

Thiosulfat- und Polythionatstoffwechsel

bei *Thiomonas intermedia* K12

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Susanne Wentzien
aus Hamburg

Hamburg
2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Sand

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Prof. Dr. P. Fortnagel

Tag der Disputation: 19. April 2002

Hamburg, den 16. März 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1992 bis Dezember 1999 in der Abteilung Mikrobiologie des Instituts für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg unter der Betreuung von Privatdozent Dr. W. Sand angefertigt.

Diese Arbeit wurde zum Teil durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt finanziell unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
3 Material und Methoden	12
3.1 Bakterium	12
3.2 Nährmedium	12
3.3 Kulturführung	14
3.3.1 Stammkulturen	14
3.3.2 Zwischenkulturen	14
3.3.3 Arbeitskulturen	14
3.3.4 Reinheitskontrolle	14
3.3.5 Technik der anaeroben Kulturführung	15
3.3.5.1 Befüllung von Serumflaschen	15
3.3.5.2 Inokulation und Probenahme	15
3.4 Thiosulfat- und Polythionatabbau durch Zellsuspensionen	16
3.4.1 Zellernte	16
3.4.2 Abbauxperimente unter aeroben Bedingungen	16
3.4.3 Abbauxperimente unter anaeroben Bedingungen	17
3.4.4 Hemmstoffe und Entkoppler	17
3.5 Bestimmung der Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase in zellfreien Rohextrakten	18
3.6 Bestimmung des Tetrathionatabbaus in zellfreien Rohextrakten	19
3.7 Thiosulfat Dehydrogenase Aktivität und Tetrathionatabbau durch Fraktionen des periplasmatischen Raums und des Cytoplasmas	20
3.8 Wachstumsexperimente unter anaeroben Bedingungen	21
3.9 Chemische Analysen	22
3.9.1 Sulfat	22
3.9.2 Thiosulfat und Polythionate	22
3.9.3 Elementarschwefel	23
3.10 Bestimmung der Gesamtzellzahl	25
3.11 Bestimmung des Proteingehaltes	25
3.12 Bestimmung des pH	25

4.1. Aerobe Experimente mit Zellsuspensionen von <i>Thiomonas intermedia</i> K12	
4.1.1 Abhängigkeit des Thiosulfatabbaus vom pH	27
4.1.2 Abhängigkeit des Tetrathionatabbaus vom pH	28
4.1.3 Thiosulfatabbau bei pH 6,5	29
4.1.4 Tetrathionatabbau bei pH 6,5	31
4.1.5 Einfluss von NEM auf den Abbau von Thiosulfat	32
4.1.6 Einfluss von NEM auf den Abbau von Tetrathionat	35
4.1.7 Einfluss von DNP auf den Abbau von Thiosulfat	37
4.1.8 Einfluss von DNP auf den Abbau von Tetrathionat	39
4.1.9 Einfluss von CCCP auf den Abbau von Thiosulfat	40
4.1.10 Einfluss von CCCP auf den Abbau von Tetrathionat	42
4.1.11 Einfluss von HQNO und Myxothiazol auf den Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat.	43
4.1.12 Einfluss von Cyanid auf den Abbau von Thiosulfat	44
4.1.13 Einfluss von Cyanid auf den Abbau von Tetrathionat	45
4.1.14 Tabellarische Zusammenfassung der Hemmstoff- und Entkopplerversuche zur Untersuchung des Abbaus von Thiosulfat und Tetrathionat	46
4.1.15 Abbau von Trithionat	47
4.2 Aerober Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat durch zellfreie Proteinfraktionen	
4.2.1 Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase	49
4.2.2 pH-Optimum der Thiosulfat-Dehydrogenase	50
4.2.3 Lokalisation der Thiosulfat-Dehydrogenase	51
4.2.4 Lokalisation des Tetrathionat abbauenden Enzyms	52

4.3 Anaerobe Experimente zum Thiosulfat- und Tetrathionatabbau	
4.3.1 Abbau von Thiosulfat unter anaeroben Bedingungen	52
4.3.2 Abbau von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen	52
4.3.3 Stöchiometrie des Abbaus von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen	54
4.3.4 Anaerobes Wachstum von <i>Thiomonas intermedia</i> K12 durch Disproportionierung von Tetrathionat	55
4.3.5 Einfluss verschiedener organischer Verbindungen auf das anaerobe Wachstum mit Tetrathionat	59
5 Diskussion	60
6 Literatur	77

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der aerobe und anaerobe Stoffwechsel von Thiosulfat und Tetrathionat bei *Thiomonas intermedia* K12 untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Der aerobe Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat erfolgt zyklisch. In beiden Fällen wird er durch die Enzyme Thiosulfat-Dehydrogenase, Tetrathionat-Hydrolase und Trithionat-Hydrolase katalysiert. Dabei werden Thiosulfat, Tetrathionat und Trithionat als Zwischenverbindungen und Sulfat als Endprodukt gebildet. Die Schlüsselverbindung in diesem Kreislauf ist die Disulfanmonosulfonsäure.
- Das Enzym Thiosulfatdehydrogenase ist im periplasmatischen Raum lokalisiert. Ein Cytochrom-c ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Elektronenakzeptor.
- Das Enzym Tetrathionat-Hydrolase ist im Cytoplasma lokalisiert und dort mit der Cytoplasmamembran assoziiert.
- Unter anaeroben Bedingungen kann der Organismus im Wege einer bislang noch nicht beschriebenen Reaktion Tetrathionat nutzen. Dieses wird nach folgender Reaktionsgleichung unter Bildung von Thiosulfat, Trithionat und Sulfat disproportioniert:



Aus dieser exergon verlaufenden Reaktion steht *Thiomonas intermedia* K12 ein Energiebetrag von $-16,1$ kJ/mol Tetrathionat zur Verfügung, der im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zur Bildung von ATP und damit zum Wachstum genutzt werden kann.

- Die Disproportionierung von Tetrathionat ist eine Möglichkeit für *Thiomonas intermedia* K12, trotz Sauerstoffmangel wachsen zu können. Dabei produziertes Thiosulfat kann nach Wiedereintritt von aeroben Bedingungen als Substrat verwendet werden. Die Ergebnisse erklären zum einen, warum *Thiomonas intermedia* im Biofilm des Biotops Abwasserleitung massenhaft vorkommt, und sind andererseits eine Bestätigung für die Theorie zur Schlüsselstellung der Polythionate im Schwefelkreislauf.

2 Einleitung

Bei *Thiomonas intermedia* K12 handelt es sich um Schwefel oxidierende, gemäßigt acidophile, gram-negative, monopolar, monotrich begeißelte Stäbchen von 1,4 – 2,0 µm Länge und 0,6 - 0,7 µm Breite. Der Stamm ist in der Lage, autotroph mit Biotin als obligatem Wachstumsfaktor (konz. 10^{-5} M), mixotroph mit Hefeextrakt als Kohlen- und Stickstoffquelle oder rein heterotroph mit Glucose oder Hefeextrakt zu wachsen (Wolff, 1981).

Thiomonas intermedia K12 wurde von Milde et al. (1983) aus korrodierten Abwassersammlern des Hamburger Sielsystems isoliert. In seinem natürlichen Biotop ist der Organismus einer hohen Organikkonzentration, wechselnden Sauerstoffpartialdrücken sowie einer Vielzahl reduzierter Schwefelverbindungen ausgesetzt. Damit stellt *Thiomonas intermedia* K12 ein geeignetes Objekt dar, um an ihm sowohl den aeroben als auch den anaeroben Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat zu untersuchen.

Der Schwefelkreislauf

In der Natur liegt Schwefel sowohl in elementarer als auch in einer Vielzahl von organischen und anorganischen Verbindungen vor. In letzteren nimmt er dabei Oxidationsstufen von -2 (in Sulfiden, S^{2-}) bis $+6$ (in Sulfat, SO_4^{2-}) ein.

Die Beziehungen der unterschiedlichen Oxidationsstufen werden im Modell des Schwefelkreislaufs beschrieben. Dieses Modell basiert auf der Oxidation von aus Proteinabbau oder bakterieller Sulfatreduktion entstandenem Sulfid zu Sulfat, was im Rahmen eines assimilatorischen oder dissimilatorischen Stoffwechsels wieder reduziert werden kann. Neben diesen kreisläufigen Hauptreaktionen gibt es Nebenreaktionen, in denen Polythionate und Thiosulfat eine Schlüsselstellung einnehmen. In Abb. 2.1 sind Zwischenverbindungen des Schwefelkreislaufs zusammengefasst.

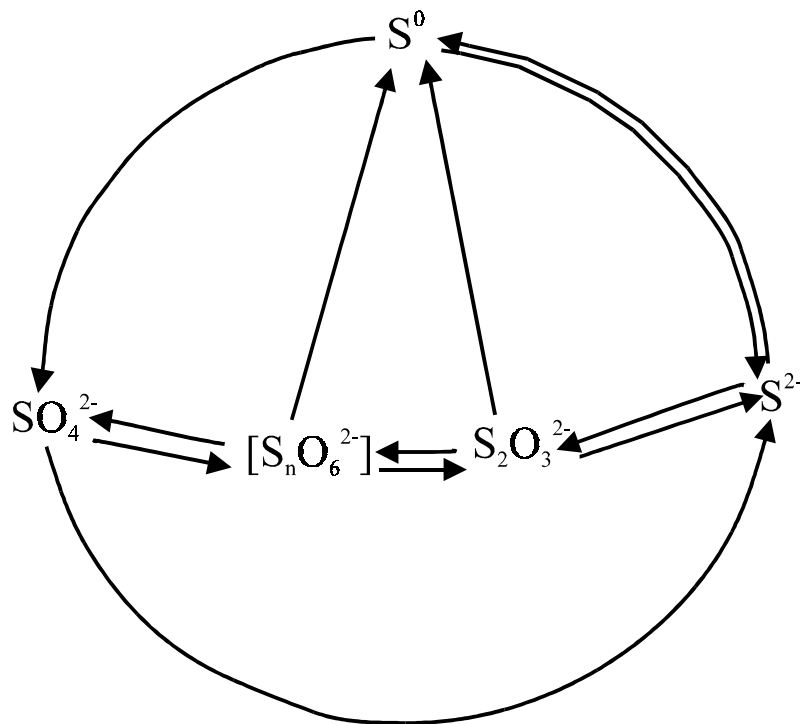


Abb. 2.1: Der anorganische Schwefelkreislauf mit ausgewählten Verbindungen.

Sulfat (SO_4^{2-}) ist das Endprodukt der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen wie Elementarschwefel, Sulfid, Thiosulfat und Polythionate. Diese erfolgt unter aeroben (z.B. durch Thiobacillen) und anaeroben (z.B. durch phototrophe oder denitrifizierende Bakterien) Bedingungen.

Sulfid (S^{2-}) ist das Hauptprodukt Sulfat reduzierender Bakterien. Außerdem wird Sulfid aus organischen Schwefelverbindungen im Prozess der Desulfuration und bei der Schwefeldisproportionierung gebildet. Unter anaeroben Bedingungen präzipitiert Sulfid z.B. mit Fe(II) unter Bildung von Eisensulfid (FeS) und Pyrit (FeS_2).

Elementarschwefel (S^0) entsteht bei der Oxidation von Sulfid durch Luftsauerstoff oder anaerob durch Sulfid oxidierende Bakterien (z.B. Chromatiaceae, Chlorobiaceae). Darüber hinaus tritt es auch als Zwischenprodukt der Oxidation von Thiosulfat und Tetrathionat auf.

Thiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) entsteht unter pH-neutralen bis alkalischen Bedingungen durch Oxidation von Metallsulfiden mit Sauerstoff (Goldhaber, 1983). Unter sauren Bedingungen, wie sie in Bergbaualtlasten herrschen, ist Pyrit stabil gegenüber einer Oxidation mit Sauerstoff; hier entsteht Thiosulfat durch Oxidationsmittel wie Fe(III)-Ionen (Schippers et al., 1996b).

Unter anaeroben Bedingungen entsteht Thiosulfat durch Oxidation von Pyrit mit Mn(IV)- und Fe(III)-Ionen. Vergleichende Untersuchungen an aeroben und anaeroben Sedimenten zeigten,

dass die Reoxidation von Sulfiden (Metallsulfide, Polysulfide, H_2S) und damit die Bildung von Thiosulfat hauptsächlich in anaeroben Teilen des Sediments stattfindet (Jørgensen, 1990; Schippers und Jørgensen, 2001).

Eine weitere Thiosulfatquelle stellt die Reaktion von während der Schwefeloxidation intermediär entstehendem Sulfit mit Elementarschwefel dar.

Polythionate ($\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$) zeichnen sich durch zwei funktionelle Sulfonsäure- (SO_3^{2-}) Gruppen aus, die durch mindestens eine Sulfan-Gruppe von einander getrennt sind. Je nach Gesamtzahl der Schwefelatome werden sie Tri-, Tetra-, Penta-, Hexathionat etc. genannt. Sie gelten als instabile Verbindungen, die unter sauren und alkalischen Bedingungen einem raschen chemischen Abbau unterliegen. Polythionate wurden in verschiedenen Biotopen nachgewiesen; hierzu zählen Bergbaualtlasten, Salzmarschen sowie anaerobe, hypersaline Sedimente (Luther et al., 1986; Schippers et al., 1996a; Henneke et al., 1997).

Tetrathionat ist das Produkt der biochemischen Thiosulfat-Oxidation. Umgekehrt wird Tetrathionat durch bakterielle und chemische Reduktion in Thiosulfat umgewandelt. Eine weitere Reaktion von Tetrathionat verläuft mit Sulfid unter Bildung von Thiosulfat und Elementarschwefel (Roy und Trudinger, 1970). Ein enger Zusammenhang von Thiosulfat und Tetrathionat wurde von Podgorsek und Imhoff (1999) als Tetrathionat-Zyklus für Ostseesedimente beschrieben. Durch das Zusammenwirken von bakterieller Oxidation von 2 Mol Thiosulfat zu 1 Mol Tetrathionat mit der chemischen Reaktion von 1 Mol Tetrathionat mit 1 Mol Sulfid, die zur Bildung von 2 Mol Thiosulfat und 1 Mol Elementarschwefel führen, kann Thiosulfat erneut in den Zyklus eintreten, wobei sich Elementarschwefel anreichert. Eine solche Anreicherung von Elementarschwefel wurde von Podgorsek (1998) in verschiedenen Ostseesedimenten beobachtet. Aufgrund dieses Zyklus ist es für Tetrathionat schwierig, in sulfidischer Umgebung zu akkumulieren. Um es zu detektieren, muss mehr Tetrathionat durch Mikroorganismen gebildet werden, als durch chemischen Abbau verloren geht.

Über das Vorkommen höherer Polythionate als Tetrathionat an natürlichen Standorten liegen wenige Informationen vor. Pentathionat konnte in Material aus Bergbaualtlasten und an korrodierenden, unlegierten Stählen nachgewiesen werden (Schippers et. al., 1996a; von Rège, 1999).

Trithionat ist unter natürlichen Bedingungen instabil. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es von Schwefel oxidierenden Bakterien als Substrat verwendet wird und dass es als Produkt des Thiosulfat- oder Tetrathionatabbaus auftritt (Trudinger, 1964b; Okuzumi und

Kita, 1965; Sinha und Walden, 1966; Wentzien et al., 1994). Außerdem tritt Trithionat als Zwischenverbindung bei der Sulfatreduktion auf.

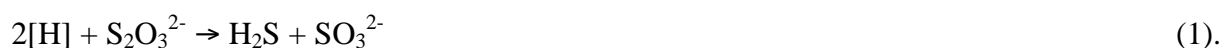
Für die Transformation von Schwefelverbindungen nehmen Polythionate und Thiosulfat eine zentrale Rolle ein. Hierbei spielen sowohl chemische als auch bakterielle Umsetzungen eine Rolle. Die Oxidationszahl des Schwefels beträgt im Mittel aller S-Atome bei Thiosulfat + 2 und bei Tetrathionat + 2,5. Bedingt durch diesen, verglichen mit Sulfat und Sulfid, intermediären Redoxzustand von Thiosulfat und Polythionaten können diese Verbindungen sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor an bakteriellen Umsetzungen beteiligt sein.

Bakterielle Reduktion von Thiosulfat und Tetrathionat

Die Fähigkeit zur Reduktion von Thiosulfat und Tetrathionat ist bei heterotrophen Bakterien weit verbreitet. In der Familie der Enterobacteriaceae finden sich Vertreter dieses Stoffwechselltyps hauptsächlich in den Gattungen *Citrobacter*, *Salmonella* und *Proteus* (Barrett und Clark, 1987). Sulfatreduzierer wie *Desulfovibrio* oder *Desulfotomaculum* können sowohl Tetrathionat als auch Thiosulfat als Elektronenakzeptor für die Oxidation von organischen Verbindungen oder molekularem Wasserstoff verwenden (Ishimoto et al., 1955; Postgate, 1965). Außerdem wurde die Tetrathionat-Reduktion für Vertreter der Gattung *Pseudomonas* beschrieben (Pollack und Knox, 1943; Tuttle, 1980).

Mechanismen. Die Reduktion von Thiosulfat und Tetrathionat wird durch Enzyme katalysiert. Während die Reduktion von Thiosulfat zur Bildung von Schwefelwasserstoff und Sulfid führt (Gleichung 1), wird Tetrathionat zu Thiosulfat reduziert (Gleichung 2):

Thiosulfat-Reduktase:



Tetrathionat-Reduktase:



Außerhalb der Gruppen der Sulfatreduzierer und Enterobakterien wurde die Tetrathionatreduktion am intensivsten an dem marinen Bakterium *Pseudomonas* 16B untersucht. Hierbei handelt es sich um einen heterotrophen Organismus, der unter anaeroben

Bedingungen Tetrathionat zu Thiosulfat reduziert und unter aeroben Bedingungen Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert. Thiosulfat wirkt zwar stimulierend auf das aerobe, heterotrophe Wachstum (Tuttle und Jannasch, 1973), aber lithoautotrophes Wachstum mit Thiosulfat findet nicht statt (Tuttle et al., 1974). Anaerobes Wachstum mit Pyruvat oder Laktat wird durch Tetrathionat und Thiosulfat unterstützt (Tuttle und Jannasch, 1973). Für *Pseudomonas* 16B wurde eine Thiosulfat-Oxidase beschrieben, die auch Tetrathionat reduziert (Tuttle, 1980). Außerdem exprimierten anaerob angezogene Zellen eine zusätzliche, membrangebundene Tetrathionat-Reduktase, die durch Sauerstoff gehemmt wurde. Dieses Enzym wies gleichzeitig eine Aktivität für Thiosulfat-Reduktase auf (Whited und Tuttle, 1983). Die Eigenschaften der durch anaerobe Anzucht induzierten Tetrathionat-Reduktase gleichen den aus Enterobakterien isolierten Enzymen.

Bakterielle Oxidation von Thiosulfat und Tetrathionat

Bakterien, die die Fähigkeit besitzen, reduzierte Schwefelverbindungen vollständig zu Sulfat zu oxidieren, wurden lange Zeit in der Gattung *Thiobacillus* zusammengefasst (Kelly und Harrison, 1989). Die Gattung umfasste chemolithoautotrophe, fakultativ chemoorganotrophe sowie mixotrophe Arten. Phylogenetische Untersuchungen mittels 5s- und 16s-rRNA Sequenzierung sowie DNA-DNA-Hybridisierungen (Woese et al., 1984, Lane et al., 1985; Lane et al., 1992; Goebel und Stackebrandt, 1994; McDonald et al., 1997) zeigten, dass sich die in der Gattung *Thiobacillus* zusammengefassten Arten auf die α -, β - und γ - Äste des Stammbaums der Proteobakterien verteilen. Weitergehende Arbeiten schlugen die Ausgliederung der fakultativ heterotrophen Arten *Thiobacillus intermedius*, *Thiobacillus cuprinus*, *Thiobacillus versutus* und *Thiobacillus acidophilus* vor (Katayama et al., 1995; Moreira und Amils, 1997). *Thiobacillus intermedius* und *Thiobacillus cuprinus* sollten demnach in *Thiomonas intermedia* bzw. *cuprina* umbenannt werden. Von Katayama (1995) wurde *Thiobacillus versutus* in *Paracoccus versutus* umbenannt. *Thiobacillus acidophilus* wurde von Hiraishi et al. (1997) in die Gattung *Acidiphilium* eingeordnet und in *Acidiphilium acidophilus* umbenannt. Moreira und Amils (1997) schlugen vor, nur die strikt chemolithoautotrophen Arten wie *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus tepidarius* und *Thiobacillus neapolitanus* in der Gattung *Thiobacillus* zu belassen. Von Kelly und Wood (2000a) wurden für diese Arten ebenfalls neue Gattungsnamen vorgeschlagen, so dass sich zum heutigen Zeitpunkt folgendes Bild bietet:

Die Arten *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* und *Thiobacillus caldus*, alle auf dem γ -Ast des Stammbaums der Proteobakterien lokalisiert, werden in der Gattung *Acidithiobacillus* zusammengefasst. Der ebenfalls zum γ -Ast gehörende *Thiobacillus tepidarius* erhält den Gattungsnamen *Thermithiobacillus* und wird aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften (gemäßigt thermophil, neutrophil) von der Gattung *Acidithiobacillus* getrennt, obwohl frühere Untersuchungen (McDonald et al. 1997; Goebel und Stackebrandt, 1994) ihn in eine Gruppe mit den Mitgliedern der neuen Gattung *Acidithiobacillus* einordneten. *Thiobacillus neapolitanus*, *Thiobacillus halophilus* und *Thiobacillus hydrothermalis* werden in der Gattung *Halothiobacillus* zusammengefasst.

Die Gattung *Thiomonas* sowie der Leitorganismus der Thiobacillen, *Thiobacillus thioparus*, sind auf dem β -Ast des Stammbaums der Proteobakterien angesiedelt. Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu *Thiobacillus thioparus* wird der Gattungsname *Thiobacillus* für *Thiobacillus denitrificans* ebenfalls beibehalten (Kelly und Wood, 2000b).

Auf dem α -Ast des Stammbaums der Proteobakterien befindet sich die Gattung *Acidiphilium*, der der frühere *Thiobacillus acidophilus* zugeordnet wurde. Auf diesem Ast befinden sich auch *Paracoccus versutus* mit *Paracoccus pantotrophus* als nächstem Verwandten und *Starkeya novella*, früher *Thiobacillus novellus* (Rainey et al., 2000; Kelly et al., 2000c).

Neben *Thiobacillus thioparus* und *Thiobacillus denitrificans* behalten nur wenige auf den Stammbaum verteilte Arten den Gattungsnamen *Thiobacillus* bei, z.B. *Thiobacillus delicatus* (β -Ast) und *Thiobacillus prosperus* (γ -Ast). Die vorliegenden, phylogenetischen Daten erlauben keine Zuordnung zu den neu gebildeten Gattungen.

Thiosulfat und Tetrathionat werden von Schwefel oxidierenden Bakterien vollständig zu Sulfat oxidiert. Dieses erfolgt durch Abbauwege, bei denen Zwischenverbindungen auftreten, oder durch eine Oxidation ohne Akkumulation von Zwischenverbindungen.

Die Bildung von Polythionaten als Zwischenprodukte ist für *Acidiphilium acidophilum*, *Halothiobacillus neapolitanus*, *Thermithiobacillus tepidarius*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Thiomonas intermedia* beschrieben worden (Sinha und Walden, 1966; Kelly und Tuovinen, 1975; Steudel et al., 1987; Pronk et al. 1990; Meulenberg et al. 1993a; Wentzien et al., 1994). Den ersten Schritt stellt die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat dar. Meulenberg et al. (1993b) gelangen aus *Acidiphilium acidophilum* die Isolierung und partielle Charakterisierung des Enzyms Thiosulfat-Dehydrogenase. Das aus zwei Untereinheiten bestehende Enzym mit einem pH Optimum von 3 und einem Molekulargewicht von 102 kDa ist wahrscheinlich im periplasmatischen Raum lokalisiert.

Als möglicher Elektronenakzeptor für die bei der Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat freiwerdenden Elektronen wurde Cytochrom-c genannt. Lokalisierung und Elektronenakzeptor decken sich mit den Eigenschaften der Thiosulfat oxidierenden Enzyme, die aus *Thermithiobacillus tepidarius* (Lu und Kelly, 1988a) und *Thiobacillus thioparus* (Lyric und Suzuki, 1970) angereichert wurden.

Während der Zellaufschluss bei dem neutrophilen *Thermithiobacillus tepidarius* mit einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust des Tetrathionat abbauenden Enzyms verbunden war (Lu und Kelly, 1988a), konnten aus Spezies der Gattungen *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium* (*Acidiphilium acidophilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*) Tetrathionat hydrolysierende Enzyme isoliert und charakterisiert werden (Tano et al., 1996; de Jong et al., 1997a + b). De Jong et al. (1997a+b) postulierten für *Acidiphilium acidophilum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* unterschiedliche Mechanismen der Tetrathionat-Hydrolyse, da in den Enzymassays unterschiedliche Zwischenverbindungen auftraten. Die Gesamtreaktion der Tetrathionat-Hydrolyse ist jedoch für *Acidiphilium acidophilum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* identisch und in der folgenden Gleichung dargestellt:



Tano et al. (1996) beschrieben für die Tetrathionat-Hydrolyse von *Acidithiobacillus thiooxidans* folgende Reaktionsgleichung:



Beide Autorenguppen postulierten auf Grund der niedrigen pH-Optima der Reaktionen eine Lokalisierung der Enzyme im periplasmatischen Raum. Dieses steht im Widerspruch zu Arbeitsergebnissen von Lu und Kelly (1988a+b) und Hallberg et al. (1996), die für Zellen von *Thermithiobacillus tepidarius* und *Acidithiobacillus caldus* eine Lokalisierung des Enzyms im Cytoplasma vorschlugen.

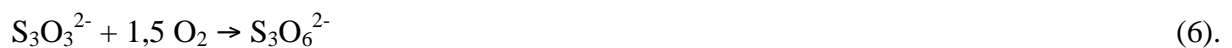
Neben Tetrathionat ist Trithionat als Zwischenprodukt des Thiosulfat-Stoffwechsels für *Halothiobacillus neapolitanus*, *Thiobacillus thioparus*, *Thermithiobacillus tepidarius*, *Thiomonas intermedia*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* postuliert worden (Vishniac, 1952; Okuzumi und Kita, 1965; Sinha und Walden, 1966; Sklodowska, 1988; Lu und Kelly, 1988a; Wentzien et. al., 1994). Trithionat hydrolysierende Enzyme konnten aus *Acidiphilium acidophilum* und *Thermithiobacillus tepidarius* isoliert und

teilweise charakterisiert werden (Lu und Kelly, 1988a; Meulenberg et al., 1992a). Die Autoren beschrieben die Hydrolyse von Trithionat zu Thiosulfat und Sulfat.

Die Reaktionen der Tetrathionat hydrolysierenden Enzyme aus *Acidiphilium acidophilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* (Gleichungen 3 und 4) erklären nicht die Entstehung von Trithionat. Steudel et al. (1987) erklärten die Bildung höherer Polythionate im Kulturverlauf von *Acidithiobacillus ferrooxidans* durch die intermediäre Bildung von Disulfanmonosulfonsäuren. Demnach folgt die Hydrolyse von Tetrathionat folgender Reaktionsgleichung:



Disulfanmonosulfonsäuren sind hochreaktive Verbindungen, die u.a. nach folgender Gleichung zu Trithionat oxidiert werden können.



Darüber hinaus unterliegen Disulfanmonosulfonsäuren einem chemischen Abbau, der, wie in Gleichung 7 beschrieben, in der Bildung von Elementarschwefel und Sulfit resultiert:



Durch die Gleichungen 5 und 6 lassen sich die Reaktionen der Enzyme Thiosulfat-Dehydrogenase, Tetrathionat-Hydrolase und Trithionat-Hydrolase zu einem Kreislaufmodell verbinden. Die Oxidation von 1 Mol Thiosulfat führt zur Bildung von 1 Mol Sulfat und 0,5 Mol Thiosulfat, wobei als Zwischenprodukte Trithionat und Tetrathionat auftreten. Pronk et al. (1990) postulierten für acidophile Thiobacillen einen solchen zyklischen Thiosulfatabbau unter Beteiligung von Disulfanmonosulfonsäuren. Außerdem stellte Schippers (1998) ein zyklisches Schema zur biologischen Pyritoxidation durch *Acidithiobacillus ferrooxidans* vor, welches die Reaktionen 5 und 6 einschließt.

Bei den verzweigten Modellen der Oxidation von Thiosulfat werden die Enzyme Rhodanese oder Thiosulfat-Reduktase als Schlüsselenzyme diskutiert (Brüser et. al., 2000). Beide höchstwahrscheinlich periplasmatischen Enzyme spalten Thiosulfat zu Sulfid und Sulfit. Sulfit wird, im Periplasma, durch eine Oxidoreduktase zu Sulfat oxidiert. Sulfid wird sofort zu Elementarschwefel in Form einer reaktionsfreudigen Polysulfankette oxidiert. Eine Sulfhydryltransferase überträgt eine Sulfangruppe vom Elementarschwefel auf ein

organisches Thiol. Das entstandene Perthiol wird in das Cytoplasma transportiert, wo eine Heterodisulfidreduktase daraus Sulfid freisetzt. Sulfid wird im Cytoplasma zu Sulfat oxidiert. Das Enzym Rhodanese ist in *Starkeya novella* und *Thiobacillus denitrificans* nachgewiesen worden (Fukumori et al. 1989; Schedel und Trüper, 1980). Die Beteiligung des Enzyms am Energiestoffwechsel ist nicht eindeutig belegt. So spricht u. a. dagegen, dass die Expression von Rhodanese in Schwefel oxidierenden Bakterien nicht durch Thiosulfat induziert wird (Friedrich, 1998). Darüber hinaus ist das Enzym Rhodanese auch in anderen Bakterien wie *Escherichia coli* (Alexander und Volini, 1987) und Eukaryoten weit verbreitet, ohne dass diese Organismen Thiosulfat als Energiequelle nutzen. Möglicherweise besteht die Funktion von Rhodanese darin, Sulfanschwefel auf organische „Carriermoleküle“ zu übertragen (z.B. Glutathion).

Das Enzym Thiosulfat-Reduktase wurde in *Thiobacillus denitrificans* (Schedel und Trüper, 1980) aber auch anderen, nicht Schwefel oxidierenden Bakterien nachgewiesen (Barret und Clark, 1987).

Für die heterotrophe Art *Paracoccus (P.) versutus* (früher *Thiobacillus versutus*) wurde ein Thiosulfatabbau ohne die Akkumulation von Zwischenverbindungen beschrieben. Die Thiosulfatoxidation erfolgt an einem, im periplasmatischen Raum lokalisierten Multienzymkomplex (Lu und Kelly, 1983; Lu et al., 1985; Lu, 1986). Dabei wurden weder Elementarschwefel noch Polythionate detektiert. 1 mol Thiosulfat werden dabei vollständig zu 2 mol Sulfat oxidiert. Darüber hinaus kann *P. versutus* nach Kelly (1989) Polythionate und Elementarschwefel nicht als Substrate verwenden. Beffa et al. (1991) beschrieben dagegen, dass *P. versutus* unter mikroaerophilen Bedingungen mit Elementarschwefel wächst. Der beschriebene Multienzymkomplex ist damit unter Umständen nicht der einzige Weg bei *P. versutus*, um reduzierte Schwefelverbindungen zu oxidieren. Für *Starkeya novella* postulierten Kappler et al. (2000) ebenfalls die Existenz von zwei Abbauwegen zur Thiosulfatoxidation. Zum einen wird Thiosulfat über lösliche, periplasmatische Enzyme abgebaut, wobei der initiale Schritt in der Spaltung von Thiosulfat besteht, vergleichbar mit der Rhodanese-Spaltung oder der Reaktion der Thiosulfatreduktase. Das entstehende Sulfit wird dann durch eine Sulfit-Oxido-Reduktase oxidiert. Darüberhinaus erfolgt die Thiosulfatoxidation zu Sulfat an einem membrangebundenen, periplasmatischen Multienzymkomplex ohne die Akkumulation von Zwischenverbindungen. Friedrich et al. (2001) postulierten einen gemeinsamen Mechanismus aller lithotrophen und phototrophen Schwefel oxidierenden Bakterien zur Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen ohne die Akkumulation von Zwischenverbindungen auf der Basis der Analyse von Gensequenzen.

Danach konnten Gene des S_{ox} -Gen-Clusters von *Paracoccus pantotrophus* in verschiedenen Schwefel oxidierenden Bakterien nachgewiesen werden. Das Schwefel oxidierende System von *Paracoccus pantotrophus* besteht aus vier Komponenten, die zu einem Komplex zusammengefasst sind: einem Trägerprotein für Thiosulfat und Sulfid (SoxZY), einem Protein mit Hydrolaseaktivität (SoxB), welches aus Thiosulfat Sulfat abspaltet, einer Dehydrogenase (SoxCD) und einem c-Typ Cytochrom (SoxxA), dessen genaue Funktion ungeklärt ist. Die N-terminale Aminosäuresequenz von SoxZY ist hoch homolog zu Enzym A des von Lu et al. (1985) beschriebenen Multienzymkomplexes von *Paracoccus versutus* (Friedrich et al., 2000). Dieses Enzym bindet ebenfalls Thiosulfat und Sulfid.

Auf SoxB basierende Primersysteme wurden erst kürzlich von Petri et al. (2001) eingesetzt, um die Verbreitung dieses Gens bei Schwefel oxidierenden Bakterien zu untersuchen. Dabei wurde das Ziel verfolgt, SoxB als Markergen für Schwefel oxidierende Bakterien bei Bestandsaufnahmen an natürlichen Standorten einzusetzen. Das SoxB Gen konnte in phototrophen und lithotrophen Thiosulfat oxidierenden Referenzstämmen und Isolaten nachgewiesen werden. SoxB fehlte in den sogenannten Tetrathionat bildenden Arten (z.B. *Pseudomonas stutzeri*) und in ausgewählten, nicht Thiosulfat oxidierenden Bakterien.

Über den Mechanismus des Thiosulfatabbaus bei der Gattung *Thiomonas* liegen bislang keine Untersuchungen vor. Beim Wachstum mit Thiosulfat als Substrat produziert *Thiomonas intermedia* K12 Trithionat und Tetrathionat, beim Wachstum mit Tetrathionat als Substrat Thiosulfat und Trithionat als Zwischenprodukte neben Sulfat als Endprodukt (Wentzien et al., 1994). Der Nachweis von Tetrathionat, Thiosulfat und Trithionat als Zwischenverbindungen deuten auf einen zyklischen Abbau mit Disulfanmonosulfonsäure als Schlüsselverbindung hin, wie er bislang nur für acidophile, Schwefel oxidierende Bakterien beschrieben wurde. Die Existenz eines solchen Abbauweges in *Thiomonas intermedia* K12 sollte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Von weiterem Interesse war der Vergleich des aeroben und anaeroben Abbaus dieser Verbindungen. Thiosulfat und Polythionate können aufgrund ihres Redoxzustandes als Elektronenakzeptoren und/oder –donatoren eingesetzt werden. Dieses kann für *Thiomonas intermedia* K12 von entscheidender Bedeutung sein, da der Organismus an seinem natürlichen Standort wechselnden Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt ist. Außerdem findet *Thiomonas intermedia* K12 dort organische Verbindungen und reduzierte Schwefelverbindungen vor. Diese Arbeit sollte Hinweise darauf liefern, ob bei *Thiomonas intermedia* K12 anaerobe StoffwechsellLeistungen existieren, die Thiosulfat oder Tetrathionat einschließen.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterium

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Bakterien der Art *Thiomonas intermedia* (alt: *Thiobacillus intermedius*) Stamm K12 durchgeführt. Die Isolierung und Charakterisierung des Stammes erfolgten durch Milde (1978) und Wolff (1981).

3.2 Nährmedium

Die Kultivierung von *Thiomonas intermedia* K12 erfolgte nach Matin und Rittenberg (1971, modifiziert).

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	5,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
NH ₄ Cl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
FeEDTA-Stammlösung	5 mL
Biotinstammlösung (1 mM)	10 mL
Spurenelementestammlösung	5 mL
aqua deion.	ad 1000 mL

Der pH-Wert des Mediums betrug 6,7. Als pH-Indikator wurde der Nährlösung Methylrot zugegeben.

FeEDTA-Stammlösung

Fe(III)Cl ₃	50 mg
EDTA	100 mg
aqua deion.	ad 100 mL

Spurenelementelösung

Na ₂ EDTA	50,0 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,2 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	4,99 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,57 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	7,34 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	5,06 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,61 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	1,10 g
aqua deion.	ad 1000 mL

Die Spurenelementelösung wurde durch Zugabe von Kaliumhydroxidplättchen auf pH 7,0 eingestellt.

Die Sterilisation des Nährmediums erfolgte bei 112°C und 1,5 bar für 30 min.

Zur Herstellung von Festmedium wurde dem Nährmedium 15 g Agar hinzugefügt.

3.3 Kulturführung

3.3.1 Stammkulturen

50 mL Stammkulturen von *Thiomonas intermedia* K12 wurden bei 28°C auf einem Rundschüttler bei 150 bis 200 Upm im Dunkeln inkubiert. Das Inokulum betrug 10 % (v/v) einer gewachsenen Kultur. Nach 3-4 Tagen waren die Kulturen gewachsen, was durch einen Farbumschlag des pH-Indikators nach rosa ($\text{pH} \leq 4$) angezeigt wurde. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C. Alle 4 bis 5 Wochen wurden Aliquote der Stammkulturen auf frisches Nährmedium übertragen.

3.3.2 Zwischenkulturen

Zum Beimpfen von 5 und 10 L Arbeitskulturen wurden Zwischenkulturen angelegt. 500 mL Nährmedium wurden mit 5 % Inokulum (v/v) einer Stammkultur beimpft. Die Kultivierung der Zwischenkulturen erfolgte wie für die Stammkulturen beschrieben. Die Dauer bis zum Farbumschlag des pH-Indikators betrug etwa 4 - 5 Tage.

3.3.3 Arbeitskulturen

Arbeitskulturen wurden in 5 L oder 10 L Steilbrustflaschen mit 4,5 bzw. 9 L Nährmedium kultiviert. Thiosulfat wurde in Form einer sterilfiltrierten Stammlösung dem Medium unmittelbar vor dem Beimpfen hinzugefügt. Die Arbeitskultur wurde mit Aliquoten einer gewachsenen Zwischenkultur beimpft. Das Inokulum betrug 5 % (v/v). Die Inkubation unter konstanter Belüftung mit wasserdampfgesättigter Luft und Rühren bei 28°C im Dunkeln dauerte 2 Tage. Nach 2 Tagen befand sich der pH-Wert bei 2,3, Thiosulfat war vollständig verbraucht und die Kultur am Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

3.3.4 Reinheitskontrolle

Stamm-, Zwischen- und Arbeitskulturen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf ihre Einheitlichkeit getestet. Des Weiteren wurde Festmedium mit den Kulturen beimpft, um die Einheitlichkeit der Koloniemorphologie zu überprüfen. Stammkulturen wurden regelmäßig auf Reinheitsagar ausgestrichen (Wolff, 1981).

3.3.5 Technik der anaeroben Kulturführung

3.3.5.1 Befüllung von Serumflaschen

25 mL und 100 mL Serumflaschen wurden vor der Befüllung anaerobisiert und autoklaviert. Um Sauerstoff aus den Serumflaschen zu beseitigen, wurden mit Gummistopfen luftdicht verschlossene Serumflaschen abwechselnd mit der Wasserstrahlpumpe entgast und nachfolgend mit Stickstoff der Reinheitsklasse 5.0 begast. Dieser Vorgang wurde 3 x wiederholt und die Serumflaschen anschliessend bei 0,5 bar und 112 °C autoklaviert.

Die anaerobe Befüllung erfolgte mit Hilfe eines Widdel-Kolbens. Dieser mit einem Steigrohr, Befüllungsschläuchen, Gasanschluss, Magnetrührstäbchen und zwei Probenahmeöffnungen versehene Kolben wurde mit 1,5 L eines 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,5) bzw. Nährmedium befüllt und autoklaviert. Sofort nach Beendigung des Autoklavierens (30 min, 0,5 bar, 112 °C) wurde der Kolben verschlossen und unter Rühren mit einem Gemisch aus N₂/CO₂ (80/20, v/v) begast.

Für die Experimente zum Abbau von Schwefelverbindungen wurde der Puffer unter kontinuierlicher Begasung mit Stickstoff unter Rühren im Eisbad abgekühlt.

Das für anaerobe Wachstumsexperimente benötigte Nährmedium wurde bei Raumtemperatur unter konstanter Begasung mit einem N₂/CO₂-Gemisch (80/20, v/v) unter Rühren abgekühlt, damit während des Autoklavierens ausgefallene Salze wieder in Lösung gingen. War dieses erfolgt, konnte bis auf Raumtemperatur unter Rühren im Eisbad abgekühlt werden.

Zur Befüllung der Serumflaschen wurde der Widdel-Kolben verschlossen, so dass die Flüssigkeit durch den Gasdruck in das Steigrohr und die daran angeschlossenen Befüllungsschläuche mit Kanülen stieg. Durch Öffnen der Kanülenhähne konnte Medium abgezapft werden. Die ersten 100 mL wurden verworfen.

Anschliessend wurden die Gummistopfen der Serumflaschen mit den Kanülen der Befüllungsschläuche des Widdel-Kolbens durchstochen und durch Anbringen einer zusätzlichen Entlüftungskanüle die Serumflasche befüllt. Hierbei wurde sichergestellt, dass die Entlüftungskanüle erst durch den Gummistopfen der Serumflasche gestochen wurde, wenn sich in der Flasche durch die Befüllungskanüle ein Überdruck aufgebaut hatte, so dass kein Luftsauerstoff in die Serumflasche eindringen konnte.

3.3.5.2 Inokulation und Probenahmen

Für Inokulation und Probenahme wurde der Stopfen mittels einer zuvor mit Stickstoff gespülten Spritze (Hungate Technik) durchstochen.

Die verwendeten Zellsuspensionen wurden vor Versuchsbeginn 15 min mit Stickstoff begast.

Die sterilfiltrierten Thiosulfat-, Trithionat- und Tetrathionatstammlösungen wurden an der Wasserstrahlpumpe entgast und nachfolgend 15 min mit Stickstoff begast.

Autoklavierbare Stammlösungen (z.B. organische Substrate) wurden an der Wasserstrahlpumpe entgast, autoklaviert und nachfolgend mindestens 15 min mit Stickstoff begast.

3.4 Thiosulfat- und Polythionatabbau durch Zellsuspensionen

3.4.1 Zellernte

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (10.000 g, 20 min, 4°C, Kontron, Centrikon H-401). Die Zellen wurden 2 x mit Phosphatpuffer (0,05 M, pH 6,5) gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.4.2 Abbauxperimente unter aeroben Bedingungen

Die Versuche wurden mit Phosphatpuffer (0,05 M, pH 6,5) in Schraubdeckelflaschen (100 mL) im Wasserbad bei 30°C unter Rühren und Belüftung durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 15 bis 180 min.

Der mit der Zellsuspension beimpfte Versuchsansatz wurde 10 min unter Versuchsbedingungen vorinkubiert.

Das Experiment wurde durch Zugabe von 1 mL einer in Phosphatpuffer (0,05 M, pH 6,5) angesetzten Thiosulfat-, Trithionat- bzw. Tetrathionatstammlösung gestartet. Unmittelbar nach dem Start sowie zu weiteren, ausgewählten Zeitpunkten wurde steril 2 mL Probe entnommen und für die Bestimmung von Polythionaten und Sulfat sofort steril filtriert.

Für die Bestimmung des Gehalts an Elementarschwefel (Kap. 3.9.3) wurden die unbehandelten Proben sofort eingefroren (-25°C).

Die Bestimmung des Gehalts an Polythionaten erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie nach entsprechender Verdünnung unmittelbar nach Beendigung der Versuchsreihe (innerhalb von 10 h) (Kap. 3.9.2).

Die Bestimmung des Sulfatgehalts erfolgte mittels Ionenchromatographie aus eingefrorenen Proben (Kap. 3.9.1).

Nach Beendigung des Experiments wurden 500 µL Probe für die Bestimmung des Proteingehalts (Kap. 3.11) entnommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Präzipitat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -25°C gelagert.

Kontrollexperimente zur Quantifizierung des chemisch bedingten Abbaus von Thiosulfat und Polythionaten wurden mit durch Dampfsterilisation abgetöteten Zellen unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt.

3.4.3 Abbauxperimente unter anaeroben Bedingungen

Abbauxperimente unter anaeroben Bedingungen wurden in anaeroben und steril mit 25 und 50 mL 0,05 M Phosphatpuffer befüllten Serumflaschen (30 mL und 100 mL; Kap. 3.3.5.1) im Wasserbad bei 30°C unter Rühren durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug 5 bis 180 min.

In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen (Kap. 3.3.5.2). Die Versuchsdurchführung und Probenbehandlung erfolgte, wie für aerobe Experimente (Kap. 3.4.2) beschrieben.

3.4.4 Hemmstoffe und Entkoppler

Hemmstoffe und Entkoppler wurden mit Ausnahme von Kaliumcyanid (KCN) in 96 %igem Ethanol gelöst und bis zum Einsatz auf Eis gelagert. KCN wurde in Phosphatpuffer (0,05 M, pH 6,5) gelöst.

Tabelle 3.1: Entkoppler und Hemmstoffe für aerobe und anaerobe Abbauxperimente:

Verbindung	Abkürzung	Wirkung	Literatur
<u>Entkoppler:</u>			
2,4-Dinitrophenol	DNP	Aufhebung des Membranpotentials	Hallberg et al., 1996
Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon	CCCP	Aufhebung des Membranpotentials	Hallberg et al., 1996
<u>Hemmstoffe:</u>			
Kaliumcyanid	CN	Hemmung der Cytochrom-c-Oxidase	Lu und Kelly, 1988b
Myxothiazol	MTZ	Blockierung des Cytochrom-bc1-Komplexes	Lu und Kelly, 1988b
2-Heptyl-4-Hydroxyquinolin-N-Oxid	HQNO	Ubichinonanalogon	Hallberg et al., 1996
N-Ethylmaleimid	NEM	bindet an Mercaptogruppen	Hazeu et al., 1988

3.5 Bestimmung der Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase in zellfreien Rohextrakten

Herstellung des Rohextraktes

Die Zellernte einer 18 L Arbeitskultur erfolgte durch Zentrifugation (10.000 g, 20 min., 4°C, Kontron, Centrikon H-401). Die Zellen wurden 2 x mit Waschlösung des Anzuchtmediums gewaschen. Anschließend wurden sie in 10 mL Waschlösung (pH 7) resuspendiert.

Zum Zellaufschluss wurde die Suspension wie folgt weiter behandelt:

1. Ultraschallbehandlung (20 min, High Intensity, 0,5 min Intervall, Bioruptor UCD-130, Toshi Denki Co. Ltd.). Durch mehrmaliges Auswechseln des Eiswasserbades war eine gleichbleibende Kühlung gewährleistet.
2. French-Press-Behandlung, 1 x (137 mPa, kleine Druckzelle, American Instruments Company).
3. Ultraschallbehandlung (20 min)
4. Abtrennen von groben Zelltrümmern durch Zentrifugation (13.000g, 30 min, 4°C, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401)

Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte die Lagerung des Überstandes auf Eis.

Test zur Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase erfolgte, wie von Meulenberg et al. (1993) beschrieben. Ferricyanid wird in diesem Aktivitätstest als Elektronenakzeptor für die Thiosulfat-Dehydrogenase eingesetzt. Der Reaktionsansatz in einer Halbmikroküvette enthielt 1 mL 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (pH 7,0), 0,9 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und unterschiedliche Volumina zellfreien Extraktes. Nach Equilibrierung für 2 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl einer 55 mM Thiosulfatstammlösung gestartet. Die Reduktion von Ferricyanid wurde bei 420 nm mit einem Spektralphotometer (Shimadzu, MPS 2000, Kyoto, Japan, mit Grafikdrucker) als Extinktionsabnahme gegen einen Blindwert ohne Rohextrakt gemessen. Die Quantifizierung der Ferricyanidreduktion erfolgte mittels eines Extinktionskoeffizienten von $0,49 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (experimentell bestimmt).

3.6 Bestimmung des Tetrathionatabbaus in zellfreien Rohextrakten

Herstellung des zellfreien Rohextraktes

Nach Meulenberget al. (1993a) sind hohe Salzkonzentrationen notwendig, um die Aktivität des Tetrathionat abbauenden Enzyms während des Zellaufschlusses zu stabilisieren. Mit *Acidiphilium acidophilum* erhielten die Autoren die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten bei einem Zellaufschluss in 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei pH 3.

Eine 9 L Arbeitskultur wurde vollständig in sterile 500 mL Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (10.000 g, 20 min., 4°C, Kontron, Centrikon H-401). Die Pellets wurden 2 x mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 3, gewaschen, und in 5 mL desselben Puffers resuspendiert.

1. French-Press-Behandlung (2 x, 137 mPa, kleine Druckzelle, American Instrument Company)
2. Zentrifugation bei 18.000 g (10 min, 4°C, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401)
3. Pellet in 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei pH 3 resuspendiert, Überstand bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt.
4. French-Press-Behandlung des resuspendierten Pellets (2 x, 137 mPa, kleine Druckzelle, American Instrument Company)
5. Wiederholung von Schritt 2
6. Vereinigung der Überstände aus Schritten 2 und 6
7. Zentrifugation bei 48.000 g (30 min, 4°C, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401)
8. Pellet verworfen, Überstand bei 48.000 g zentrifugiert (30 min, 4°C, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401)
9. Der Überstand wurde für den Enzymaktivitätstest verwendet.

Bestimmung des Tetrathionatabbaus

Der Tetrathionatabbau durch Rohextrakte wurde in 20 mL einer 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Lösung mit pH 3 bei 30°C unter intensivem Rühren bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug 0,65 mg/mL. Nach 15 min Aequilibrierung wurde der Versuch durch Zugabe von 2 mL einer 10 mM Tetrathionatstammlösung gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden Proben für die Tetrathionatbestimmung (Kap. 3.9.2) entnommen und sofort mit Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Kontrolle wurde mit einem Reaktionsansatz mit autoklaviertem Rohextrakt identisch verfahren. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 150 min.

3.7 Thiosulfat Dehydrogenase Aktivität und Tetrathionatabbau durch Fraktionen des periplasmatischen Raums und des Cytoplasmas

Herstellung der Cytoplasma- und Periplasmafraktionen

Um die Lokalisation der Enzyme des Thiosulfatabbaus genauer zu untersuchen, wurde das Periplasma der Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 vom Cytoplasma (+ Membran) abgetrennt (Lu und Kelly, 1988a, modifiziert). Hierfür wurde eine 9 L Arbeitskultur vollständig geerntet (10.000 g, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401), das Pellet 2 mal in Waschlösung gewaschen und anschließend in 5 mL folgender Lösung resuspendiert:

0,5 M Sacharose

0,05 M K-Phosphat pH 7

0,05 M Tris-HCL (pH 7)

5 mM EDTA

Nach Zugabe von 1 mL einer 1,5 % LysozymbLösung wurde die Zellsuspension bei 30°C inkubiert. Die Auflösung der“Äußerer“ Membran wurde in regelmäßigen Abständen im Lichtmikroskop (Phasenkontrast, 1000 fache Vergrößerung) kontrolliert. Nach 1,75 h waren überwiegend Sphaeroblasten zu erkennen.

Sphaeroblasten und vollständige Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4°C und 10.000 g (15 min, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401) entfernt. Der Überstand wurde als Inhalt des periplasmatischen Raums eingefroren.

Das Pellet wurde in 0,1 M K-PO₄-Puffer (pH 7) aufgenommen und 5 min inkubiert. Dieser als osmotischer Schock wirkende Schritt führte zur Lysis der Sphaeroblasten. Verbleibende vollständige Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4°C (15 min, 10.000 g, Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401) abgetrennt. Der Überstand wurde als Inhalt des Cytoplasmas + Membran eingefroren.

Mit den Periplasma- und Cytoplasmafraktionen wurde die Aktivität der Thiosulfatdehydrogenase bestimmt sowie der Abbau von Tetrathionat untersucht.

Bestimmung des Tetrathionatabbaus durch Fraktionen des periplasmatischen Raums und des Cytoplasmas (+ Membran):

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 mL Proteinfraction

1 mL 0,05M Tris-HCl (pH 7)

Äquilibration für 10 min bei 30°C

Durch Zugabe von 0,2 mL einer 20 mM Tetrathionatstammlösung wurde der Versuch gestartet. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 15, 30, 60 min wurden 10 µl Probe genommen und sofort eingefroren (-25°C). Die Bestimmung des Tetrathionatgehalts erfolgte wie unter 3.9.2 beschrieben.

3.8 Wachstumsexperimente unter anaeroben Bedingungen

Zur Überprüfung, ob *Thiomonas intermedia* K12 unter anaeroben Bedingungen mit Tetrathionat wächst, wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden folgende Parameter bestimmt: pH-Wert, Konzentrationen von Schwefelverbindungen (Thiosulfat, Polythionate, Elementarschwefel, Sulfat), Gesamtzellzahlen.

Die Versuche wurden in mit 45 mL Nährmedium befüllten (Kap. 3.3.5.1) 100 mL Serumflaschen durchgeführt.

Die Versuchsansätze wurden so beimpft, dass die Zellzahl zu Versuchsbeginn ca. 1×10^6 /mL betrug. Die Zellen stammten entweder aus aerob angezogenen Zwischenkulturen oder aus anaerob gehaltenen Kulturen. Im ersten Fall wurden die Zellen bei 10.000 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge Kontron Centrikon 401), 2 x mit *Thiomonas intermedia*-Waschlösung gewaschen und in 10 mL Lösung resuspendiert. Die Gesamtzellzahl dieser Zellsuspension wurde mikroskopisch bestimmt und das Nährmedium entsprechend beimpft.

Im Falle von anaerob kultivierten Vorkulturen wurden die Wachstumsexperimente direkt aus diesen Kulturen mit einem Inokulum von 20 % beimpft.

Tetrathionat wurde in Form einer Stammlösung hinzugegeben.

In regelmäßigen Abständen wurden Proben (2 mL) zur Bestimmung der oben benannten Parameter entnommen.

Die Kulturen wurden 3 Wochen bei 28°C auf einem Rundschtüttler im Dunkeln inkubiert.

Um den Einfluss von organischen Verbindungen auf das anaerobe Wachstum von *Thiomonas intermedia* K12 mit Tetrathionat zu überprüfen, wurden Wachstumsexperimente unter Zusatz von Hefe, Laktat, Glucose, Acetat und Pyruvat in wechselnden Konzentrationen durchgeführt. Ansonsten wurde verfahren, wie für die Experimente ohne Zusatz von organischen Verbindungen beschrieben.

3.9 Chemische Analysen

3.9.1 Sulfat

Der Sulfatgehalt wurde mittels Ionenchromatographie bestimmt. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung der Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Ladung in einer mit einem Anionenaustauscherharz gefüllten Säule. Die Detektion der Ionen erfolgte durch die Änderung der Leitfähigkeit des Eluenten. Zur Erhöhung der Messempfindlichkeit wurde die Hintergrundleitfähigkeit des Eluenten mit Hilfe eines Suppressors auf 14 μ S herabgesetzt. Als Eluent diente eine Lösung aus 1,8 mM Natriumcarbonat und 1,7 mM Natriumhydrogencarbonat in deionisiertem Wasser. Die Durchflussrate betrug 2 mL/min. Der Eichbereich lag zwischen 10 und 1000 μ M Sulfat. Das verwendete Chromatographiesystem DX 500 der Firma Dionex bestand aus folgenden Komponenten: Probenaufgeber AS3500, Gradientenpumpe GP40, Vorsäule AG9-SC/4 mm, Suppressor ASRS-1, Leitfähigkeitsdetektor CD20, Software PeakNet Version 4.3, Computer

3.9.2 Thiosulfat und Polythionate

Die Bestimmung von Thiosulfat und Polythionaten wurde mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) nach Steudel et al. (1987) durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels Ionenpaarchromatographie. Bei dieser Form der Flüssigkeitschromatographie enthält der Eluent ein Gegenion zur entgegengesetzt geladenen ionischen Probenkomponente. Das verwendete Gegenion war Tetrabutylammonium. Bei dem Eluenten handelte es sich um ein Wasser/Acetonitril-Gemisch (75/25, v/v) mit Zusatz von 1 mM Dinatriumcarbonat und 2 mM Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat (FLUKA). Der pH lag bei 7,7. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Diodenarraydetektors. Dieser Detektor erlaubt im Gegensatz zum herkömmlichen UV-Detektor eine Messung über einen

Wellenlängenbereich und nicht nur bei einer bestimmten Wellenlänge. Bei 215 nm befanden sich die Absorptionsmaxima von Thiosulfat, Tetrathionat und Pentathionat, bei 195 nm das Absorptionsmaximum von Trithionat. Die Identifizierung der Chromatogramme erfolgte anhand der Retentionszeiten und des Vergleichs der Wellenlängenspektren der jeweiligen Probenkomponente mit denen von Standards. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte anhand der Berechnung der Peak-Fläche. Die Durchflussrate betrug 1 mL/min. Der Eich- und Messbereich lagen zwischen 0 und 1000 μM . Als Eichstandards dienten frisch angesetzte, wässrige Lösungen von Natrium- und Kaliumsalzen der einzelnen Verbindungen. Tri- und Pentathionat wurden von Prof. Steudel (TU Berlin) nach Feher (1975) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Reines Hexathionat stand nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um Standards herzustellen. Die Identifizierung der Hexathionatpeaks erfolgte über ein hinterlegtes Absorptionsspektrum und die Quantifizierung erfolgte aus den Peakflächen mit dem Absorptionskoeffizienten bei 215 nm für Pentathionat.

Das verwendete Chromatographiesystem der Firma Kontron Instruments bestand aus folgenden Komponenten: Probenaufgeber 465, Gradientenformer 425, Pumpe 422, Vorsäule, Trennsäule GPC 150/4,6 mm Polymer Standard Service, Software 450-MT2/DAD, Version 1.10, Computer.

3.9.3 Elementarschwefel

Elementarschwefel ist in Wasser nahezu unlöslich. Kleinere Aggregate werden in Form von Schwefelglobuli in wässriger Phase gehalten, die sich jedoch durch Zentrifugation nicht abtrennen lassen (Steudel et al., 1981). Mit n-Hexan ist es möglich, Elementarschwefel direkt aus der wässrigen Phase zu extrahieren.

Probenvorbereitung:

Es fanden während der Kurzzeit- und Wachstumsexperimente genommene und bei -18°C eingefrorene Proben Verwendung. Für die Bestimmung von in Lösung befindlichem Elementarschwefel wurden zu 800 μL der Probenlösung 600 μL n-Hexan gegeben. Durch intensives Rühren (3 x 1 min.) des Reaktionsgemisches auf einem Whirlmix (Ikamag) wurde sichergestellt, dass beide Lösungen intensiv gemischt wurden. Anschließend wurden beide Phasen durch Zentrifugation bei 10.000 g voneinander getrennt. Das im Überstand befindliche n-Hexan wurde abgehoben, in Gefäße für den HPLC-Probengeber überführt und sofort gemessen.

Analyse:

Die Bestimmung des Elementarschwefels (S_8 -Schwefel) wurde mittels Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase Chromatography) nach Steudel et. al. (1981) durchgeführt. Bei dieser Form der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Als stationäre Phase dient Octadecylsilan (ODS), als mobile Phase Methanol. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Diodenarraydetektors bei 254 nm. Bei dieser Wellenlänge weist das Wellenlängenspektrum von Schwefel ein charakteristisches Minimum auf. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeit und des Vergleichs mit dem Wellenlängenspektrum für Schwefel. Die Durchflussrate des Eluenten betrug 1 mL/min. Eich- und Messbereich lagen zwischen 10 und 1000 μ M Schwefel. Die Konzentration wurde aus der Peakfläche errechnet. Als Eichstandard dienten Lösungen von Elementarschwefel in n-Hexan. Das verwendete Chromatographiesystem der Firma Kontron entsprach dem bereits beschriebenen (3.9.2) mit der Abweichung, dass eine Vorsäule fehlte und eine Trennsäule des Typs Hypersil-ODS-5 μ m 125/4,6 mm zum Einsatz kam.

3.10 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt. Das Zählen erfolgte im Phasenkontrast bei 400facher Vergrößerung mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

3.11 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach Bradford (1976), modifiziert nach Spector (1978). Die zentrifugierten und gewaschenen Zellen (siehe Kap.3.4.2) wurden in 500 µl 0,9 % NaCl/0,3 N NaOH (1:1) Lösung resuspendiert und 10 min bei 95°C inkubiert. Um Zellbruchstücke abzutrennen, wurde die Lösung 10 min bei 10.000 g (Heraeus Tischzentrifuge) zentrifugiert. 0,1 mL des Überstandes wurden zu 1 mL Bradfordreagenz gegeben und 10 min inkubiert. Der Messbereich lag zwischen 10 und 100 µg Protein. Die photometrische Messung (LKB) erfolgte bei 595 nm.

BRADFORD-Reagenz:

Serva-Blau G	40 mg
Ethanol (96 %)	40 mL
ortho-Phosphorsäure (85 %)	100 mL
Aqua deion.	ad 1000 mL

3.12 Bestimmung des pH

Der pH wurde mit einem pH-Meter pH 522 (WTW) gemessen. Es wurden Elektroden der Firma Metrohm verwendet.

4 Ergebnisse

Diese Arbeit baut auf den Ergebnissen meiner Diplomarbeit auf (Wentzien, 1991). In dieser konnte ich mit Hilfe von Mikrokalorimetrie und on-line Aufzeichnung des pH-Wertes in Kombination mit Schwefelanalytik charakteristische Muster der Wärmefreisetzung sowie der Produktion von Tetrathionat, Trithionat und Sulfat während des Wachstums von *Thiomonas intermedia* K12 mit Thiosulfat darstellen. Bei diesen Versuchen fiel der pH-Wert zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von 6,5 schwach ab und stieg intermediär erneut an, um mit Erschöpfung des Substrats steil auf ca. pH 2 abzufallen.

Beim Wachstum mit Tetrathionat als Substrat kam es zu einer kontinuierlichen Ansäuerung des Kulturmediums, die bei einem pH-Wert unter 5 zu einem Einstellen des Wachstums führte. Unter pH-konstanten Bedingungen (pH 6,5) produzierte *Thiomonas intermedia* K12 während des Wachstums mit Tetrathionat als Substrat Thiosulfat und Trithionat als Zwischenverbindungen sowie Sulfat als Endprodukt (Wentzien et al. 1994).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden für diese Arbeit Abbauxperimente in einem Zeitrahmen von 15 bis 180 min mit Thiosulfat, Tetrathionat und Trithionat durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden dargestellt sind. Aus den Ergebnissen sollte auf Abbauwege und beteiligte Enzyme geschlossen werden.

4.1 Aerobe Experimente mit Zellsuspensionen von *Thiomonas intermedia* K12

4.1.1 Abhängigkeit des Thiosulfatabbaus vom pH

In Abb. 4.1 ist der Thiosulfatabbau bei unterschiedlichen Start-pH-Werten als prozentualer Anteil am optimalen Abbau bei pH 6,2 dargestellt.

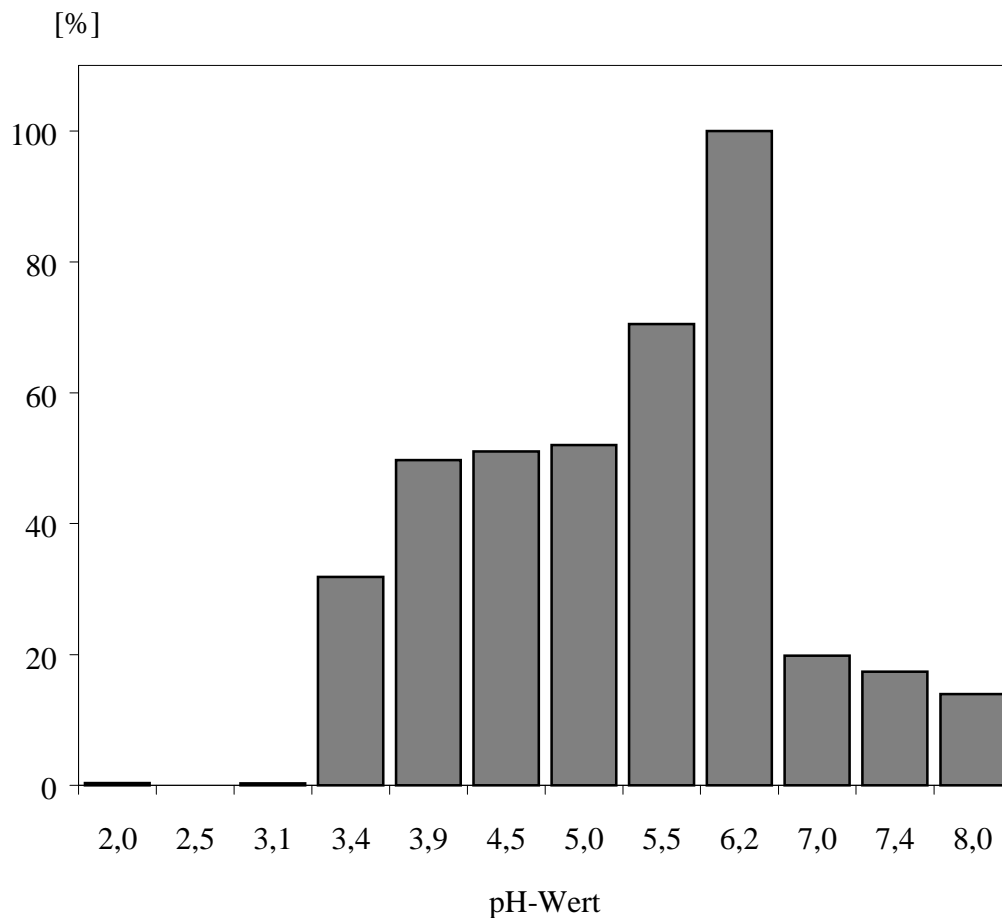


Abb.4.1: pH-Optimum des Thiosulfatabbaus (1 mM) für Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. 30 °C, 0,05 M Phosphatpuffer, 0,1 mg Protein/mL (Mittelwerte aus 3 Experimenten, Fehler: $\pm 6\%$, jeweils um den Wert der chemischen Kontrolle reduziert)

Das pH-Optimum für die Thiosulfatoxidation liegt im schwach sauren Bereich um pH 6,2. Bei niedrigen Werten unter pH 3 dominiert die rein chemische Umsetzung von Thiosulfat. Oberhalb von pH 3 überwiegt der biologische Abbau. Über pH 7 ist der Abbau deutlich reduziert. Die Werte lagen nur noch bei 20 % des Maximalwerts.

4.1.2 Abhängigkeit des Tetrathionatabbaus vom pH

In Abb. 4.2 ist der Tetrathionatabbau bei verschiedenen pH-Werten als prozentualer Anteil am optimalen Abbau bei pH 7 dargestellt.

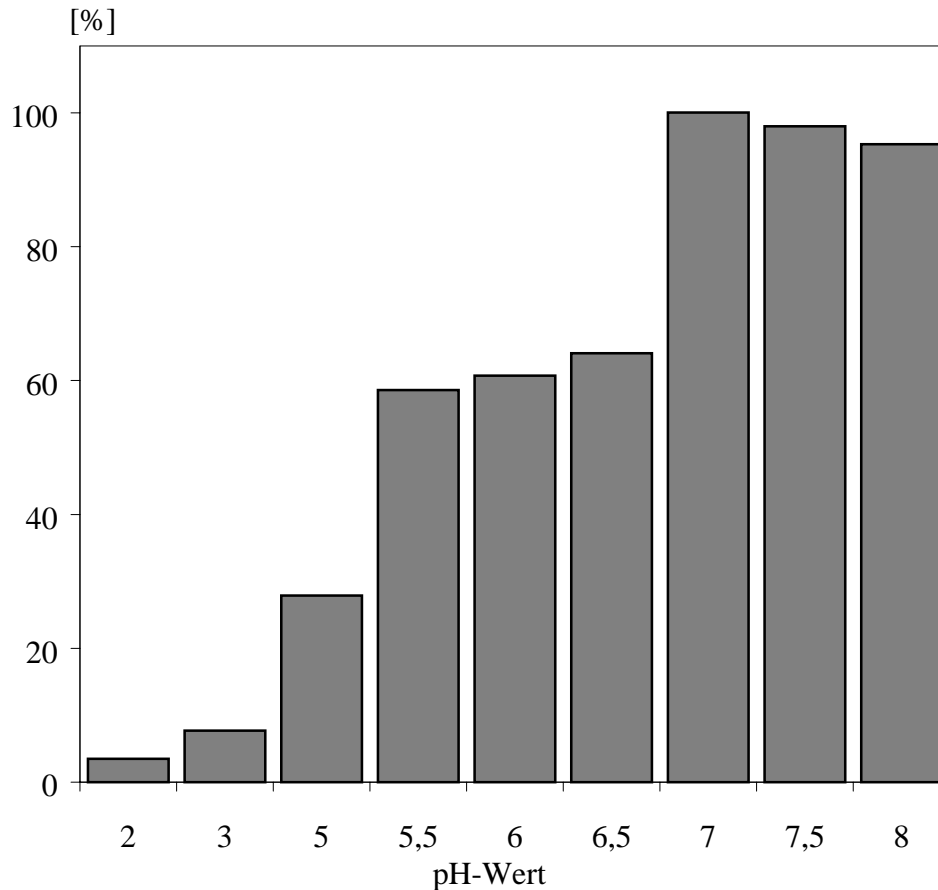


Abb. 4.2: pH-Optimum des Tetrathionatabbaus (1 mM) für Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. 30 °C, 0,05 M Phosphatpuffer, 0,1 mg Protein/mL (Mittelwerte aus 3 Experimenten, ± 9 %, jeweils um den Wert der chemischen Kontrolle reduziert).

Das Optimum des Tetrathionatabbaus liegt im neutralen bis schwach alkalischen Bereich um pH 7. Bei stark saurem pH (pH 2 und pH 3) liegen die Aktivitäten bei unter 10 % des Maximalwertes. Über pH 5 steigen die Aktivitäten deutlich an. Bei pH 8 sind noch 90 % des Maximalwertes messbar. Um den Abbau sowohl von Thiosulfat als auch von Tetrathionat simultan untersuchen zu können, wurden alle weiteren Experimente bei pH 6,5 durchgeführt, da der Abbau beider Verbindungen bei diesem pH-Wert ausreichend gewährleistet ist (>60 % und 90 % der jeweiligen Optima).

4.1.3 Thiosulfatabbau bei pH 6,5

Der Abbau von Thiosulfat sowie die Entstehung anderer Schwefelverbindungen wurden im Experiment über 15 min verfolgt. Die Ergebnisse eines ausgewählten Experimentes sind in Abb. 4.3 dargestellt.

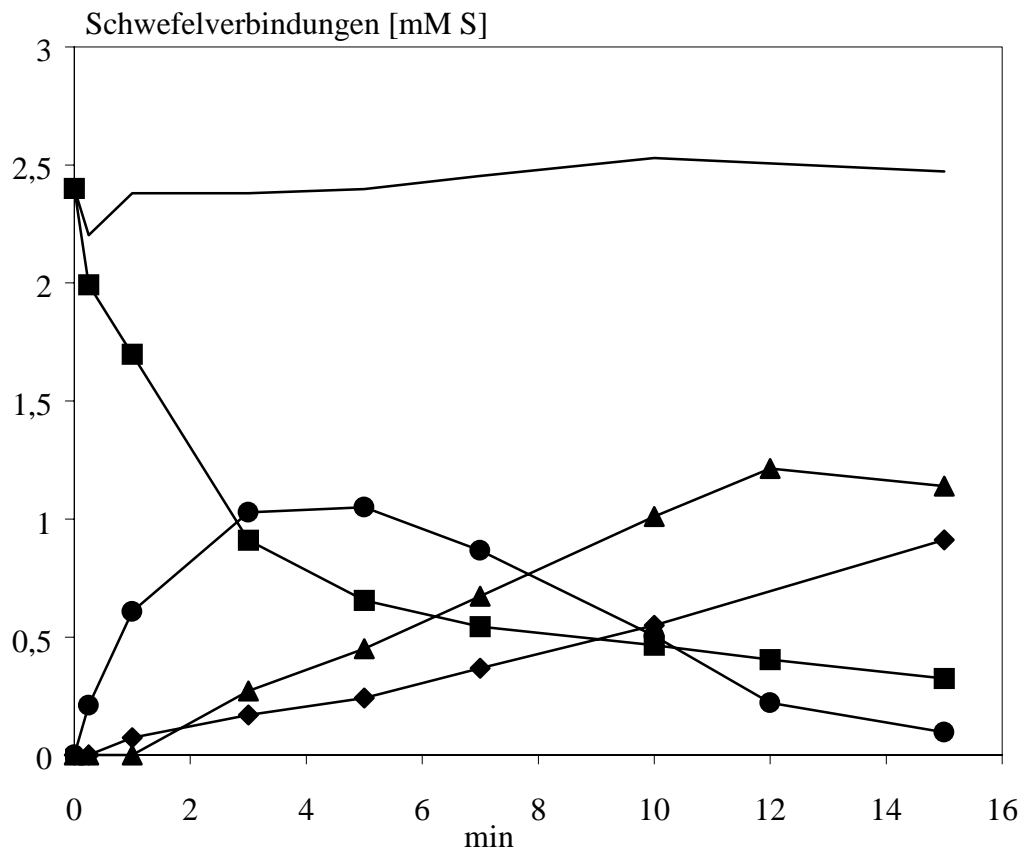


Abb. 4.3: Thiosulfatabbau durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen / mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆), Gesamtschwefel (—); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Innerhalb der ersten 3 min wird Thiosulfat schnell abgebaut und findet sich zum größten Teil als Tetrathionat wieder. Gleichzeitig werden geringe Mengen Sulfat und Trithionat gebildet. Während letztere im weiteren Verlauf gleichförmig akkumulieren (1,1 mM S Trithionat und 0,9 mM S Sulfat nach 15 min), folgt der anfänglichen Tetrathionatbildung (1 mM S nach 3 min) eine Abbauphase (0,1 mM S nach 15 min). Elementarschwefel und höhere Polythionate

wie Pentathionat und Hexathionat konnten bei diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Wie in den Wachstumsexperimenten mit Thiosulfat und Tetrathionat (Wentzien, 1991; Wentzien et al., 1994) stellt sich im Reaktionsansatz ein Gemisch aus Trithionat, Tetrathionat, Sulfat und Thiosulfat ein. Nur in den ersten 3 min ist eine dominante Reaktion, die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat, zu erkennen. In den darauffolgenden Minuten schwächt sich der Abbau von Thiosulfat deutlich ab und Trithionat und Sulfat werden nachweisbar. Die Tetrathionatkonzentration beginnt ab der 5. min wieder abzunehmen. Auch Trithionat wird bei verlängerter Inkubation (ca. 120 min, nicht dargestellt) vollständig abgebaut. Offensichtlich ist für Trithionat die geringste Abbaugeschwindigkeit gegeben. Dieses deutet daraufhin, dass Thiosulfat, Tetrathionat und Trithionat ineinander umgewandelt werden. Sulfat ist hiervon ausgenommen und akkumuliert kontinuierlich.

4.1.4 Tetrathionatabbau bei pH 6,5

Der Abbau von Tetrathionat sowie die Entstehung anderer Schwefelverbindungen bei pH 6,5 wurden über 15 min verfolgt. Die Ergebnisse eines ausgewählten Experimentes sind in Abb. 4.4 dargestellt.

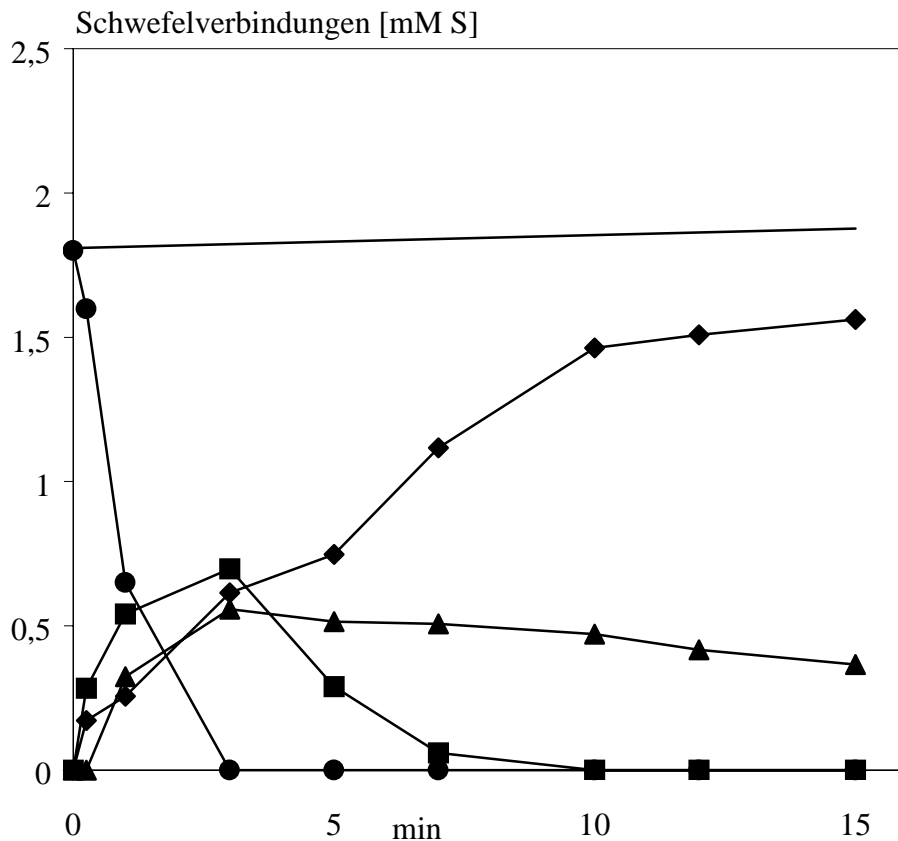


Abb 4.4: Tetrathionatabbau durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen / mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆), Gesamtschwefel (—); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Tetrathionat (1,8 mM S) wird innerhalb von 3 min vollständig abgebaut. Dabei werden Thiosulfat (0,7 mM S), Trithionat (0,56 mM S) und Sulfat (0,6 mM S) gebildet. Nachfolgend wird Thiosulfat vollständig abgebaut. Die Trithionatkonzentration nimmt langsam ab (vollständige Erschöpfung nach 120 min, nicht dargestellt), während Sulfat weiterhin

akkumuliert. Elementarschwefel und höhere Polythionate wie Pentathionat und Hexathionat wurden bei diesen Experimenten nicht nachgewiesen.

Die auftretenden Schwefelverbindungen sind identisch mit denen, die bei Versuchen zum Wachstum mit Thiosulfat und Tetrathionat mit *Thiomonas intermedia* K12 detektiert wurden (Wentzien, 1991; Wentzien et al., 1994).

Im Folgenden sollten die Abbauewege mit Hilfe von Hemmstoffen und Entkopplern unterbrochen werden. Aus den Ergebnissen dieser Versuche sollte abgeleitet werden, auf welchem Wege und mit welchen Komponenten Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 Thiosulfat und Tetrathionat metabolisieren.

4.1.5 Einfluss von NEM auf den Abbau von Thiosulfat

Bei N-Ethylmaleimid (NEM) handelt es sich um einen an Sulfhydrylgruppen (HS-) bindenden Hemmstoff. Dabei kommt es zur Ausbildung von Schwefelbrückenbindungen, die irreversibel sind. Die Mercaptogruppe ist als Bestandteil von Aminosäuren (z.B. Cystein, Methionin) häufig in aktiven Zentren von Enzymen zu finden und damit bei der Substratbindung und -positionierung von Bedeutung. Hemmung durch NEM deutet auf eine Beteiligung von Thiol-Gruppen an der Substratumsetzung hin.

In Abbildung 4.5 ist der Abbau von Thiosulfat in Gegenwart unterschiedlicher NEM-Konzentrationen (10, 100, 1000 μM) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

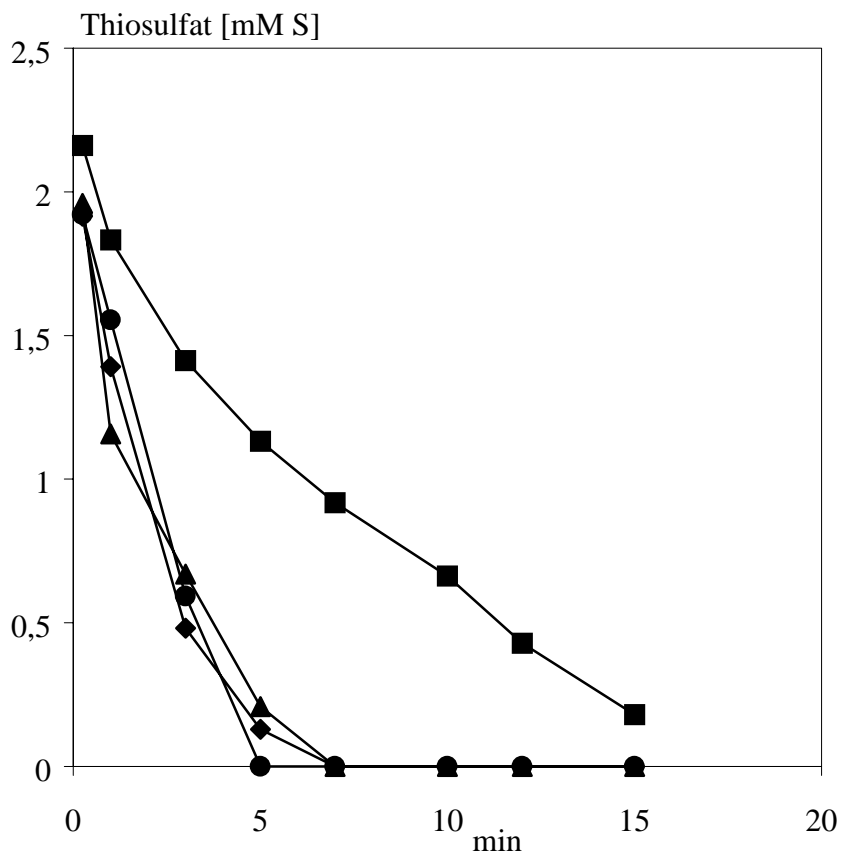


Abb. 4.5: Abbau von Thiosulfat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 10 µM (◆), 100 µM (▲) und 1000 µM (●) NEM im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL); Mittelwerte aus 3 Experimenten ($\pm 7\%$); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Die Inkubation von Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 mit NEM führt zu einer Beschleunigung des Abbaus von Thiosulfat. In Abb. 4.6 sind die beim Thiosulfatabbau in Gegenwart von 1mM NEM entstehenden Schwefelverbindungen in einem ausgewählten Experiment dargestellt.

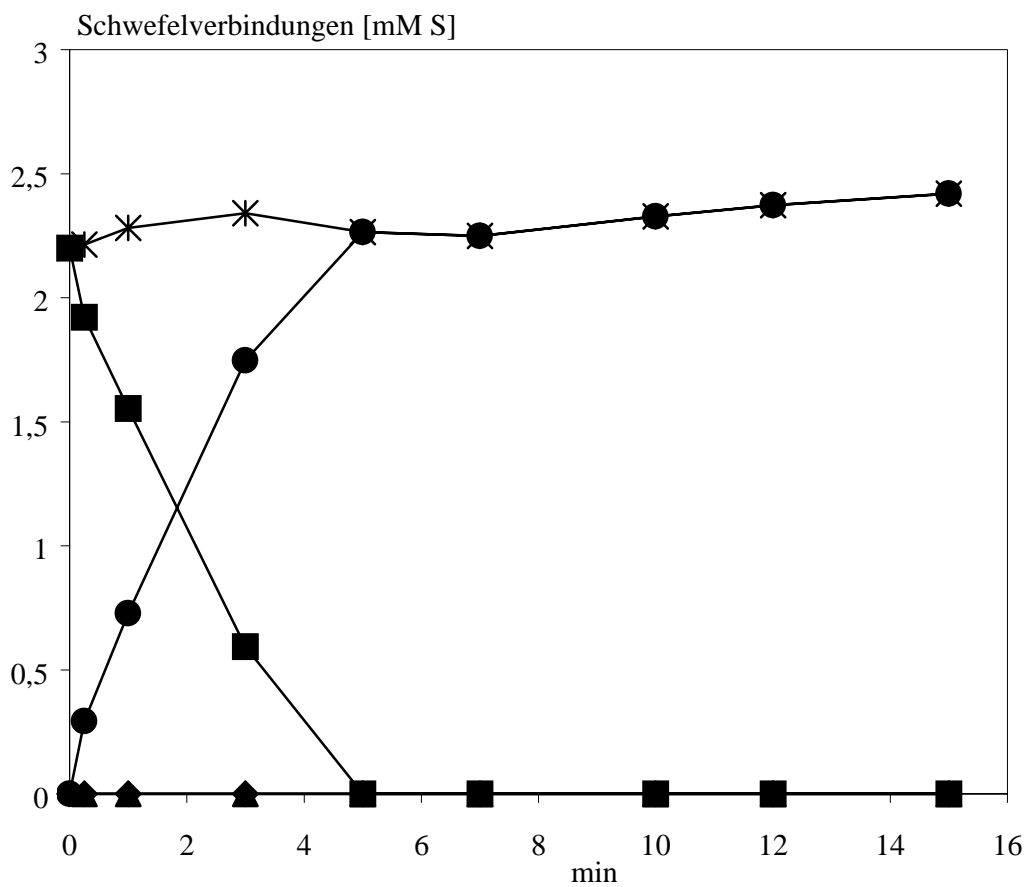


Abb. 4.6: Abbau von Thiosulfat in Gegenwart von 1mM NEM durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen /mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆) Gesamtschwefel (*); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

In Gegenwart von 1 mM NEM wurde Thiosulfat vollständig zu Tetrathionat oxidiert. Weitere Abbauprodukte wie Trithionat und Sulfat waren nicht nachweisbar. Tetrathionat ist somit das primäre Zwischenprodukt des Thiosulfatabbaus. Anscheinend wird die weitere Oxidation von Tetrathionat durch NEM blockiert. Dieses wurde in Abbauversuchen mit Tetrathionat als Substrat überprüft.

4.1.6 Einfluss von NEM auf den Abbau von Tetrathionat

In Abb. 4.7 ist der Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von verschiedenen NEM-Konzentrationen dargestellt.

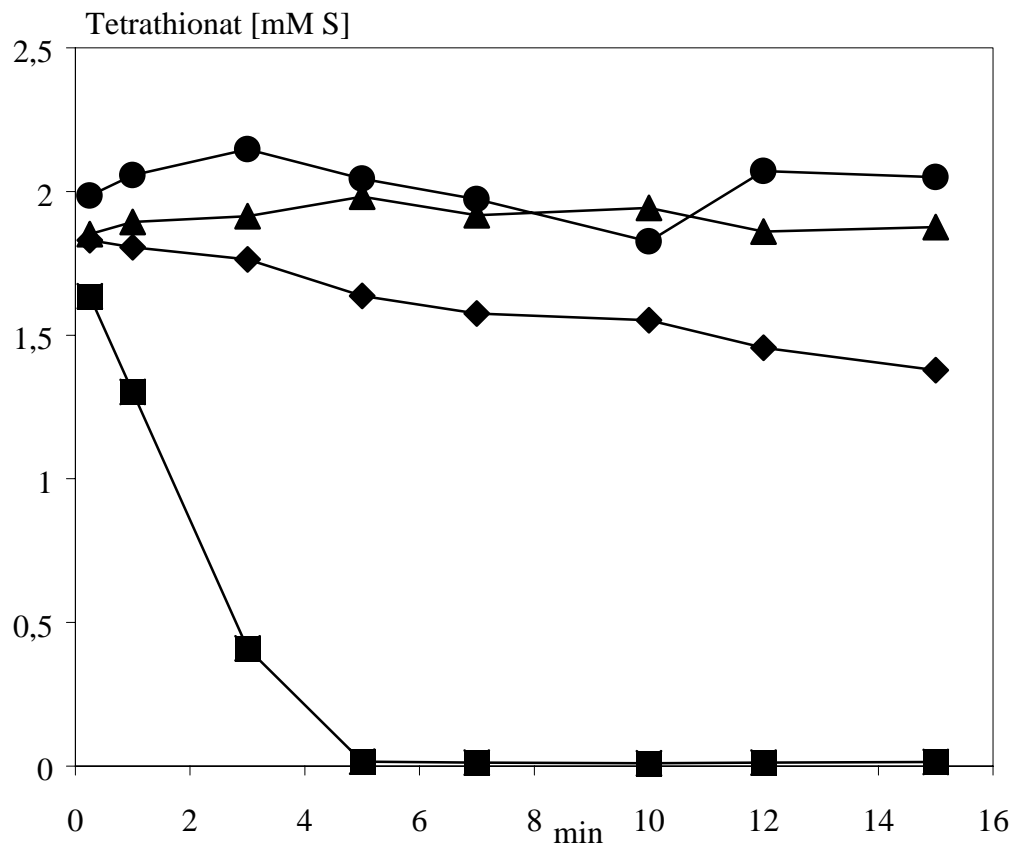


Abb. 4.7: Abbau von Tetrathionat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 10 µM (◆), 100 µM (▲) und 1000 µM (●) NEM im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/ mL), Mittelwerte aus 3 Experimenten (Fehler ± 5 %). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

NEM hemmt schon in geringen Konzentrationen den Tetrathionatabbau. In Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ NEM waren nur geringe Mengen an Trithionat und Sulfat detektierbar (dargestellt in Abb. 4.8), während bei einem Zusatz von 100 und $1000 \mu\text{M}$ NEM kein Tetrathionat abgebaut wurde. Somit wurden die Ergebnisse des Abbaus von Thiosulfat in Gegenwart von NEM durch die Ergebnisse der Experimente mit Tetrathionat als Substrat bestätigt. NEM unterbricht den Thiosulfatabbau auf der Stufe des Tetrathionats und verhindert damit die Bildung weiterer Schwefelverbindungen wie Trithionat und Sulfat. Damit fehlt das Substrat für die Hydrolyse von Trithionat zu Thiosulfat und Sulfat, und Thiosulfat wird folglich nicht mehr aus Tetrathionat gebildet. Die fehlende „Neubildung“ von Thiosulfat erklärt, warum NEM den Thiosulfatabbau im Verhältnis zur Kontrolle beschleunigt (Abb. 4.6). Im Endergebnis ist der Thiosulfatpool in Gegenwart von NEM deutlich schneller erschöpft als ohne NEM-Gabe.

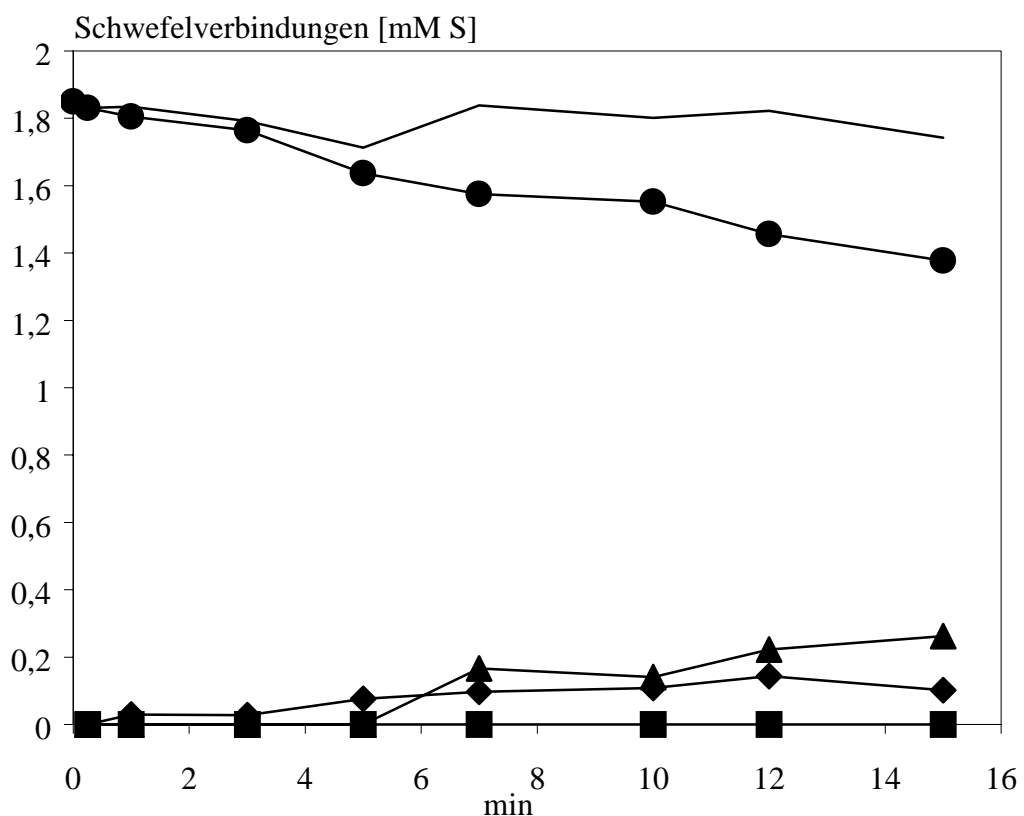


Abb 4.8: Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ NEM durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/ mL). Dargestellt ist ein ausgewähltes Experiment. Tetrathionat (●), Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Sulfat (◆) Gesamtschwefel (—); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

4.1.7 Einfluss von DNP auf den Abbau von Thiosulfat

Als Entkoppler bezeichnet man Substanzen, die eine Trennung der oxidativen Phosphorylierung von der ATP-Gewinnung bewirken. Dieses kann z.B. durch den Einsatz von Protonophoren erreicht werden. Protonophoren gelangen in protonierter Form über die Cytoplasmamembran in das Cytoplasma, wo sie dann dissoziieren. Dieses führt zur Aufhebung des H^+ -Gradienten zwischen Membraninnen- und -außenseite und damit zur Auflösung des Membranpotentials, der Grundlage der ATP-Gewinnung durch die ATPase. Damit hemmen Entkoppler solche Prozesse, die eine energetisierte Membran oder ATP benötigen. Die Auflösung des Membranpotentials durch die Entkoppler führt zu einer verstärkten Atmung mit dem Ziel, das aufgelöste Membranpotential wieder aufzubauen. Für diese Versuche wurden zwei verschiedene Protonophoren eingesetzt: 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Carbonyl-cyanid-m-chlorophenyl-hydrazon (CCCP) (Kap. 4.1.7 und 4.1.8). In Abb. 4.9 ist der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von DNP auf den Abbau von Thiosulfat dargestellt.

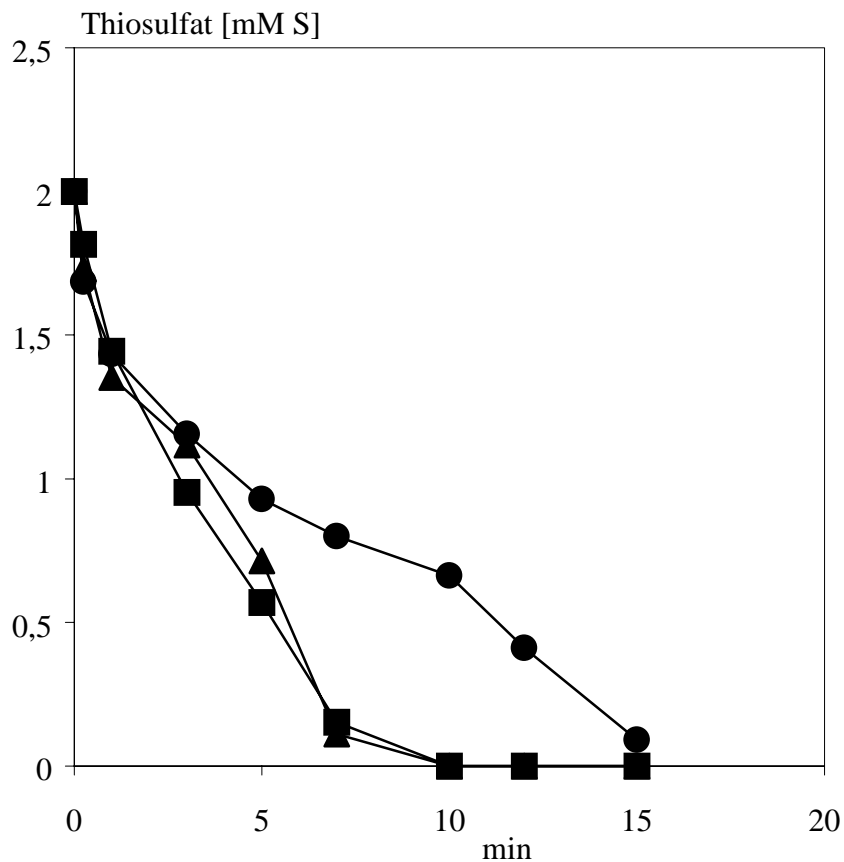


Abb. 4.9: Abbau von Thiosulfat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 200 µM (▲) und 1 mM (●) DNP im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/ mL). Mittelwerte aus 3 Experimenten (Fehler ± 5 %). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Im Zeitraum 0 bis 3 min ist kein Unterschied zwischen Kontrolle und Ansätzen mit DNP zu erkennen. Legt man die Abbauraten zwischen 1 und 5 min zugrunde, so ergibt sich eine Reduzierung der Abbauraten um 40 % in Anwesenheit von 1 mM DNP.

4.1.8 Einfluss von DNP auf den Abbau von Tetrathionat

In Abb. 4.10 ist der Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von 100, 200 μM und 1 mM DNP dargestellt.

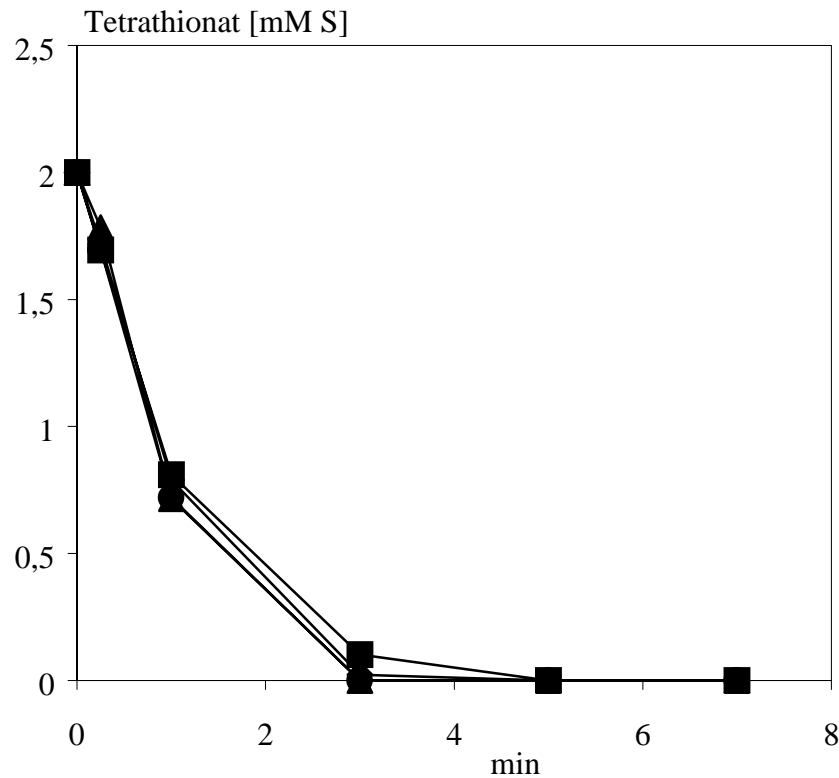


Abb. 4.10: Abbau von Tetrathionat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 100 (◆), 200 μM (▲) und 1 mM (●) DNP im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Mittelwerte aus 3 Experimenten (Fehler $\pm 5\%$). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

DNP hat keinen signifikanten Einfluss auf den Abbau von Tetrathionat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12.

4.1.9 Einfluss von CCCP auf den Abbau von Thiosulfat

Beim Entkoppler CCCP handelt es sich um einen weiteren Protonophoren. Um die Ergebnisse mit DNP zu überprüfen, wurde auch sein Einfluss auf den Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat bestimmt. In Abb. 4.11 ist der Thiosulfatabbau in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an CCCP dargestellt.

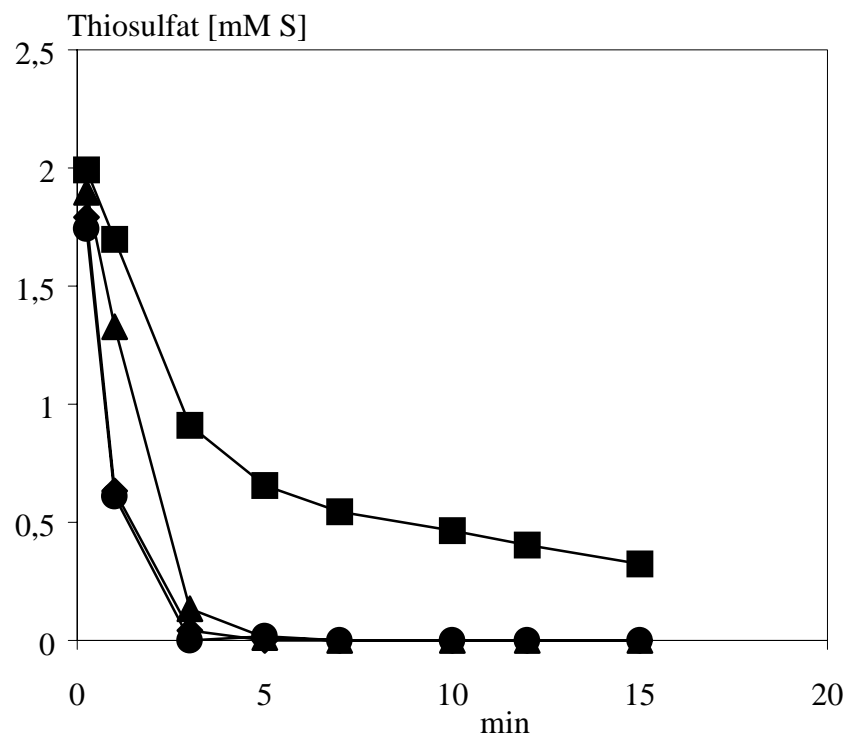


Abb. 4.11: Abbau von Thiosulfat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 5 (▲), 50 μM (◆) und 200 μM (●) CCCP im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Mittelwerte aus 3 Experimenten (Fehler ± 5 %). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Der Abbau von Thiosulfat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 wird durch CCCP deutlich beschleunigt. Die Geschwindigkeit des Thiosulfatabbaus steigt in Gegenwart von 50 und 200 μM CCCP auf 140 % der Abbaugeschwindigkeit der Kontrolle im Zeitraum 0-3 min. In Abbildung 4.12 sind die im Versuch mit 200 μM CCCP entstehenden Schwefelverbindungen dargestellt (ausgewähltes Experiment).

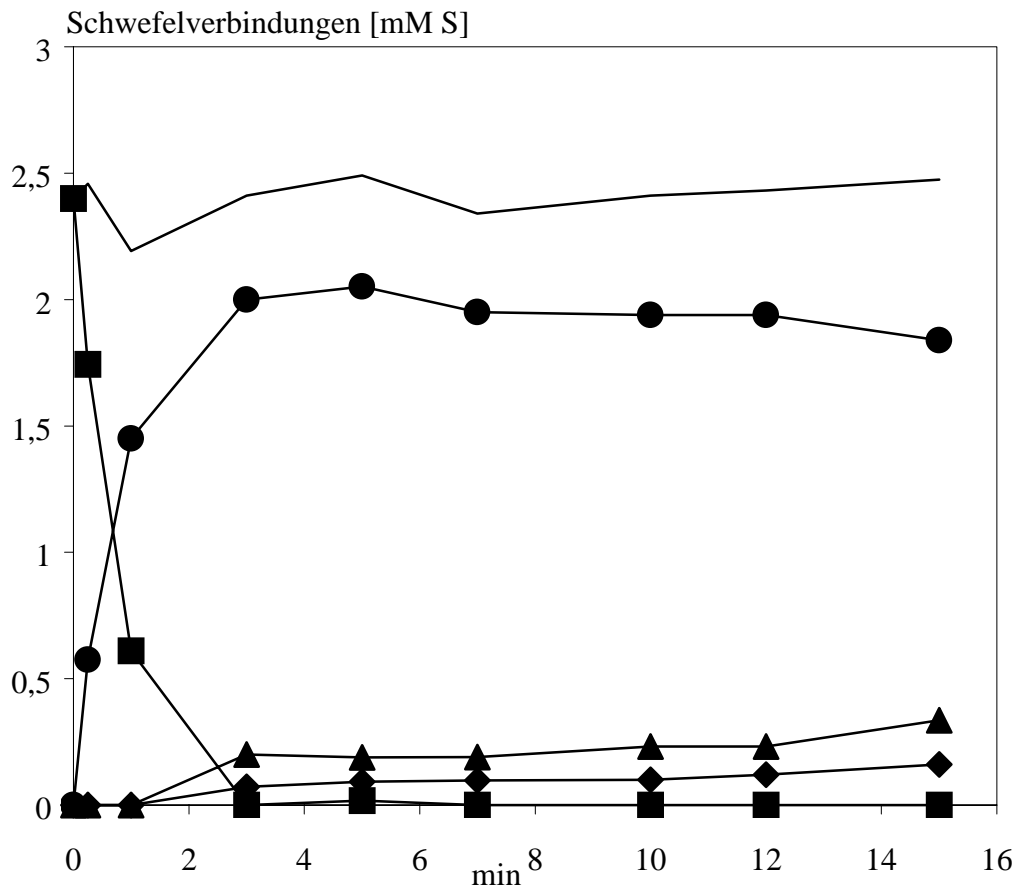


Abb. 4.12: Abbau von Thiosulfat in Gegenwart von CCCP (200 μM) durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Innerhalb von 3 min wurde Thiosulfat vollständig abgebaut. Als Hauptprodukt entstand Tetrathionat (2 mM S nach 3 min). Gleichzeitig wurden Trithionat und Sulfat in Vergleich zu den Kontrollexperimenten in deutlich reduzierten Konzentrationen gebildet (siehe Abb. 4.3). Im weiteren Verlauf wurde Tetrathionat langsam abgebaut und Trithionat und Sulfat gebildet.

4.1.10 Einfluss von CCCP auf den Abbau von Tetrathionat

In Abb. 4.13 ist der Einfluss von CCCP auf den Abbau von Tetrathionat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 dargestellt.

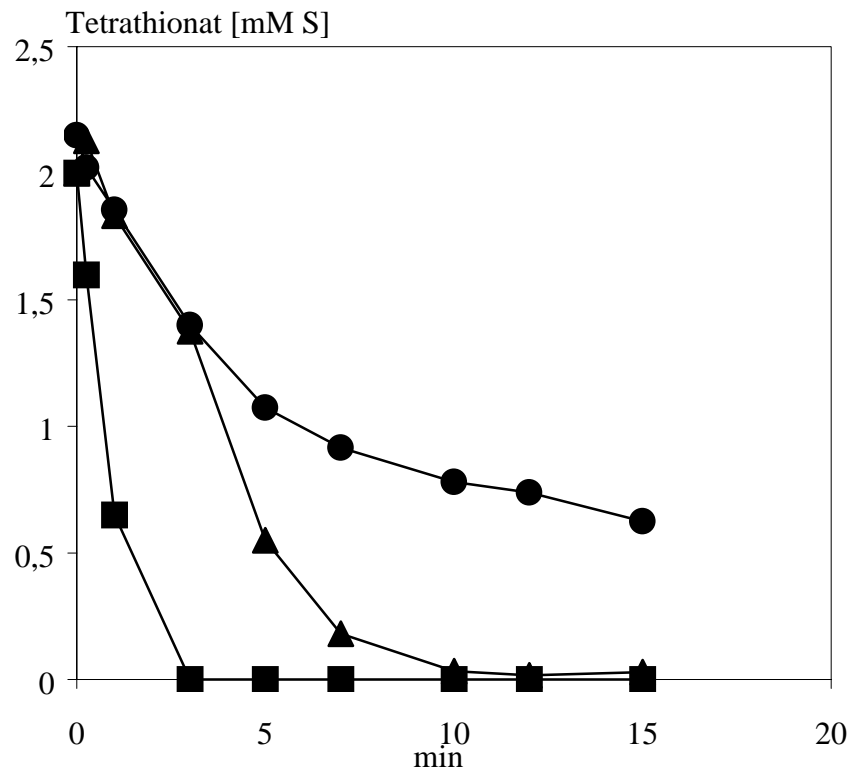


Abb.4.13: Abbau von Tetrathionat durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 in Gegenwart von 100 (▲) und 200 µM (●) CCCP im Vergleich zur Kontrolle (■), (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen /ml). Mittelwerte aus drei Experimenten (Fehler ± 5 %). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

In Gegenwart von CCCP wird Tetrathionat durch *Thiomonas intermedia* K12 verlangsamt abgebaut. In den ersten drei Minuten ist der Tetrathionatabbau in Gegenwart von 100 oder 200 µM CCCP gegenüber der Kontrolle um über 80 % reduziert.

Der beschleunigte Abbau von Thiosulfat (Abb. 4.11) sowie der gehemmte Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von CCCP (Abb. 4.13) spiegeln sich in den beim Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von 200 µM CCCP auftretenden Schwefelverbindungen wider (Abb. 4. 14, ausgewähltes Experiment). Es kommt nicht wie in der Kontrolle (Abb. 4.4) zu

einer vorübergehenden Akkumulation von Thiosulfat, sondern Thiosulfat tritt im gesamten Messzeitraum, allerdings in geringen Konzentrationen, auf. Sulfat und Trithionat steigen kontinuierlich an.

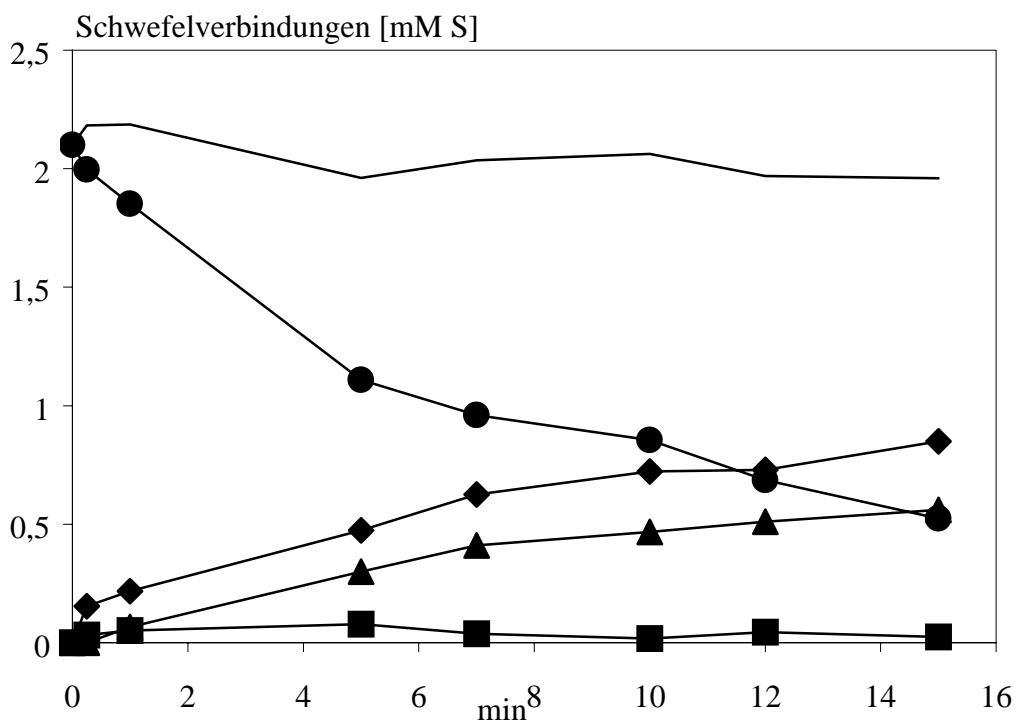


Abb. 4.14: Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von CCCP (200 μ M) durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆) Gesamtschwefel (—); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

4.1.11 Einfluss von HQNO und Myxothiazol auf den Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat.

In der Atmungskette werden Elektronen von Elektronendonatoren auf den finalen Elektronenakzeptor, z.B. Sauerstoff, übertragen. Hierbei wird ein Redoxpotentialanstieg ausgenutzt, um einen Protonengradienten aufzubauen, der letztendlich zur ATP-Gewinnung

genutzt werden kann (chemiosmotische Theorie). Die Atmungskette setzt sich aus mehreren Multienzymkomplexen zusammen, die jeweils einem Redoxpaar in der Kette entsprechen. Hemmstoffe der Atmungskette können an den einzelnen Enzymen angreifen und den Elektronentransport unterbrechen. Die Wirksamkeit der Hemmstoffe lässt Rückschlüsse darauf zu, an welcher Position Elektronen aus Oxidationsreaktionen in die Atmungskette eingespeist werden, welcher Energiegewinn damit verbunden sein kann und wie eng die enzymatische Reaktion mit der Atmungskette verknüpft ist. Folgende Hemmstoffe wurden getestet: HQNO (4-Hydroxyquinolin) ist ein Ubihydrochinonanalogen, dessen hemmende Wirkung von Hallberg et al. (1996) auf die Oxidation von Sulfit bei *Acidithiobacillus caldus* bereits beschrieben wurde. Myxothiazol ist ein Hemmstoff des Cytochrom bc_1 -Komplexes und Cyanid (CN^-) hemmt die terminale Cytochrom-c-Oxidase (Kap. 4.1.12).

In den Versuchen konnte kein hemmender oder aktivierender Einfluss von Myxothiazol oder HQNO auf die Oxidation von Thiosulfat und Tetrathionat festgestellt werden. In Konzentrationsbereichen von je $1\mu M$ bis $500\mu M$ Myxothiazol oder HQNO konnten keine signifikanten Unterschiede zum Thiosulfat- bzw. Tetrathionatabbau der Kontrollen festgestellt werden. Das gleiche galt für die Muster der beim Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat auftretenden Schwefelverbindungen. Daher kann auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet werden.

Anders lagen die Verhältnisse beim Zusatz von Cyanid.

4.1.12 Einfluss von Cyanid auf den Abbau von Thiosulfat

In Gegenwart von 1 mM Cyanid (CN^-) wird Thiosulfat nicht durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 abgebaut. Die beim Abbau von Thiosulfat in der Kontrolle auftretenden Schwefelverbindungen Trithionat, Tetrathionat und Sulfat konnten lediglich in um ein hundertfaches reduzierten Konzentrationen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

4.1.13 Einfluss von Cyanid auf den Abbau von Tetrathionat

In Gegenwart von 1 mM Cyanid wird Tetrathionat im Verhältnis zur Kontrolle mit doppelter Geschwindigkeit abgebaut. Dabei unterscheidet sich das Muster der entstehenden Schwefelverbindungen grundsätzlich von dem der Kontrolle. Trithionat und Sulfat sind nur in reduzierten Konzentrationen nachweisbar. Drei Viertel des verbrauchten Tetrathionates wurden in Form von Thiosulfat wiedergefunden (Abb. 4.15). Da CN^- den Thiosulfatabbau verhindert (Kap. 4.1.12), tritt eine Akkumulation von Thiosulfat auf. Die Menge an detektiertem Thiosulfat kann jedoch nicht allein auf die Reaktionen der Tetrathionat-Hydrolase und Trithionat-Hydrolase zurückzuführen sein. Wäre dies der Fall, hätten pro Mol entstandenem Thiosulfat 2 Mol Sulfat entstehen müssen. Das entspräche 1,5 mM S Sulfat im Gegensatz zu den tatsächlich entstandenen 0,3 mM S. Die Stöchiometrie der entstandenen Verbindungen spricht vielmehr dafür, dass ein Teil des Thiosulfates durch eine andere Reaktion, z.B. eine Reduktion von Tetrathionat, entstanden ist. In Abb. 4.15 ist ein ausgewähltes Experiment des Tetrathionatabbaus in Gegenwart von 1 mM CN^- dargestellt.

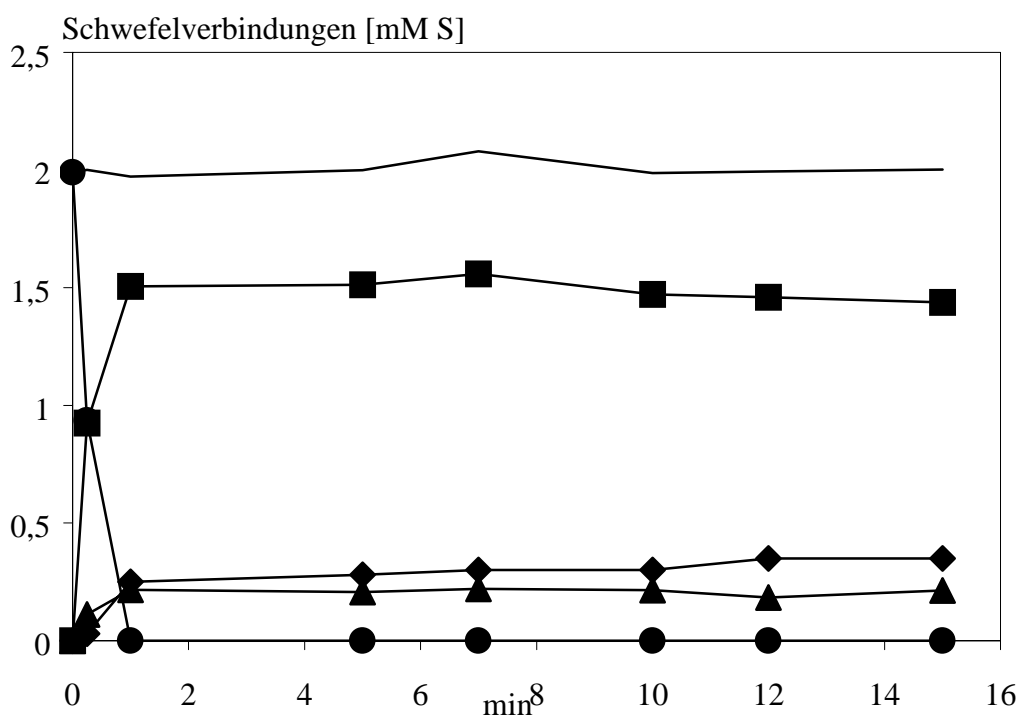


Abb. 4.15: Abbau von Tetrathionat in Gegenwart von CN^- (1 mM) durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12. (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆) Gesamtschwefel (—); mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

4.1.14 Tabellarische Zusammenfassung der Hemmstoff- und Entkopplerversuche zur Untersuchung des Abbaus von Thiosulfat- und Tetrathionat

Basierend auf den Ergebnissen der Abbauxperimente in Gegenwart von Hemmstoffen oder Entkopplern wurden in Tab. 4.1 die Abbauraten für Thiosulfat und Tetrathionat sowie deren prozentuales Verhältnis zur Kontrolle zusammengefasst. Die Abbauraten wurden aus der negativen Steigung der Thiosulfat- oder Tetrathionatkonzentrationen im Zeitraum 0 bis 3 min bestimmt.

Tab. 4.1 Einfluss von Carbonyl-cyanid-m-chlorophenyl-hydrazon (CCCP), 2,4-Dinitrophenol (DNP), N-Ethylmaleimid (NEM), Cyanid (CN⁻), 4-Hydroxyquinolin (HQNO) und Myxothiazol (MTZ) auf die Abbauraten [$\mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$] von Thiosulfat und Tetrathionat. Prozentangaben bezogen auf die Abbauraten der Ansätze ohne Zusatz von Hemmstoffen und Entkopplern.

Konz.	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$		$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$		
	$[\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$	[%]	$[\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}]$	[%]	
<u>Entkoppler:</u>					
CCCP	200 μM	$4,1 \pm 0,2$	240	0,4	13
DNP	1mM	$1,8 \pm 0,1$	100	$3,1 \pm 0,3$	100
<u>Hemmstoffe:</u>					
NEM	1 mM	$2,6 \pm 0,2$	150	0	0
CN ⁻	1 mM	0,1	1	$6,0 \pm 0,2$	194
HQNO	500 μM	$1,7 \pm 0,1$	100	$3,1 \pm 0,3$	100
MTZ	500 μM	$1,7 \pm 0,1$	100	$3,1 \pm 0,3$	100
Kontrolle		$1,7 \pm 0,1$		$3,1 \pm 0,3$	

Versuchsbedingungen: 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,5, 0,1 mg Protein $\times \text{mL}^{-1}$, 30 °C, Thiosulfatkonzentration 1 mM, Tetrathionatkonzentration 0,5 mM.

Aus der Tabelle geht hervor, dass der Abbau von Thiosulfat sowie der von Tetrathionat durch jeweils andere Hemmstoffe reduziert werden. Ein Hemmstoff, der die Abbaurate von Thiosulfat verringert, führt zu einer Beschleunigung des Abbaus von Tetrathionat. Umgekehrt führt ein Hemmstoff, der den Abbau von Tetrathionat hemmt, zu einer Beschleunigung des Abbaus von Thiosulfat. Am stärksten wird der Thiosulfatabbau durch den Entkoppler CCCP beschleunigt. Der Entkoppler DNP hat im Zeitraum 0 bis 3 min keinen Einfluss auf den Thiosulfatabbau. HQNO und MTZ haben weder Einfluss auf den Abbau von Tetrathionat noch auf den Abbau von Thiosulfat.

4.1.15 Abbau von Trithionat

Ein Hauptprodukt sowohl des Abbaus von Thiosulfat als auch des von Tetrathionat ist Trithionat. Es wird in den Abbauversuchen nur langsam und nach ca. 120 min vollständig zu Sulfat abgebaut (nicht dargestellt). Versuche, in denen Trithionat als Substrat eingesetzt wurde, zeigten ebenfalls nur geringe Abbauraten von $0,003 \mu\text{mol Trithionat} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$, wobei als Produkt lediglich Sulfat detektierbar war ($0,012 \mu\text{mol Sulfat} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$). Die niedrigen Umsatzraten führten offensichtlich dazu, dass andere Zwischenverbindungen nicht über die Nachweisgrenze akkumulierten. Nur das Endprodukt Sulfat war daher nachweisbar.

Hemmstoffexperimente haben gezeigt, dass der Thiosulfatabbau in Gegenwart von Cyanid vollständig blockiert war. Thiosulfat ist ein Produkt des Enzyms Trithionat-Hydrolase (Meulenberg et al., 1992; Lu und Kelly, 1988a). Eine weitere Metabolisierung von Thiosulfat könnte damit durch den Einsatz von Cyanid verhindert werden. In Gegenwart von 1 mM Cyanid verläuft der Trithionatabbau, wie in Abb. 4.16 dargestellt. Trithionat wird mit einer Geschwindigkeit von $0,05 \pm 0,005 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ abgebaut. Nach 90 min ist Trithionat vollständig verbraucht. Als Hauptprodukte liegen Thiosulfat (0,45 mM S) und Sulfat (1 mM S) vor. Weitere Schwefelverbindungen wie Elementarschwefel und höhere Polythionate waren nicht nachweisbar. Die Schwefelbilanz weist jedoch nach 100 min ein Defizit von 15 % auf.

Legt man zugrunde, dass in diesem Versuchsansatz die isolierte Reaktion der Trithionat-Hydrolase betrachtet wurde, so hätten Thiosulfat und Sulfat im Verhältnis 1:1 entstehen müssen. In dem dargestellten Versuch entsteht jedoch ca. 4 mal soviel Sulfat pro mol Thiosulfat. Dieses Ergebnis legt nahe, dass bei Cyanidhemmung zusätzlich zur Trithionat-Hydrolase weitere enzymatische Reaktionen am Trithionatabbau beteiligt sind. In Abb. 4.16

sind die beim Abbau von Trithionat in Gegenwart von 1 mM Cyanid entstehenden Schwefelverbindungen dargestellt. Es handelt sich hierbei um Mittelwerte aus drei Experimenten (Fehler $\pm 10\%$).

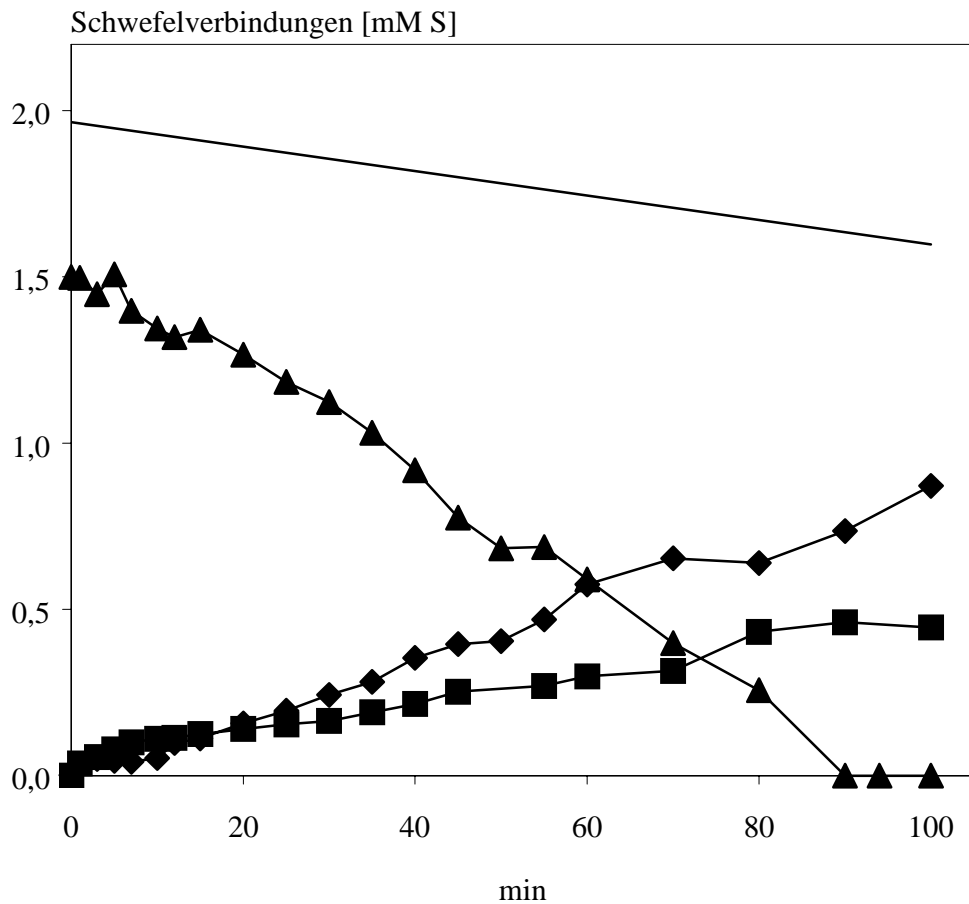


Abb. 4.16: Abbau von Trithionat in Gegenwart von CN^- (1mM) durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 (pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1×10^{10} Zellen/mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Sulfat (◆) Gesamtschwefel (—). mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

4.2 Aerober Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat durch zellfreie Proteinfraktionen

4.2.1 Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase

Mittels Ultraschall- und nachfolgender French-Press-Behandlung sowie Zentrifugation gewonnene, zellfreie Proteinextrakte von *Thiomonas intermedia* K12 weisen deutlich messbare Aktivitäten des Enzyms Thiosulfat-Dehydrogenase auf. Zur Messung wird dem Ansatz in einer Halbmikroküvette ein künstlicher Elektronenakzeptor ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) zugefügt, dessen Reduktion (durch Thiosulfatoxidation) als eine Extinktionsabnahme bei 420 nm photometrisch messbar ist. Durch Zugabe einer Thiosulfatstammlösung wurde der Test gestartet. In Abb. 4.17 ist die Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase in Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Proteingehalten dargestellt. In allen Ansätzen werden im Mittel $0,9 \pm 0,1 \text{ mmol Fe(III)} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$ reduziert.

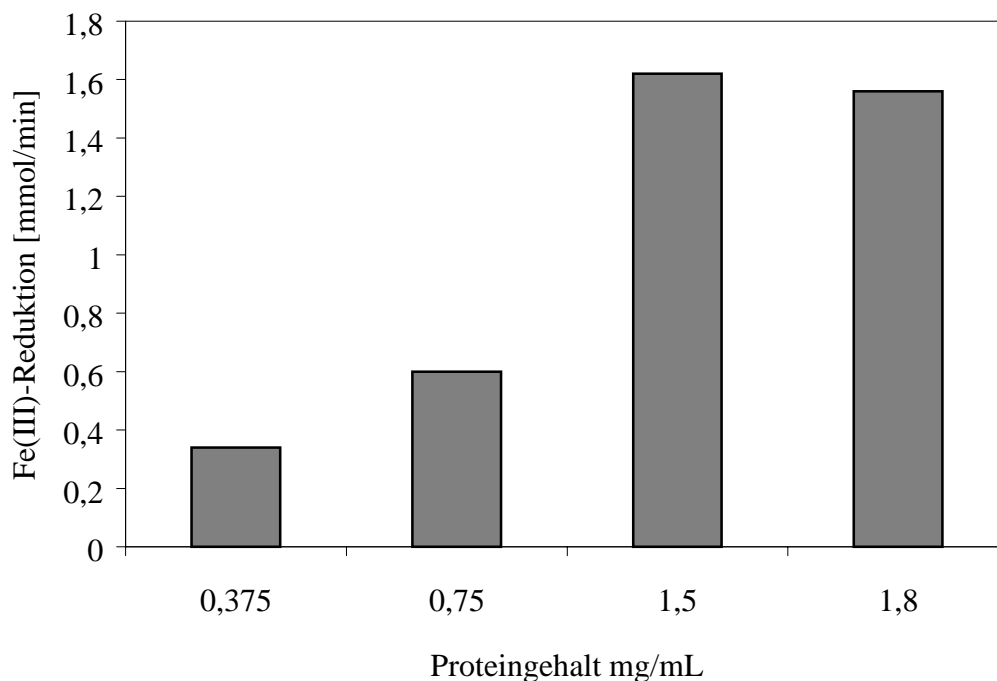


Abb. 4.17 Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase in zellfreien Rohextrakten von *Thiomonas intermedia* K12 bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. (Versuchsbedingungen: 1 mL Versuchsansatz in Halbmikroküvette; 5 mM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,9 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ pH 7,0, 30°C, Versuchsdauer ca. 3 min)

4.2.2 pH-Optimum der Thiosulfat-Dehydrogenase

Aus den unter 4.2.1 dargestellten Ergebnissen wurde deutlich, dass Aktivitäten der Thiosulfat-Dehydrogenase in zellfreien Proteinfraktionen von *Thiomonas intermedia* K12 nachweisbar sind. Von weiterem Interesse war das pH-Optimum des Enzyms Thiosulfat-Dehydrogenase. Hierzu wurde der Start-pH der Versuchsansätze mit KOH oder H₂SO₄ auf Werte von pH 2 bis pH 8 eingestellt. Gemessen wurde gegen eine chemische Kontrolle als Blindwert.

In Abb. 4. 18 sind die Versuchswerte zusammengefasst.

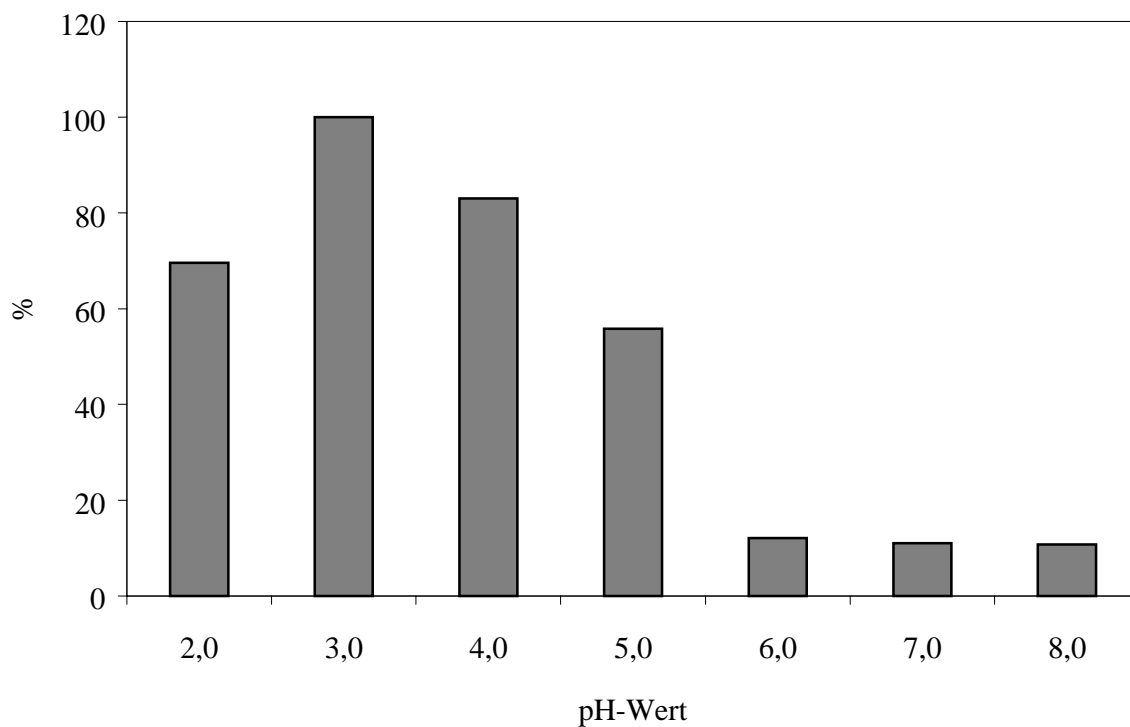


Abb. 4.18: Aktivität von Thiosulfat-Dehydrogenase im zellfreien Rohextrakt bei Start-pH-Werten von 2 bis 8. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an der maximalen Aktivität bei pH 3. (Versuchsbedingungen: 1 mL Versuchsansatz in Halbmikroküvette, 5 mM S₂O₃²⁻, 0,9 mM K₃Fe(CN)₆, 30 °C, 250 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 mg Protein / mL, Start pH eingestellt mit KOH oder H₂SO₄).

Die Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase ist bei pH 3 am größten und fällt bei niedrigeren oder höheren pH-Werten steil ab. Bei pH 6 weist das Enzym nur noch 12 % der maximalen Aktivität (bei pH 3) auf.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit ganzen Zellen (siehe Kap. 4.1.1) weisen die in Abb. 4.18 dargestellten Werte auf ein eindeutiges Maximum hin. Dies ist mit Sicherheit darauf zurückzuführen, dass bei ganzen Zellen nicht nur die isolierte Reaktion der Thiosulfat-Dehydrogenase betrachtet wird, sondern Folgereaktionen auftreten, die zusätzlich die Poolgröße Thiosulfat beeinflussen.

4.2.3 Lokalisation der Thiosulfat-Dehydrogenase

Wie bei anderen acidophilen, Schwefel oxidierenden Bakterien weist die Thiosulfat-Dehydrogenase bei dem neutrophilen *Thiomonas intermedia* K12 ein niedriges pH-Optimum auf. Zur Bestimmung der Lokalisation, d.h. ob das Enzym im Cytoplasma oder im periplasmatischen Raum vorkommt, wurden ganze Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 nach Zentrifugation in isotonischem Puffer resuspendiert und mit Lysozym behandelt. Dieses führte zur Bildung von Sphaeroplasten, Zellen ohne "Äußere Membran". Die Sphaeroplasten konnten durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt werden. Der dabei anfallende Überstand wurde für die Versuche als Inhalt des periplasmatischen Raumes verwendet. Die Sphaeroplasten wurden mittels hypotonischen Puffers zum Platzen gebracht und diese Suspension nach Abtrennung von Zelltrümmern als Cytoplasmafraktion (+ Membran) verwendet. In Tab. 4.2 ist dargestellt, wie sich die Aktivitäten der Thiosulfat-Dehydrogenase auf Cytoplasma (+ Membran) und periplasmatischen Raum verteilen.

Tab. 4.2: Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase in Cytoplasma (+ Membran) und periplasmatischem Raum. (Versuchsbedingungen: 1 mL Versuchsansatz in Halbmikroküvette, 5 mM $S_2O_3^{2-}$, 30 °C, 250 mM $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0, 0,9 mM $K_3Fe(CN)_6$)

Fraktion	Fe(III)-Reduktion
	[$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$]
Periplasma	8,4
Cytoplasma(+ Membran)	0,4

Die Werte weisen deutlich auf eine Konzentrierung der Aktivität der Thiosulfat-Dehydrogenase im periplasmatischen Raum hin. Die Aktivität pro mg Protein ist in der Periplasmafraktion mehr als 20 x so hoch wie in der Cytoplasma und Membran enthaltenen Fraktion. Damit konnten Kontrollen auf Verunreinigung der Fraktion des Periplasmatischen Raums durch Cytoplasmabestandteile vernachlässigt werden. Eine Lokalisierung des Enzyms im periplasmatischen Raum ist ebenfalls für andere acidophile und neutrophile, Schwefelverbindungen oxidierende Bakterien beschrieben worden (Lu und Kelly, 1988a; Meulenberg et al., 1993b)

4.2.4 Lokalisation des Tetrathionat abbauenden Enzyms

Der Einsatz von Tetrathionat im Enzymtest mit Thiosulfat-Dehydrogenase führte zu keiner messbaren Reduktion von Hexacyanoferrat (weder mit zellfreiem Rohextrakt noch mit Cytoplasma- und Periplasmafraktion). Auch mittels HPLC war über 60 min kein Abbau von Tetrathionat durch zellfreien Rohextrakt bzw. Cytoplasma- und Periplasmafraktion oder eine Produktion von Polythionaten messbar.

4.3 Anaerobe Experimente zum Thiosulfat- und Tetrathionatabbau

Cyanid verhindert als Hemmstoff der terminalen Cytochrom-c-Oxidase die Übertragung von Elektronen auf den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff. Vergleichbare Verhältnisse lassen sich durch anaerobe Bedingungen einstellen. Anaerobe Verhältnisse sollten sich somit auf den Thiosulfat- und den Tetrathionatstoffwechsel wie die Cyanidinhibition auswirken.

4.3.1 Abbau von Thiosulfat unter anaeroben Bedingungen

Thiosulfat wurde unter anaeroben Bedingungen nicht durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 abgebaut. Demzufolge waren Tetrathionat, Trithionat und Sulfat, die Produkte des aeroben Thiosulfatabbaus, nicht nachweisbar (auf die Darstellung wurde verzichtet).

4.3.2 Abbau von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen

In Abb. 4.19 ist der Abbau von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 dargestellt. Der Abbau wurde über 130 min verfolgt.

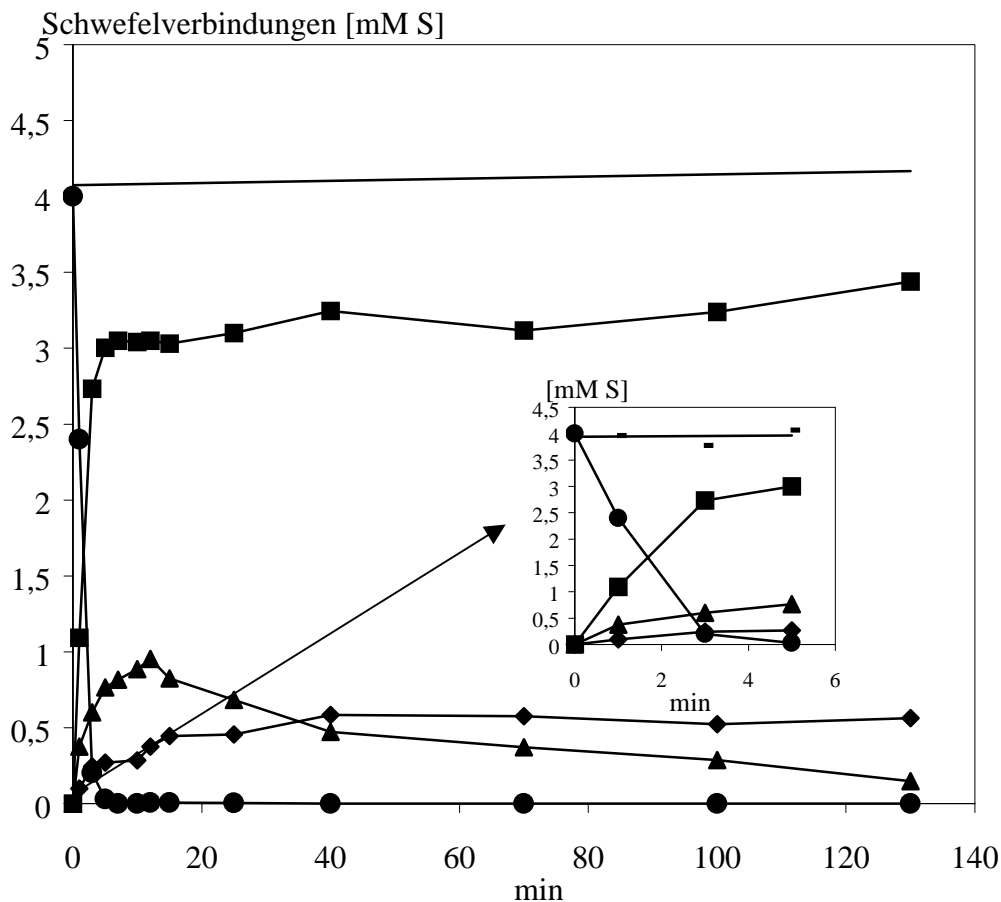


Abb. 4.19: Anaerober Tetrathionatabbau durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 (Serumflasche mit N₂-Atmosphäre, pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, Proteingehalt 0,1 mg/mL, ca. 1 x 10¹⁰ Zellen/mL). Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆), Gesamtschwefel (—). Einsatzgrafik: Konzentration der Schwefelverbindungen im Zeitraum 0 bis 5 min. mM S: Die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Tetrathionat wird unter anaeroben Bedingungen binnen 5 min zu Thiosulfat, Trithionat und Sulfat abgebaut. Nachfolgend wird Trithionat weiter zu Thiosulfat und Sulfat abgebaut. Nach 130 min ist Trithionat nahezu vollständig erschöpft und Thiosulfat und Sulfat stellen die Endprodukte des anaeroben Tetrathionatabbaus dar. Da Thiosulfat unter anaeroben Bedingungen nicht abgebaut wird, akkumulieren folgerichtig Thiosulfat und Sulfat.

4.3.3 Stöchiometrie des Tetrathionatabbaus unter anaeroben Bedingungen

Um Aufschluss über die Prozesse zu erhalten, die bei dem Tetrathionatabbau unter anaeroben Bedingungen ablaufen, wurde die Stöchiometrie bestimmt. Hierzu wurden die Steigungen in den linearen Bereichen der Verläufe des Tetrathionatabbaus und der Thiosulfat-, Trithionat- und Sulfatbildung berechnet. Es wurden insgesamt 18 Experimente mit Ausgangskonzentrationen von 0,5 bis 20 mM Tetrathionat für diese Berechnungen herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.3: Stöchiometrie des Abbaus von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen durch Zellen von *Thiomonas intermedia* K12

Schwefel Verbindung	abgebaut	gebildet		
	$S_4O_6^{2-}$	$S_2O_3^{2-}$	$S_3O_6^{2-}$	SO_4^{2-}
gem. Verhältnis [mol]	1	$1,60 \pm 0,21$	$0,23 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,02$
Stöchiometrie [mol]	4	6	1	1
Stöchiometrie [molS]	16	12	3	1

(Serumflaschen mit N_2 -Atmosphäre, pH 6,5, 0,05 M Phosphatpuffer, 0,1 mg Protein/mL, 30°C, +/- = Standardabweichung, gem.= experimentell bestimmt)

Etwa drei Viertel (80 %) des im Tetrathionat enthaltenen Schwefels wurden in Thiosulfat umgewandelt. Trithionat entstand zu 17 % und Sulfat zu 7 %.

Diese Mengenverhältnisse lassen sich nur erklären, wenn ein Teil des Tetrathionates zu Trithionat und Sulfat oxidiert wurde und der andere, mengenmäßig größere, zu Thiosulfat reduziert wurde. Im Ergebnis wäre das nur durch eine Disproportionierung von Tetrathionat erklärbar.

4.3.4 Anaerobes Wachstum von *Thiomonas intermedia* K12 durch Disproportionierung von Tetrathionat

Im folgenden Versuch sollte überprüft werden, ob *Thiomonas intermedia* K12 in der Lage ist, durch Disproportionierung von Tetrathionat zu wachsen. Um auszuschließen, dass Wachstum und Tetrathionatabbau nicht auf den Verbrauch von intrazellulären Reservestoffen aus dem aeroben Wachstum der Vorkultur zurückzuführen war, wurden Experimente mit über mindestens 3 Passagen anaerob kultivierten Zellen durchgeführt. Hierbei handelte es sich um 50 mL Ansätze, die anaerob (unter N_2/CO_2 - Atmosphäre) mit Tetrathionat als Substrat 20 Tage unter pH-Korrektur kultiviert wurden. Aus einer solchen Kultur wurde das Experiment mit einem Inokulum von 20 % angeimpft. In Abb. 4.20 ist der Verlauf der Konzentrationen der Schwefelverbindungen, des pH und der Zellzahlen für ein ausgewähltes Experiment dargestellt.

Die Zellzahl stieg innerhalb von 8 Tagen von 6×10^5 Zellen/mL auf $\log 5 \times 10^6$ Zellen/mL an. Nachfolgend stieg die Zellzahl weiter an, um nach 20 Tagen 1×10^7 Zellen/mL zu erreichen. In dem gewählten Zeitrahmen kam es zu keinem vollständigen Verbrauch des Tetrathionates. Es ist eine erhebliche Bildung höherer Polythionate messbar. Der größte Anteil des als Tetrathionat eingesetzten Schwefels findet sich im Pentathionat wieder (50 %). Außerdem waren Thiosulfat, Trithionat, Hexathionat und Sulfat in über den Inkubationszeitraum ansteigenden Konzentrationen nachweisbar. Am Versuchsende war darüber hinaus 1 mM Elementarschwefel detektierbar.

Als Ergebnis des Versuches ist festzuhalten, dass Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 mit Tetrathionat als alleiniger Energiequelle wachsen können. Allerdings ist die aus den Kurzzeitexperimenten abgeleitete Stöchiometrie in den Wachstumsversuchen nicht zu erkennen. Anstelle von Thiosulfat sind vielmehr Polythionate wie Pentathionat und Hexathionat nachweisbar.

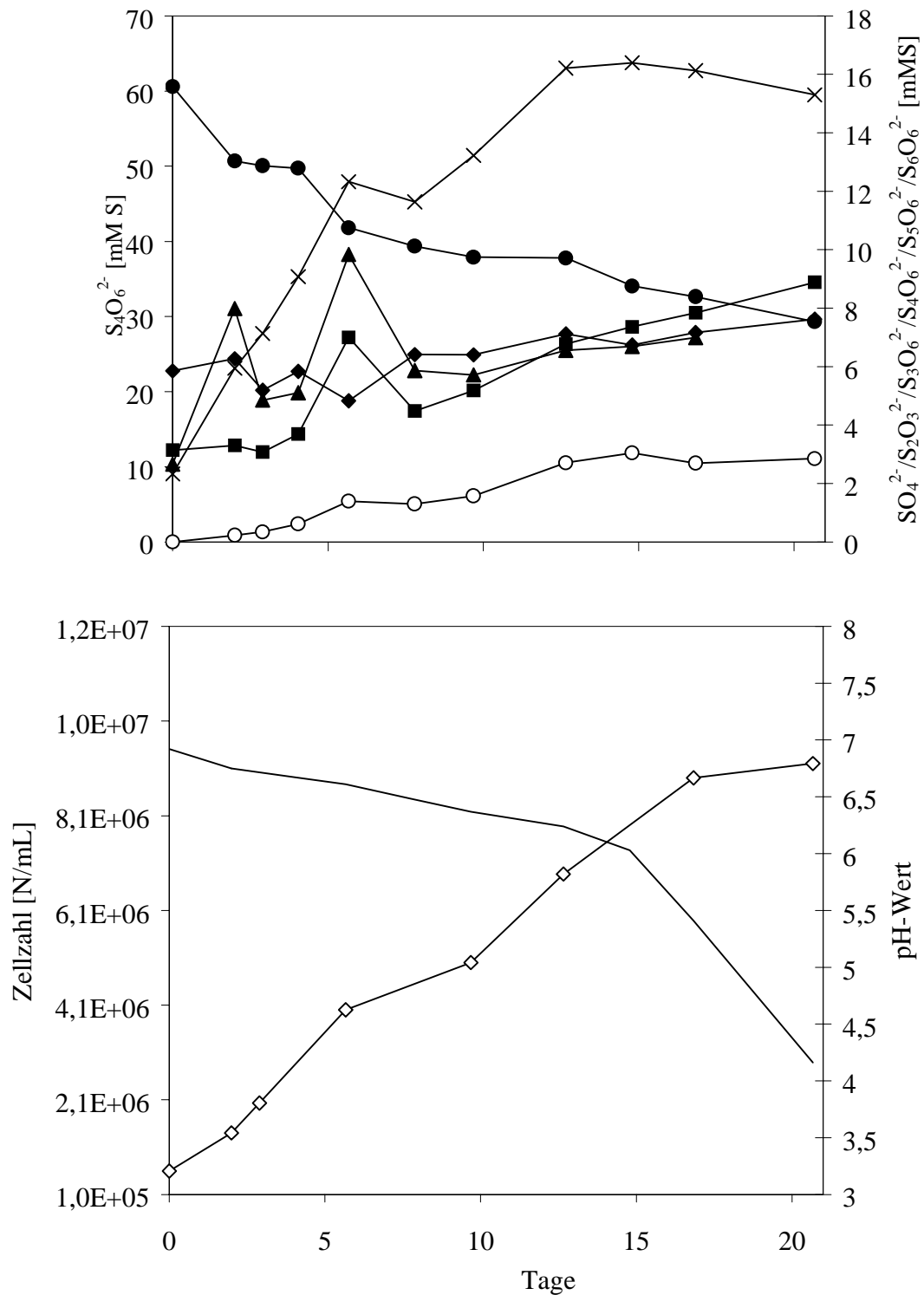


Abb. 4.20 Auf- und Abbau von Schwefelverbindungen beim anaeroben Wachstum von *Thiomonas intermedia* K12 mit Tetrathionat nach anaerober Vorkultur mit Tetrathionat. Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆), Pentathionat (×), Hexathionat (○), pH-Wert (—) und Zellzahl (◇). Schwefelverbindungen in mM S: die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen.

Bei *Thiomonas intermedia* K12 handelt es sich um einen fakultativ heterotroph wachsendes Bakterium. Aerobes Wachstum mit Hefeextrakt und Glucose wurden für den Organismus beschrieben (Wolff, 1981). Um zu überprüfen, wie sich die Anwesenheit dieser Verbindungen im Medium auf das anaerobe Wachstum mit Tetrathionat auswirken, wurden Wachstumsversuche mit 0,5 und 0,05 % Hefeextrakt durchgeführt. In Abb. 4.21 sind der Verlauf der Gesamtzellzahlen, von Schwefelverbindungen und pH-Wert während des anaeroben Wachstums der Zellen mit Tetrathionat und 0,05 % Hefeextrakt für ein ausgewähltes Experiment dargestellt. Die verwendeten Zellen waren aus wiederholter anaerober Vorkultur. Innerhalb von 17 Tagen stieg die Zellzahl von 9×10^5 Zellen/mL auf 1×10^7 Zellen/mL an. Der pH- Wert sank dabei ab. Wie bei dem vorhergehenden Versuch werden Thiosulfat, Trithionat, Tetrathionat, Pentathionat und Hexathionat gebildet. Außerdem war am Versuchsende 1 mM Elementarschwefel nachweisbar.

Der Verlauf der Schwefelverbindungen und der Zellzahlen wurde in dem Versuch nur unwesentlich beeinflusst. Wachstumsversuche mit 0,5 % Hefeextrakt ergaben keine anderen Ergebnisse, sodass hier auf eine Darstellung verzichtet werden kann.

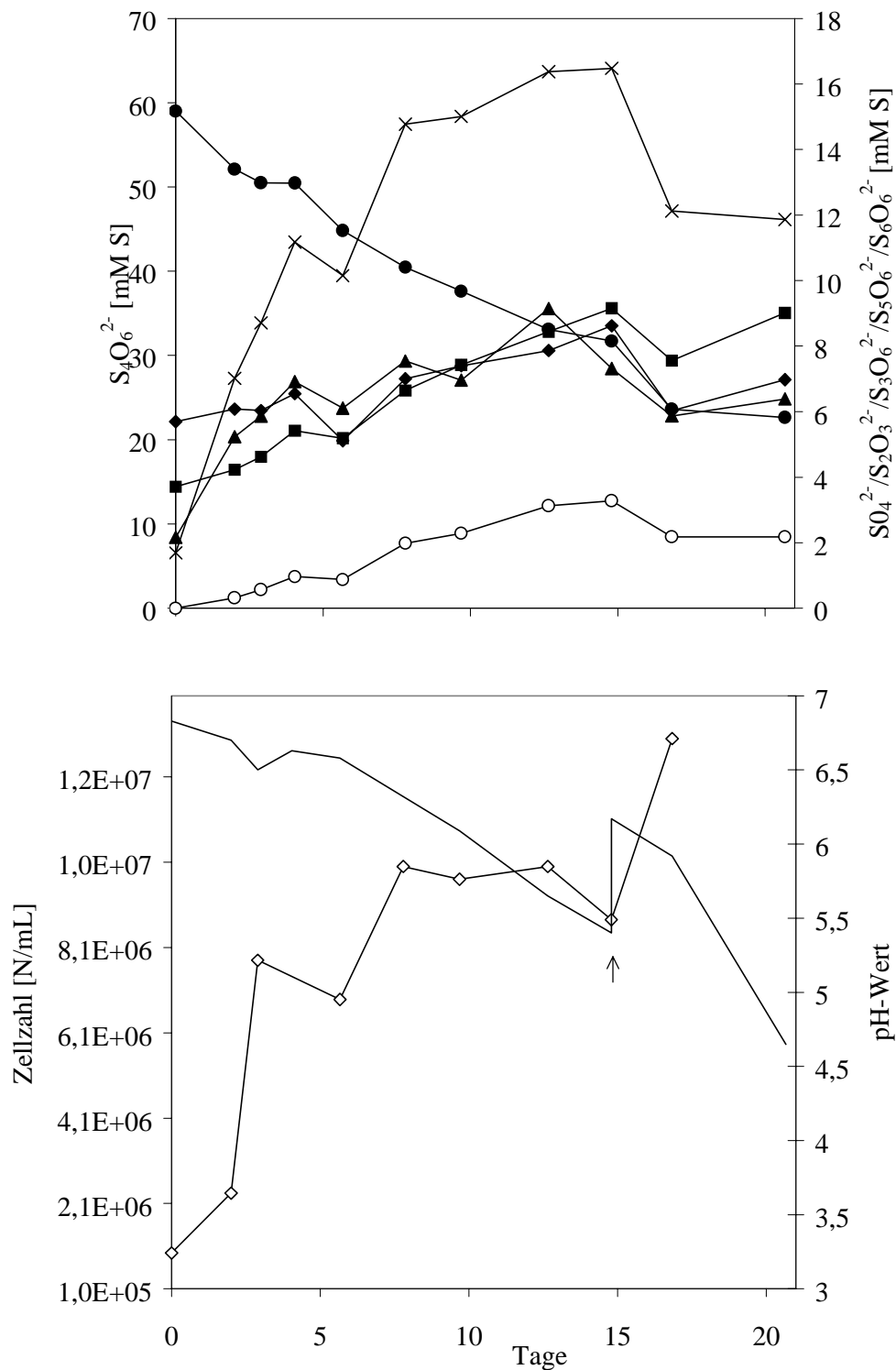


Abb. 4. 21 Auf- und Abbau der Schwefelverbindungen beim anaeroben Wachstum von *Thiomonas intermedia* K12 (nach anaerober Vorkultur) mit Tetrathionat in Gegenwart von 0,05 % Hefeextrakt. Thiosulfat (■), Trithionat (▲), Tetrathionat (●), Sulfat (◆), Pentathionat (×), Hexathionat (○), pH-Wert (—) und Zellzahl (◇). Schwefelverbindungen in mM S: die Konzentration wurde auf die Anzahl der Schwefelatome in der jeweiligen Verbindung bezogen. (↑) Titration des pH-Wertes mit 1N KOH.

4.3.5 Einfluss verschiedener organischer Verbindungen auf das anaerobe Wachstum mit Tetrathionat

Neben Hefeextrakt wurde auch der Einfluss anderer organischer Verbindungen auf das anaerobe Wachstum von *Thiomonas intermedia* K12 mit Tetrathionat geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 4. 4 zusammengefasst.

Organische Substanz	Konz.	Zuwachs der Zellzahl / mL
Hefeextrakt	0,05%	$1,5 \times 10^7$
	0,50%	$1,5 \times 10^7$
Glucose	20mM	$0,6 \times 10^7$
Acetat	20mM	$0,5 \times 10^7$
Glutamat	20mM	$0,7 \times 10^7$
Laktat	0,25%	$0,5 \times 10^7$
Kontrolle		$1,0 \times 10^7$

Tab. 4.4 Einfluss organischer Verbindungen auf das anaerobe Wachstum von Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 mit Tetrathionat. Auswertung nach 20 Tagen Versuchsdauer, Inokulum: Zellen aus aerober Vorkultur. Mittelwerte aus 3 Experimenten. Konz. = Konzentration im Versuch

Aus den Werten ist zu entnehmen, dass nur der Zusatz von Hefeextrakt zu einem verbesserten Wachstum der Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 führt. Alle anderen Verbindungen hemmen offensichtlich das Wachstum.

5 Diskussion

Aufgrund der Vielfalt der Abbauewege, die für acidophile und neutrophile Schwefel oxidierende Bakterien bekannt sind, wurden zur Klärung der Abbauewege bei *Thiomonas intermedia* K12 die hier vorgestellten Arbeiten durchgeführt. Bisher wurden von verschiedenen Autoren für acidophile und neutrophile Schwefel oxidierende Bakterien Experimente mit Entkopplern und Hemmstoffen durchgeführt. Überwiegend wurden dabei die Umsätze von Schwefelverbindungen aus Messwerten errechnet, die aus Messungen des O₂-Verbrauchs mit einer O₂-Elektrode stammten (Beffa et al., 1992; Lu und Kelly, 1988b; Hazeu et al. 1988). Nur vereinzelt wurden bei der Oxidation von Thiosulfat oder Tetrathionat auftretende Schwefelverbindungen gemessen, wobei man sich unpräziser nasschemischer Methoden bediente (Hallberg et al., 1996; Meulenberg et al., 1992b). In der hier vorliegenden Arbeit erlaubte der Einsatz von Chromatographiemethoden erstmals die Detektion aller beim aeroben und anaeroben Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat auftretenden Schwefelverbindungen. Damit wurde es möglich, die Wirkung von Entkopplern und Hemmstoffen direkt enzymatischen Reaktionen zuzuordnen. Somit lassen sich aus den Ergebnissen Modelle ableiten, die den Schwefelstoffwechsel von *Thiomonas intermedia* K12 erklären können und die im Folgenden vorgestellt werden.

Effekte von Hemmstoffen und Entkopplern

Tetrathionat und Trithionat treten als Zwischenprodukte bei der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat durch *Thiomonas intermedia* K12 unter aeroben Bedingungen auf. Thiosulfat ist neben Trithionat wiederum ein Zwischenprodukt der Oxidation von Tetrathionat zu Sulfat. Durch den Einsatz von Hemmstoffen ließen sich die Abbauewege der Verbindungen an unterschiedlichen Stellen unterbrechen. NEM blockierte die Oxidation von Tetrathionat. Folgerichtig wurde Thiosulfat vollständig zu Tetrathionat oxidiert. Darüber hinaus erfolgte dieser Abbau gegenüber dem der hemmstofffreien Kontrolle beschleunigt. Offensichtlich entsteht ohne NEM beim Thiosulfatabbau nach mehreren Reaktionsschritten erneut Thiosulfat, was mit dem von Schippers et al. (1996b) postulierten Modell des zyklischen Abbaus erklärbar wäre. Einen mit NEM vergleichbaren Effekt hat der Entkoppler CCCP.

Diese Verbindung hemmt den Tetrathionatabbau und führt damit auch zu einem beschleunigten Abbau von Thiosulfat. Auch die Ergebnisse des Einsatzes von Cyanid sprechen für einen zyklischen Abbau von Thiosulfat und Tetrathionat. Cyanid blockiert unter aeroben Bedingungen den Abbau von Thiosulfat, was in der Konsequenz dazu führt, dass Tetrathionat beschleunigt abgebaut wird, da durch Folgereaktionen kein Thiosulfat nachgeliefert wird. Diese Ergebnisse passen in das zyklische Modell des Thiosulfatabbaus, welches Schippers et al. (1996b) für den Abbau von Pyrit durch *Acidithiobacillus ferrooxidans* postulierten. Es ist in modifizierter Form in Abb. 5.1 dargestellt.

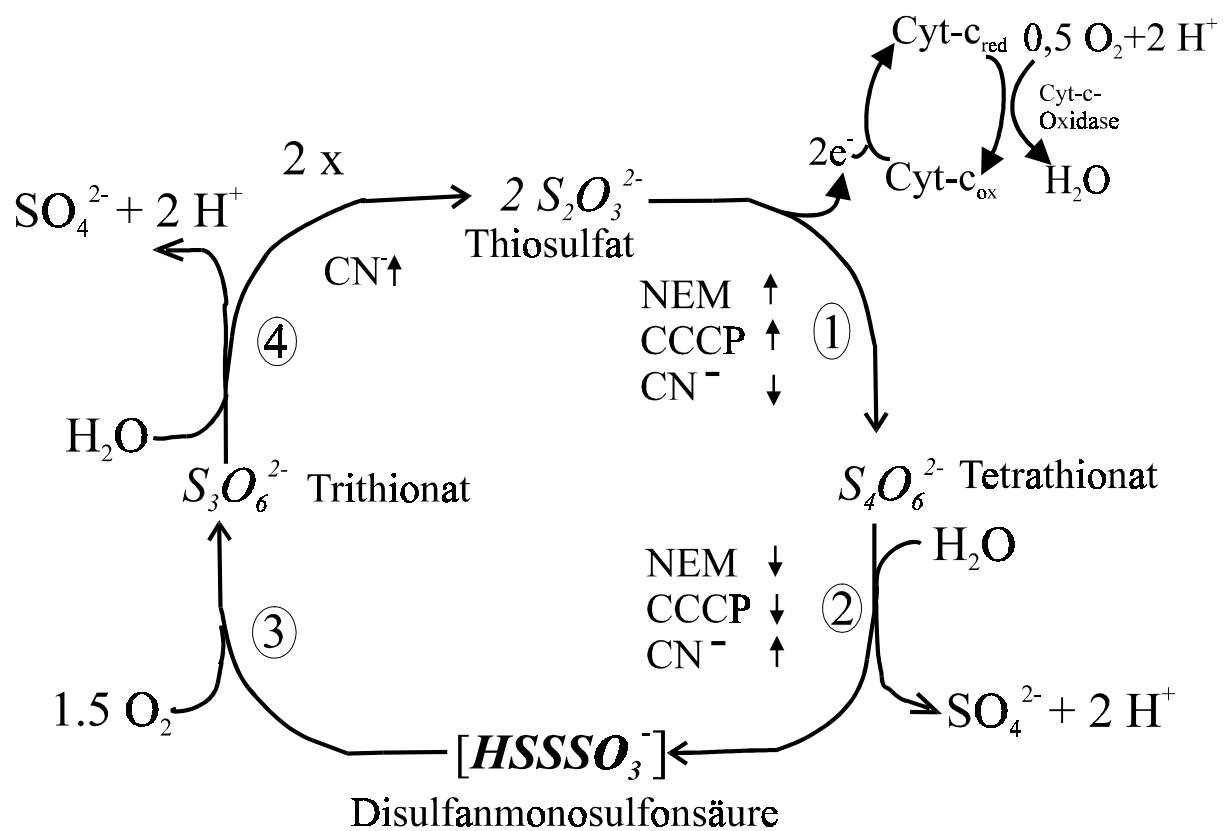


Abb. 5.1: Zyklischer Abbau von Thiosulfat in Zellen von *Thiomonas intermedia* K12 unter aeroben Bedingungen. Hemmender Einfluss (↓); förrender Einfluss (↑); instabile Verbindung []; 1, Oxidation von Thiosulfat (Thiosulfat-Dehydrogenase); 2, Hydrolyse von Tetrathionat (Tetrathionat-Hydrolase); 3, Oxidation der Disulfanmonosulfonsäure (enzymatisch (Enzym unbekannt) oder chemisch); 4, Hydrolyse von Trithionat (Trithionat-Hydrolase). Komponenten, Reaktionen und Enzyme (1-4) werden im Text näher erläutert.

Die **Reaktion 1** in diesem Schema, die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat, wird durch das Enzym Thiosulfat-Dehydrogenase katalysiert. Durch NEM ließ sich die Reaktion bei *Thiomonas intermedia* K12 von den übrigen Kreislaufreaktionen isolieren, da NEM eine weitere Verstoffwechslung von Tetrathionat unterbindet. Cyanid, ein Hemmstoff der terminalen Cytochrom-c-Oxidase, blockiert die Oxidation von Thiosulfat. Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung, die an Elektronenakzeptoren mit negativerem Redoxpotential als Cytochrom-c angreifen (HQNO, Myxothiazol), blieben ohne Einfluss auf die Thiosulfatoxidation durch *Thiomonas intermedia* K12. Dieses spricht dafür, dass die bei der Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat frei werdenden Elektronen auf Cytochrom-c übertragen werden. Diese Interpretation steht im Einklang mit Ergebnissen, die für acidophile (*Acidiphilium acidophilum*) und neutrophile Schwefel oxidierende Bakterien (*Thermithiobacillus tepidarius*) erzielt wurden (Lyric und Suzuki, 1970; Lu und Kelly, 1988a; Meulenberg et al., 1993b). Als wahrscheinlicher Elektronenakzeptor der Thiosulfat-Dehydrogenase wird von allen Autorengruppen Cytochrom-c angesehen.

Eine enge Kopplung der Thiosulfat-Dehydrogenase aus *Thiomonas intermedia* K12 an die oxidative Phosphorylierung wird auch durch den, verglichen mit NEM, stärker beschleunigenden Einfluss des Entkopplers CCCP untermauert. Die durch CCCP entkoppelte Atmungskette oxidiert beschleunigt Cytochrom-c, was direkt auf die Thiosulfat-Dehydrogenase rückwirkt und die Umsetzung von Thiosulfat steigert.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass über 95 % der Enzymaktivität im Periplasma lokalisiert sind. Es ist somit davon auszugehen, dass das Enzym Thiosulfat-Dehydrogenase ein periplasmatisches Enzym ist. Auch bei dem neutrophilen *Thermithiobacillus tepidarius* wurde der überwiegende Anteil (73 %) der Enzymaktivität im Periplasma nachgewiesen (Lu und Kelly, 1988a). Die Lokalisation im Periplasma ist ebenfalls für *Acidiphilium acidophilum* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* auf Grund eines niedrigen pH-Optimums von pH 3 beschrieben worden (Meulenberg et al., 1993b).

Reaktion 2, die Hydrolyse von Tetrathionat zu Disulfanmonosulfonsäure, Sulfat und 2 mol Protonen wird durch das Enzym Tetrathionat-Hydrolase katalysiert. Bei *Thiomonas intermedia* K12 findet kein Tetrathionatabbau in Gegenwart von 1 mM NEM statt. Diese Hemmung bedarf keiner Inkubationszeit. Wurde zu einem Tetrathionat abbauenden Ansatz NEM hinzugegeben, so stoppte die Reaktion sofort, bzw. während der Thiosulfatoxidation wurde das Thiosulfat ab diesem Zeitpunkt quantitativ als Tetrathionat wiedergefunden. Der Befund spricht dafür, dass Tetrathionat und NEM um die Bindungsstellen am Enzym

konkurrieren. NEM bindet an SH-Gruppen von Proteinen. Mercaptogruppen sind Bestandteile von reaktiven Zentren und damit häufig direkt an der Positionierung eines Substrates in einem reaktiven Zentrum eines Enzyms beteiligt. Die Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber NEM deutet darauf hin, dass SH-Gruppen in dem Enzym Tetrathionat-Hydrolase eine solche Funktion haben. Darauf basierend wurde ein Modell des Reaktionsmechanismus der Tetrathionat-Hydrolase entwickelt, welches in Abbildung 5.2 dargestellt ist.

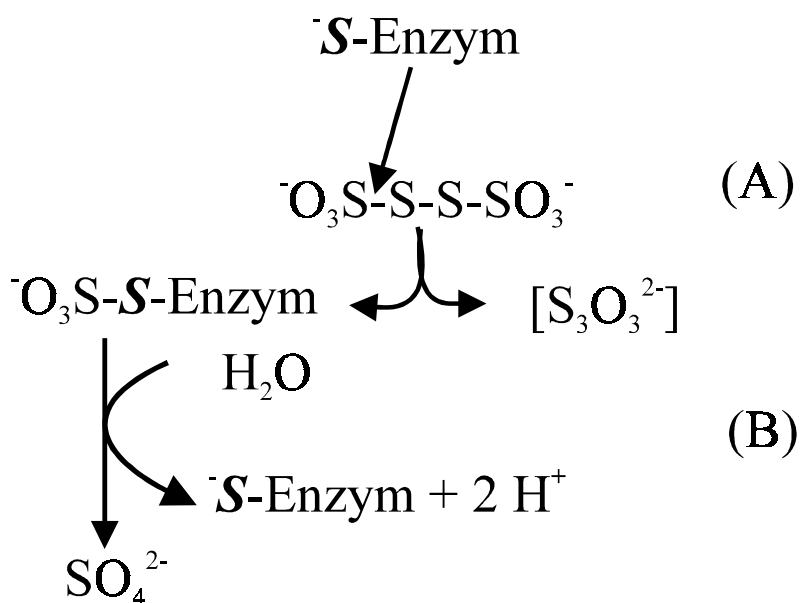


Abb. 5.2 Modell für den Reaktionsmechanismus der Tetrathionat-Hydrolase. Erläuterungen der Reaktionschritte A und B siehe Text. [] = instabile Verbindung

Eine SH-Gruppe im reaktiven Zentrum der Tetrathionat-Hydrolase greift im Rahmen eines nucleophilen Angriffs die Bindung zwischen einer Sulfonsäuregruppe (elektrophil) und einem Sulfanschwefel an. Die Sulfonsäuregruppe wird an die Sulfidgruppe des Enzyms gebunden, während die Disulfanmonosulfonsäure freigesetzt wird (A). Sulfat wird danach durch hydrolytische Spaltung gebildet, wobei die Ausgangsform des Enzyms wiederhergestellt wird und 2 mol H^+ gebildet werden (B). In Gegenwart von NEM bindet anstelle von Tetrathionat NEM an das Enzym und blockiert die Bindungsstelle für Tetrathionat. Folglich wird im Falle des Thiosulfatabbaus in Gegenwart von NEM Tetrathionat nicht weiter verstoffwechselt und akkumuliert. Darüber hinaus können Folgeprodukte der Hydrolyse von Tetrathionat wie Disulfanmonosulfonsäure, Trithionat und Sulfat nicht auftreten.

Ein hemmender Einfluss von NEM auf den Sauerstoffverbrauch ist auch für *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* beschrieben worden (Hazeu et al. 1988; Hallberg et al. 1996, Masau et al., 2001). Spektrophotometrische oder colorimetrische Analysen der Reaktionsansätze belegten in allen Fällen jedoch eine Akkumulation von Elementarschwefel während des mit NEM gehemmten Abbaus von Tetrathionat. Diese Ergebnisse kann man dahingehend interpretieren, dass in diesen Fällen nicht wie bei *Thiomonas intermedia* K12 die Tetrathionat-Hydrolase gehemmt wird, sondern die Verstoffwechslung des Zwischenproduktes Elementarschwefel. Hier soll jedoch auch eine andere Möglichkeit in Betracht gezogen werden.

Die Entstehung von Elementarschwefel wird durch folgende Reaktionsgleichung erklärt, die von de Jong et al. (1997a) und de Jong et al. (1997b) für die Reaktion der Tetrathionat-Hydrolase aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium acidophilum* postuliert wurde.



Gleichung 11 steht nun in einem scheinbaren Widerspruch zu der hier für *Thiomonas intermedia* K12 postulierten Reaktion der Tetrathionat-Hydrolase mit der Schlüsselverbindung Disulfanmonosulfonsäure. Der Widerspruch löst sich auf, wenn man Gleichung (8) als Summenformel für die Reaktionsprodukte der Tetrathionat-Hydrolase und die Zerfallsprodukte der Disulfanmonosulfonsäure unter den gewählten Reaktionsbedingungen betrachtet. Bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium acidophilum* handelt es sich um acidophile Bakterien. Das Optimum der Tetrathionat Hydrolase liegt bei pH 3. Gleichung (8) lässt sich in Teilreaktionen zerlegen, die das Verhalten der Disulfanmonosulfonsäure unter diesen Bedingungen berücksichtigen (Schippers, 1998).

Durch Hydrolyse von 1 mol Tetrathionat entstehen 1 mol Disulfanmonosulfonsäure, 1 mol Sulfat und 2 mol Protonen:



Im zweiten Schritt entstehen unter sauren Bedingungen durch chemischen Abbau aus 1 mol Disulfanmonosulfonsäure rasch 2 mol Elementarschwefel und 1 mol Sulfit:



Im dritten Schritt reagiert 1 mol Sulfit mit der Hälfte des entstandenen Elementarschwefels chemisch zu 1 mol Thiosulfat:



Eine Akkumulation von Elementarschwefel, wie sie von Hallberg et al. (1996) und Hazeu et al. (1988) bei *Acidithiobacillus caldus* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* gemessen wurde, lässt sich somit damit erklären, dass bei diesen beiden Organismen eine Folgereaktion, die Verstoffwechselung der Disulfanmonosulfonsäure durch NEM, gehemmt wurde. Der Elementarschwefel resultiert somit aus der bekannten, chemischen Reaktionsfreudigkeit der Disulfanmonosulfonsäure und ist nicht die Folge einer Hemmung der Verstoffwechselung von Elementarschwefel. Das bedeutet, dass NEM bei pH-neutralen Bedingungen, wie sie im Cytoplasma von *Thiomonas intermedia* K12 vorliegen, bereits den ersten Schritt der Tetrathionat-Hydrolase hemmt, während bei saurem pH wie im Periplasma von z.B. *Acidithiobacillus ferrooxidans* eine Hemmung mit NEM nicht möglich ist, weil z.B. die SH-Gruppen alle protoniert sind. Erst die Folgereaktion, der Disulfanmonosulfonsäureabbau, wird durch NEM gehemmt. Dieses könnte sich z.B. in einer veränderten Bindung des Produkts Disulfanmonosulfonsäure an das Enzym äußern. In Gegenwart von NEM kommt diese Bindung nicht zustande und die Disulfanmonosulfonsäure wird freigesetzt und unterliegt einem raschen chemischen Zerfall. Möglicherweise wird auch bei *Thiomonas intermedia* K12 der Abbau der Disulfanmonosulfonsäure durch NEM gehemmt dieses bleibt jedoch verdeckt, da bereits die Bindung von Tetrathionat an die Tetrathionat-Hydrolase durch NEM gehemmt wird.

Ein weiteres Merkmal des Enzyms Tetrathionat-Hydrolase in *Thiomonas intermedia* K12 ist dessen Empfindlichkeit gegenüber Zellaufschlussbedingungen (French Press, Ultraschallbehandlung, osmotischer Schock). In zellfreien Rohextrakten konnten keine Aktivitäten dieses Enzyms nachgewiesen werden. Auch mit unter anaeroben Bedingungen hergestellten, zellfreien Rohextrakten war kein Abbau von Tetrathionat nachweisbar. Diese

Befunde sprechen dafür, dass dieses Enzym mit der Cytoplasmamembran assoziiert ist. Eine intakte Membranstruktur scheint eine Voraussetzung dafür zu sein, dass das Enzym Tetrathionat-Hydrolase funktioniert. Bei Versuchen mit dem neutrophilen Bakterium *Thermithiobacillus tepidarius* erhielten Lu und Kelly (1988a+b) ähnliche Ergebnisse. Es konnte kein Sauerstoffverbrauch durch zellfreie Rohextrakte trotz Gegenwart von Tetrathionat gemessen werden.

Die Empfindlichkeit des Enzyms Tetrathionat-Hydrolase gegenüber Zellaufschlussbedingungen ist auch ein weiterer Beleg für die Beteiligung von Sulfidgruppen am reaktiven Zentrum des Enzyms. In Gegenwart von Luftsauerstoff oxidieren SH-Gruppen unter Bildung von Disulfidbindungen, was die in Abb. 5.2 dargestellten Reaktionen unmöglich macht.

Ein weiteres Ergebnis meiner Versuche ist, dass das Enzym Tetrathionat-Hydrolase durch den Entkoppler CCCP gehemmt wird. Protonophoren wie CCCP heben das Membranpotential auf. Neben dem Effekt der Entkopplung von Atmung und ATP-Gewinn werden durch die Aufhebung des Membranpotentials aktive Transportprozesse durch die Cytoplasmamembran unmöglich gemacht. Die gemessene Hemmung des Tetrathionatabbaus durch CCCP deutet somit auf eine Lokalisation des Enzyms Tetrathionat-Hydrolase im Cytoplasma hin.

Im Gegensatz zu CCCP hat der Entkoppler DNP (2,4-Dinitrophenol) keinen hemmenden Einfluss auf den Tetrathionatabbau. Ein ähnlicher Befund wurde bereits für *Acidiphilium acidophilum* beschrieben und als unspezifische Wirkung des Entkopplers CCCP interpretiert (Meulenbergh et al., 1992b). Der stark beschleunigende Einfluss von CCCP auf den Thiosulfatabbau bei *Thiomonas intermedia* K12 ist ein Beleg dafür, dass CCCP unter den gewählten Versuchsbedingungen das Membranpotential aufhebt. Die Unempfindlichkeit des Tetrathionatabbaus gegenüber DNP kann bedeuten, dass DNP bei *Thiomonas intermedia* K12 keine entkoppelnde Wirkung hat. Von *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* und *E. coli* sind Mutanten bekannt, die unempfindlich gegenüber Entkopplern sind (Ito und Ohnishi, 1981; Decker und Lang, 1977). Als Ursache hierfür wurden bei *Bacillus subtilis* Veränderungen im Spektrum der Membranlipide der Mutante genannt (Guffanti et al., 1987). Eine Unempfindlichkeit von *Thiomonas intermedia* K12 gegenüber DNP würde die unterschiedlichen Einflüsse von DNP und CCCP erklären. Das konnte jedoch in dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden.

Cyanid hat einen beschleunigenden Einfluss auf den Tetrathionatabbau. Der beschleunigende Effekt ist in der Hemmung der Thiosulfatoxidation durch Cyanid begründet. Unter Cyanid-Einfluss wird kein Tetrathionat aus der Thiosulfatoxidation nachgeliefert. Dadurch wird der Tetrathionatpool im Vergleich zur Kontrolle schneller erschöpft.

Reaktion 3, die Oxidation der Disulfanmonosulfonsäure zu Trithionat, kann rein chemisch durch Sauerstoff oder andere Oxidationsmittel wie Fe(III)Ionen (Schippers et al., 1996b) erfolgen. Neben der rein chemischen Oxidation ist aber auch eine enzymatische Übertragung von Elektronen auf Cytochrome unter Beteiligung eines Enzymkomplexes, der Tetrathionat-Hydrolase Aktivität und Disulfanmonosulfonsäure-Dehydrogenase Aktivität aufweist, möglich. Die bei der letzteren, enzymatischen Reaktion freiwerdenden Elektronen werden dann z.B. auf Cytochrom-c übertragen. Für eine eng an die Tetrathionat-Hydrolase gekoppelte, enzymatische Oxidation der Disulfanmonosulfonsäure spricht, dass sich die Oxidation der Disulfanmonosulfonsäure nicht durch die hier verwendeten Hemmstoffe und Entkoppler von der Hydrolyse von Tetrathionat durch das Enzym Tetrathionat-Hydrolase trennen ließ. Eine Hemmung einer enzymatischen Oxidation der bei der Tetrathionat Hydrolyse entstandenen Disulfanmonosulfonsäure zu Trithionat hätte sich in einer rein chemischen Umwandlung z.B. der Disulfanmonosulfonsäure zu Elementarschwefel oder zu höheren Polythionaten in Folge von Kondensationsreaktionen niederschlagen sollen. Dieses wurde nicht beobachtet.

Reaktion 4, die Hydrolyse von Trithionat durch das Enzym Trithionat-Hydrolase, liefert Thiosulfat und Sulfat. Thiosulfat dient wiederum als Substrat des Enzyms Thiosulfat-Dehydrogenase, das den Kreis schließt (Reaktion 1). Eine Trithionat-Hydrolase wurde bereits aus *Acidiphilum acidophilus* und *Thermithiobacillus tepidarius* isoliert bzw. aufgereinigt (Lu und Kelly, 1988a; Meulenber et al., 1992a).

Trithionat wird von *Thiomonas intermedia* K12 langsam abgebaut; während des Abbaus wurden lediglich Thiosulfat und Sulfat detektiert. Bei dem geringen Umsatz akkumulierte das durch Reaktion 1 zu postulierende Tetrathionat nicht bis zur Nachweisgrenze. Die zunehmenden Sulfatwerte weisen jedoch daraufhin, dass Thiosulfat nachfolgend weiter (zyklisch) abgebaut wird. Trithionat akkumuliert offensichtlich im Laufe des Abbaus von Tetrathionat und Thiosulfat, weil Reaktion 4, wie experimentell belegt, die langsamste im Kreislauf ist.

In Gegenwart von 1 mM Cyanid war ein deutlich verstärkter Trithionatabbau messbar. Unter diesen Bedingungen ist die nachfolgende Thiosulfat-Dehydrogenase blockiert. Einzig auftretende Verbindungen waren somit Sulfat und Thiosulfat. Bei einer Reaktion von 1 mol Trithionat entstehen durch die Hydrolyse 1 mol Thiosulfat und 1 mol Sulfat. Gemessen wurde allerdings ein Verhältnis von 1 mol Thiosulfat zu 4 mol Sulfat. Möglicherweise hat ein Teil des gebildeten Thiosulfats mit Cyanid zu Thiocyanat reagiert, welches dann von den Zellen zu Sulfat oxidiert wurde. Kontrollexperimente mit toten Zellen ergaben keine Bildung von Thiosulfat und Sulfat aus Trithionat in Gegenwart von CN^- , so dass eine rein chemische Entstehung von Sulfat auszuschließen ist. Eine weitergehende Klärung des Sachverhaltes war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Auf Grundlage der beschriebenen Ergebnisse lässt sich ein Modell über die Lokalisierung der einzelnen Reaktionen und Enzyme des Thiosulfat Abbaus bei *Thiomonas intermedia* K12 erstellen. Es ist in Abb. 5.3 dargestellt. Thiosulfat wird im periplasmatischen Raum durch die Thiosulfat Dehydrogenase zu Tetrathionat oxidiert (1). Die dabei frei gewordenen Elektronen werden auf Cytochrom-c übertragen, welches wiederum von der auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisierten Cytochrom-c-Oxidase oxidiert wird. Tetrathionat wird durch einen aktiven Transportmechanismus in das Cytoplasma transportiert. Im Cytoplasma wird Tetrathionat durch einen membranintegrierten Enzymkomplex aus Tetrathionat-Hydrolase (2) und einer zu postulierenden Disulfanmonosulfonsäure-Dehydrogenase (3) erst zur Disulfanmonosulfonsäure und Sulfat hydrolysiert. Die Disulfanmonosulfonsäure wird nachfolgend unter Übertragung von Elektronen auf Cytochrom-c zu Trithionat oxidiert. Das auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran freigesetzte Trithionat wird langsam durch die Trithionat-Hydrolase (4) zu Thiosulfat und Sulfat hydrolysiert, wodurch das Enzym das Substrat für die Thiosulfat-Dehydrogenase liefert.

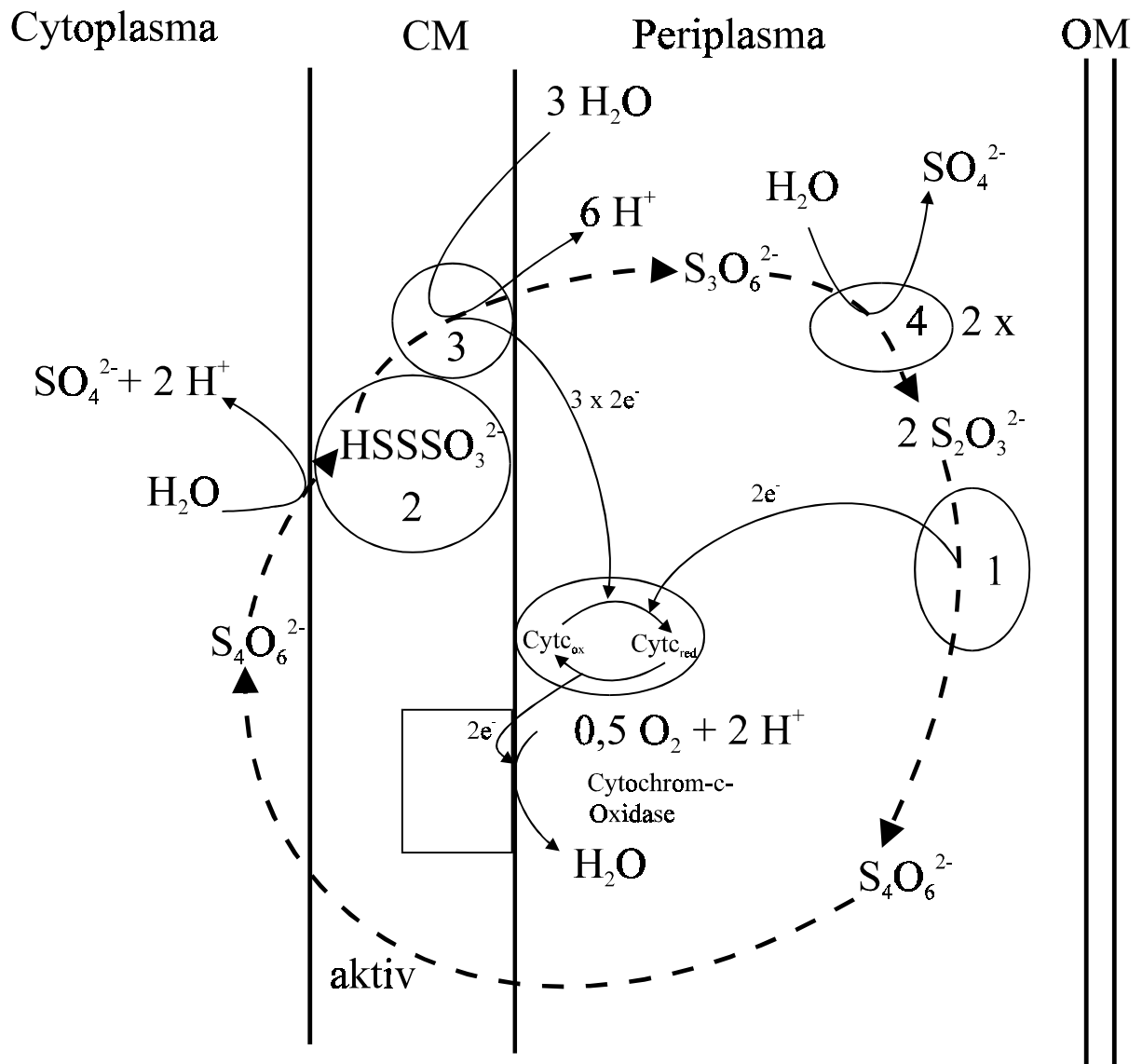


Abb. 5.3 Hypothetisches Modell für die Lokalisation der am Thiosulfatabbau beteiligten Enzyme und Reaktionen bei *Thiomonas intermedia* K12. CM: Cytoplasmamembran; OM: „Outer membrane“; Cyt: Cytochrom-c; red: reduziert; ox: oxidiert; e^- : Elektronen; aktiv: aktiver Transport; DH = Dehydrogenase; $- \rightarrow$ = kreisläufige Hauptreaktionen

1 = Thiosulfat-Dehydrogenase; 2 = Tetrathionat-Hydrolase; 3 = Disulfanmonosulfonsäure-Dehydrogenase; 4 = Trithionat-Hydrolase

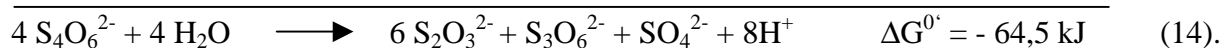
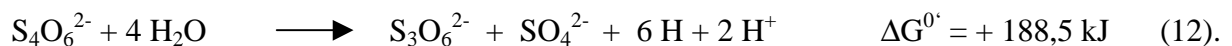
Abbau von Thiosulfat und Polythionaten unter anaeroben Bedingungen

Der Einsatz des Hemmstoffs Cyanid simuliert anaerobe Bedingungen. Die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor wird dadurch unmöglich. Folgerichtig sind bei *Thiomonas intermedia* K12 die Ergebnisse des anaeroben Thiosulfat- und Tetrathionatabbaus nahezu identisch mit denen, die unter Cyanidhemmung erzielt wurden. Unter anaeroben Bedingungen ist die Thiosulfatoxidation ebenfalls blockiert, der Tetrathionatabbau erfolgt jedoch beschleunigt.

Die Stöchiometrie des anaeroben Abbaus von Tetrathionat durch *Thiomonas intermedia* K12 weist auf eine Disproportionierung von Tetrathionat hin. Tetrathionat wird zum Teil oxidiert, nämlich zu Trithionat und Sulfat, und zum Teil reduziert, nämlich zu Thiosulfat.

In der Literatur sind unterschiedliche Disproportionierungsreaktionen für Schwefelverbindungen beschrieben worden. Um zu berechnen, ob diese Reaktionen thermodynamisch sinnvoll sind, wurden die $\Delta G^{0'}$ -Werte von Thauer et al. (1977) herangezogen. Es handelt sich hierbei um Gibbs freie Bildungsenergien unter physiologischen (pH 7) Bedingungen.

Aus der experimentell bestimmten Stöchiometrie (Kap. 4, Tab. 4.3) lassen sich folgende Gleichungen (12 bis 14) zur Disproportionierung von Tetrathionat ableiten.



Aus den Gleichungen 12, 13 sowie 14 ergibt sich, dass die Oxidation von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen durch Disproportionierung in Trithionat und Sulfat sowie Thiosulfat energetisch möglich ist. Die endergonische Reaktion 12 wird durch die exergonische Reaktion 13 ermöglicht.

Für die Bewertung, ob eine Stoffwechselleistung ausreichend Energie zum Wachstum liefert, wird der $\Delta G^{0'}$ -Wert einer Reaktion herangezogen. Grundvoraussetzung für die Nutzung zur Energiegewinnung ist eine exergonische Reaktion, d.h. ein negativer $\Delta G^{0'}$ -Wert. Für die Bildung von 1 mol ATP werden von Thauer et al. (1977) Werte zwischen -41,8 und -50,2 kJ angegeben. Der $\Delta G^{0'}$ -Wert der Gesamtreaktion, also von Oxidation und Reduktion

zusammen, muss mindestens in diesem Bereich liegen, damit die Reaktion zur Energiegewinnung nutzbar ist. Weiter liefert der Wert Hinweise auf die mögliche Art der Energiegewinnung. Eine Substratkettenphosphorylierung, d.h. die Bildung einer energiereichen Zwischenverbindung, deren nachfolgende Hydrolyse direkt zur Bildung von ATP führt, setzt voraus, dass mindestens ein Wert zwischen $-41,8$ und $-50,2$ kJ pro mol Substrat erreicht wird. Niedrigere Werte pro mol Substrat weisen darauf hin, dass die Energiegewinnung durch eine energetisierte Membran erfolgt.

Der $\Delta G^{0'}$ -Wert von $-64,5$ kJ für die Gesamtreaktion der Tetrathionat Disproportionierung bei *Thiomonas intermedia* K12 ist ausreichend, um die Bildung von 1 mol ATP zu ermöglichen. Der $\Delta G^{0'}$ -Wert von $-16,1$ kJ/mol Tetrathionat spricht für einen an Elektronentransport gekoppelten Energiegewinn.

Aus den Ergebnissen ließ sich das in Abb. 5.4 dargestellte Reaktionsschema ableiten.

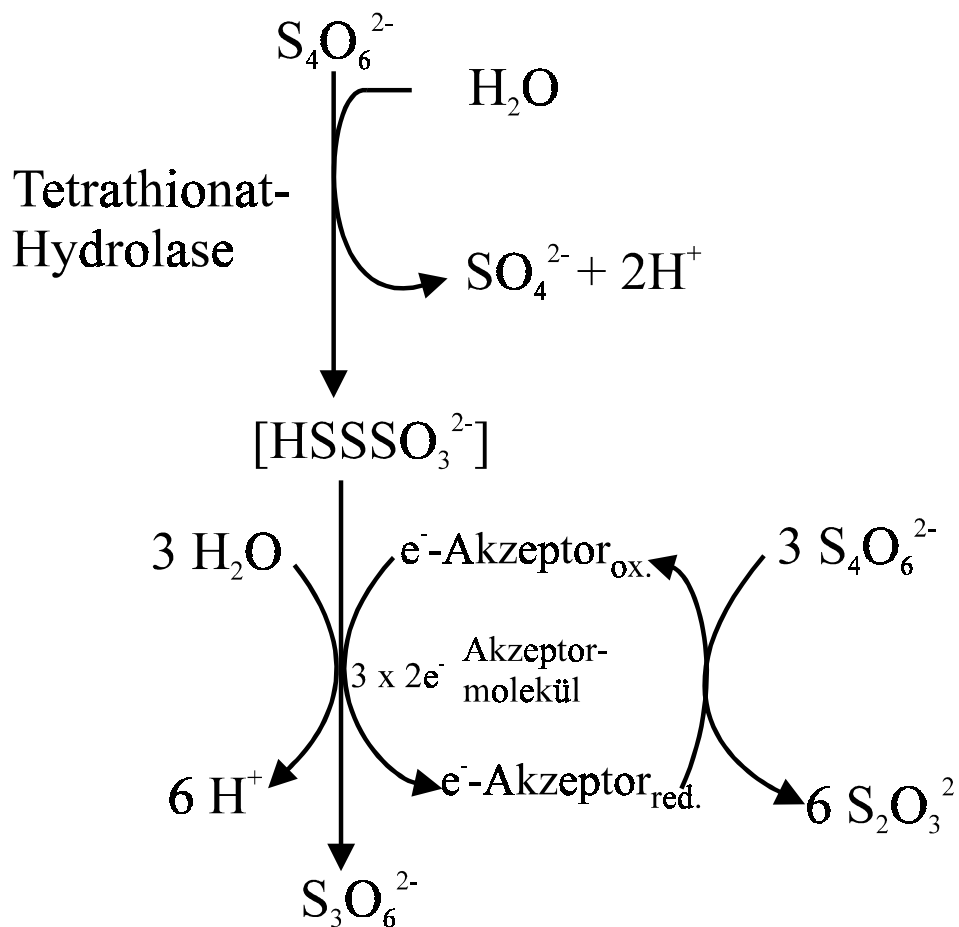


Abb. 5.4 Hypothetisches Modell für die anaerobe Disproportionierung von Tetrathionat in Zellen von *Thiomonas intermedia* K12.

Das Enzym Tetrathionat-Hydrolase hydrolysiert Tetrathionat sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Die dabei entstehende Disulfanmonosulfonsäure wird zu Trithionat oxidiert, wobei die frei werdenden 6 Elektronen auf einen Elektronenakzeptor übertragen werden. Dabei kann es sich z.B. um ein Cytochrom handeln. Die Elektronen werden danach auf Tetrathionat als terminalem Akzeptor übertragen, das dabei zu Thiosulfat reduziert wird.

Von dem marinen Pseudomonaden Stamm 16 B wurde eine Thiosulfat-Oxidase beschrieben, die zusätzlich zur Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat die Umkehrung der Reaktion, nämlich die Reduktion von Tetrathionat zu Thiosulfat katalysiert (Withed und Tuttle, 1983). Auch für *Thiomonas intermedia* K12 ist eine solche Funktion des Enzyms Thiosulfat-Dehydrogenase denkbar.

Untersuchungen des anaeroben Stoffwechsels von Tetrathionat bei anderen Schwefel oxidierenden Bakterien wie *Halothiobacillus neapolitanus* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* wiesen ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 für abgebauten Tetrathionat und gebildetes Thiosulfat auf (Trudinger, 1964a; Kelly und Tuovinen, 1975). Der fehlende Schwefelanteil fand sich in Form von Elementarschwefel und Sulfat wieder. Im Gegensatz zu *Thiomonas intermedia* K12 wurde bei diesen Organismen die durch die Tetrathionat Hydrolyse entstehende Disulfanmonosulfonsäure unter anaeroben Bedingungen nicht weiter oxidiert, vielmehr akkumulierten ihre Zerfallsprodukte.

Der sich aus der Gesamtbilanz des anaeroben Tetrathionatabbaus von *Thiomonas intermedia* K12 ergebende Stoffwechselweg der Disproportionierung von Tetrathionat, also die partielle Nutzung von Tetrathionat als Elektronendonator und auch Akzeptor unter anaeroben Bedingungen, ist vergleichbar mit der anaeroben Fermentation organischer Verbindungen. Bei diesen Reaktionen wird eine organische Verbindung, z.B. Glucose, über die Reaktionen der Glykolyse unter Energiegewinn (Substratkettenphosphorylierung) oxidiert. Außerdem wird ein Abbauprodukt (Pyruvat) dieses Weges zur Regeneration der für die oxidativen Schritte benötigten Elektronenakzeptoren reduziert. Je nach Fermentationsart entstehen dabei z.B. Ethanol, Milchsäure oder Bernsteinsäure.

Die hier aufgezeigte Disproportionierung von Tetrathionat reiht sich in die Vielzahl von ähnlichen Reaktionen ein, die bereits für Disproportionierungsreaktionen von Schwefelverbindungen beschrieben worden sind. Die Nutzung der Disproportionierung von

Schwefelverbindungen zum Wachstum wurde z.B. am Sulfatreduzierer *Desulfovibrio disulfodismutans* (später *Desulfocapsa thiozymogenes*) entdeckt (Bak und Cypionka, 1987; Bak und Pfennig, 1987). Dabei wurden Elementarschwefel, Thiosulfat, Tetrathionat und Sulfit untersucht, wobei nur die Disproportionierung von Thiosulfat (Gleichung 15) oder Sulfit (Gleichung 16) eindeutig an Wachstum gekoppelt sind.

Disproportionierung von Thiosulfat:



Disproportionierung von Sulfit:



Ein nicht Sulfat reduzierender, chemolithoautotropher, ausschließlich durch Disproportionierungsreaktionen wachsender Organismus wurde von Finster et al. (1998) beschrieben. *Desulfocapsa sulfoexigens* ist in der Lage, durch Disproportionierung von Elementarschwefel (Gleichung 17), Thiosulfat (Gleichung 15) oder Sulfit (Gleichung 16) zu wachsen. Die Nutzung der Disproportionierung von Elementarschwefel zum Wachstum ist allerdings nur durch Kopplung mit einer chemischen Sulfidoxidation durch Eisen(III)- oder Mangan(IV)oxide möglich. Die Gesamtreaktion der Schwefeldisproportionierung (Gleichung 17) ist endergonisch und weist unter Standardbedingungen einen $\Delta G^{0'}$ Wert von + 40,9 kJ/mol S^0 auf.

Disproportionierung von Schwefel



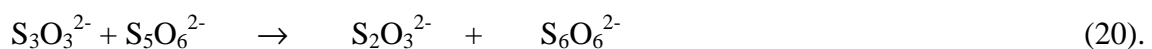
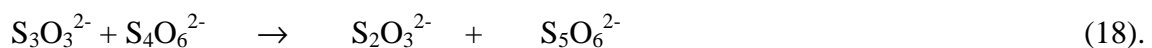
In Gegenwart von Fe(III)-Ionen tritt kein freies Sulfid auf, es liegt in Form von FeS und FeS_2 vor. Das stöchiometrische Verhältnis von verbrauchten Fe(III)-Ionen zu gebildetem Sulfid betrug 2:1. Das Verhältnis wurde bereits von Thamdrup et al. (1993) für die Disproportionierung von Schwefel durch Anreicherungskulturen in Gegenwart von Ferrihydrit gemessen. Mit dem Entzug eines Endproduktes durch die benannten Sulfidfänger wird die Reaktion thermodynamisch möglich und, wie Finster et al. (1998) durch Wachstumsexperimente belegten, für die Bakterien nutzbar.

Der für *Thiomonas intermedia* K12 ermittelte ΔG° -Wert von $-16,1$ kJ/mol Tetrathionat liegt im Bereich derer, die für die Disproportionierung von Thiosulfat und Sulfit durch *Desulfovibrio sulfodismutans* von Bak und Cypionka (1987) veröffentlicht wurden. Die ΔG° -Werte dieser Substrate sind ähnlich niedrig wie die von Tetrathionat und erlauben maximal die Bildung von 1 mol ATP/mol Substrat ($-21,9$ kJ/mol Thiosulfat, $-58,9$ kJ/mol Sulfit).

Wachstum durch Disproportionierung von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen

Die Ergebnisse der Experimente zum anaeroben Wachstum belegen, dass *Thiomonas intermedia* K12 durch Disproportionierung von Tetrathionat wachsen kann. Der Anstieg der Zellzahl auf etwa das Zehnfache der Ausgangszellzahl war vergleichbar mit dem, der für *Desulfocapsa sulfoexigenes* beim Wachstum mit Schwefeldisproportionierung beschrieben worden ist (Finster et al., 1998).

Allerdings lässt sich die aus den Kurzzeitexperimenten abgeleitete Stöchiometrie nicht direkt auf die der Wachstumsexperimente übertragen. Das ist durch das Turnover der Schwefelverbindungen bedingt. Pentathionat, Hexathionat und Elementarschwefel sind ein Resultat der hohen Reaktionsfreudigkeit der intermediär auftretenden Disulfanmonosulfonsäure (Gleichungen 18 bis 21).



Organische Verbindungen zeigten keinen positiven Einfluss auf das anaerobe Wachstum mit Tetrathionat. Lediglich im Falle von Hefeextrakt konnte bereits mit einer Zugabe von 0,05 % eine geringfügige Steigerung des Wachstums beobachtet werden. Höhere Dosierungen führten jedoch zu keinen erhöhten Zellzahlen. Die Zusammensetzung der Schwefelverbindungen war dabei identisch mit der, die in den Versuchen ohne Zusatz von Organik gemessen worden war. Der positive Effekt von 0,05% Hefeextrakt ist vermutlich auf im Hefeextrakt enthaltene Spurenelemente oder Vitamine zurückzuführen. Wenn es sich um

ein im Hefeextrakt enthaltenes Substrat gehandelt hätte, sollte bei zunehmender Konzentration ein besseres Wachstum messbar gewesen sein, was jedoch nicht der Fall war.

Der Ertrag an Trockengewicht pro mol Tetrathionat in Gegenwart von Organik ist identisch mit den unter lithotropen Bedingungen erreichten Werten:

Der Ertrag, ermittelt aus dem Verhältnis vom Zelltrockengewicht zum Zellvolumen von $0,305 \text{ g/cm}^3$ (Neidhardt, 1987), betrug bei lithotropher Anzucht $0.24 \pm 0.08 \text{ g}$ und bei Zusatz von Organik $0.25 \pm 0.1 \text{ g}$ Trockengewicht pro mol verbrauchtem Tetrathionat. Diese Werte sind identisch mit denen, die für *Desulfocapsa sulfoexigenes* beim Wachstum durch Schwefeldisproportionierung bestimmt wurden ($0,24 \text{ g}$ Trockengewicht /mol verbrauchtem Schwefel).

Diese Werte sowie die gesamten Ergebnisse der anaeroben Wachstumsexperimente belegen, dass es sich beim anaeroben Tetrathionatstoffwechsel von *Thiomonas intermedia* K12 um einen lithoautotrophen Stoffwechsel handelt. Eine anaerobe Oxidation organischer Verbindungen unter Übertragung von Elektronen auf Schwefelverbindungen konnte nicht nachgewiesen werden.

Ökologische Bedeutung der anaeroben Disproportionierung von Tetrathionat

Wie bereits durch eine Vielzahl von Autoren beschrieben, spielen Polythionate und andere reduzierte Schwefelverbindungen in Ökosystemen mit wechselnden Sauerstoffverhältnissen eine besondere Rolle. Hierzu zählen Bergbaualtlasten, marine bzw. Süßwassersedimente und Abwassertransportleitungen. In den erwähnten Bereichen kommt es zu periodisch auftretenden und/oder räumlich begrenzten anoxischen Verhältnissen. Mit Hilfe der anaeroben Disproportionierung von Tetrathionat ist es dort lebenden Organismen möglich, periodisch auftretende Situationen von Sauerstoffmangel zu überstehen. Gleichzeitig liefert die Reaktion mit ihrem Produkt Thiosulfat ein Substrat, welches nach Beendigung der anoxischen Verhältnisse leicht verwertbar ist.

Unter strikt anaeroben Bedingungen wird die Disproportionierung von Tetrathionat nur geringe Bedeutung haben, da Polythionate nur in geringen Mengen vorkommen. Das Modell der Disproportionierung von Tetrathionat impliziert ein strategisches Stoffwechselkonzept, mit dem die Bakterien anoxische Milieubedingungen zumindest kurzfristig überdauern können.

In der Literatur sind Disproportionierungsreaktionen zum Energiegewinn ausschließlich bei strikt anaeroben Organismen beschrieben worden. Die Entdeckung der Fähigkeit zur Disproportionierung von Tetrathionat unter anaeroben Bedingungen bei *Thiomonas intermedia* K12, einem bislang als strikt aerob geltenden Organismus, belegt, dass Polythionate als Verbindungen mit intermediärem Redoxzustand von den auf sie spezialisierten Organismen vielfältig genutzt werden können und spiegelt die zentrale Rolle der reduzierten Schwefelverbindungen im Schwefelkreislauf wider. Außerdem stützen die Disproportionierung von Tetrathionat sowie die Ergebnisse der Hemmstoffexperimente die Hypothese des zyklischen Abbaues von Thiosulfat mit Disulfanmonosulfonsäure als Schlüsselverbindung, wie er für acidophile Schwefel oxidierende Bakterien bereits beschrieben worden ist.

6 Literatur

Alexander, K., and M. Volini. 1987. Properties of *Escherichia coli* rhodanese. J. Biol. Chem. **262**: 6595-6604.

Bak, F., and H. Cypionka. 1987. A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulfur compounds. Nature **326**:891-892.

Bak, F., and N. Pfennig. 1987. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. Nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds. Arch. Microbiol. **147**:184-189.

Barrett, E. L., and M. Clark. 1987. Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. Microbiol. Rev. **51**:192-205

Beffa, T., M. Berczy and M. Aragno. 1991. Chemolithoautotrophic growth on elemental sulfur (S^0) and respiratory oxidation of S^0 by *Thiobacillus versutus* and another sulfur-oxidizing bacterium. FEMS Microbiol. Lett. **84**:285-290.

Beffa, T., M. Berczy, and M. Aragno. 1992. Inhibition of respiratory oxidation of elemental sulfur (S^0) and thiosulfate in *Thiobacillus versutus* and another sulfur-oxidizing bacterium. FEMS Microbiol. Lett. **90**:123-128.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye-binding. Ann. Biochem. **72**:248-254.

Brüser, T., Lens, P.L., and H.G. Trüper. 2000. The biological sulfur cycle.. In: Environmental technologies to treat sulfur pollution, p. 47-85. Eds.: P. N. L. Lens and L. Hulshoff Pol. IWA Publishing, London, 2000.

Decker, S. J., and D. R. Lang. 1977. Mutants of *Bacillum megaterium* resistant to uncouplers of oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. **252**: 5936-5938.

Feher, F. 1975. Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie, Teil 1, 2. Auflage. Ed.: G. Brauer, Enke Verlag, Stuttgart.

- Finster, K., W. Liesack, and B. Thamdrup.** 1998. Elemental sulfur and thiosulfate disproportionation by *Desulfocapsa sulfoexigenes* sp. Nov., a new anaerobic bacterium isolated from marine surface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:119-125.
- Friedrich, C. G., A. Quentmeier, F. Bardischewsky, D. Rother, R. Kraft, S. Kostka, and H. Prinz.** 2000. Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **182**:4677-4687.
- Friedrich, C.G., D. Rother, F. Bardischewsky, A. Quentmeier, and J. Fischer.** 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2873-2882.
- Friedrich, C.G..** 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **39**:235-289.
- Fukumori, Y., K. Hoshiko, and Tateo Yamanaka.** 1989. Purification and some properties of thiosulphate-cleaving enzyme from *Thiobacillus novellus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 159-164.
- Goebel, B.M., and E. Stackebrandt.** 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *App. Environ. Microbiol.* **60**:1614-1621.
- Goldhaber, M. B..** 1983. Experimental study of metastable sulfur oxyanion formation during pyrite oxidation at pH 6 – 9 and 30 °C. *American Journal of Science* **283**: 193-217.
- Guffanti, A. A., Clejan, S., Falk, L. H., Hicks, D.B., and Terry A. Krulwich.** Isolation and characterization of uncoupler-resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169** (10): 4469-4478.
- Hallberg, K.B., M. Dopson and E.B. Lindström.** 1996. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**:6-11.
- Hazeu, W., H. Batenburg van der Vetge, P. Bos, R.K. van der Pas, and J.G. Kuenen.** 1988. The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **150**: 574-579.

- Henneke, E., G. W. Luther III, G. J. de Lange, J. Hoefs.** 1997. Sulphur speciation in anoxic hypersaline sediments from the eastern Mediterranean Sea. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**: 307-321.
- Hiraishi, A., Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., Katayama, Y.** 1997. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov.. *Int. J. System. Bac.* **48**:1389-1398.
- Ishimoto, M., J. Koyama, and Y. Nagai.** 1955. Biochemical studies on sulfate reducing bacteria. IV. Reduction of thiosulfate by cell-free extract. *J. Biochem.* **42**: 41-53.
- Ito, M., and Y. Ohnishi.** 1981. Isolation of *Escherichia coli* mutants which are resistant to an inhibitor of H⁺-ATPase tributyltin and also to uncouplers of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **136**: 225-230.
- Jong de, G.A.H., W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1997a. Isolation of tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. *Eur. J. Biochem.* **243**:678-683.
- Jong de, G.A.H., W. Hazeu, P. Bos, and J.G. Kuenen.** 1997b. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**:499-504.
- Jørgensen, B.B.** 1990. The sulfur cycle of freshwater sediments: Role of thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.* **35**(6):1329-1342.
- Kappler, U., C. G. Friedrich, H. G. Trüper, and C. Dahl.** 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**:102-111.
- Katayama, Y., A. Hiraishi and H. Kuraishi.** 1995. *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov. a new species of thiocyanate utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* **141**:1469-1477.
- Kelly, D.P.** 1989. Physiology and biochemistry of unicellular sulfur bacteria. *In: Autotrophic bacteria*, p. 193-218. Eds.: H.G. Schlegel, B. Bowien. Science Tech. Publ., Madison, Ill.

- Kelly, D. P., and O. Tuovinen.** 1975. Metabolism of inorganic sulphur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* and some comparative studies on *Thiobacillus* A2 and *T. neapolitanus*. *Plant and Soil* **43**:77-93.
- Kelly, D.P., and A. H. Harrison.** 1989. Genus *Thiobacillus*. *In: Bergeys Manual of systematic Bacteriology*, 1st edn, vol.3. pp 1842-1858. Eds.: J. T. Staley, M. P. Bryant. N. Pfennig und J. G. Holt. Williams and Wilkins Baltimore, USA.
- Kelly, D.P., and A. P. Wood.** 2000a. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov., and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* **50**:511-516.
- Kelly, D.P., and A. P. Wood.** 2000b. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the β -subclass of the *Proteobacteria*, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* **50**:547-550.
- Kelly, D.P., Mc Donald, I. R., and A.P. Wood.** 2000c. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the α -subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1797-1802.
- Krämer, M., and H. Cypionka.** 1989. Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate and sulfite disproportionating bacteria. *Arch. Microbiol.* **151**:232-237.
- Lane, D.J., A.P. Harrison, Jr., D. Stahl, B. Pace, S.J. Giovannoni, G.J. Olsen and N.R. Pace.** 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**:269-278.
- Lane, D.J., D.A. Stahl, G.J. Olsen, D.J. Heller and N.R. Pace.** 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **163**:75-81.
- Lu, W.P.** 1986. A periplasmic location for the thiosulphate –oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus versutus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**:313-317.
- Lu, W.P., and D. P. Kelly.** 1983. Partial purification and resolution of a thiosulphate-oxidizing system from *Thiobacillus* A2. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1673-1681.

- Lu, W.-P., and D. P. Kelly.** 1988a. Cellular location and partial purification of the thiosulphate-oxidizing enzyme and trithionate hydrolyase from *Thiobacillus tepidarius*. J. Gen. Microbiol. **134**:877-885.
- Lu, W.P., and D.P. Kelly.** 1988b. Kinetics and energetic aspects of inorganic sulphur compound oxidation by *Thiobacillus tepidarius*. J. Gen. Microbiol. **134**:865-876.
- Lu, W.P., B.E.P. Swoboda and D.P. Kelly.** 1985. Properties of the thiosulfate oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus versutus*. Biochim. et Biophys. Acta **828**:116-122.
- Luther, G.W. III, T. M. Church, J. R. Scudlark, and M. Cosman.** 1986. Inorganic and organic sulfur cycling in salt-marsh pore waters. Science **232**: 746-749.
- Lyric, R.M. and I. Suzuki.** 1970. Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. III: Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. Can. J. Biochem. **48**:355-363.
- Masau, R. J. Y, Oh, J. K. , and I. Suzuki.** 2001. Mechanism of oxidation of inorganic compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. Can. J. Microbiol. **47**:348-358.
- Matin, A. and S. C. Rittenberg.** 1971. Enzymes of carbohydrate metabolism in *Thiobacillus* species. J. Bacteriol. **107**: 179-186.
- McDonald, I.R., Kelly, D.P., Murrell, J.C., and A. P. Wood.** 1997. Taxonomic relationship of *Thiobacillus halophilus*, *Thiobacillus aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rRNA sequencing. Arch. Microbiol. **166**:394-398.
- Meulenberg, R., E.J. Scheer, J.T. Pronk, W. Hazeu, P. Bos and J.G.Kuenen.** 1993a. Metabolism of tetrathionate in *Thiobacillus acidophilus*. FEMS Microbiol. Lett. **112**:167-172.
- Meulenberg, R., J. T. Pronk, J. Frank, W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1993b. Purification and partial characterization of thiosulphate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. J. Gen. Microbiol. **139**:2033-2039.
- Meulenberg, R., J. T. Pronk, J. Frank, W. Hazeu, P. Bos, and J.G. Kuenen.** 1992a. Purification and partial characterization of a thermostable trithionate hydrolase from the acidophilic sulphur oxidizer *Thiobacillus acidophilus*. Eur. J. Biochem. **209**:367-374.

- Meulenberg, R., J. T. Pronk, W. Hazeu, P. Bos, and J. G. Kuenen.** 1992b. Oxidation of reduced sulphur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. Arch. Microbiol. **157**: 161-168.
- Milde, K., W. Sand, W. Wolff, and E. Bock.** 1983. Thiobacilli of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. J. Gen. Microbiol. **129**:1327-1333.
- Milde, K..** 1978. Isolierung und Charakterisierung von Thiobacillen aus krrrodierten Abwassersammlern. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Moreira D., and R. Amils.** 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**:522-528.
- Neidhardt, F.C.** 1987. Chemical composition of *Echerichia coli*, p 3-6. In: F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. Escherichai coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology , Washington D.C.
- Okuzumi, M., and Y. Kita.** 1965. Studies on biochemistry of the thiobacilli. Part VI. Oxidation of thiosulfate to tetrathionate by *T. thiooxidans*. Agric. Biol. Chem. **29**:1063-1068.
- Petri, R., L. Podgorsek, and J. F. Imhoff.** 2001. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **197**:171-178.
- Podgorsek, L., and J. F. Imhoff.** 1999. Tetrathionate production by sulfur oxidizing bacteria and the role of tetrathionate in the sulfur cycle of Baltic Sea Sediments. Aquat. Micro. Ecol. **17**:255-265.
- Podgorsek, L..**1998. Oxidative Prozesse des Schwefelcyclus in den Sedimenten der Ostsee. Aerobe bakterielle Umsetzungen von Thiosulfat. Doktorarbeit, Universität Kiel.
- Pollack, M. R, and R. Knox.** 1943. Bacterial reduction of tetrathionate. Biochem. J. **37**:476-481.
- Postgate, J. R.** 1965. Recent advances in the study of sulphate-reducing bacteria. Bacteriol. Rev. **29**:425-444.

Pronk, J.T, R. Meulenberg, W. Hazeu, P. Bos and J.G. Kuenen. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:293-309.

Rainey, F. A., D. P. Kelly, E. Stackebrandt, J. Burghardt, A. Hiraishi, Y., Katayama, and A. P. Wood. 2000. A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov.. *Int. J. Syst. Microbiol.* **49**:645-651.

Rège von, H.. 1999. Bedeutung von Mikroorganismen des Schwefelkreislaufs für die Korrosion von Metallen. Doktorarbeit, Universität Hamburg.

Roy, A. B., and P. A. Trudinger. 1970. The biochemistry of inorganic compounds of sulfur. Cambridge University Press, Cambridge.

Schedel, M. and H.G. Trüper. 1980. Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch. Microbiol.* **121**: 29-36

Schippers, A. 1994. Zusammensetzung von Laugungsbiozosen in Armerzablagerungen und -haufen. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Schippers, A. 1998. Untersuchungen zur Schwefelchemie der biologischen Laugung von Metallsulfiden. Doktorarbeit, Universität Hamburg.

Schippers, A., and B. B. Jørgensen. 2001. Oxidation of pyrite by manganese dioxide in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **65**: 915-922.

Schippers, A., H. von Rège, and W. Sand. 1996a. Impact of microbial diversity and sulfur chemistry on safeguarding sulfidic mine waste. *Minerals Engineering* **9**:1069-1079.

Schippers, A., P.-G. Jozsa and W. Sand. 1996b. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3424-3431.

Schippers, A., R. Hallmann, S. Wentzien, and W. Sand. 1995. Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2930-2935.

Sinha, D.B., and C.C. Walden. 1966. Formation of polythionates and their interrelationships during oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **12**:1041-1054.

- Skłodowska, A..** 1988. Polythionates and adenosinphosphosulphate formation during thiosulfate oxidation by *Thiobacillus neapolitanus*. Can. J. Microbiol. **34**:1283-1287.
- Spector, T..** 1978. Refinement of Coomassie-blue method of protein quantitation. Ann. Biochem. **86**:142-146.
- Studel, R., H.-J. Mäusele, D. Rosenbauer, H. Möckel, and T. Freyholdt.** 1981. Separation and determination of homocyclic sulfur molecules by high pressure liquid chromatography – detection of new sulfur rings. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **20**:394-395
- Studel, R.G., G. Holdt and T. Göbel.** 1987. Chromatographic separation of higher polythionates S_nO_6 ($n= 3..22$) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur excretions. Angew. Chem. Int. Ed. Eng. **26**:151-153.
- Tano, T.H. Kitaguchi, M. Harada, T. Nagasawa and T. Sugio.** 1996. Purification and some properties of a tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. Biosci. Biotech. Biochem. **60**:224-227.
- Thamdrup, B., K. Finster, J. W. Hansen, and F. Bak.** 1993. Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 101-108.
- Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker.** 1977. Energy conservation in chemotrophic bacteria. Bacteriol. Rev. **41**:100-180.
- Trudinger, P. A..** 1964. Products of anaerobic metabolism of tetrathionate by *Thiobacillus X*. Aust. J. Biol. Sci. **17**:446-458.
- Trudinger, P. A..** 1964. The metabolism of trithionate by *Thiobacillus X*. Aust. J. Biol. Sci. **17**:459-468.
- Tuttle, J. H..** 1980. Thiosulfate oxidation and tetrathionate reduction by a marine pseudomonad 16B. App. Environ. Microbiol. **39**:1159-1166.
- Tuttle, J. H., and H. W. Jannasch.** 1973. Dissimilatory reduction of inorganic sulfur by facultatively anaerobic marine bacteria. J. Bacteriol. **115**:732-737.

Tuttle, J. H., P. E. Holmes, and H. W. Jannasch. 1974. Growth rate stimulation of marine pseudomonads by thiosulfate. *Arch. Microbiol.* **99**:1-14.

Vishniac, W. 1952. The metabolism of *Thiobacillus thioparus*. I. The oxidation of - thiosulfate. *J. Bacteriol.* **64**:363-373.

Wentzien, S. 1991. Mikrokalorimetrische Untersuchungen zum Thiosulfatabbau von Thiobacillen. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Wentzien, S., W. Sand, A. Albertsen, and R. Steudel. 1994. Thiosulfate and tetrathionate degradation as well as biofilm generation of *Thiobacillus intermedius* and *Thiobacillus versutus* studied by microcalorimetry and ion-pair-chromatography. *Arch. Microbiol.* **161**:116-125.

Whited, G. M., and J. H. Tuttle. 1983. Separation and distribution of thiosulfate oxidizing enzyme, tetrathionate reductase in extracts of marine heterotroph strain 16B. *J. Bacteriol.* **156**:600-610.

Woese, C. R., W. G. Weisburg, P. J. Paster, C. M. Hahn, R. S. Tanner, N. R. Krieg, H.-P. Koops, H. Harms, and E. Stackebrandt. 1984. The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**:327-336.

Wolff, W. 1981. Identifizierung von fakultativ chemolithoautotrophen Thiobacillen. Diplomarbeit, Universität Hamburg.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Privatdozent Dr. Wolfgang Sand für die Themenstellung, seine intensive Betreuung, seine wertvollen Anregungen, seine ständige Bereitschaft zur kritischen Diskussion und seine Geduld.

Prof. Dr. Peter Fortnagel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Thore Rohwerder, Axel Schippers und Tilman Gehrke danke ich für wertvolle Anregungen und das kritische Lesen meiner Arbeit.

Von unschätzbarem Wert war die Unterstützung von Thore Rohwerder bei der Analytik der Schwefelverbindungen und Dirk Wagner bei der anaeroben Kulturtechnik.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Sand und Bock, die ich während meiner Promotionszeit kennenlernen durfte, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Matthias, sowie Beatrice Peter.

Lebenslauf

Name: Susanne Wentzien

Geburtsdatum: 5.10.1964 in Hamburg

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: verheiratet seit dem 21.08.1992

Kinder: Helen Wentzien, geb. 12.04.94
Lino Wentzien, geb. 30.07.01

1970 – 1974 Grundschule in Hamburg

1974 – 1983 Besuch der kooperativen Gesamtschule Heinrich-Hertz,
Abteilung Gymnasium, Schulabschluss: Juni 1983/Abitur

1983-1985 Bürotätigkeit in der LVA Freie und Hansestadt Hamburg

1985-1991 Biologiestudium an der Universität Hamburg
Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Biochemie, Hydrobiologie
Diplomarbeit zum Thema: „Mikrokalorimetrische Untersuchungen
zum Thiosulfatabbau von Thiobacillen“.
Studienabschluss: 13.12.1991/Diplombiologin

1992-2002 Dissertation an der Universität Hamburg zum Thema: „Thiosulfat-
und Polythionatstoffwechsel bei *Thiomonas intermedia* K12“ und

1992-1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in drei Drittmittelprojekten im
Themenbereich Sanierung von Bergbaualtlasten in Kooperation mit
der Wismut GmbH und der TU Clausthal, unterbrochen durch einen
2-jährigen Erziehungsurlaub

1999 - Dez. 2000 Tätigkeit als Biologin für die Dr. Miller Pharma GmbH.
Tätigkeitsfeld: Überwachung und Etablierung von GMP-Regularien
im Produktionsbetrieb, Methodenentwicklung und Optimierung.

Jan. – März 2001 freiberufliche Beratungstätigkeit für die Dr. Miller Pharma GmbH.

seit Juni 2001 Mutterschutz und Erziehungsurlaub