; Binder-Eicher, P.; Schwarzenbach, R. P. (1990): Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. Arch. Microbiol. 154, 336 - 341

Drews, G. (1983): Mikrobiologisches Praktikum, 4. neubearbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.

Durfee, R. L.; Contos, G.; Whitmore, F. C.; Barden, J. D.; Hackman, E. E. (1976): PCBs in the United States: Industrial use and environmental distribution. PB 252012. National Technical Information Service, Springfield, VA, p.488

Egli, C.; Scholtz, R.; Cook, A. M.; Leisinger, T. (1987): Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp.. 43, 257 - 261

Evans, W. C.; Fuchs, G. (1988): Anaerobic degradation of aromatic compounds. Ann. Rev. Microbiol. 42, 289 - 317

Evans, P. J.; Mang, D. T.; Kim, K. S.; Young, L. Y. (1991): Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1139 - 1145

Fathepure, B. Z.; Boyd, S. A. (1988): Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. FEMS Microbiol. Lett. 49, 149 - 156

Ferry, J. G.; Wolfe, R. S. (1976): Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. Arch. Microbiol. 107, 33 - 40

Folkerts, M.; Ney, U.; Kneifel. H.; Stackebrandt, E.; Witte, E. G.; Förstel, H.; Schoberth, S. M.; Sahm, H. (1989): *Desulfovibrio furfuralis* sp. nov., a furfural degrading strictly anaerobic bacterium. System. Appl. Micriobiol. 11, 161 - 169

Fraisse, L.; Simon, H. (1988): Observations on the reduction of non-activated carboxylates by Clostridium formicoaceticum with carbon monoxide or formate and the influence of various viologens. Arch Microbiol., 150, 381 - 386

Frimmer, U.; Widdel, F. (1989): Oxidatioon of ethanol by methanogenic bacteria. Arch. Microbiol. 152, 479 - 483

Gälli, R.; McCarty, P. L. (1989a): Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp.. Appl. Environ. Microbiol. 55, 837 - 844

Gälli, R.; McCarty, P. L. (1989b): Kinetics of biotransformation of 1,1,1-trichloroethane by *Clostridium* sp. strain TCAIIB. Appl. Environ. Microbiol. 55, 845 - 851

Gerhardt, P. (1981): Diluents and biomass measurement. In: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R. G. E. et al. (eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, pp 504 - 507

Ghisalba, O. (1983): II. Microbial degradation of chemical waste, an alternative to physical methods of waste disposal. Experientia 39, 1247 - 1257

Gibson, S. A.; Suflita, J. M. (1990): Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer: stimulation by short-chain organic acids and alcohols. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1825 - 1832

Glöckler, R.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1989): Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species. FEBS Lett. 251, 237 - 240

Gorris, L.G.M.; van der Drift, C. (1986): Methanogenic cofactors in pure cultures of methanogens in relation to substrate utiliza-

tion. In: Dubourguier, H. C. et al. (eds): Biology of anaerobic bacteria. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 114 - 150

Gorris, L. G. M.; v. Deursen, J. M. A.; van der Drift, C.; Vogels, G.D. (1988a): Influence of waste water composition on biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 95 - 102

Gorris, L.G.M.; DeKok, M.; Kroon, B.M.; van der Drift, C.; Vogels, G.D. (1988b): Relationship between methanogenic cofactor content and maximum specific methanogenic activity of anaerobic granular sludges. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1126-1130

Gorris, L. G. M.; v. Deursen, J. M. A.; van der Drift, C.; Vogels, G.D. (1989): Biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors. Biotechnol. Bioeng. 33, 687 - 693

Gottschalk. G. (1988): Bacterial metabolism. 2nd Edition Springer Verlag, Heidelberg

Haas, C. N. (1989): Estimation of microbial densities from dilution count experiments. Appl. Environ. Microbiol. 55,1934 - 1942

Häggblom, M. (1990): Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. J. Basic Microbiol. 30, 115 - 141

Häggblom, M.; Young, L. Y. (1990): Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3255 - 3260

Hager, L. P. (1981): Mother nature likes some halogenated compounds. In: Hollaender, A.; de Moos, R. d.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D.; Wolfe, R. S. (eds): genetic engineering of microorganisms of chemicals, Basic Life Sciences 19, Plenum Publishers, New York, 415 - 529

Hakulinen, R.; Salkinoja-Salonen, M. (1982): Treatment of pulp and paper industry wastewaters in an anaerobic fluidized bed reactor. Process Biochem. 1988(3/4), 18 - 22

Harwood, C. S.; Gibson, J. (1988): Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 712 - 717

Heijnen, J.J.; Enger, W.A.; Mulder, A.; Lourens, P.A.; Keijzers, A.A.; Hoeks, F.W. (1985): Anwendung der anaeroben Wirbelschichttechnik in der biologischen Abwasserreinigung. Gas u. Wasserfach 126, 81-88

Holdemann, L.V.; Cato, E.P.; Moore, W.E.C. (eds.) (1977): Anaerobic laboratory manual, 4th edition. Blacksburg/Virginia, Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University.

Hollemann; A. F.; Wiberg,E. (1956): Lehrbuch der anorganischen

Chemie, Walter de Gruyter & Co., Berlin

Hungate, R.E. (1950): The anaerobic mesophilic cellolytic bacteria. Bact. Rev., 14, 1-63

Hungate, R.E. (1969): A roll tube method for cultivating of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, 3 B (Norris, J.R.; Ribbons, D.W.; eds), Academic Press, London, New York, 117 - 132

Huysman, P.; v. Meenen, P.; v. Assche, P.; Verstraete, W. (1983): Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model upflow methane reactors. Biotechnol. Lett. 5, 643 - 648

Immhoff-Struckle, D.; Pfennig, N. (1983): Isolation and characterization of a nicotinic acid-degrading sulfate-reducing bacterium, Desulfococcus niacini. Arch. Microbiol. 133, 194 - 198

Jarrell, K. F.; Kalmokoff, M. L. (1988): Nutritional requirements of the methanogenic archaebacteria. Can. J. Microbiol. 34, 557 - 576

Johnson, J. L. (1981): Genetic characterization. In: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R. G. E. et al. (eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, 450 - 474

Johnson, R. L.; Brillante, S. M.; Isabelle, L. M.; Houck, J. E.; Pankow, J. F. (1985): Migration of chlorophenolic compounds at the chemical waste disposal site at Alkali Lake, Oregon - 2. contaminant distributions, transport, and retardation. Ground Water 23, 652 - 666

Jones, W.J.; Nagle, D.P. jr.; Whitman, W.B. (1987): Methanogens and the diversity of archaebacteria. Microbiol. Rev. 51, 135-177

Kamal, V. S.; Wyndham, R. C. (1990): Anaerobic phototrophic metabolism of 3-Chlorobenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* WS17. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3871 - 3873

Kaspar, H. F.; Wuhrmann, K. (1978): Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. Appl. Environ. Microbiol. 36, 1 - 7

King, G. M. (1986): Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from a hemichordate. Nature 323, 257 - 259

Kluge, C.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1990): Anaerobic metabolism of resorcyclic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. 155, 68 - 74

Knoll, G.; Winter, J. (1987): Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 384 - 391

Knoll, G.; Winter, J. (1989): Degradation of phenol via carboxyla-

tion to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 318 - 324

Kobayashi, T.; Hashinaga, T.; Mikami, E.; Suzuki, T. (1989): Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. Wat. Sci. Tech. 21, 55 - 56

Koch, A. L. (1981): Growth measurement. In: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt, P., Murray, R. G. E. et al. (eds.) American Society for Microbiology, Washington DC, 179 - 207

Kohring, G.-W.; Zhang, X., Wiegel, J. (1989): Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2735 - 2737

Krumme, M. L.; Boyd, S. A. (1988): Reductive dechlorination of chlorinated phenols in anaerobic upflow bioreactors. Wat. Res. 22, 171 - 177

Kuhn, E. P.; Zeyer, J.; Eicher, P.; Schwarzenbach, R. P. (1988): Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. Appl. Environ. Microbiol. 54, 490 - 496

Kuhn, E. P.; Suflita, J. M. (1989): Sequential reductive dehalogenation of chloroanilines by microorganisms from a methanogenic aquifer. Environ. Sci. Technol. 23, 848 - 852

Kuhn, E. P.; Townsend, G. T.; Suflita, J. M. (1990): Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dehalogenation of chloroanilines in anaerobic aquifer slurries. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2630 - 2637

Laanbroek, H.L.; Abee, T.; Voogd, I.L. (1982): Alcohol conversions by Desulfobulbus propionicus Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen. Arch. Microbiol. 133, 178-184

Lal, R.; Saxena, D. M. (1982): Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. Microbiological Reviews 46, 95 - 127

Lalitha, K.; Krishnan, S. (1991): Isolation of a novel rod shaped methanogen growing on methanol and 2-propanol. Arch. Microbiol. 155, 402 - 408

Latham, M.J.; Wolin, M.J. (1978): Use of the serum bottle technique to study interactions between strict anaerobes in mixed cultures. In: Techniques for the study of mixed populations (Soc. Appl. Bacteriol., Technical Ser. II), Academic Press, London.

LeGall, J.; Fauque, G. (1987): Dissimilatory reduction of sulfur compounds. In: A.J.B. Zehnder (ed.) Biology of anaerobic microorganisms, Wiley & Sons New York, 587 - 639

Lindström, K.; Österberg, F. (1984): Characterization of the high molecular mass chlorinated matter in spent bleach liquors (SLB). Holzforschung 38, 201 - 212

Lissolo, T.; Choi, E. S.; LeGall, J.; Peck, H. D. (1986): The prsence of multiple intrinsic membrane nickel-containing hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Biochem. Biophys. Res. Com. 139, 701 - 708

Ljungdahl, L.G.; Andreesen, J.R. (1978): Formate dehydrogenase, a selenium-tungsten enzyme of Clostridium thermoaceticum. Methods Enzymol. 53, 360-372

Ljungdahl, L.G.; Wiegel, J. (1986): Working with anaerobic bacteria. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain, A.L.; Solomon, N.A., eds.), ASM Washington, 84-96

Loosdrecht v., M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. (1987a): The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1893 - 1897

Loosdrecht v., M. C. M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. B. (1987b): Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1898 - 1901

Lovley, D. R..; Lonergan, D. J. (1990): Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1858 - 1864

Lupton, F. S.; Conrad, R.; Zeikus, J. G. (1984): Physiological function of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic bacteria on organic substrates. J. Bact. 159, 843 - 849

Mah, R.A.; Smith, M.A. (1981): The methanogenic bacteria. In: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Bulows, A.; Schlegel, H.G.(eds.) The Procaryotes, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 948-977

Markwell, M. A. K.; Haas, S. M.; Bieber, L. L.; Tolbert, N. E. (1978): A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination im membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87, 206 - 210

Marmur, J. (1961): A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208 - 218

McKay, G.; Bino, M. J. (1988): Adsorption of pollutants from wastewater onto activated carbon based on esternal mass transfer and pore diffusion. Wat. Res. 22, 279 - 286

Mikesell, M. D.; Boyd, S. A. (1985): Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T, and Pentachlorophenol in anaerobic sludges. J. Environ. Qual. 14, 337 - 340

Miller, T.L.; Wolin, M.. (1974): A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl. Microbiol. 27, 985-987

Möller-Zinkhan, D.; Thauer, R. K. (1988): Membrane-bound NADPH dehydrogenase- and ferredoxin:NADP oxidoreductase activity involved

in electron transport during acetate oxidation to CO_2 in *Desulfobacter postgatei*. Arch. Microbiol. 150, 145 - 154

Mohn, W. W.; Tiedje, J. M. (1990): Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. Arch. Microbiol. 153, 267 - 271

Moodie, A. D.; Ingledew, W. J. (1990): Microbial anaerobic respiration. Adv. Microbial Physiol. 31, 225 - 269

Morgan, P.; Watkinson, R. J. (1989): Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. FEMS Microbiol. Rev. 63, 277 - 300

Mountfort, D. O.; Bryant, M. P. (1982): Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. Arch. Microbiuol. 133, 249 - 256

Mountfort, D. O.; Brulla, W. J.; Krumholz, L. R.; Bryant, M. P. (1984): *Syntrophus buswellii* gen. nov., sp. nov.: a benzoate catabolizer from methanogenic ecosystems. Int. J. Syst. Bact. 34, 216 - 217

Mountfort, D. O.; Asher, R. A. (1986): Isolation from a methanogenic ferulate degrading consortium of an anaerobe that converts methoxyl groups of aromatic acids to volatile fatty acids. Arch. Microbiol. 144, 55 - 61

Mozes, N.; Marchal, F.; Hermesse, M. P.; van Haecht, J. L.; Reuliaux, L. (1987): Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. Biotechnol. Bioeng. 30, 439 - 450

Neilson, A. H.; Allard, A.-S.; Hynning, P.-A.; Remberger, M. (1988): Transformations of halogenated aromatic aldehydes by metabolically stable anaerobic enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2226 - 2236

Newport, P. J.; Nedwell, D. B. (1988): The mechanism of inhibition of *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species by selenate and molybdate. J. Appl. Microbiol. 65, 419 - 423

Ney, U.; Macario, A. J. L.; Macario, de, E. C.; Aivasidis, A.; Schoberth, S. M.; Sahm, H. (1990): Quantitative microbiological analysis of bacterial community shifts in a high-rate anaerobic bioreactor treating sulfite evaporator condensate. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2389 - 2398

Nies, L.; Vogel, T. M. (1990): Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2612 - 2617

Odom, J. M.; Peck, H. D. (1984): Hydrogenase, electron-transfer proteins, and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. Ann. Rev. Micobiol. 38, 551 - 592

Ohisa, W.; Yamaguchi, M.; Kanikara, N. (1980): Lindan degradation

by cell-free extracts of *Clostridium rectum*. Arch Microbiol. 125, 221 - 225

Ozturk, S. S.; Palsson, B. O.; Thiele, J. H. (1989): Control of interspecies electron transfer flow during anaerobic digestion: Dynamic diffusion reaction models for hydrogen gas transfer in microbial flocs. Biotechnol. Bioeng. 33, 745 - 757

Pachmayr, F. (1960): Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, Uni. München

Pascik, I. (1988): Die anaerobe Behandlung von Zellstoffabwässern mit an PUR-Trägermasse immobilisierten Organismen. Reprints Verfahrenstechnik der mechanischen, thermischen, chemischen und biologischen Abwasserreinigung, Band 2: biologische Verfahren, Baden-Baden 1988, GVC, 89 - 98

Patel, T. R.; Jure, K. G.; Jones, G. A. (1981): Catabolism of Phloroglucinol by the rumen anaerobe *Caprococcus*. Appl. Environ. Microbiol. 42, 1010 - 1017

Patel, G.B.; Sprott, G.D. (1990): *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("*Methanothrix concilii*") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. Int. J. Syst. Bact. 40, 79-82

Patterson, J. W.; Kodukala, P. S. (1981): Biodegradation of hazardous organic pollutants. CEP, April 1981, pp. 48 - 55

Postgate, J.R. (1959): A diagnostic reaction of *Desulfovibrio desulfuricans*. Nature 163, 481 - 482

Postgate, J.R. (1984): The sulphate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge

Rafii, F.; Franklin, W.; Heflich, R.; Cerniglia, C. E. (1991): Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 57, 962 - 968

Rahalkar, S. B.; Joshi, S.R.; Shivaraman, N. (1991): Biodegradation of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas gelatinosa*. Current Microniol. 22, 155 - 158

Reineke, W.; Knackmuss, H.-J. (1988): Microbial degradation of haloaromatics. Ann. Rev. Microbiol. 42, 263 - 287

Ruckdeschel, G.; Renner, G.; Schwarz, K. (1987): Effects of pentachlorophenol and some of its known and possible metabolites on different species of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2689 - 2692

Rudolphi, A.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1991): Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 155, 238 - 248

Sahasrabudhe, S. R.; Modi, V. V. (1987): Microbial degradation of chlorinated aromatic compounds. Microbiological Sciences 4, 300 -

303

Sahm, H. (1984): Anaerobic wastewater treatment. Advances in Biochem. Eng. & Biotechnol. 29, 83-115

Sahm, H. (1988): Anaerobic treatment of industrial wastewater. In: Sahm, H.; Hollenberg, (eds): Biotec II, Fischer Verlag, pp 79 - 87

Sangodkar, U. M. X.; Aldrich, T. L.; Haugland, R. A.; Johnson, J.; Rothmel, R. K.; Chapman, P. J. Chakrabarty, A. M. (1989): Molecular basis of biodegradation of chloroaromatic compounds. Acta Biotechnol. 9, 301 - 316

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

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

Scherer, P. (1983): Separaton of bacteria from a methanogenic wastewater population by utilizing a self-generating Percoll gradient. J. Appl. Bact. 55, 481 - 486

Schink, B.; Pfennig, N. (1982): Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. sp. nov., a new strictly anaerobic non-spore-forming bacterium. Arch. Microbiol. 133, 195 - 201

Schink, B.; Tschech, A. (1988): Fermentative degradation of aromatic compounds. In: Hagedorn, S. R.; Hanson, R. S.; Kunz, D. A. (eds): Microbial metabolism and the carbon cycle. Harwood Academic Publishers, Chur, London, pp 213 - 226

Schnell, S.; Bak, F.; Pfennig, N. (1989): Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacter anilini*. Arch. Microbiol. 152, 556 - 563

Schnell, S.; Brune, A.; Schink, B. (1991): Degradation of hydroxyhydroquinone by the strictly anaerobic fermenting bacterium *Pelobacter massiliensis* sp. nov.. Arch. Microbiol. 155, 511 - 516

Schoberth, S. M.; Brunner, M.; Sahm, H. (1988): Anaerober Abbau von Halogenaromaten. gwf Wasser, Abwasser 129, 86 - 90

Scholz-Muramatsu, H.; Szewzyk, R.; Szewzyk, U.; Gaiser, S. (1990): Tetrachloroethylene as electron acceptor for the anaerobic degradation of benzoate. FEMS Microbiol. Lett. 66, 81 - 86

Seyfried, B.; Tschech, A.; Fuchs, G. (1991): Anaerobic degradation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate by denitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 155, 249 - 255

Sharak Genthner, B. R.; Price II, W. A.; Pritchard, P. H. (1989a): Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1466 - 1471

Sharak Genthner, B. R.; Price II, W. A.; Pritchard, P. H. (1989b): Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1472 - 1476

Shelton, D. R.; Tiedje, J. M. (1984): Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. 48, 840 - 848

Simon, H.; White, H.; Lebertz, H.; Iordanes, T. (1987): Reduction of 2-enoates and alkanoates with carbon monoxide or formate, viologens, and *Clostridium thermoaceticum* to saturated acids and unsaturated and saturated alcohols. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26, 785 - 787

Skyring, G. W.; Jones, H. E. (1972): Guanine plus cytosine contents of deoxyribonucleic acids of some sulfate reducing bacteria: a reassessment. J. Bact. 109, 1298 - 1300

Sonenshein , D. E.; Silverstein, R. M.; West, J. R.; Carson, K. A.; Homsher, J.; Bennet, S.; Tayler, D. (1985): Studies on possible roles of catecholamines in the regulation of sex pheromone gland in american dog tick, *Dermacentor variabilis*. J. Chem. Ecol. 11, 363 -368

Suflita, J. M.; Robinson, J. A.; Tiedje, J. M. (1983): Kinetics of microbial dehalogenation of haloaromatic substrates in methanogenic environments. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1466 - 1473

Tasaki, M.; Kamagata, Y.; Nakamura, K.; Mikami, E. (1991): Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. nov..Arch. Microbiol. 155, 348 - 352

Thauer, R. K.; Jungermann, K.; Decker, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 100 - 180

Thiele, J. H.; Chartrain, M.; Zeikus, J. G. (1988a): Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 54, 10 - 19

Thiele, J. H.; Zeikus, J. G. (1988b): Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs. Appl. Environ. Microbiol. 54, 20 - 29

Thom, N. S.; Agg, A. R. (1975): The breakdown of synthetic organic compounds in biological processes. Proc. R. Soc. Lond. B. 189, 347 - 357

Tiedje, J. M.; Boyd, S. A.; Fathepure, B. Z. (1987): Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons. Dev. Ind. Microbiol. 27, 117 - 127

Tschech, A. (1989): Der anaerobe Abbau von aromatischen Verbindungen. Forum Mikrobiologie 12, 251 - 264

Tschech, A.; Fuchs, G. (1989): Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}CO_2$ and 4-hydroxybenzoate. Arch. Microbiol. 152, 594 - 599

Tsuchiya, T.; Yamaha, T. (1984): Reductive dehalogenation of 1,2,4-Trichlorbenzene by *Staphylococcus epidermidis* isolated from intestinal contents of rats. Agric. Biol. Chem. 48, 1545 - 1550

Turner, N.; Barata, B.; Bray, R. C.; Deistung, J.; LeGall, J.; Moura, J. J. G. (1987): The molybdenum iron-sulfur protein from Desulfovibrio gigas as a form of aldehyde oxidase. Biochem. J. 243, 755 - 761

Uyeda, K.; Rabinowitz, J. C. (1971): Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. J. Biological Chem. 246, 3111 - 3119

Verrier, D.; Mortier, B.; Dubourguier, H. C.; Albagnac, G. (1988): Adhesion of anaerobic bacteria to inert supports and development of methanogenic biofilms. In: Proceedings 5th Int. Symp. Anaerobic digestion, Bologna 1988, Hall et al. (eds), Pergamon Press 1988, 61 - 69

Wang, S.-D.; Wang, D. I. C. (1989): Pore dimension effects in the cell loading of a porous carrier. Biotechnol. Bioeng. 33, 915 - 917

White, H.; Strobl, G.; Feicht, R.; Simon, H. (1989): Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. Eur. J. Biochem. 184, 89 - 96

Widdel, F. (1980): Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäuren durch neu isolierte Sulfat-reduzierende Bakterien; Dissertation, Universität Göttingen

Widdel, F.; Trüper, H.G. (1981): The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: The Procaryotes (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balous, H.G. Schlegel eds.) Springer-Verlag, Berlin pp.: 926-940

Widdel, F. (1988): Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: A.J.B. Zehnder (ed.) Biology of anaerobic microorganisms, Wiley & Sons New York, 469-586

Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, 221-271

Young, J.C.; McCarty, P.L. (1969): The anaerobic filter for waste treatment. J. WPCF 41, 160-173

Zellner, G.; Sleytr, U. B.; Messner, P.; Kneifel, H.; Winter, J. (1990): *Methanogenium liminatans* spec. nov., a new coccoid, mesophilic methanogen able to oxidize secondary alcohols. Arch. Microbiol. 153, 287 - 293

Zellner, G.; Kneifel, H.; Winter, J. (1990): Oxidation of benzaldehydes to benzoic acid derivatives by three *Desulfovibrio* strains. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2228 - 2233

Zhang, X.; Wiegel, J. (1990): Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1119 - 1127

Zhang, X.; Morgan, T. V.; Wiegel, J. (1990): Conversion of ^{13}C-1 phenol to ^{13}C-4 benzoate, an intermediate step in the anaerobic degradation of chlorophenols. FEMS Microbiol. Lett. 67, 63 - 66

Danksagung

Meinem Lehrer Professor Sahm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. Schoberth bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit und die hilfreichen Diskussionen in schwierigen Situationen.

Herrn Professor Kneifel danke ich für die Unterstützung und Hilfe in allen analytischen Fragen.

Bei allen übrigen Mitarbeitern des IBT möchte ich für die ständige Hilfsbereitschaft, die sie mir gewährten recht herzlich danken.

Herrn Professor Simon und seinen Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung bei den enzymatischen Arbeiten.

Der Firma Bayer danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Trägermaterialien und Herrn Dr. Pascik für das große Interesse am Fortgang der Arbeit.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

JÜl-2616
Mai 1992
ISSN 0366-0885