

Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei acidophilen Laugungsbakterien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Thore Rohwerder
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 Professor Dr. P. FORTNAGEL

Tag der Disputation: 15. November 2002

Hamburg, den 31. Oktober 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read "U. Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1996 bis September 2002 in der Abteilung Mikrobiologie des Instituts für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg unter Betreuung von Privatdozent Dr. Wolfgang Sand angefertigt.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie über das Umweltbundesamt und durch die Max-Buchner-Stiftung der DECHEMA e. V. durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Elementarschwefel im Schwefelkreislauf	3
2.2	Elementarschwefel in der biologischen Laugung.....	5
2.3	Enzymatische Oxidation von Schwefelverbindungen.....	8
2.4	Ziel der vorliegenden Arbeit	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Mikrobiologie.....	17
3.1.1	Bakterienstämme	17
3.1.2	Nährmedien und Waschlösung.....	18
3.1.3	Stammkulturen.....	20
3.1.4	Zwischenkulturen	20
3.1.5	Massenanzucht und Zellernte.....	20
3.1.6	Reinheitskontrolle	22
3.1.7	Gesamtzellzahl	22
3.2	Versuchsdurchführung.....	23
3.2.1	Versuche mit ganzen Zellen	23
3.2.2	Arbeiten unter anaeroben Bedingungen	23
3.2.3	Herstellung von zellfreien Systemen.....	23
3.2.4	Aktivitätstests für das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem	24
3.3	Analyse der Schwefelverbindungen.....	27
3.3.1	Probenvorbereitung	27
3.3.2	Ionenpaarchromatographie: GSH und GSH-Derivate, Thiosulfat, Polythionate, p-Toluolsulfinat und p-Toluolthiosulfonat.....	27
3.3.3	Reversed-Phase-Chromatographie: Elementarschwefel	35
3.3.4	Ionenaustauschchromatographie: Sulfit, Sulfat und Thiosulfat	36
3.3.5	Quantifizierung von Hydrogensulfid	37
3.3.6	Darstellung der Messergebnisse	38
3.4	Weitere analytische Methoden.....	38
3.4.1	Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen.....	38
3.4.2	pH-Wert, Redoxpotenzial.....	39
3.4.3	Proteinbestimmung.....	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Vorversuche mit intakten Zellen.....	41
4.2	Identifizierung der <i>in vitro</i> bei der enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel auftretenden Schwefelverbindungen	43
4.2.1	Oxidation von Elementarschwefel durch ein zellfreies System von <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> R1	43

4.3	Kinetische Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel.....	52
4.3.1	Bildung von höheren Bisorganylpolysulfanen in Abhängigkeit von der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation	52
4.3.2	GSH-Oxidation und Sulfidbildung in Abhängigkeit von der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation	58
4.3.3	Produkte der Elementarschwefel-Oxidation.....	73
4.4	Untersuchungen zur Substratspezifität der Schwefel-Dioxygenase.....	79
4.4.1	Thiosulfat als Substrat	79
4.4.2	Tetrathionat als Substrat.....	80
4.4.3	p-Toluolthiosulfonat als Substrat.....	82
4.4.4	Höhere Bisorganylpolysulfane des GSSG als Substrat	84
4.4.5	Hydrogensulfid plus GSSG als Substrat	86
4.5	Untersuchungen zu alternativen Elektronenakzeptoren.....	88
4.6	Weitere Eigenschaften der Schwefel-Dioxygenase	89
4.6.1	Spezifische Aktivitäten und K_m -Werte für GSH	89
4.6.2	pH-Abhängigkeit der Aktivität.....	92
5	Diskussion	95
5.1	Verwendung von grobdispertiertem Elementarschwefel	95
5.2	Monoorganylpolysulfane als exklusive Substrate der Schwefel-Dioxygenase	96
5.3	Sulfit als exklusives Produkt der Schwefel-Dioxygenase	101
5.4	Reaktivität der Schwefel-Dioxygenase gegenüber alternativen Elektronenakzeptoren	102
5.5	Weitere Eigenschaften der Schwefel-Dioxygenase	104
5.6	Synopse: Mechanismus für die Oxidation von Elementarschwefel bei acidophilen Laugungsbakterien	108
5.7	Ausblick: Gibt es ein universelles System für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel?.....	111
6	Literatur	115
7	Liste der eigenen Veröffentlichungen	135

1 Zusammenfassung

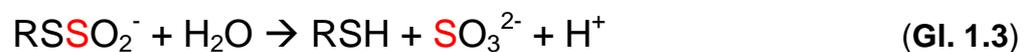
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das von reduziertem Glutathion (GSH) abhängige Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem der acido-mesophilen Laugungsbakterien unter Berücksichtigung der *in vitro* ablaufenden Schwefelchemie untersucht. Ziel war es, den Oxidationsmechanismus im Detail zu verstehen. Dazu wurden die Aktivitäten für die Oxidation von Elementarschwefel in zellfreien Systemen von zwei Stämmen der Art *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSM 504 und K6), von einem Stamm der Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* (R1) und zum ersten Mal in diesem Zusammenhang von dem Typstamm der Art *Acidiphilium acidophilum* (DSM 700) analysiert.

Unter aeroben Bedingungen und ohne Zugabe weiterer externer Elektronenakzeptoren wurde nur in Anwesenheit von GSH Elementarschwefel durch Rohextrakte aller 4 untersuchten Schwefeloxidanten enzymatisch abgebaut. Als Oxidationsprodukte wurden überwiegend Thiosulfat und in geringerem Umfang das Glutathion-S-Sulfonat (GSSO_3^-) und Sulfat identifiziert. Des Weiteren traten in diesen Enzymtests neben freiem Sulfid das Disulfid des GSH (GSSG) und dessen höhere Homologe bis zum Bisorganylpentasulfan (GS_5G) auf. Letztere Verbindungen sind das Ergebnis der nicht-enzymatischen Reduktion von Elementarschwefel durch GSH, die über die sehr reaktiven Monoorganylpolysulfane des GSH (GS_nH) verläuft. Durch kinetische Studien zur enzymatischen Oxidation und nicht-enzymatischen Reduktion von Elementarschwefel konnte bewiesen werden, dass allein der Sulfanschwefel der intermediär auftretenden Monoorganylpolysulfane durch das Enzymsystem oxidiert wird. Weder das freie Sulfid noch die höheren Bisorganylpolysulfane konnten als Substrat genutzt werden. Auch mit weiteren Sulfanschwefel enthaltenden Verbindungen wie Tetrathionat oder p-Toluolthiosulfonat konnten keine Oxidationsaktivitäten detektiert werden. Da unter den Versuchsbedingungen die höheren Monoorganylpolysulfane des GSH sehr instabil sind, wird angenommen, dass exklusiv das Monoorganyldisulfan (GSSH), auch als Persulfid bezeichnet, von dem Enzymsystem oxidiert wird.

Als unmittelbares Oxidationsprodukt wurde für alle Stämme einheitlich Sulfit identifiziert, das in den Testansätzen rasch nicht-enzymatisch mit Elementarschwefel zu Thiosulfat weiterreagierte, aber durch Zugaben von GSSG abgefangen werden konnte. Mit GSSG bildet Sulfit dabei das Glutathion-S-Sulfonat. Die geringen Mengen an Sulfat wurden wahrscheinlich durch Autoxidation des Sulfits verursacht.

Unter anaeroben Bedingungen konnte in keinem Fall mit alternativen Elektronenakzeptoren wie Eisen(III)-Komplexen, Quinonen oder Nitrat Elementarschwefel enzymatisch oxidiert werden. Allein GSH wurde durch einen Teil der eingesetzten Elektronenmediatoren oxidiert.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgender Mechanismus für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel bei acido-mesophilen Schwefeloxidanten ableiten: Das S₈-Ringsystem muss zunächst durch eine Thiolverbindung (RSH) aufgebrochen werden, da es nicht direkt als Substrat genutzt werden kann (**Gl. 1.1**). *In vitro* wird hierzu GSH eingesetzt. Bei dem Aktivierungsschritt entstehen Monoorganylpoly-sulfane, von denen das Persulfid (RSSH) die stabilste Stufe darstellt. Der Sulfan-schwefel des Persulfids wird enzymatisch oxidiert, wobei das S-Sulfinat (RSSO₂⁻) gebildet wird (**Gl. 1.2**). Abschließend wird Sulfit hydrolytisch abgespalten und somit das Thiol regeneriert (**Gl. 1.3**).



Oxidiert wird also nur Schwefel, der wie Elementarschwefel die Oxidationsstufe 0 aufweist. Zumindest für die *in vitro* stattfindenden Prozesse kann davon ausgegangen werden, dass der oxidative Schritt eine Dioxygenase-Reaktion ist (**Gl. 1.2**). Somit enthalten alle 4 untersuchten Stämme eine Elementarschwefel-Dioxygenase. Bei dem *in vivo* aktiven Thiol handelt es sich wahrscheinlich um eine membrangebundene Gruppe, da mit den Rohextrakten, die im Wesentlichen alle löslichen Zellbestandteile enthielten, ohne GSH keine Aktivität beobachtet wurde.

Aktivitäten für die Elementarschwefel-Dioxygenase wurden bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unabhängig davon gefunden, ob die Zellen mit Elementarschwefel oder mit Eisen(II)-Ionen angezogen worden waren. Dagegen wiesen im Falle von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T heterotrophe Zellen nur 30 % derjenigen Aktivität auf, wie sie bei autotroph mit Elementarschwefel gewachsenen Zellen gemessen wurde. Insgesamt wurden bei pH 6,5 und 30 °C mit Rohextrakten der 4 untersuchten Schwefeloxidanten spezifische Aktivitäten von 1 bis 28 µmol/h/(mg Protein) für den enzymatischen Abbau von Elementarschwefel erhalten. Die K_m-Werte für GSH lagen zwischen 110 und 250 µM. Erwartungsgemäß konnte bei dem ebenfalls getesteten Typstamm von *Leptospirillum ferrooxidans* keine Aktivität für die Elementarschwefel-Dioxygenase beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu wurden mit dem Typstamm der obligat heterotrophen Art *Acidiphilium cryptum* mit 0,2 bis 0,4 µmol/h/mg geringe Aktivitäten nachgewiesen. Das pH-Optimum der Dioxygenase lag für *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T um 7,5, und bei einem pH-Wert ≤ 3,5 war das Enzym inaktiv. Diese Ergebnisse sprechen für eine cytoplasmatische Lokalisierung des Systems.

2 Einleitung

2.1 Elementarschwefel im Schwefelkreislauf

Die Redoxprozesse zwischen Sulfat und Sulfid bezeichnet man als Schwefelkreislauf. Sulfat stellt dabei die am höchsten oxidierte Form dar, die für Schwefel eine Oxidationszahl von +6 aufweist. Sulfid dagegen ist mit einer Oxidationsstufe von -2 die reduzierteste Verbindung. Unter den in unserer Biosphäre vorherrschenden, gemäßigten Druck- und Temperaturverhältnissen wird dieser Kreislauf weitestgehend durch assimilatorische und dissimilatorische mikrobielle Vorgänge kontrolliert (Ferguson 1988, Ehrlich 2002). Mit einer Oxidationsstufe von 0 spielt Elementarschwefel in diesem Kreislauf wie Thiosulfat und andere intermediäre Schwefelverbindungen eine Vermittlerrolle zwischen Sulfid und Sulfat.

Elementarer Schwefel wird dabei hauptsächlich durch die Oxidation von Hydrogensulfid gebildet (Ehrlich 2002). Er kann somit praktisch in allen Lebensräumen angetroffen werden, in denen Sulfid durch Mineralisation schwefelhaltiger, organischer Substanz oder durch dissimilatorische Sulfatreduktion (Widdel 1988, Barton 1995) freigesetzt wird, und ein Elektronenakzeptor wie Sauerstoff oder Nitrat für die Oxidation des Sulfids zur Verfügung steht. Die Oxidation erfolgt oft bereits abiotisch (Chen & Morris 1972, O'Brien & Birkner 1977, Millero & Hershey 1989), kann aber z. B. in marinen Sedimenten bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck durch Vertreter der Gattungen *Beggiatoa* und *Thiovulum* um den Faktor 10^2 bis 10^5 beschleunigt werden (Jørgensen & Revsbech 1983). Die Oxidation zum Elementarschwefel wird hier zum chemolithotrophen Wachstum genutzt. Des Weiteren kann Hydrogensulfid von vielen Gruppen phototropher Mikroorganismen als Elektronendonator verwendet werden (Trüper 1975, Brune 1995).

Von den zahlreichen bekannten, stets hydrophoben Allotropen des Elementarschwefels (Meyer 1964, 1976) kommt in unserer Biosphäre fast nur der ringförmige Octasulfanschwefel (S_8) vor. Im wässrigen System bilden sich deshalb bei der Sulfidoxidation zunächst S_8 -Aggregate (Steudel 1996) und schließlich rhombische Kristalle (α - S_8). Diese besitzen bei 25 °C eine Löslichkeit von nur 156 nM (Boulegue 1978) und stellen unterhalb von etwa 96 °C die thermodynamisch stabilste Form von elementarem Schwefel dar (Schmidt 1973, Hollemann et al. 1985, Steudel 2000). Einige Sulfidoxidanten wie *Beggiatoa*-Arten (Lawry et al. 1981) und die phototrophen *Chromatiaceae* (Hageage et al. 1970, Pattaragulwanit et al. 1998) können Elementarschwefel im Periplasma speichern und nach Erschöpfen des Sulfidpools weiteroxidieren. Die Kristallisation in diesen Schwefeltröpfchen wird offenbar verzögert, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, ob lediglich Mikrokristallaggregate von S_8 (Pasteris et al. 2001, Pickering et al. 2001) oder möglicherweise andere, dann

metastabile, Schwefelallotrope sowie organische Polysulfanverbindungen vorliegen (Prange et al. 1999, 2002).

Der durch die Sulfidoxidation entstandene elementare Schwefel kann in einem so genannten kleinen Schwefelkreis gleich wieder dissimilatorisch zu Sulfid reduziert werden. Ein derart kurzgeschlossener Schwefelkreis wurde beispielsweise bei einer syntrophen Bakteriengemeinschaft aus photolithotrophen Sulfidoxidanten und dem Schwefelreduzierer *Desulfuromonas acetoxidans* gefunden (Pfennig & Biebl 1976). Elementarschwefel kann aber auch bis zum Sulfat oxidiert werden. Während im alkalischen Milieu eine Disproportionierung zu Sulfid, Polysulfiden, Sulfit und Thio-sulfat führt (Steudel 2000) und somit auch abiotisch oxidierbare Verbindungen entstehen, zeichnet sich Elementarschwefel in wässrigen Systemen mit neutralem und insbesondere saurem pH-Wert durch eine vergleichsweise geringe Reaktions-freudigkeit aus. Hier erfolgt die Oxidation nahezu ausschließlich durch bakterielle Katalyse. Wird der durch die Sulfidoxidation freigesetzte Elementarschwefel in diesen Lebensräumen nicht biologisch weiteroxidiert, akkumuliert er. Auf diese Weise sind vermutlich viele Lagerstätten von elementarem Schwefel wie z. B. in Salzdomen entstanden (Jones et al. 1956, Ehrlich 2002).

Mikroorganismen, die Elementarschwefel oxidieren, kommen in allen größeren prokaryotischen Entwicklungslinien vor (Lane et al. 1992, Friedrich 1998, Skirnisdottir et al. 2001) und sind wie ihr Substrat in fast allen Lebensräumen nachzuweisen. Besonders spektakulär sind allerdings Biotope, deren Sulfid- und damit auch Elementarschwefel-Pool ständig durch geologische Vorgänge aufgefüllt werden, und dadurch ein Ungleichgewicht im Schwefelkreislauf entsteht. So sind Solfataren schwefelreiche, vulkanische Gasquellen, bei denen magmatisches Hydrogensulfid und z. T. auch Schwefeldioxid zusammen mit Wasserdampf an die Erdoberfläche gelangen (Richter 1992). Bekannt sind auch die hydrothermalen Sulfidquellen submariner Vulkanregionen. In Spalten eingesickertes Meerwasser wird durch Magma erhitzt, löst dann Mineralien wie z. B. Metallsulfide aus Basaltgestein heraus und transportiert sie zur Oberfläche. Bei ≥ 300 °C erfolgt vermutlich auch eine Reduktion des im Meerwasser enthaltenen Sulfats durch Eisen(II)-Ionen (Jannasch & Mottl 1985). Das hydrothermale Wasser ist oft durch Metallsulfidpräzipitate schwarz gefärbt (black smoker). Andere Sulfidquellen basieren beispielsweise auf der Mobilisierung von mit Erdölfeldern assoziierten Sulfidreservoirs (Ehrlich 2002). In Abwesenheit von Licht sind freie oder symbiotische chemolithoautotrophe Schwefel-oxidanten in diesen Biotopen für einen Großteil der Primärproduktion verantwortlich (Corliss et al. 1979, Sarbu et al. 1996). Außerdem können derartige Standorte stark durch die stets mit der Oxidation zum Sulfat verbundene Säurebildung geprägt werden. So liegt den meisten natürlichen Lebensräumen mit extrem acidophilen pH-Werten dieser Mechanismus zugrunde (Johnson 1998). In Karstgebieten mit geo-thermalen oder anderen Sulfidquellen kommt es infolge der bakteriellen Schwefel-säurebildung zur Auflösung des Gesteins. Es sind sogar Höhlensysteme bekannt, die

ihre Entstehung im Wesentlichen dieser Oxidationsaktivität verdanken (Northup & Lavoie 2001). Beispiele hierfür sind die Movile-Höhle in Rumänien (Sarbu et al. 1994), Lechuguilla in den USA (Cunningham et al. 1995) und die Cueva de Villa Luz in Mexiko (Hose & Pisarowicz 1999). Große Probleme bereitet die Schwefelsäurekorrosion in Abwasserleitungen. Durch bakterielle Oxidation von Schwefelverbindungen, die mit dem Abwasser kontinuierlich nachgeliefert werden, bildet sich Schwefelsäure an den Kanalwänden. Lokal können pH-Werte unter 1 entstehen, so dass die üblicherweise aus Beton bestehenden Wände stark geschädigt werden (Parker 1947, Milde et al. 1983, Sand 2001, Vincke et al. 2001).

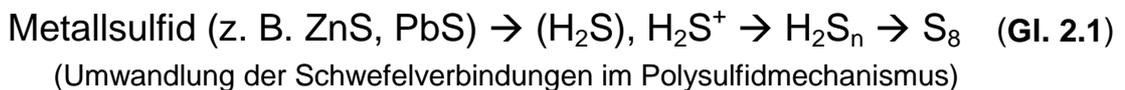
2.2 Elementarschwefel in der biologischen Laugung

Andere anthropogene Lebensräume für acidophile Schwefeloxidanten werden durch bergbauliche Aktivitäten geschaffen. Zusammen mit den acidophilen Eisen(II)-Ionen oxidierenden Bakterien werden sie hier als Laugungsbakterien bezeichnet. Unter biologischer Laugung versteht man generell die Mobilisierung von Schwermetallen aus schwerlöslichen Verbindungen, namentlich den Metallsulfiden, mit der Hilfe von Mikroorganismen (Lundgren & Silver 1980, Hutchins et al. 1986, Rossi 1990, Ehrlich & Brierley 1990, Rawlings 1997, Rohwerder et al. 2002). Während die Extraktion nicht-oxidierbarer Metallverbindungen wie Carbonate und Oxide durch heterotrophe Mikroorganismen noch erprobt wird (Bosecker 1997, Willscher & Bosecker 2001), handelt es sich bei der klassischen biologischen Laugung von Metallsulfiden heute um eine Technologie erster Wahl (Rohwerder et al. 2002). Die Metallsulfide werden dabei durch die Laugungsbakterien zu Schwefelsäure und darin gelösten Metallkationen oxidiert.

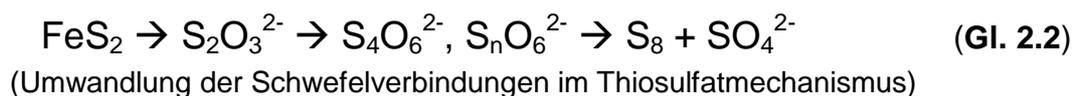
Zum einen wird dieses Verfahren zur Gewinnung der in den Sulfiden gebundenen Metalle eingesetzt, wie z. B. Kupfer aus Covellin (CuS) und Chalcopyrit (CuFeS_2) (Murr 1980). Zum anderen ist es aber auch ein Mittel, störende sulfidische Verbindungen zu entfernen. So liegen Silber und Gold in natürlichen Erzen meist elementar vor, sind aber von einem Mantel aus Metallsulfiden wie Pyrit (FeS_2) oder Arsenopyrit (FeAsS) umschlossen. Um die Edelmetalle durch Cyanidlaugung oder durch andere Extraktionsverfahren gewinnen zu können, müssen zuvor die vergesellschafteten Metallsulfide entfernt werden. Dieses geschieht heute durch biohydrometallurgische Verfahren, bei denen Erzkonzentrate in Reaktoren (Tanklaugung) durch Laugungsbakterien oxidiert werden (Rawlings & Silver 1995). So werden im zurzeit größten Betrieb dieser Art in Obuasi, Ghana (Ashanti Goldfields Company), etwa 1000 t Erzkonzentrat pro Tag in einem Reaktorvolumen von insgesamt 21.600 m^3 biologisch gelaugt (Dew et al. 1997). Neben der Gewinnung von Wertmetallen kann die biologische Laugung auch zur Entschwefelung von Kohle genutzt werden (Rossi 1993), da hier der oxidierbare Schwefel zum größten Teil als Pyrit oder Markasit vorliegt.

Überall dort aber, wo Laugungsbakterien unkontrolliert Metallsulfide – insbesondere Pyrit – oxidieren, kann es zu einer ernsthaften Schädigung der Umwelt kommen (Evangelou 1995, Nordstrom 2000). In Bergbaualtlasten wie aufgelassenen Tagebauen und Stollen sowie Halden mit Abraum oder anderen Bergbaurückständen finden grundsätzlich die gleichen Laugungsprozesse statt wie in den Bioreaktoren, sofern nicht verhindert wird, dass Luft und Wasser in noch sulfidhaltiges Material eindringen können. Die Konsequenz sind schwefelsaure, schwermetallhaltige Abwässer, die weltweit eine Begleiterscheinung bergbaulicher Aktivitäten darstellen und unter ungünstigen Bedingungen Oberflächengewässer und das Grundwasser kontaminieren können (Schippers et al. 1995, 2000, Schippers & Bosecker 2002, Nordstrom & Alpers 1999).

In Abhängigkeit von der Art des Metallsulfids erfolgt dessen Auflösung durch eine Kombination aus Protolyse und Oxidation oder allein durch Oxidationsmittel wie Eisen(III)-Ionen (Schippers & Sand 1999, Sand et al. 2001). In beiden Fällen wird der Prozess durch elektrochemische Reaktionen kontrolliert, die direkt auf der Sulfidoberfläche ablaufen. Aus säurelöslichen Sulfiden wie Sphalerit (ZnS), Galenit (PbS) und Covellin kann schon durch einen reinen Protonenangriff Hydrogensulfid freigesetzt werden. Da aber Eisen(III)-Ionen oder andere Oxidationsmittel stets in der Laugungslösung vorhanden sind, wird vermutlich meist eine bereits oxidierte Verbindung wie das Sulfidkation frei (Rohwerder et al. 2002). Dieses wird dann über Polysulfide überwiegend zu Elementarschwefel oxidiert (**Gl. 2.1**), sodass man hier von dem Polysulfidmechanismus spricht (Schippers 1998, Schippers & Sand 1999).



Säureunlösliche Metallsulfide wie Pyrit und Molybdänit (MoS_2) werden über den Thiosulfatmechanismus abgebaut (Schippers 1998, Schippers & Sand 1999). Das Sulfid des Pyrits wird dabei in mehreren Schritten durch Eisen(III)-Ionen oxidiert, bis schließlich Thiosulfat freigesetzt wird (Moses et al. 1987, Luther 1987, Schippers et al. 1996). Dieses wird über Polythionate zum Sulfat oxidiert, wobei auch beträchtliche Mengen an Elementarschwefel anfallen können (**Gl. 2.2**).



Bei pH-Werten um 1 bis 2 werden für eine Auflösung nach dem Polysulfid- und Thiosulfatmechanismus zunächst nur Eisen(III)-Ionen benötigt, die allerdings bei der Oxidation der Schwefelverbindungen reduziert werden. Eine Reoxidation erfolgt unter sauren Bedingungen nahezu ausschließlich durch Eisen(II)-Ionen oxidierende Bakterien, da hierbei eine abiotische Oxidation praktisch nicht stattfindet (Singer & Stumm 1970). Eine Auflösung von Metallsulfiden kann also bereits allein durch ob-

ligate Eisenoxidierer wie *Leptospirillum ferrooxidans* (Hippe 2000) verursacht werden. Bei der Laugung in Abwesenheit von Schwefeloxidanten akkumuliert allerdings Elementarschwefel. Der Sulfidschwefel säurelöslicher Metallsulfide wird zu über 90 % in diese Verbindung überführt (Schippers & Sand 1999) und bei der Oxidation von Pyrit entstehen im Sauren neben Schwefelsäure als Hauptprodukt etwa 10 bis 20 % Elementarschwefel, wenn keine Schwefeloxidanten aktiv sind (Rohwerder et al. 1998, Schippers et al. 1996, 1999).

In biotechnologischen Anlagen zur Laugung von Metallsulfiden führt eine Akkumulation von elementarem Schwefel zu einer Vielzahl von Problemen, sodass i. d. R. großer Wert auf eine gut funktionierende biologische Schwefeloxidation gelegt wird (Rawlings 1997). So müssen insbesondere beim Polysulfidmechanismus durch die Oxidation von Elementarschwefel Protonen nachgeliefert werden, die zuvor bei der Auflösung der Metallsulfide verbraucht wurden. Des Weiteren liegen Aggregate und Kristalle von Elementarschwefel nicht nur frei suspendiert vor, sondern können auch Ablagerungen auf den Sulfidoberflächen bilden (de Donato et al. 1993, Mustin et al. 1993, Fowler & Crundwell 1999). Hierdurch wird die Diffusion von Sauerstoff und Eisenionen zur Sulfidoberfläche beeinträchtigt sowie das elektrochemische Verhalten des Metallsulfids verändert und somit die gesamte Laugung gebremst. Im Falle der biologischen Goldgewinnung führt eine Anhäufung von elementarem Schwefel während der Laugung zu einem unnötig hohen Cyanidverbrauch bei der nachgeschalteten Cyanidlaugung durch Bildung von Thiocyanat (Hackl & Jones 1997). Neben der Bereitstellung von Eisen(III)-Ionen und der Oxidation von Elementarschwefel und anderen Schwefelverbindungen können Laugungsbakterien wahrscheinlich durch Anheftung an die Sulfidoberfläche auch direkt den elektrochemischen Auflösungsprozess beeinflussen. So wird ein besonderer Reaktionsraum zwischen Sulfidoberfläche und Bakterienzelle postuliert (Sand et al. 1995). In diesem Raum sollen von der übrigen Laugungslösung abweichende Redoxpotenziale (Gehrke et al. 1998, 2001, Sand et al. 2001) und pH-Werte (Fowler et al. 1999) vorherrschen, die zu einer beschleunigten Sulfidauflösung beitragen.

Vertreter von strikt chemolithoautotrophen, Schwefel oxidierenden Laugungsbakterien sind Arten der Gattung *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood 2000). Unter diesen γ -Proteobakterien finden sich Spezialisten wie *Acidithiobacillus thiooxidans* (Waksman & Joffe 1922) und *Acidithiobacillus caldus* (Hallberg & Lindström 1994), die nur Schwefelverbindungen oxidieren können. Mit *Acidithiobacillus ferrooxidans* gibt es aber auch einen Vertreter mit einem ausgesprochen vielseitigen Stoffwechsel. So kann diese Art sowohl Schwefel- als auch Eisenverbindungen chemolithotroph oxidieren (Temple & Colmer 1951). Auch sind Stämme bekannt, die mit Wasserstoff zu wachsen vermögen (Drobner et al. 1990, Ohmura et al. 2002). Die Gattung *Acidiphilium* umfasst chemoorganotrophe α -Proteobakterien, die regelmäßig in mesophilen Laugungsbiotopen anzutreffen sind (Harrison 1984, Hiraishi et al. 1998), aber nicht direkt am Laugungsprozess teilnehmen. Allerdings ist eine Art bekannt,

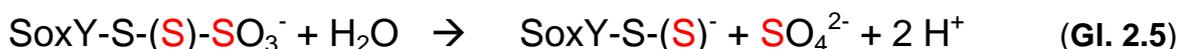
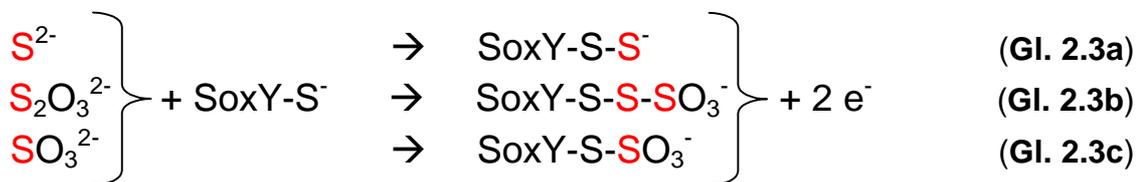
Acidiphilium acidophilum (Guay & Silver 1975), die auch chemolithoautotroph durch Oxidation von Schwefelverbindungen leben kann. Gram-positive, acidophile Eisen- und Schwefeloxidanten sind z. B. Vertreter der Gattung *Sulfobacillus* (Golovacheva & Karavaiko 1978, Norris et al. 1996). Während die bisher bekannten laugenden Vertreter der *Bacteria* vor allem in mesophilen bis gemäßigt thermophilen Lebensräumen anzutreffen sind, ist der ebenfalls biotechnologisch interessante Bereich der Laugung unter extrem thermophilen Bedingungen allein durch Vertreter der *Archaea* wie *Sulfolobus*, *Metallosphaera* und *Acidianus* besetzt (Norris et al. 2000).

2.3 Enzymatische Oxidation von Schwefelverbindungen

Aufgrund der großen ökologischen und wirtschaftlichen Bedeutung der biologischen Oxidation von Schwefelverbindungen ist ein Verständnis der ihr zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen von besonderem Interesse. Wünschenswert ist v. a. die Aufklärung der acidophilen Oxidation von Elementarschwefel, um biologische Laugungsverfahren optimieren und Bergbaufolgeschäden minimieren zu können.

Lösliche Schwefelverbindungen

Die enzymatische Oxidation von anorganischen Schwefelverbindungen erfolgt prinzipiell über die Oxidation zu Sulfinat- oder Sulfonatgruppen und anschließender Hydrolyse von Sulfit bzw. Sulfat (Vishniac & Trudinger 1962, Roy & Trudinger 1970, Kelly 1985, 1988, Takakuwa 1992, Kelly et al. 1997, Suzuki 1999, Brüser et al. 2000). Zusätzlich können Komponenten beteiligt sein, die Schwefelverbindungen oder Untereinheiten von diesen binden und so den Oxidasen und Hydrolasen zur Verfügung stellen. Ein Beispiel für dieses Zusammenspiel ist der Reaktionsmechanismus, wie er für den Thiosulfat oxidierenden Multienzymkomplex der neutromesophilen α -Proteobakterien *Paracoccus versutus* DSM 582^T und *Paracoccus pantotrophus* LMD 82.5^T (GB 17) vorgeschlagen wird (Friedrich 1998, Friedrich et al. 2001).



Ein 11 kDa großes, periplasmatisches Protein (SoxY) soll hier mit seiner einzigen Thiolgruppe in einem bereits oxidativen Schritt Sulfid, Thiosulfat und Sulfit binden (Gl. 2.3a-c) (Quentmeier & Friedrich 2001). Entsprechend entstehen das Monoorganylsulfid (Persulfid, Gl. 2.3a), das Monoorganylsulfidansulfonat (Gl. 2.3b) und

das Monoorganyl-S-Sulfonat (**Gl. 2.3c**) (zur Nomenklatur s. z. B. Steudel & Kustos 1994). Das Persulfid wird durch eine Dehydrogenase (SoxCD) bis zum S-Sulfonat oxidiert (**Gl. 2.4**). Mittels einer Hydrolase (SoxB) können die Sulfonate in Sulfat und SoxY bzw. dem Persulfid gespalten werden (**Gl. 2.5**), das erneut zum Sulfonat oxidiert werden kann (**Gl. 2.4**). Auch Elementarschwefel könnte als Sulfanschwefel des Persulfids durch den Multienzymkomplex oxidiert werden. Mit der Ausnahme der Polythionate können somit vermutlich alle relevanten anorganischen Schwefelverbindungen durch den Sox-Komplex bis zum Sulfat oxidiert werden. Alle freiwerdenden Elektronen sollen auf Höhe des Cytochrom c in die Atmungskette eingespeist werden. Allerdings wurde bisher allein für Thiosulfat und Sulfit eine der Oxidation zum Sulfat entsprechende Reduktion von Cytochrom c nachgewiesen (Friedrich et al. 2000, Rother et al. 2001).

Bei dem beschriebenen Sox-Enzymkomplex werden außer dem Endprodukt Sulfat keine weiteren Oxidationsprodukte freigesetzt. Demgegenüber sind auch eine Reihe von einzelnen Enzymen bekannt, die nur Teile der oxidativen und hydrolytischen Reaktionskette des Sox-Komplexes oder sogar andere Abbauewege katalysieren und freie Verbindungen mit intermediärer Oxidationsstufe für Schwefel entstehen lassen. So existieren verschiedene Sulfid-Dehydrogenasen, die mit Quinonen (Arieli et al. 1994, Reinartz et al. 1998, Schütz et al. 1998) oder Cytochrom c (Yamanaka 1994, Visser et al. 1997) als Elektronenakzeptoren Hydrogensulfid zu Elementarschwefel oxidieren. Thiosulfat wird nach **Abb. 2.1** durch eine separate Dehydrogenase zu Tetrathionat oxidiert (**Gl. 2.6**), welches durch eine Tetrathionat-Hydrolase (**Gl. 2.7**) zu Sulfat und der sehr instabilen Disulfanmonosulfonsäure abgebaut wird. Diese Verbindung kann in Thiosulfat und Elementarschwefel zerfallen oder – möglicherweise enzymatisch – zu Trithionat oxidiert werden (**Gl. 2.8**). Eine Trithionat-Hydrolase spaltet letzteres zu Sulfat und Thiosulfat (**Gl. 2.9**), sodass für Thiosulfat, Trithionat und Tetrathionat ein cyclischer Abbau postuliert wird (Sinha & Walden 1966, Pronk et al. 1990b, Wentzien et al. 1994, Wentzien 2002). Sulfit kann durch Dehydrogenasen direkt oder durch Umkehr der Sulfatreduktion über Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) zu Sulfat oxidiert werden (Kappler & Dahl 2001).

Aus verschiedenen Stämmen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidithiobacillus thiooxidans* sowie aus *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T wurden bisher die Enzyme des cyclischen Thiosulfat-Abbaueweges, Thiosulfat-Dehydrogenasen (Silver & Lundgren 1968b, Meulenbergh et al. 1993, Nakamura et al. 2001), Tetrathionat-Hydrolasen (Tano et al. 1996, Sugio et al. 1996, de Jong et al. 1997a, 1997b) und eine Trithionat-Hydrolase (Meulenbergh et al. 1992), isoliert. Ebenso wurden bei diesen acido-mesophilen Schwefeloxidanten Sulfit: Cytochrom c-Oxidoreduktasen (Vestal & Lundgren 1971, Nakamura et al. 1995, de Jong et al. 2000) gefunden. Außerdem wurde im Genom von *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T eine Sequenz identifiziert, die homolog zu bisher bekannten für Sulfid:Quinon-Oxidoreduktasen codierenden Genen ist (Nübel et al. 2000, Bronstein et al. 2000). Dage-

gen gibt es bis heute bei diesen laugungsrelevanten Bakterien keinerlei Hinweise auf Komponenten des Sox-Systems und auch der oxidative APS-Weg scheint bei der Gattung *Acidithiobacillus* nicht zu existieren (Nakamura et al. 1992, Dopson et al. 2002).

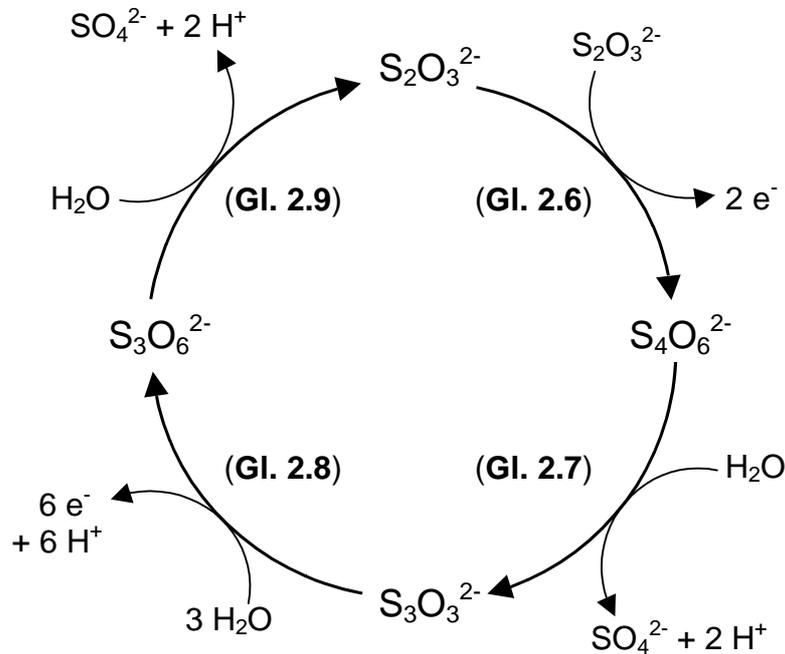


Abb. 2.1: Cyclischer Abbauweg für Thiosulfat, Trithionat und Tetrathionat durch **Gl. 2.6** bis **2.9** nach Pronk et al. (1990b) und Wentzien (2002).

Elementarschwefel

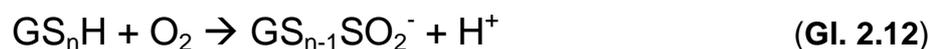
Auch für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel ergibt sich kein einheitliches Bild, und abgesehen von der möglichen Beteiligung des Sox-Systems (Friedrich et al. 2001, Rother et al. 2001) wird eine Vielzahl anderer Mechanismen diskutiert. Grundsätzlich wird von einem Aktivierungsschritt zur Zerstörung des S_8 -Ringes ausgegangen. Dieser kann durch ein Nukleophil wie Sulfit erfolgen (Vishniac & Santer 1957, Pronk et al. 1990b). Als Polysulfanmonosulfonsäuren (**Gl. 2.10**) oder Thiosulfat (**Gl. 2.10**, $n = 2$) könnte Elementarschwefel dann über den cyclischen Abbauweg (**Abb. 2.1**, **Gl. 2.6** bis **2.9**) oxidiert werden. Fraglich ist allerdings, wie das benötigte Sulfit bereitgestellt werden kann (Pronk et al. 1990b).



Von den meisten Autoren wird deshalb eine Aktivierung durch Thiolgruppen favorisiert (Vishniac & Santer 1957, Pronk et al. 1990b). Hierdurch könnte der elementare Schwefel zum Hydrogensulfid reduziert werden, was dann oxidiert werden würde. So wurde aus den neutrophilen Bakterien *Thiobacillus denitrificans* NCIMB 9548^T (RT) (Schedel & Trüper 1979) und *Allochromatium vinosum* DSM 180^T (Schedel et al. 1979) eine so genannte reverse Sulfit-Reduktase (DsrAB) isoliert,

welche die Oxidation von Hydrogensulfid zu Sulfit katalysieren soll (Hipp et al. 1997, Pott & Dahl 1998). Der physiologische Elektronenakzeptor dieser putativen Dehydrogenase ist unbekannt, und bisher konnte nur eine Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden (Schedel & Trüper 1979, Dahl & Trüper 1994). Bei der Aktivierung des Elementarschwefels spielen hier vermutlich niedermolekulare Thiolverbindungen eine Rolle. So wurden bei mehreren *Chromatiaceae*-Arten Persulfide von Glutathionderivaten nachgewiesen (Bartsch et al. 1996), die aus der Reaktion von Elementarschwefel und den entsprechenden Thiolen hervorgegangen sein könnten.

Ein ähnlicher Mechanismus wird für acido-mesophile Bakterien angenommen, da hier bisher charakterisierte Enzymsysteme eine ausgesprochene Abhängigkeit zu niedermolekularen Thiolverbindungen, namentlich Glutathion (GSH), aufweisen (Suzuki 1974, 1994b). Die entsprechenden Enzyme aus extrem thermophilen *Acidianus*-Arten wiederum sind auch ohne Zusatz von Thiolverbindungen aktiv (Emmel et al. 1986, Kletzin 1989). Im Gegensatz zum DsrAB-System wird wahrscheinlich bei den Enzymen der acidophilen Schwefeloxidanten direkt molekularer Sauerstoff eingebaut. Erstmals wurde durch Suzuki & Werkman (1959) eine GSH-abhängige, enzymatische Oxidation von Elementarschwefel in Aufschlüssen von *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 beobachtet. Durch partielle Aufreinigung des Enzymsystems konnte mit GSH die Umsetzung von Elementarschwefel zu Thiosulfat (Suzuki 1965a) und der Einbau von $^{18}\text{O}_2$ in das Oxidationsprodukt (Suzuki 1965b) demonstriert werden. In mit Elementarschwefel angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 13661 wurde ein vergleichbares System entdeckt (Silver & Lundgren 1968a). Als unmittelbares Produkt der Oxidation von Elementarschwefel wurde Sulfit identifiziert, das in den Testansätzen nicht-enzymatisch mit Elementarschwefel zu Thiosulfat weiterreagierte (**Gl. 2.10**, $n = 2$), aber durch Zugabe von Formaldehyd abgefangen werden konnte (Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968a). Aufgrund dieser Untersuchungen wird folgender Mechanismus für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel vorgeschlagen (Suzuki 1965b, Suzuki 1974):



Initial bildet sich durch einen nicht-enzymatischen, nukleophilen Angriff der Thiolgruppe an das S_8 -Ringsystem ein Nonasulfan-Derivat des GSH (**Gl. 2.11**). Eine Dioxygenase katalysiert die Bildung einer Sulfinatgruppe durch den Einbau von O_2 an das endständige Schwefelatom dieses Polysulfans bzw. von dessen Homologen mit $n \geq 2$ (**Gl. 2.12**). Darauf folgt die hydrolytische Abspaltung des Sulfits (**Gl. 2.13**). Der

Sulfanschwefel des GSH-Polysulfans wird also im Gegensatz zum Sox-System schrittweise zu Sulfit und nicht zu Sulfat oxidiert. Schließlich wird das eingesetzte GSH bei der Umsetzung des Disulfans/Persulfids ($n = 2$) zurückgewonnen.

Ein GSH-abhängiger, enzymatischer Abbau von Elementarschwefel zu Sulfit bzw. Thiosulfat konnte auch in Aufschlüssen neutro-mesophiler Schwefeloxidanten wie *Thiobacillus thioparus* ATCC 8158^T (Suzuki & Silver 1966), *Starkeya novella* ATCC 8093^T (Charles & Suzuki 1966, Oh & Suzuki 1977a, 1977b), *Thiobacillus denitrificans* NCIMB 9548^T (Justin & Kelly 1978) und Stämmen von *Leucothrix* (Grabovich et al. 2002) nachgewiesen werden. Dagegen zeigten zellfreie Extrakte von *Thiomonas intermedia* ATCC 15466^T (Charles 1969) keine und Ansätze von *Paracoccus versutus* DSM 582^T (Silver & Kelly 1976) nur geringe Aktivitäten. Das System wurde allerdings auch in dem acido-thermophilen *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* VKM B-1269^T gefunden (Krasil'nikova et al. 1998).

Die für die GSH-abhängige Oxidation von Elementarschwefel verantwortliche Dioxygenase (E.C. 1.13.11.18) sowie die mit deren Aktivität verbundene Schwefelchemie sind bisher nur ungenügend charakterisiert worden (Suzuki 1994b). Bei *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 gelang Chahal (1986) die Isolierung eines 46-kDa-Proteins aus der löslichen Fraktion von Zellaufschlüssen, das die oben beschriebenen Reaktionen (**Gl. 2.12** und **2.13**) katalysieren soll. Durch denaturierende Gelelektrophorese ließen sich zwei 21 bzw. 26 kDa große Untereinheiten unterscheiden. Das Protein enthält lösliche Eisen- und Schwefelatome, besitzt aber keine Häm- oder Flavinkomponenten. Im Vergleich mit anderen nieder-molekularen Thiolen wurde mit GSH die höchste Aktivität festgestellt. So wurden beispielsweise mit Cystein keine Oxidation und mit Dithiothreitol nur 40 % des mit GSH erzielten Umsatzes erreicht. Das pH-Optimum der bisher untersuchten Enzymisolate bzw. -anreicherungen lag bei pH 7,5 bis 7,8, wobei enzymatische Aktivitäten von etwa pH 5 bis 12 nachgewiesen wurden (Silver & Lundgren 1968a, Chahal 1986).

Ein zu dem von Chahal (1986) beschriebenen Enzym sehr ähnliches System wurde von Sugio et al. (1987) aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP19-3 isoliert. Die Oxidation von Elementarschwefel wird hier von einem 46-kDa-Homodimer katalysiert. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Systemen wurden allerdings nicht nur mit molekularem Sauerstoff, sondern auch in anaeroben Ansätzen mit Eisen(III)- und Molybdän(VI)-Ionen als Elektronenakzeptor geringe Aktivitäten nachgewiesen (Sugio et al. 1987, 1988a), sodass eine Kopplung der Schwefeloxidation an das Eisen(II)-Ionen oxidierende System von *Acidithiobacillus ferrooxidans* diskutiert wird. Da auch in niedrigen Konzentrationen appliziertes Hydrogensulfid zu Sulfit oxidiert wurde (Sugio et al. 1989), wird angenommen, dass das bei einer GSH-Oxidation durch Elementarschwefel frei werdende Sulfid (**Gl. 2.14**) das eigentliche Substrat des daraufhin als Sulfid:Eisen(III)-Oxidoreduktase bezeichneten Enzyms darstellt. Zwar wurde eine Bildung von Hydrogensulfid in Ansätzen mit GSH und Ele-

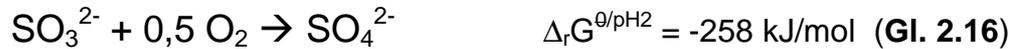
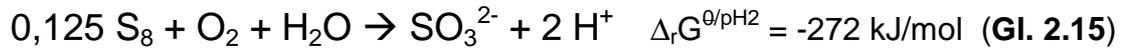
mentarschwefel nachgewiesen (Suzuki & Werkman 1959, Sugio et al. 1989). Ein Beleg für den stöchiometrischen GSH-Verbrauch parallel zur Sulfit/Thiosulfat-Bildung wurde aber bisher nicht erbracht (Sugio et al. 1989), sodass die Rolle von GSH bei der Oxidation von Elementarschwefel durch die Schwefel-Dioxygenase oder Sulfid:Eisen(III)-Oxidoreduktase unklar ist.



Neben diesen vergleichsweise einfach aufgebauten Enzymen wurden auch komplexere zur Elementarschwefel-Oxidation befähigte Systeme bei acido-mesophilen Bakterien untersucht. So oxidierten große, aus Zellen von *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 gewonnene Membranfragmente ohne Zusätze aerob Elementarschwefel und Sulfit zu Sulfat (Adair 1966). Dagegen wurde in der löslichen Fraktion der Zellaufschlüsse nur die GSH-abhängige Oxidation zu Sulfit beobachtet. Mit Membranfraktionen von *Acidithiobacillus thiooxidans* IFO 13724 (Stamm Iwatsuka & Mori) wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Kodama & Mori 1968). In weiterführenden Arbeiten wurden insgesamt 4 für die Oxidation von Elementarschwefel notwendige Komponenten unterschieden (Kodama 1969, Takakuwa 1975). Aktive Ansätze mussten Membranfragmente, die sowohl Sulfit als auch reduzierte Pyridinnukleotide in Gegenwart von Sauerstoff oxidierten, ebenso wie zwei lösliche, 23 bzw. 120 kDa große Proteine enthalten. Außerdem musste ein Pyridinnukleotid zugegeben werden. Die beiden isolierten Proteine enthalten lösliches Eisen und besitzen wie die bereits erwähnten 46-kDa-Enzyme keine Hämgruppen. Ein Vergleich mit den von Chahal (1986) und Sugio et al. (1987) gefundenen Enzymen legt nahe, dass es sich bei zumindest einem der löslichen Proteine um die für die Oxidation verantwortliche Komponente handeln könnte. Die Elektronen werden möglicherweise auf Höhe des NADH in die Atmungskette eingespeist. Die zugesetzte Membranfraktion würde dann sowohl den Elektronentransport zum Sauerstoff bereitstellen als auch – analog zum GSH-abhängigen System – durch reaktive nukleophile Gruppen die Aktivierung des Elementarschwefels bewirken. Die Substruktur der isolierten Proteine sowie das genaue Zusammenspiel der beschriebenen Komponenten sind allerdings nicht aufgeklärt worden (Takakuwa 1975, 1992).

Die Untersuchungen zur Elementarschwefel-Oxidation unter Beteiligung von Membrankomponenten (Adair 1966, Kodama & Mori 1968, Kodama 1969, Takakuwa 1975) wie auch die Nutzung von Eisen(III)-Ionen als Elektronenakzeptor (Sugio et al. 1987) wirft die Frage auf, in wie weit Elektronen aus der Oxidation zum Sulfit tatsächlich in die Atmungskette eingespeist werden. Der Einsatz einer Dioxygenase bei der Oxidation zum Sulfit erscheint aus energetischer Sicht unsinnig, da erst durch die Oxidation des Sulfits zu Sulfat Elektronen in die Atmungskette eingespeist werden könnten (Sulfit:Cytochrom c-Oxidoreduktase) bzw. Energieäquivalente bei der Substratketten-Phosphorylierung gewonnen würden (oxidatives APS-System). Hierdurch wären etwa 50 % der bei der Oxidation von Elementarschwefel zu Sulfat statt-

findenden Änderung der Freien Enthalpie ($\Delta_r G$) *a priori* für den Energiestoffwechsel verloren (**Gl. 2.15** und **2.16**, $\Delta_r G^{\theta/\text{pH}2}$ steht für die Änderung unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 2).



Die Übertragung der bei der Oxidation von Elementarschwefel frei werdenden Elektronen auf Eisen(III)-Ionen mit anschließender Reduktion von Sauerstoff verspricht eine bessere Verwertung der im Elementarschwefel gebundenen chemischen Energie. Ein derartiges System wäre allerdings nur auf Eisenoxidanten wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* anwendbar und würde nicht die Oxidation von Elementarschwefel bei nahe verwandten Arten wie *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus caldus* erklären. Deshalb werden universellere Mechanismen favorisiert, bei denen alle 6 Elektronen, die bei der Oxidation von Elementarschwefel zu Sulfat frei werden, über Cytochrome oder andere Redoxpartner in die Atmungskette eingespeist werden können (Corbett & Ingledew 1987, Kelly 1999). Der Beweis für eine derartige Reaktionsfolge konnte allerdings bisher nicht erbracht werden. So konnte mit den in Stämmen von *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* gefundenen, GSH-abhängigen Enzymen keine Elementarschwefel-Oxidation durch den Hexacyano-Eisen(III)-Komplex oder durch andere alternative Elektronenakzeptoren außer Eisen(III)- und Molybdän(VI)-Ionen nachgewiesen werden (Suzuki 1965a, 1965b, Suzuki & Silver 1966, Sugio et al. 1987, 1988a). GSH wurde dabei i. d. R. in nicht-enzymatischen Reaktionen rasch oxidiert, ohne dass es zu einer Oxidation von Elementarschwefel kam.

Reduzierte Thiolgruppen sind jedoch essentiell für die bisher bei acido-mesophilen Bakterien isolierten Elementarschwefel oxidierenden Enzyme. Die Rolle von GSH wird hierbei wahrscheinlich von membranassoziierten Thiolverbindungen ausgeübt, wie die Untersuchungen über GSH-unabhängige Systeme nahe legen (Adair 1966, Kodama & Mori 1968). Diese Thiolverbindungen wurden bei acido-mesophilen Schwefeloxidanten noch nicht identifiziert. Trotzdem gibt es offenbar bei allen mesophilen Schwefeloxidanten einen sehr ähnlichen Mechanismus der Aktivierung von elementarem Schwefel, seien es nun Proteine wie SoxY oder niedermolekulare Thiole. In wieweit GSH *in vitro* die Aufgaben eines Thiols, das bei acidophilen Schwefeloxidanten *in vivo* Sulfanschwefel bindet und möglicherweise zu Hydrogensulfid reduziert, übernehmen kann, ist unklar. Beispielsweise müssten bei der vermuteten periplasmatischen Lokalisierung des Elementarschwefel oxidierenden Enzyms (Sugio et al. 1987) auch noch bisher nicht gezeigte Aktivitäten unterhalb von pH 4 vorhanden sein. Bei derart niedrigen pH-Werten steht die Thiolgruppe von GSH

mit einem pK_S -Wert um 8,6 (Huxtable 1986) jedoch nur noch bedingt für einen nukleophilen Angriff auf den S_8 -Ring zur Verfügung.

2.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der bisher nur unzureichend aufgeklärte Mechanismus der enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei acidomesophilen Laugungsbakterien untersucht. Zum einen wurde die Rolle von GSH überprüft, um das von der Dioxygenase tatsächlich genutzte Substrat zu identifizieren. Hierbei sollte geklärt werden, ob der enzymatischen Oxidation ein reduktiver Schritt vorausgeht – also zunächst Sulfid gebildet wird – oder Schwefel der Oxidationsstufe 0 als Substrat verwendet werden kann. Durch den Einsatz verschiedener chromatographischer Messverfahren gelang es dabei erstmals, nahezu die gesamte anorganische und organische Schwefelchemie der *in vitro* stattfindenden Prozesse aufzuzeichnen und zu bilanzieren. Im Gegensatz zu den meisten vorhergehenden Studien zum GSH-abhängigen Elementarschwefel oxidierenden System wurde kein kristalliner Elementarschwefel als Substrat eingesetzt. Vielmehr wurde zur Standardisierung des Enzymtests und zur Erhöhung der Reaktivität ein grobdisperses System (Brezesinski & Mögel 1993) aus relativ kleinen Schwefelaggregaten gewählt, wie es auch intermediär bei der abiotischen und biologischen Oxidation von Hydrogensulfid entsteht (Steudel 1996). Zur weiteren Charakterisierung des vom Enzymsystem genutzten Substrates und des Oxidationsmechanismus wurden anstelle von Elementarschwefel auch andere Sulfanverbindungen getestet und erneut die Reaktivität gegenüber zu Sauerstoff alternativen Elektronenakzeptoren untersucht. Um ein möglichst weitreichend gültiges Bild zu erhalten, wurden neben den bisher untersuchten acidophilen Arten *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* zusätzlich zellfreie Systeme von Vertretern der Gattung *Acidiphilium* verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Mikrobiologie

3.1.1 Bakterienstämme

Folgende Stämme acidophiler Laugungsbakterien aus der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie des Instituts für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Art	Stamm	Isolierung; Referenzen
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	R1	Kupfermine, Rumänien; Zenneck (1988), Sand et al. (1992), Hallmann et al. (1993), Mitchell (2002)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	ATCC 8085/ DSM 504	Bodenprobe, USA; Waksman & Joffe (1922), Harrison (1982), Mitchell (2002)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	K6	Abwassersammler, Hamburg; Milde et al. (1983), Hallmann et al. (1993), Mitchell (2002)
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	ATCC 27807 ^T / DSM 700 ^T	aus Kultur von <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 13661 (isoliert aus einer Kohlemine, USA); Guay & Silver (1975), Harrison (1983), Hiraishi et al. (1998)
<i>Acidiphilium cryptum</i>	ATCC 33463 ^T / DSM 2389 ^T	aus Kultur von <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> IFO 14245 (isoliert aus einer Kohlemine, USA); Harrison (1981), Harrison (1983), Hiraishi et al. (1998)
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	ATCC 29047 ^T / DSM 2705 ^T	Kupfermine, Armenien; Markosyan (1972), Hippe (2000), Coram & Rawlings (2002)

Gültige Analysen der Verwandtschaftsverhältnisse auf der Basis der 16S-rRNA-Gene sind bisher für die oben aufgeführten Stämme nur z. T. durchgeführt worden. Eine phylogenetische Zuordnung wurde für die 3 Typstämme veröffentlicht (hier mit „^T“ gekennzeichnet, Hiraishi et al. 1998, Hippe 2000, Coram & Rawlings 2002). Für den Stamm ATCC 8085 ist nur die Sequenz der 5S rDNA bekannt, die für eine genaue taxonomische Klassifizierung unzureichend ist (Lane et al. 1985). Dieser Stamm kann aber trotzdem klar als *Acidithiobacillus thiooxidans* bezeichnet werden, da mit genomischer DNA des Typstammes ATCC 19377^T ein hoher Hybridisierungsgrad von 87 % erzielt wurde (Harrison 1982, 1984). Dagegen wird der Stamm K6 nur aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften zu *Acidithiobacillus thiooxidans* gezählt (Milde et al. 1983). Für Stamm R1 wurde kürzlich die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens durchgeführt und eine Zuordnung zur Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* erhalten (Sand & Stackebrandt, unveröffentlicht). Ein Vergleich der bisher in Genbanken hinterlegten 16S-rDNA-Daten von Stämmen der Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* zeigt, dass die nächsten Verwandten von R1 die Stämme NFe2 (Goebel & Stackebrandt 1994) und D2 (Selenska-Pobell et al. 2001) sind.

3.1.2 Nährmedien und Waschlösung

Die im Folgenden aufgeführten Medien und Lösungen wurden zur Anzucht, Reinheitskontrolle und bei der Zellernte verwendet. Eine Sterilisation erfolgte im Autoklav (112 °C und 1,5 bar) bei Volumina bis zu 1 L für 30 min und bei größeren Volumina (5, 10 oder 20 L) für 1 bis 2 h.

- Standardmedium zum autotrophen Wachstum mit Elementarschwefel (Standardschwefelmedium).

NH ₄ Cl	107 mg	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100,0 µg
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	25,4 mg	ZnCl ₂	70,0 µg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,0 mg	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	120,0 µg
KH ₂ PO ₄	27,22 mg	H ₃ BO ₃	31,0 µg
Fe ₂ (SO ₄) ₃ · H ₂ O	1,0 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	12,1 µg
Elementarschwefel	5 g	CuCl ₂ · H ₂ O	85,2 µg

aqua deion. ad 1000 mL

Dieses Nährmedium, das im Folgenden als Standardschwefelmedium bezeichnet wird, basiert auf Angaben von Mackintosh (1978). Statt (NH₄)₂SO₄ als Stickstoffquelle wurde NH₄Cl verwendet, der pH-Wert wurde nicht mit H₂SO₄, sondern mit HCl auf 4,5 (Stammkulturen) oder 3,0 (Zwischenkulturen, Massenanzucht) eingestellt, und als Substrat diente Elementarschwefel (Schwefelpulver/-blume „Schwefel fein verteilt“, Merck, Nr. 1.07987) anstelle von Eisen(II)-Ionen. Eine

Lösung der Salze ohne Elementarschwefel konnte als 50fache Stammlösung angesetzt werden, ohne dass sich dabei Präzipitate bildeten.

- Nährmedium zum Wachstum mit Elementarschwefel nach Hutchinson et al. (1965).
Das Medium wurde nach Originalvorschrift verwendet. Als Substrat diente Elementarschwefel (10 g/L), und der pH-Wert wurde mit H₂SO₄ auf 4,5 eingestellt.
- Nährmedium zum autotrophen Wachstum mit Eisen(II)-Ionen nach Mackintosh (1978).
Das Medium wurde nach Originalvorschrift unter Modifikation der Substratkonzentration (Eisen(II)-Ionen) verwendet. Der Gehalt an Eisenionen betrug bei Stammkulturen 2 g/L, bei Zwischenkulturen und Massenzucht wurden 5 g/L eingesetzt. Der pH-Wert des Mediums betrug 1,9.
- Nährmedium zum Wachstum von acidophilen, chemoorganoheterotrophen Mikroorganismen nach Harrison (1981).
Das Medium wurde nach Originalvorschrift hergestellt. Als Substrate dienten Glucose (1 g/L) und Trypticase Soy Broth (100 mg/L), der pH-Wert wurde mit H₂SO₄ auf 2,2 eingestellt. Bei Verwendung als festes Medium wurden 12 g/L Agar-Agar zugegeben.
- Nährmedium zum Wachstum von neutrophilen, chemoorganoheterotrophen Mikroorganismen.
Zum Nachweis neutrophiler, chemoorganoheterotropher Kontaminanten diente DEV-Gelatine-Agar (Merck, Nr. 10685). Der pH-Wert des Mediums betrug 7,3.
- Lösung zum Suspendieren von Zellpellets nach Zentrifugation (Waschlösung)

NH ₄ Cl	107 mg
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	25,4 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,0 mg

aqua deion. ad 1000 mL

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 3,0 eingestellt. Diese Lösung wird im Folgenden als Waschlösung bezeichnet und wurde bei der Zellernte von Massenzuchten verwendet.

3.1.3 Stammkulturen

Die Stammkulturen der untersuchten Stämme von *Acidithiobacillus thiooxidans* (s. Kapitel 3.1.1) wurden ausschließlich auf dem Schwefelmedium nach Hutchinson et al. (1965) kultiviert. Ebenso wurden die verwendeten Stämme von *Leptospirillum ferrooxidans* und *Acidiphilium cryptum* nur auf dem Eisenmedium nach Mackintosh (1978) bzw. auf dem Glucosemedium nach Harrison (1981) angezogen. *Acidithiobacillus ferrooxidans* wurde sowohl auf dem Eisenmedium nach Mackintosh (1978) als auch auf dem Standardschwefelmedium kultiviert. *Acidiphilium acidophilum* wurde auf dem Glucosemedium nach Harrison (1981) und auf Standardschwefelmedium gehalten. Kulturen der Bakterienstämme wurden in 100-mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL des jeweiligen Nährmediums bei 28 °C auf einem Rundschtüttler bei 150 bis 200 U/min im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug je nach Generationszeit 1 bis 7 d, wie bei Zenneck (1988), Rohwerder (1995) und Hallmann (1996) beschrieben. Anschließend wurden die Kulturen bei 17 °C im Dunkeln gelagert (Friedrich 1991). Das Überimpfen auf frisches Nährmedium mit 5 % (v/v) Inoculum erfolgte im Abstand von 4 bis 8 Wochen bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans* auf Medium nach Mackintosh (1978), nach 3 bis 6 Monaten bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium acidophilum* auf Standardschwefelmedium und nach 3 bis 6 Monaten bei *Acidithiobacillus thiooxidans* auf Medium nach Hutchinson et al. (1965). Bei *Acidiphilium acidophilum* und *Acidiphilium cryptum* auf Medium nach Harrison (1981) betrug die Ruhephase bei 17 °C 6 bis 12 Monate.

3.1.4 Zwischenkulturen

Als Inocula für Massenzuchten wurden Zwischenkulturen mit 500 mL Nährlösung in 1-L-Erlenmeyerkolben angelegt. Inkubationsbedingungen und -zeiten entsprachen denen der Stammkulturen. Als Nährmedien dienten das Standardschwefelmedium, das Eisenmedium nach Mackintosh (1978) und das Glucosemedium nach Harrison (1981). Zum Beimpfen wurden stets Stammkulturen verwendet, die mit dem gleichen Substrat angezogen worden waren. Nach erfolgter Inkubation wurden die Kulturen entweder sofort oder nach bis zu 4-wöchiger Lagerung bei 17 °C im Dunkeln als Inoculum eingesetzt.

3.1.5 Massenzucht und Zellernte

Kulturbedingungen

Die Massenzucht der Bakterienstämme erfolgte in Steilbrustflaschen unter Rühren und aktiver Belüftung bei 28 °C im Dunkeln. Als Nährmedien dienten das Standardschwefelmedium, das Eisenmedium nach Mackintosh (1978) oder das Glucosemedium nach Harrison (1981) (s. **Tab. 4.3**, S. 91). Die Kulturgröße betrug bei den autotrophen Ansätzen 10 L (Elementarschwefel) oder 20 L (Eisenionen) und bei dem

heterotrophen Medium 5 L. Für eine Massenanzucht wurden als Inoculum 2,5 % (v/v) einer Zwischenkultur eingesetzt, die mit dem gleichen Medium gewachsen war. Für Versuche mit ganzen Zellen und zur Gewinnung von Zellextrakten wurden Zellen der späten logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Im Falle der autotrophen Anzucht auf Elementarschwefel wurden hierfür etwa 14 d benötigt (**Abb. 3.1**). Geerntet wurde, nachdem die Bakterien etwa 30 mM Elementarschwefel zu Sulfat oxidiert hatten. Mit einem 10-L-Ansatz konnten dann etwa $0,5$ bis 2×10^{13} Zellen gewonnen werden, was einer Proteinmenge um $0,5$ g entsprach. Wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber pH-Werten unterhalb von $1,5$ wurde in Ansätzen mit *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T der pH-Wert durch Titration mit 10 M KOH auf Werte oberhalb von $1,7$ gehalten (**Abb. 3.1**). Mit Eisen(II)-Ionen angezogene Kulturen wurden solange inkubiert, bis etwa 50 % des Substrats oxidiert waren und das Redoxpotenzial bei 650 bis 670 mV vs. SHE lag (SHE = Standardwasserstoffelektrode). Hierfür wurden mit *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 etwa $2,5$ d und mit *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T etwa $4,5$ d benötigt. Für jeden Zellaufschluss wurden 40 L Medium pro Stamm inkubiert und auf diese Art etwa $0,2$ g Zellprotein gewonnen. Bei heterotrophen Anzuchten mit *Acidiphilium*-Stämmen wurde etwa 3 d bis zu einer Zelldichte von 2×10^9 /mL inkubiert und mit einem 5 -L-Ansatz um $0,3$ g Zellprotein erhalten.

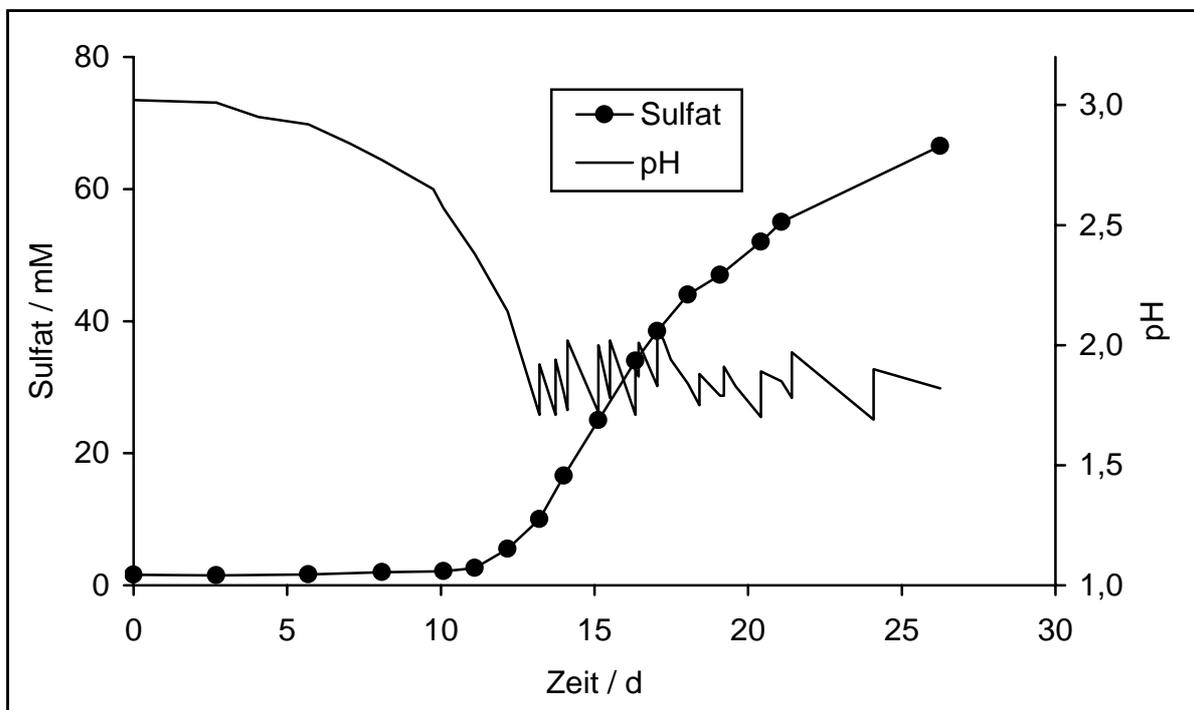


Abb. 3.1: Massenanzucht von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 auf lithotrophem Medium mit Elementarschwefel als Substrat (Standardschwefelmedium, 2,5 % Inoculum, 28 °C). Dargestellt sind die Konzentration von Sulfat und der Verlauf des pH-Wertes über einen Zeitraum von 26 d.

Zellernte

Die Ernte erfolgte durch Filtrieren (Ultrafilter von Fresenius, Deutschland) und anschließender Zentrifugation (10.500 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 450 mL Waschlösung suspendiert (s. Kapitel 3.1.2). Überschüssiger Elementarschwefel bzw. Eisenausfällungen wurden durch Zentrifugation (120 x g, 5 min, 4 °C) abgetrennt. Zum weiteren Waschen der Zellen wurde erneut bei 10.500 x g zentrifugiert und in Waschlösung suspendiert. Nach Wiederholung des letzten Schrittes und einer abschließenden Zentrifugation bei 10.500 x g wurde ein Pellet gewonnen, das sofort zum Zellaufschluss vorbereitet (s. Kapitel 3.2.3) oder nach erneuter Suspendierung in Waschlösung für Oxidationsversuche mit intakten Zellen eingesetzt wurde (s. Kapitel 3.2.1).

3.1.6 Reinheitskontrolle

Eine Kontrolle der Kulturen auf Kontamination erfolgte durch lichtmikroskopische Untersuchung (1000fache Vergrößerung, Phasenkontrast). Zusätzlich wurden alle Kulturen durch Ausstreichen auf Agarplatten mit dem Medium nach Harrison (1981) und dem DEV-Gelatine-Agar auf heterotrophe Verunreiniger überprüft (2 Wochen Inkubation bei 28 °C im Dunkeln). Kulturen von *Leptospirillum ferrooxidans* wurden durch Kontrollen mit Standardschwefelmedium und Medium nach Hutchinson et al. (1965) auf Schwefeloxidanten getestet (Inkubation wie Stammkulturen). Reinkulturen von *Acidithiobacillus thiooxidans* wurden durch Kontrollen mit dem Eisenmedium nach Mackintosh (1978) auf Eisen(II)-Oxidanten getestet. Die Identität von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium acidophilum* wurde mithilfe ihrer Vielseitigkeit bezüglich der Nutzung verschiedener Substrate überprüft. So waren auch nach über 5 a Kultivierung auf Elementarschwefel *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Acidiphilium acidophilum* noch in der Lage auf Eisen- bzw. Glucosemedium zu wachsen. Dies galt umgekehrt auch für die über 5 a auf Eisen(II)-Ionen bzw. Glucose angezogenen Kulturen bezüglich der Nutzung von Elementarschwefel als Wachstums-substrat.

3.1.7 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde mithilfe einer Helber-Zählkammer bestimmt. Das Zählen erfolgte lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrast.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Versuche mit ganzen Zellen

Der Abbau des für die Enzymtests mit zellfreien Systemen verwendeten grob-dispergierten Elementarschwefels wurde auch mit ganzen Zellen untersucht. Unter aeroben Bedingungen wurden geerntete und in Waschlösung suspendierte Zellen (s. Kapitel 3.1.5) mit 1,2 mM Elementarschwefel unter Rühren (Magnetrührer Ikamag, 400 U/min) bei 30 °C (Wasserbad) inkubiert. Die Ansätze hatten ein Volumen von 50 mL, wobei zu 40 mL in Waschlösung suspendierte Zellen 10 mL Elementarschwefel (Dialyseprodukt, s. Kapitel 3.2.4) gegeben wurden. Der pH-Wert betrug 3,0 und wurde durch Titration mit KOH (50 mM) kontrolliert.

3.2.2 Arbeiten unter anaeroben Bedingungen

Sowohl für die Herstellung der Aufschlüsse als auch z. T. für die Enzymtests wurde unter strikt anaeroben Bedingungen gearbeitet. Die entsprechenden Versuche wurden in einer Anaeroben-Box (anaerobic workstation, du scientific) unter einer Atmosphäre aus N₂/CO₂/H₂ (88:10:2, v/v/v) durchgeführt. Spuren von Sauerstoff, die evtl. durch Einschleusen von Gefäßen und Lösungen etc. eingebracht werden, reagieren in diesem System mit dem vorhandenen Wasserstoff zu Wasser (Vanadiumoxid-Katalysator, du scientific), sodass ein sicheres anaerobes Arbeiten möglich ist. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle mithilfe eines flüssigen Sauerstoff-Indikators (du scientific), der während der Versuche kontinuierlich mit der Atmosphäre der Anaeroben-Box durchströmt wurde. Alle für die anaeroben Arbeiten benötigten Lösungen wurden zuvor entgast und nach dem Einschleusen mit der anaeroben Atmosphäre begast.

3.2.3 Herstellung von zellfreien Systemen

Nach Empfehlungen von Suzuki (1965a) wurde die Herstellung von Zellaufschlüssen komplett unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zellpellets mit einem Proteingehalt von 0,2 bis 0,5 g wurden sofort nach der Ernte (s. Kapitel 3.1.5) in 10 bis 20 mL Phosphatpuffer (Kaliumphosphat, pH 6,5, Phosphatgehalt 50 mM) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein gasdichtes Glasgefäß mit Magnetstab überführt (100-mL-Schottflasche mit Gummiseptum) und dessen Gasphase evakuiert. Erst in der Anaeroben-Box wurde das Gefäß wieder geöffnet, die Suspension mit sauerstoff-freiem Gas durchströmt und eine dem Flüssigkeitsvolumen äquivalente Menge Glasperlen (150-212 µm, Sigma, G-9018) zugegeben. Die so vorbereiteten Zellen wurden dann bei 0 °C (Eisbad) durch Rühren der Perlen-Zell-Suspension aufgeschlossen (1 h, Magnetrührer Ikamag, 1000 U/min). Der Aufschluss wurde durch Dekantieren von den Perlen getrennt und mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer nachgespült, sodass insgesamt in Abhängigkeit vom Aus-

gangsvolumen etwa 20 bis 40 mL gewonnen wurden. Diese wurden in gasdicht verschließbare Zentrifugenbecher überführt und größere Zellfragmente durch Zentrifugation abgetrennt (2-mal 20 min, 25.000 x g, 4 °C), sodass im mikroskopischen Bild keinerlei Zellstrukturen mehr zu erkennen waren (1000fache Vergrößerung, Phasenkontrast). Die Abwesenheit von intakten Zellen wurde auch durch Inkubation von 1 mL Extrakt auf Standardschwefelmedium überprüft, wobei stets negative Ergebnisse erzielt wurden (4 Wochen Inkubation wie Stammkulturen). Der Überstand wurde bei -25 °C eingefroren und innerhalb von maximal 3 Monaten für Aktivitätstests verwendet. Auf diese Weise hergestellte Aufschlüsse besaßen einen Proteingehalt von etwa 1 bis 2 g/L.

Die für den Zellaufschluss verwendeten Glasperlen (150-212 µm, Sigma, G-9018) wurden vor ihrem Einsatz gereinigt. Die Perlen wurden in 10 M KOH und danach in 12 M HCl für jeweils 10 min gekocht, dann bis zur Neutralität etwa 5- bis 10-mal mit aqua deion. gespült und abschließend bei 100 °C getrocknet.

3.2.4 Aktivitätstests für das Elementarschwefel oxidierende Enzym-system

Herstellung von grobdispertem Elementarschwefel

Als Substrat für den Standardtest zur Bestimmung der Aktivität für die Oxidation von Elementarschwefel in zellfreien Systemen wurde ein grobdispertes, wässriges System von Elementarschwefel eingesetzt. Dazu wurden 50 mL aqua deion. mit 50 mL einer gesättigten acetonischen Lösung von Elementarschwefel (ca. 20 mM bei Raumtemperatur) vereinigt. Hierdurch entstand für wenige Sekunden ein bläulich-weißes, kolloiddisperses System (Sol) nach Weimarn (Albertsen 1993, Steudel & Albertsen 1999). Aufgrund der hohen Konzentration an Elementarschwefel war dieses Sol allerdings nicht stabil, sondern es bildeten sich schnell Aggregate von über 1 µm Größe, die dem Gemisch eine einheitlich weiße Farbe gaben. Das Aceton wurde durch Dialyse gegen 5 L aqua deion. bei Raumtemperatur über 24 h entfernt, wobei das Dialysewasser 3-mal ausgetauscht wurde. Chromatographisch (Ionenpaarchromatographie, Methode 3, s. Kapitel 3.3.2) war Aceton danach nicht mehr nachweisbar (Detektionslimit bei 215 nm ca. 10 µM). Da der grobdispertierte Elementarschwefel osmotisch aktiv war, vergrößerte sich das Volumen des Systems durch die Dialyse von 100 auf ca. 150 mL, entsprechend betrug die Konzentration an Elementarschwefel dann um 6 mM. Makroskopisch sichtbare, weiße Präzipitate an der Gefäßwand des Dialyseschlauches konnten durch leichtes Schütteln wieder in den grobdispertierten Zustand überführt werden. Mikroskopisch waren kugelförmige Aggregate mit einem Durchmesser von 2 bis 10 µm zu sehen, die wahrscheinlich aus Mikrokristallen bestanden (Pasteris et al. 2001). Derartiger Elementarschwefel wurde dann innerhalb von 10 h als Substrat für den Aktivitätstest verwendet, ohne dass in diesem Zeitraum weitere Alterungsprozesse zu beobachten waren. Das Substrat

stellt also eine intermediäre Form zwischen einem Schwefelol nach Weimarn (Steudel & Albertsen 1999) und dem monokristallinen, gelben Elementarschwefel dar (Steudel 2000). Im Dialyseprodukt konnten keine Oxidationsprodukte wie Sulfit, Sulfat, Thiosulfat und Polythionate nachgewiesen werden, sondern ausschließlich S₈-Elementarschwefel. Es handelte sich also nicht um ein Gemisch aus Polysulfanen und Polythionaten, wie es für den so genannten hydrophilen Schwefel diskutiert wird (Steudel et al. 1988). Vielmehr kann das für die Oxidationsversuche eingesetzte Substrat als grobdisperses System von hydrophobem Elementarschwefel und Wasser bezeichnet werden, bei dem innerhalb der in dieser Arbeit eingehaltenen Versuchszeiten keinerlei Autoxidation messbar war.

Für die Dialyse wurden Schläuche auf Cellulosebasis (Visking-Typ 1-7/8SS, Carl Roth GmbH, Nr. 5358.1) mit einem cut-off von 10 bis 20 kDa verwendet. Zur Reinigung wurden etwa 3 m Schlauch in 2 L Reinigungslösung (100 mM Na₂CO₃, 10 mM Ethylendiamintetraacetat, EDTA, pH 7 mit HCl eingestellt) 30 min gekocht und mit aqua deion. gespült. Derart behandelte Schläuche wurden in 70 % (v/v) Ethanol bei 4 °C gelagert.

Herstellung eines Gemisches aus höheren Homologen des GSSG (Polysulfangemisch)

Unter anaeroben Bedingungen wurden 500 mM Elementarschwefel (Schwefelpulver, Merck, Nr. 1.07987) mit 100 mM GSH bei pH 7,5 (mit KOH eingestellt) unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 d entwickelte die Lösung eine gelbliche Farbe und das eingesetzte GSH war vollständig oxidiert worden. Der überschüssige Elementarschwefel wurde durch Filtrieren entfernt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5,0 eingestellt, vorhandenes Sulfid durch Entgasen entfernt und dann mit KOH bis pH 6,5 titriert. Auf diese Weise wurde eine Lösung aus GSSG und höheren Bisorganylpolysulfanen erhalten, die sofort für Aktivitätstests verwendet wurde.

Aerober Standardtest für die Oxidation von Elementarschwefel (Standard-enzymtest)

Die Oxidationsaktivität von zellfreien Systemen der untersuchten Laugungsbakterien in Bezug auf Elementarschwefel wurde i. d. R. unter aeroben Bedingungen getestet. Die Ansätze hatten je nach dem zeitlichen Umfang der Versuche Volumina von 12,5 bis 25 mL (Versuche bis 3 h) oder 50 bis 100 mL (Versuche bis 12 h) und setzten sich wie folgt zusammen:

Rohextrakt (Proteingehalt 0 bis 0,4 g/L)
10 mM Phosphat (Kaliumphosphatpuffer pH 6,5)
4 mM Elementarschwefel (grobdisperses System)
0 bis 600 µM GSH
pH-Wert 6,5

Inkubiert wurde in offenen Glasflaschen (lose aufgelegter Deckel) von 50 oder 100 mL Volumen unter Rühren (Magnetrührer Ikamag, 300 U/min) bei 30 °C (Temperierung mittels Wasserbad). Gestartet wurden die Versuche durch die Zugabe von GSH (frisch angesetzte Lösung von 1 bis 10 mM in aqua deion.). Für pH-Messungen und Schwefelanalytik wurden pro Messpunkt Proben von etwa 1 bis 2 mL entnommen. Der pH-Wert wurde nur durch eine relativ geringe Phosphatkonzentration kontrolliert, da sich eine höhere Pufferung ungünstig auf die Peakauflösung bei den chromatographischen Methoden, insbesondere bei der Ionenpaarchromatographie, auswirkte (s. Kapitel 3.3.2). Bei hohen Aktivitäten für die Elementarschwefel-Oxidation (um 1000 $\mu\text{M/h}$) musste deshalb zusätzlich mit KOH (50 mM) titriert werden, um einen konstanten pH von 6,5 zu gewährleisten. Ebenso wurden bei Enzymtests mit von 6,5 abweichenden pH-Werten diese durch Zugabe von KOH oder HCl eingestellt. Bei pH-Werten $\leq 5,5$ wurden zur Stabilisierung des grobdispargierten Elementarschwefels 0,2 g/L Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben, da der Schwefel sonst ausflockte. Zur Messung der nicht-enzymatischen Aktivität wurden hitzeinaktivierte Zellextrakte verwendet (anaerobe Inkubation bei 90 °C für 30 min).

Aerober Test alternativer Substrate

Neben Elementarschwefel wurden weitere Verbindungen getestet, die Sulfanschwefel enthielten. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen für den Standardenzymtest. Die Versuche wurden ebenfalls bei pH 6,5 durchgeführt (10 mM Phosphatpuffer). Die Substrate wurden als wässrige Lösungen zugegeben. Bei Thio-sulfat (Natriumsalz), Tetrathionat (Kaliumsalz) sowie p-Toluolthiosulfonat (Kaliumsalz) wurden frisch angesetzte Stammlösungen von 10 mM (in aqua deion.) und bei Sulfid (Natriumsalz) eine Stammlösung von 50 mM (in aqua deion.) eingesetzt. Polysulfangemische von höheren Homologen des GSSG wurden wie oben beschrieben hergestellt. Die Konzentrationen der jeweiligen Substrate wurden mittels der entsprechenden analytischen Methode (s. Kapitel 3.3) überprüft. Gestartet wurden die Versuche durch Zugabe des Substrates oder, wenn eingesetzt, durch Zugabe von GSH.

Anaerobe Enzymtests

Zu Sauerstoff alternative Elektronenakzeptoren wurden nur unter strikt anaeroben Bedingungen getestet (Anaeroben-Box). Die weiteren Inkubationsbedingungen entsprachen denen des aeroben Standardenzymtestes. Die Versuche wurden ebenfalls bei pH 6,5 durchgeführt (10 mM Phosphatpuffer). Alle getesteten Elektronenmediatoren sind in **Tab. 4.2** (s. Kapitel 4.5, S. 88) aufgeführt und wurden als wässrige Lösungen verwendet. Eisen(III)-EDTA und der entsprechende Phenanthrolin-Komplex wurden mit FeCl_3 und EDTA bzw. 1,10-Phenanthrolinium-Chlorid hergestellt. Für die Stammlösungen dieser Komplexe wie auch für die des Eisen(III)-Citrates (10 mM, aqua deion.) wurde mit KOH ein pH-Wert von 6,5 eingestellt. Die übrigen untersuchten Elektronenmediatoren wurden ebenfalls als Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM (aqua deion.) eingesetzt. Dabei wurden neben

reinen Substanzen Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), Flavinadenindinukleotid (FAD) und 1,2-Naphthoquinon-4-sulfonsäure als Natriumsalze und Nitrat als Kaliumsalz verwendet.

3.3 Analyse der Schwefelverbindungen

3.3.1 Probenvorbereitung

Zur quantitativen Erfassung von organischen und anorganischen Schwefelverbindungen wurden verschiedene analytische Methoden verwendet. Während dabei Konzentrationen von Stammlösungen etc. meist direkt gemessen werden konnten, mussten Proben aus den Aktivitätstests für die Analysen vorbereitet werden. Für die Quantifizierung löslicher Schwefelspezies (Kapitel 3.3.2, 3.3.4, 3.3.5) wurden die Proben filtriert (Nylon, Porengröße 0,2 μm , Carl Roth GmbH, Nr. P813.1), um Elementarschwefel und Zellen (bei Versuchen mit intakten Zellen) abzutrennen. Konnten die Proben für die Ionenpaar- und Ionenaustauschchromatographie nicht sofort eingespritzt werden, wurden sie maximal 30 min in den entsprechenden Probenvials auf Eis zwischengelagert. Wenn nötig, wurden die Proben mit aqua deion. verdünnt.

3.3.2 Ionenpaarchromatographie: GSH und GSH-Derivate, Thiosulfat, Polythionate, p-Toluolsulfinat und p-Toluolthiosulfonat

Fast alle im Rahmen dieser Arbeit relevanten anionischen Schwefelverbindungen konnten aufgrund eines Ionenpaarchromatographischen Trennprinzips mit Tetrabutylammonium als Gegenion bestimmt werden (Steudel et al. 1987, Weiß 1991, Albertsen 1993, Schippers 1998).

HPLC-System

Das verwendete chromatographische System (Kontron/Bio-Tek Instruments) bestand aus folgenden Komponenten: Autosampler 465, Gradientenformer 425, Pumpe 422, Diodenarraydetektor 440, Software 450-MT2/DAD 1.10, Computer. Als Trennsäule wurde eine PLRP-S 100 Å , 8 μm , 150 x 4,6 mm (Latek Labortechnik, Nr. 1512-3800) in Kombination mit einer Vorsäulenkartusche PLRP-S 5 x 3 mm (Latek Labortechnik, Nr. 1612-1801) eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug maximal 80 μL . Bei jeder Messung wurden Chromatogramme bei 205, 215, 265 und 300 nm mit einer Wellenlängenbande (bandwidth) von 5 nm aufgezeichnet. Dabei wurden zusätzlich Spektren von 190 bis 320 nm mit einem Bunching-Faktor von 2 erstellt.

Methode 1

Diese Methode ermöglichte die Bestimmung von GSH, dessen Derivaten und Thiosulfat, welches als letzte dieser Verbindungen eluierte. Da GSH bei Verwendung der für die Quantifizierung von Thiosulfat und Polythionaten üblichen, neutralen oder

alkalischen Eluenten (Albertsen 1993, Schippers 1998) während des Messvorgangs zu einem erheblichen Teil autoxydierte, wurde ein saures Laufmittel entwickelt. Der Eluent bestand aus einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (82:18, v/v), dem 2 mM Tetrabutylammoniumchlorid zugesetzt wurden. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2 mM Acetatpuffer (Essigsäure/Natriumacetat pH 4,0) auf 4,0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert blieb GSH während des Messvorgangs stabil, gleichzeitig wurde ein Zerfall des Thiosulfats nicht beobachtet. Bei einer Durchflussrate von 1 mL/min betrug der Messzeitraum bis zur vollständigen Elution des Thiosulfats etwa 18 min (**Abb. 3.2**).

Methode 2

Zur Erfassung von Polythionaten war Methode 1 nur bedingt anwendbar, da sehr lange Laufzeiten, z. B. für die Bestimmung von Tetrathionat über 30 min, eingeplant werden mussten. Um auch Polythionate bis zum Pentathionat innerhalb akzeptabler Messzeiten auftrennen zu können, wurde basierend auf Methode 1 eine Methode mit einem Acetonitril-Gradienten eingesetzt. Hierbei entsprachen die Gehalte an Tetrabutylammonium und Acetatpuffer sowie der pH-Wert denen des bei Methode 1 angegebenen Eluenten, während die Acetonitril-Konzentration variiert wurde. Der Acetonitril-Gehalt wurde innerhalb der ersten 11 min linear von 18 auf 34 % (v/v) angehoben, dann 4 min auf 34 % gehalten und schließlich linear innerhalb von 3 min wieder auf 18 % reduziert. Nach 5 min weiterem isokratischen Lauf mit 18 % Acetonitril erfolgte die nächste Injektion, sodass für diese Methode insgesamt eine Messdauer von 23 min benötigt wurde. Die Durchflussrate betrug zu allen Zeiten 1 mL/min. Thiosulfat eluierte nach 12 min und die Laufzeiten von Tri-, Tetra- und Pentasulfat betrugen etwa 13, 14 und 15 min.

Methode 3

Für die Quantifizierung von Thiosulfat und Polythionaten bei Routinemessungen von Standards und Stammlösungen wurde auch eine von Albertsen (1993) entwickelte Methode verwendet, die bereits ausführlich beschrieben wurde (Schippers 1998). Der Eluent bestand hier aus einem Acetonitril-Wasser-Gemisch mit 25 % (v/v) Acetonitril und hatte einen pH-Wert von 7,7. Als Gegenion diente ebenfalls wie bei Methode 1 und 2 Tetrabutylammonium (2 mM). Bei einem Fluss von 1 mL/min ließen sich Polythionatgemische innerhalb von 18 bis 20 min bis zum Pentathionat auftrennen, und die Laufzeit von Hexathionat betrug etwa 35 bis 40 min. Diese Methode wurde auch eingesetzt, um Aceton zu detektieren, das bei etwa 4 min eluierte.

Bestimmung von reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG)

GSH und GSSG wurden sowohl mit Methode 1 als auch mit Methode 2 erfasst. In beiden Fällen betrug die Laufzeit für GSH etwa 3 min und für GSSG ca. 6 min. Die aufgezeichneten Spektren beider Verbindungen waren sehr ähnlich, die Absorption war um 200 nm maximal und nahm dann mit zunehmender Wellenlänge ab (**Abb. 3.4**). Deshalb wurde die Konzentration dieser Verbindungen anhand der Peakflächen

bei 205 nm (bei 0 bis 100 μM und einer Injektion von 80 μL) oder 215 nm (bei 100 bis 1000 μM und einer Injektion von 80 μL) ermittelt. Als Standards wurden frisch angesetzte wässrige Lösungen der freien Säuren verwendet (0 bis 1000 μM in aqua deion.).

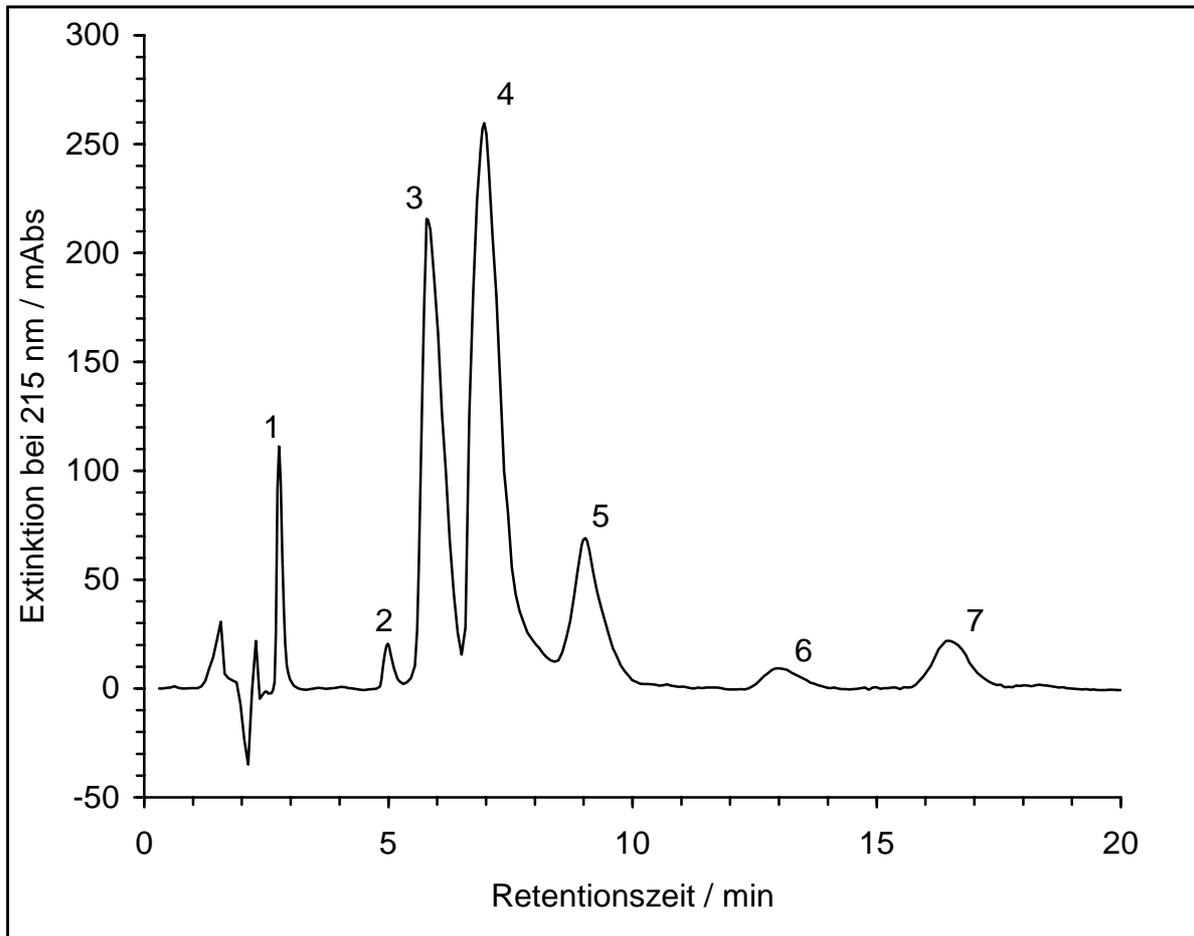


Abb. 3.2: Ionenpaarchromatographische Auftrennung eines Gemisches aus Bisorganopolysulfanen des GSH nach Methode 1 (Herstellung s. Text): GSH (Peak 1, 2,8 min), Nitrat (Peak 2, 5,0 min), GSSG (Peak 3, 5,8 min), GS_3G (Peak 4, 7,0 min), GS_4G (Peak 5, 9,0 min), GS_5G (Peak 6, 13,0 min), Thiosulfat (Peak 7, 16,5 min).

Bestimmung von höheren Homologen des GSSG (GS_nG , $n > 2$)

Mit den Methoden 1 und 2 konnten Gemische von höheren Homologen des GSSG (GS_nG) bis zu Verbindungen mit 5 Schwefelatomen aufgetrennt werden. Mit Methode 1 betragen die Laufzeiten für das Trisulfan um 7 min, für das Tetrasulfan um 9 min und für das Pentasulfan um 13 min (**Abb. 3.2**). Mit Methode 2 eluierte das Trisulfan bei etwa 6,5 min, das Tetrasulfan bei 7,5 min und das Pentasulfan bei 8,5 min. Ähnlich wie GSH und GSSG zeigten auch die höheren Polysulfane eine starke Absorption um 200 nm, die mit zunehmender Wellenlänge rasch abnahm (**Abb. 3.4**). Um auch geringste Mengen der GS_nG nachweisen zu können, wurde deshalb v. a. bei 205 und 215 nm ausgewertet. Bereits bei 215 nm war allerdings eine ausreichende Trennung von GSSG und dem Trisulfan nur mit Methode 1 möglich (**Abb. 3.2**). Bei hohen GSSG-Konzentrationen wurden deshalb zusätzlich die bei 265 und

300 nm aufgezeichneten Chromatogramme herangezogen, da hier GSSG im Gegensatz zu den höheren Polysulfanen nur sehr schwach absorbierte (**Abb. 3.4**). Höhere Homologe des GSSG waren nicht über den Handel erhältlich. Generell sind einzelne Bisorganylpolysulfane schwierig als reine Verbindungen darzustellen (Göbel 1988), und man erhält i. d. R. Gemische von mehreren Polysulfanen. Um zumindest eine Zuordnung der einzelnen Peaks zu ermöglichen, wurden Polysulfangemische durch Reaktion von GSH mit Elementarschwefel hergestellt (Huxtable 1986) und chromatographisch untersucht. Hierzu wurden bei pH 7,5 zu 10 mL einer acetonischen Lösung von Elementarschwefel (ca. 20 mM) 10 mL einer GSH-Lösung (10 mM) gegeben. Die Lösung wurde sofort gelb und chromatographisch ergab sich das in **Abb. 3.2** gezeigte Bild. In einem isokratischen System erhält man für Bisorganylpolysulfane stets eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Kapazitätsfaktors k und der Anzahl der enthaltenen Schwefelatome (Göbel 1988, Steudel & Kustos 1994). Deshalb ist auch hier aufgrund der Laufzeiten der Polysulfane eine Zuordnung nach der Kettenlänge möglich (**Abb. 3.2**), wie auch der logarithmische Auftrag der gefundenen Kapazitätsfaktoren belegt (**Abb. 3.3**).

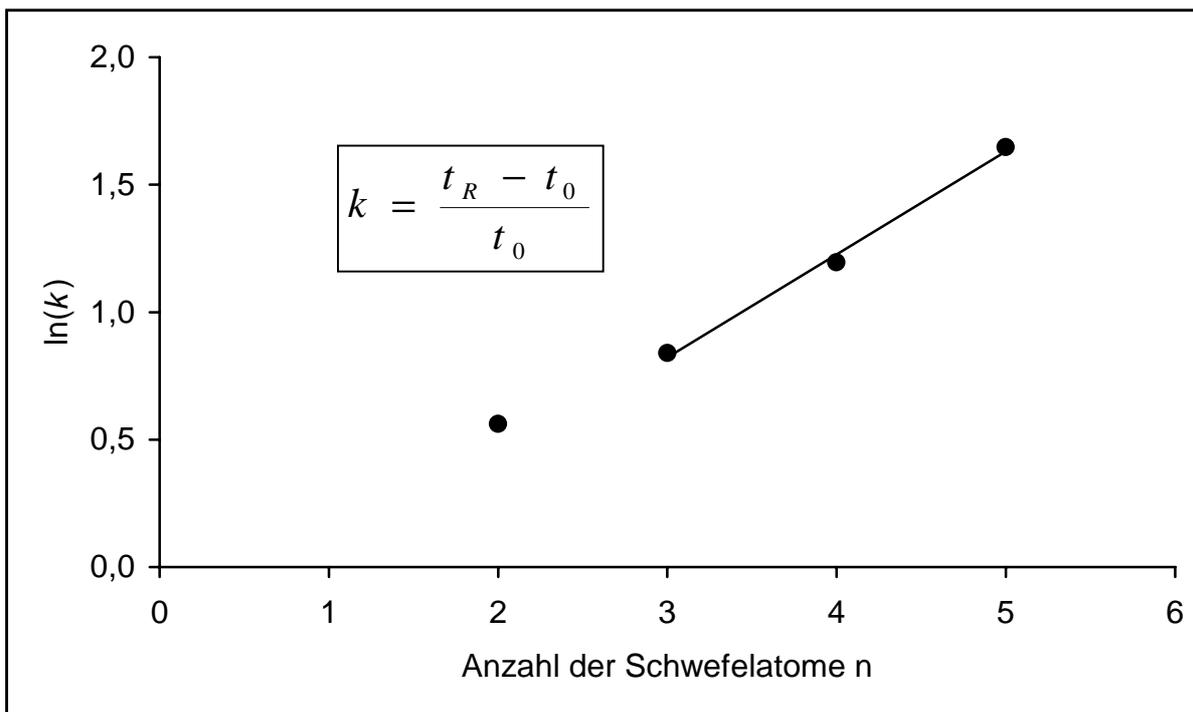


Abb. 3.3: Beziehung zwischen Retentionszeit und Kettenlänge der Bisorganylpolysulfane des GSH (GS_nG , $n \geq 2$) bei Auftrennung nach Methode 1. Aufgetragen ist der Logarithmus des Kapazitätsfaktors k gegen die Anzahl der Schwefelatome n . Der Faktor k wurde mithilfe der beigefügten Formel ermittelt, t_R ist dabei die Retentionszeit der jeweiligen Verbindung (s. **Abb. 3.2**) und t_0 ist die Totzeit des chromatographischen Systems. Eine lineare Regression wurde für $n = 3$ bis 5 durchgeführt ($r = 0,9977$).

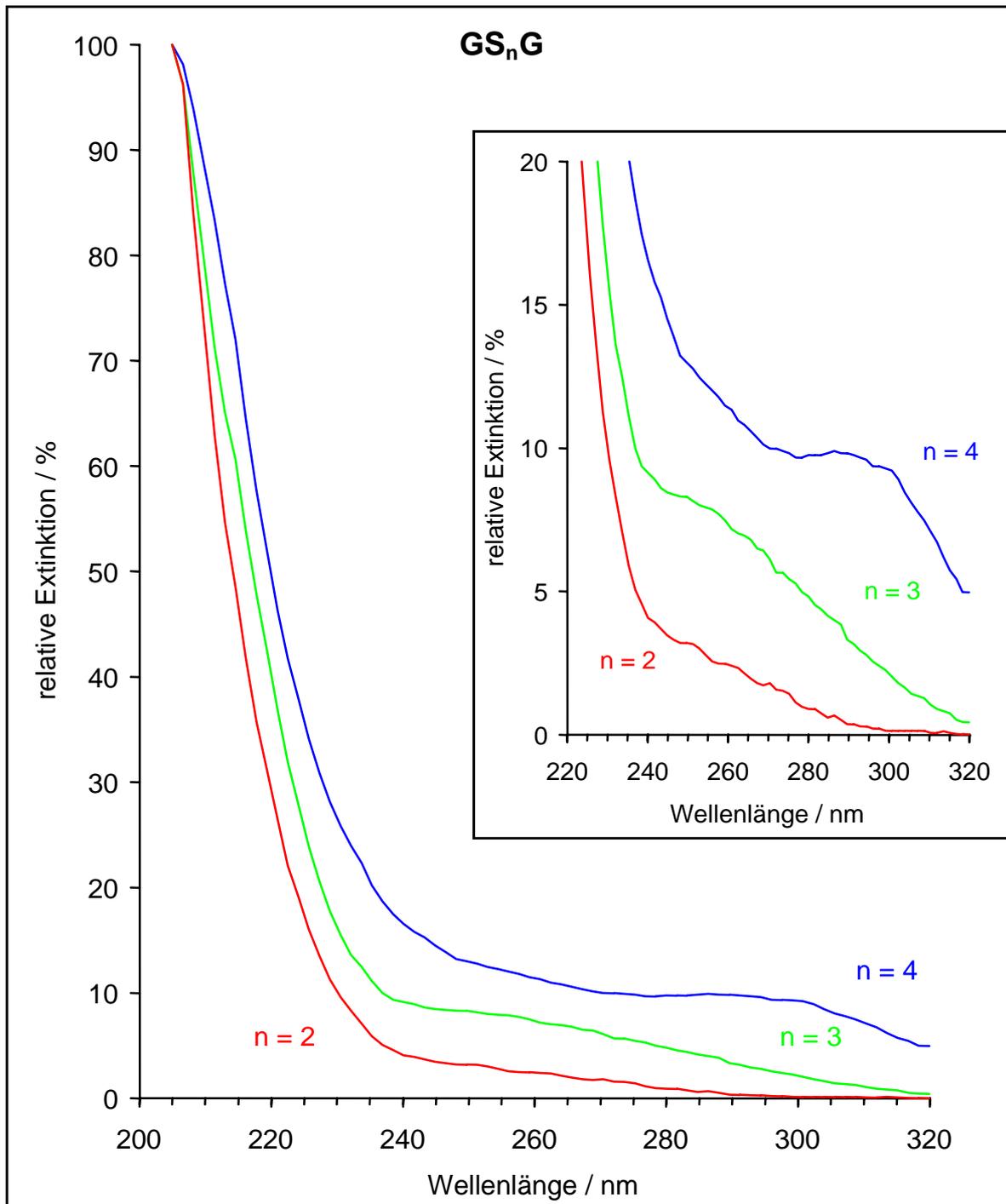
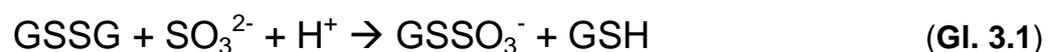


Abb. 3.4: UV-Spektren von Bisorganylpolysulfanen des GSH (GS_nG , $n = 2$ bis 4). Dargestellt sind die Extinktionen bei 205 bis 320 nm, wobei die einzelnen Spektren normalisiert wurden (die Extinktionen bei 205 nm wurden als 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu angegeben). Zusätzlich ist die Extinktion im Bereich 220 bis 320 nm vergrößert gezeigt. Grundlage für die Erstellung der Spektren ist die in **Abb. 3.2** dargestellte ionenpaarchromatographische Auftrennung eines Polysulfan-gemisches nach Methode 1. Ausgewertet wurden die Spektren, die zum Zeitpunkt des Peakmaximums der jeweiligen Verbindungen aufgezeichnet wurden.

Bestimmung von Glutathion-S-Sulfonat (GSSO₃⁻)

Glutathion-S-Sulfonat konnte im gleichen Lauf zusammen mit Thiosulfat, Glutathion und oxidiertem Glutathion erfasst werden. Die Retentionszeit betrug um 15 min mit Methode 1 und etwa 10 min mit Methode 2, sodass das S-Sulfonat nach dem Pentasulfan des GSSG und vor Thiosulfat eluierte. Wie die höheren Bisorganylpolysulfane ist auch das Glutathion-S-Sulfonat nicht im Handel verfügbar. Zur Identifizierung wurde deshalb nach einer Methode von Inglis & Liu (1970) für die Synthese des Cystein-S-Sulfonats das entsprechende Derivat des Glutathions hergestellt. Im Prinzip werden hierfür das Thiol mit Tetrathionat zusammen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion werden wasserunlösliche Produkte (v. a. Elementarschwefel) abzentrifugiert und der Überstand mit Ethanol aufgefüllt, sodass sich eine 70 %ige Lösung (v/v) desselben ergibt. Bei 4 °C kristallisiert dann das S-Sulfonat aus. In eigenen Versuchen mit Glutathion anstelle von Cystein wurden nach der Ethanol-Fällung Präzipitate erhalten, deren HPLC-Chromatogramme zwar das Glutathion-S-Sulfonat als dominierenden Peak aufwiesen, aber noch erhebliche Verunreinigungen von GSSG, Thiosulfat und Polythionaten enthielten. Auf diese Weise hergestellte Präparate wurden deshalb nur als Referenz für eine qualitative Bestimmung herangezogen.

Zur Quantifizierung des S-Sulfonats wurde dagegen die Umsetzung von GSSG mit Sulfit verfolgt. Diese Reaktion ist quantitativ und liefert nach **Gl. 3.1** pro Mol eingesetztem GSSG und Sulfit die gleiche Menge S-Sulfonat und GSH (Clarke 1932, Cecil & McPhee 1955, Swan 1957, Steudel & Albertsen 1992, Steudel et al. 1993, Albertsen 1993). Um dabei die Oxidation von Sulfit und Glutathion durch Sauerstoff zu vermeiden, wurde anaerob gearbeitet (Anaeroben-Box). Z. B. wurden zu 500 µM GSSG 350 µM Sulfit gegeben und unter Rühren bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7,2 (10 mM Phosphatpuffer) inkubiert (**Abb. 3.5**).



Wie erwartet, nahm die Konzentration von GSSG parallel zu der von Sulfit ab, während der Gehalt an GSH im Gegenzug im gleichen Umfang anstieg (**Abb. 3.5 A** und **B**). Die Konzentration von Sulfat blieb unverändert. Auch wurden keine weiteren Schwefelverbindungen wie etwa Thiosulfat oder Polythionate detektiert (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde das Glutathion-S-Sulfonat gebildet, dessen bei 205 und 215 nm gemessene Peakflächen mit den bei GSH, GSSG und Sulfit erzielten Umsätzen korrelierten (**Abb. 3.5 C** und **D**). Auf der Basis der hier gefundenen linearen Abhängigkeiten konnte somit eine Eichung für das S-Sulfonat erfolgen. Wegen der stärkeren Absorption bei 205 nm wurde vorzugsweise bei geringen Konzentrationen bis etwa 100 µM bei dieser Wellenlänge quantifiziert. Bei höheren Gehalten des S-Sulfonats wurden auch bei 215 nm aufgezeichnete Chromatogramme herangezogen.

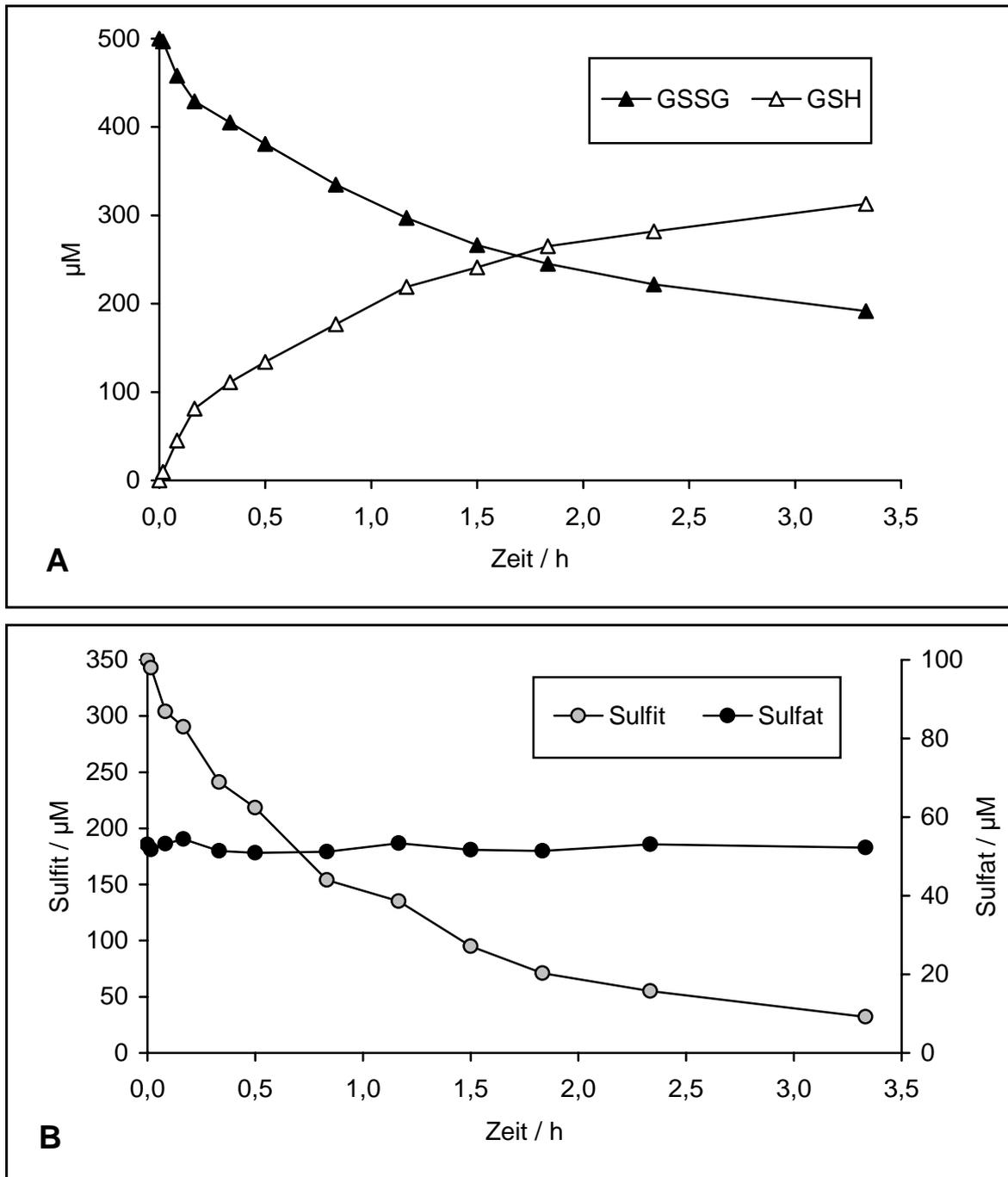


Abb. 3.5: Reaktion von GSSG mit Sulfit unter Bildung des Glutathion-S-Sulfonats. Inkubiert wurden 500 μM GSSG und 350 μM Sulfit unter anaeroben Bedingungen bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7,2 (10 mM Phosphatpuffer). **A:** Verlauf der Konzentrationen von GSH und GSSG. **B:** Gehalte an Sulfit und Sulfat.

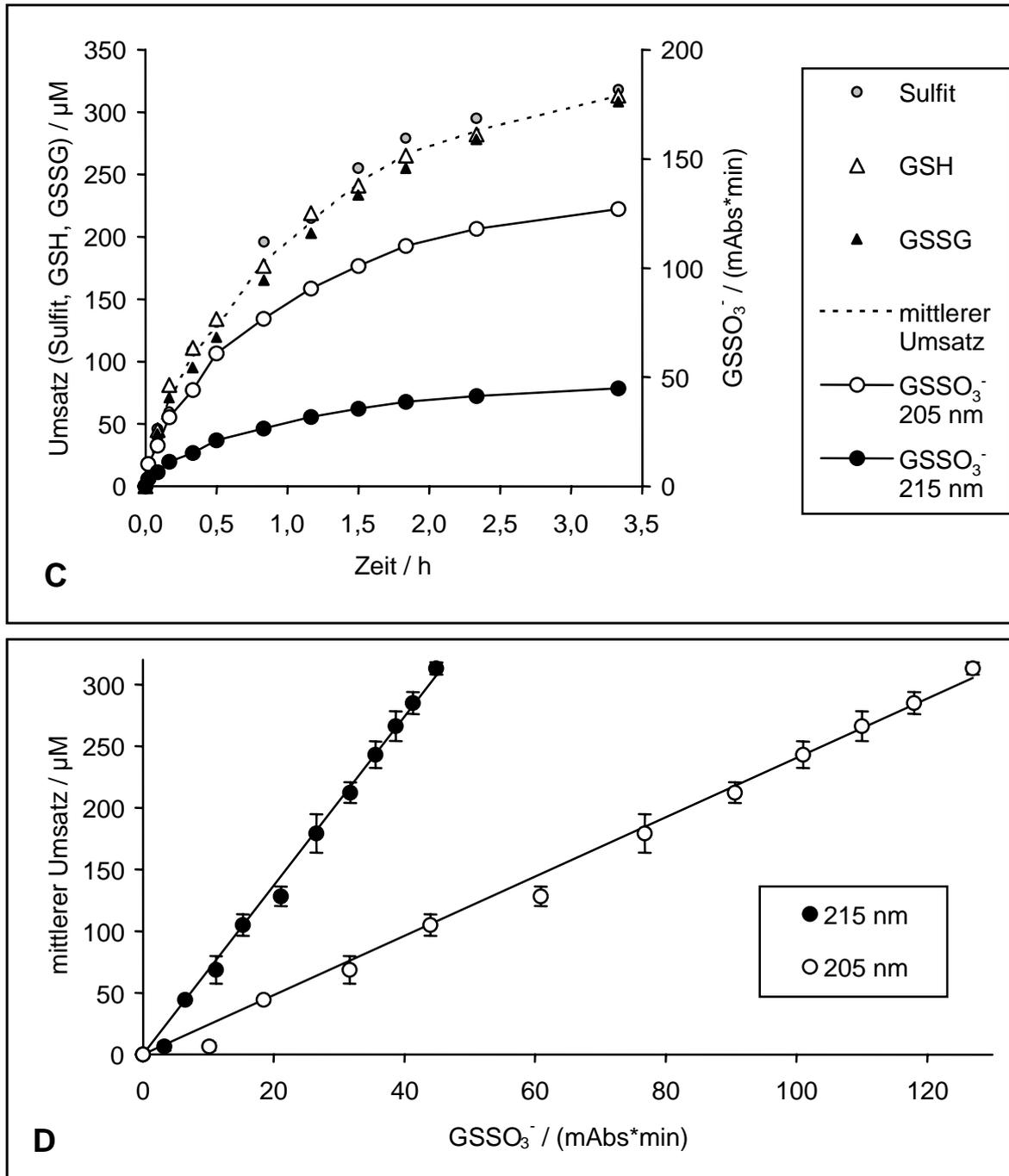


Abb. 3.5 (Fortsetzung): **C**: Erzielte Umsätze von Sulfit, GSH und GSSG im Vergleich zur Bildung des Glutathion-S-Sulfonats, dessen bei 205 und 215 nm im HPLC-Chromatogramm erhaltene Peakflächen angegeben sind. **D**: Lineare Beziehungen zwischen den mittleren Umsätzen von Sulfit, GSH und GSSG und dem Zuwachs der Peakflächen des S-Sulfonats bei 205 und 215 nm. Regressionsanalyse ergibt für 205 nm einen Umrechnungsfaktor von $(2,40 \pm 0,05) \mu\text{M}/(\text{mAbs} \cdot \text{min})$ ($r = 0,9974$, $n = 12$), und für 215 nm erhält man einen Umrechnungsfaktor von $(6,84 \pm 0,13) \mu\text{M}/(\text{mAbs} \cdot \text{min})$ ($r = 0,9980$, $n = 12$).

Bestimmung von Thiosulfat und Polythionaten

Thiosulfat konnte mit allen 3 Methoden quantifiziert werden, während Trithionat und die höheren Polythionate allein durch Methode 2 und 3 erfasst wurden. Als Standards für Thiosulfat und Tetrathionat wurden die über den Handel beziehbaren Kaliumsalze in wässrigen Lösungen (aqua deion.) mit Konzentrationen von 0 bis 1000 μM verwendet. Kaliumsalze von Tri-, Penta- und Hexathionat wurden nach Methoden von Fehér (1975) synthetisiert und ebenfalls als wässrige Standards (0 bis 1000 μM) eingesetzt. Eine Quantifizierung erfolgte in allen Fällen auf der Basis der bei 215 nm erhaltenen Peakflächen. UV-Spektren aller hier angegebenen Verbindungen sind z. B. bei Miura & Kawaoi (2000) aufgeführt.

Bestimmung von p-Toluolsulfinat und p-Toluolthiosulfonat

Sowohl p-Toluolsulfinat als auch das entsprechende Thiosulfonat (zur Struktur s. **Abb. 4.18**, S. 79) konnten mit Methode 2 bestimmt werden. Das Sulfinat eluierte bei 11 min und das Thiosulfonat hatte eine Laufzeit um 13,5 bis 14 min. Als Standards dienten im Falle des p-Toluolthiosulfonats Lösungen des Kaliumsalzes in aqua deion., und beim Sulfinat wurde das Natriumsalz verwendet. Mit Stammlösungen von 10 mM wurden Eichreihen von 0 bis 1000 μM erstellt. Beide Verbindungen wurden aufgrund der bei 215 nm erhaltenen Peakflächen quantifiziert.

3.3.3 Reversed-Phase-Chromatographie: Elementarschwefel

Die Bestimmung von Elementarschwefel (S_8 -Schwefel) erfolgte nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie (Steudel et al. 1981), bei der die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile Phase (reversed phase).

HPLC-System

Die HPLC-Anlage entsprach dem für die Ionenpaarchromatographie beschriebenen System (s. Kapitel 3.3.2), ein Gradientenformer wurde allerdings nicht benötigt und anstelle von PLRP-S-Säulen wurde eine Trennsäule des Typs Hypersil-ODS-5 μm 125/4,6 mm verwendet. Das Injektionsvolumen betrug maximal 80 μL . Bei jeder Messung wurde ein Chromatogramm bei 254 nm mit einer Wellenlängenbande (bandwidth) von 5 nm aufgezeichnet. Dabei wurden zusätzlich Spektren von 190 bis 320 nm mit einem Bunching-Faktor von 2 erstellt.

Methode

Die Reversed-Phase-Chromatographie wurde ausschließlich für die Bestimmung von Elementarschwefel eingesetzt. Als Laufmittel diente Methanol mit einer Durchflussrate von 1 mL/min. Diese Bedingungen waren ausreichend, um eine Trennung des Elementarschwefels von den für die Extraktion verwendeten Lösungsmitteln (Ethanol, n-Octan) zu erreichen. Elementarschwefel eluierte bei 3,3 min, und die Messzeit pro Probe betrug insgesamt 5 min.

Bestimmung von Elementarschwefel

Die für die Eichung benötigten Standards wurden mit handelsüblichem Elementarschwefel hergestellt (Schwefelpulver, Merck, Nr. 1.07987). Eine 50-mM-Stamm-lösung wurde durch Lösen des Schwefels in reinem n-Octan erhalten. Eichreihen (0 bis 5 mM) wurden dann durch Verdünnung mit Ethanol angefertigt. Für die Quantifizierung von elementarem Schwefel in Proben aus den Aktivitätsversuchen wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren angewendet. So wurden im einfachsten Fall bei den Abbauversuchen mit grobdispertiertem Elementarschwefel 100 µL ungefilterte Probe entnommen, eingefroren (-25 °C) oder sofort mit 500 µL Ethanol vermischt. Nach Zentrifugation (Heraeus-Biofuge, 10.000 U/min, 10 min, Raumtemperatur) konnte im Überstand direkt der Gehalt an Elementarschwefel bestimmt werden. Da einzelne Messwerte trotz der feinen Verteilung des Schwefels Abweichungen um 10 bis 30 % aufwiesen, wurden i. d. R. pro Messzeitpunkt 6 Proben für die Quantifizierung des Elementarschwefels genommen und die Ergebnisse gemittelt. Um noch geringste Konzentrationen (unter 10 µM) erfassen zu können, wurden 1 bis 2 mL ungefilterte Probe 1-mal mit 200 µL n-Octan extrahiert. Vor der Messung wurde dann die Octanphase 1:5 mit Ethanol verdünnt, da zu hohe Octankonzentrationen die chromatographische Auftrennung beeinträchtigten. Eine Extraktion mit n-Octan wurde auch durchgeführt, um Sulfidproben auf Elementarschwefel zu testen. Hierfür wurde zunächst das Sulfid durch Zinkacetat gefällt (s. Kapitel 3.3.5) und dann die Probe mit n-Octan ausgeschüttelt.

3.3.4 Ionenaustauschchromatographie: Sulfit, Sulfat und Thiosulfat

Die Bestimmung von Sulfit und Sulfat erfolgte ausschließlich durch Ionenaustauschchromatographie (Weiß 1991). Dagegen wurde Thiosulfat auch mithilfe der Ionenaustauschchromatographie gemessen (s. Kapitel 3.3.2), sodass für diese Verbindung insgesamt 2 unabhängige Verfahren existierten.

IC-Anlage

Eingesetzt wurde das System DX 500 der Firma Dionex mit Gradientenpumpe GP40, Autosampler AS3500, Suppressor ASRS-1, Detektor CD20 (Leitfähigkeit), Software PeakNet Version 4.3 und Computer. Die stationäre Phase bestand aus einer Vorsäule AG9-SC/4 mm und einer Trennsäule AS9-SC/4 mm. Das Injektionsvolumen betrug maximal 50 µL.

Methoden

Verwendet wurden Methoden, wie sie für das oben aufgeführte Trennsystem zur Messung von Standardanionen (Chlorid, Nitrit, Nitrat, Phosphat und Sulfat) vom Hersteller vorgeschlagen werden (Dionex). Der Eluent bestand entweder aus einer Lösung von 3 mM Na₂CO₃ in aqua bideion. oder, wenn höhere Trennleistungen verlangt waren, aus in aqua bideion. gelösten 1,8 mM Na₂CO₃ und 1,7 mM NaHCO₃. Der pH-Wert dieser Lösungen lag zwischen 10,5 und 11. Die Durchflussrate betrug

2 mL/min, und die Hintergrundleitfähigkeit der Eluenten wurde durch den Suppressor bei einer Stromstärke von 100 mA auf etwa 14 μS reduziert. Sulfit eluierte nach Phosphat und noch vor Sulfat. Die Laufzeiten lagen in Abhängigkeit vom Zustand der Trennsäule und je nach verwendetem Eluenten für Sulfit bei 3 bis 4 min und für Sulfat bei 5 bis 6 min. Thiosulfat wurde am längsten durch das Trennsystem zurückgehalten und eluierte nach 15 bis 25 min.

Bestimmung von Sulfit, Sulfat und Thiosulfat

Im Falle von Sulfat und Thiosulfat wurden zur Eichung wässrige Standards (aqua bideion.) der Kaliumsalze mit Konzentrationen von 0 bis 1000 μM verwendet. Eichstandards von Sulfit wurden mit dem Natriumsalz in einer Lösung von 1 mM KOH angesetzt, der 0,5 ‰ (v/v) einer 37%igen Formaldehydlösung zugesetzt waren (Lindgren et al. 1982, Weiß 1991). Der Eichbereich lag wie bei Sulfat und Thiosulfat bei 0 bis 1000 μM . Sofern nur Sulfat und Thiosulfat erfasst werden sollten, konnten gefilterte Proben direkt eingespritzt werden. Wurde auch Sulfit gemessen, so mussten die Proben alkalisiert werden (pH 10 bis 11) und das Sulfit durch Zugabe von Formaldehyd fixiert werden. Hierfür wurden üblicherweise 500 μL gefilterte Probe aus den Aktivitätstests mit 50 μL KOH-Lösung (100 mM) und 50 μL Formaldehydlösung (5 ‰ (v/v) einer 37%igen Lösung) versetzt.

3.3.5 Quantifizierung von Hydrogensulfid

Gelöstes Sulfid wurde mit der so genannten Methylenblau-Methode nach DEV bestimmt (Anonymus 1984, Kapitel D7, direkte Bestimmung). Die Methode basiert auf der sehr spezifischen Reaktion von Sulfid mit Dimethyl-p-phenylendiamin. Es bildet sich Leukomethylenblau, das in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen zu Methylenblau oxidiert wird. Dessen Konzentration wird photometrisch bei 670 nm bestimmt (1-cm-Küvette).

Probenvorbereitung

Alle Proben wurden grundsätzlich mit einer 2%igen Zinkacetatlösung (enthält ca. 100 mM Zn^{2+}) verdünnt, um vorhandenes Sulfid zu binden. Zu üblicherweise 100 μL gefilterter Probe aus den Aktivitätsversuchen wurden 100 μL Zinkacetatlösung gegeben. Bei niedrigen Sulfidgehalten (unter 10 μM) wurden 500 μL Probe mit 100 μL Zinkacetat versetzt. So behandelt, wurden die Proben entweder zunächst bei -25 °C gelagert oder sofort zur Sulfidmessung vorbereitet.

Messung

Eichreihen von 0 bis 25 μM wurden aus einer 50 mM Stammlösung (Natriumsalz, aqua deion.) hergestellt. Dabei wurde die Stammlösung mit der Zn-Acetatlösung verdünnt und die so erhaltenen Standards wie die Proben aus den Aktivitätstests behandelt. Zu einer mit Zinkacetat fixierten, aufgetauten Probe mit einem Volumen von insgesamt 200 oder 600 μL wurden 650 bzw. 250 μL aqua deion., 100 μL Dimethyl-

p-phenylendiamin-Lösung (0,2%ige Lösung des Chlorids in 3,6 M H_2SO_4) und 50 μL Eisen(III)-Lösung (1%ige Lösung von $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ in 0,36 M H_2SO_4) gegeben und vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die erste photometrische Messung, die in Abständen von 10 min wiederholt wurde. Bei hohen Konzentrationen von GSH lief die Farbreaktion verzögert ab, sodass insbesondere bei niedrigen Sulfidgehalten bis zu 40 min inkubiert werden musste, bis sich das bei 670 nm erhaltene Signal nicht mehr verstärkte. Wichtig ist, dass stets mehr Eisen(III)-Ionen im Reaktionsansatz vorhanden sein müssen als GSH, da auch bei den im Test vorherrschenden pH-Werten von 0 bis 1 das Thiol durch die Eisenionen zum Disulfid oxidiert wird. Die nach DEV vorgeschriebenen 1 mM Eisen(III)-Ionen reichten problemlos aus, im Reaktionsansatz Konzentrationen von 500 μM GSH zu neutralisieren. Die Inkubationsdauer verlängerte sich dann beispielsweise für 12,5 μM Sulfid von 10 auf 20 min. Waren zu hohe Gehalte an GSH vorhanden, mussten die Proben entsprechend mit der Zinkacetatlösung verdünnt werden.

3.3.6 Darstellung der Messergebnisse

Im Falle der Enzymtests (s. Kapitel 3.2.4) war es wegen der z. T. sehr schnell ablaufenden Reaktionen unmöglich, für den Zeitpunkt 0, also unmittelbar nach Zugabe aller Reagenzien, einen korrekten Messwert zu erhalten, zumal einige Sekunden für die Vermischung aller Verbindungen benötigt wurden. Tatsächlich wurden erste Messwerte etwa 1 min nach Versuchsstart genommen. Die in den Abbildungen zu Enzymtests dargestellten Werte für den Zeitpunkt 0 basieren deshalb i. d. R. nicht auf Proben aus den Reaktionsansätzen, sondern wurden aufgrund der gemessenen Konzentrationen, die die jeweiligen Schwefelverbindungen in den verwendeten Stammlösungen besaßen, berechnet. Sind Werte mit Fehlerbalken dargestellt, so handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 5 Einzelwerten.

3.4 Weitere analytische Methoden

3.4.1 Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen

Die Bestimmung der löslichen Eisen(II)-Ionen und die Summe der insgesamt gelösten Eisenionen erfolgte nach der DEV-Methode (Anonymus 1984, Kapitel E1). Die Differenz beider Werte entspricht dem Gehalt an Eisen(III)-Ionen. Bei dieser Methode bilden zweiwertige Eisenionen mit 1,10-Phenanthrolin einen roten Komplex, dessen Extinktion photometrisch bei 492 nm gemessen wird. Durch Zugabe von Hydroxylamin werden vorhandene dreiwertige Eisenionen reduziert, sodass eine Quantifizierung der insgesamt gelösten Eisenionen ermöglicht wird.

3.4.2 pH-Wert, Redoxpotenzial

Für die Messung von pH-Werten und Redoxpotenzialen wurden Instrumente der Firma WTW eingesetzt (Typen pMX 2000 und pH 522) und entsprechende Elektroden der Firmen Ingold oder Metrohm verwendet. Kalibriert wurden die Geräte mit handelsüblichen pH- und Redoxpuffern.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte photometrisch nach Bradford (1976), modifiziert nach Spector (1978), wie bereits bei Wentzien (2002) beschrieben. Rohextrakte konnten direkt für die Messung eingesetzt werden. Dagegen mussten geerntete Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Da Schwefelverbindungen und insbesondere Elementarschwefel bei der Bestimmung störend wirken, wurden mit Schwefel angezogene Zellen mit Methanol gewaschen (Visscher & van Gernerden 1991). Hierzu wurden 100 µL in Waschlösung suspendierte Zellen mit 900 µL Methanol überschichtet und vermischt. Nach Zentrifugation (Heraeus-Biofuge, 10.000 U/min, 10 min, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgetrennt. Enthielt das Zellpellet noch Elementarschwefel, wurde der Methanolschritt wiederholt; ansonsten wurden die Zellen in Lysislösung (0,45 % NaCl, 0,15 N NaOH) suspendiert und durch Hitzebehandlung aufgeschlossen (95 °C, 10 min). Nach Zentrifugation (Heraeus-Biofuge, 10.000 U/min, 10 min, Raumtemperatur) wurde dann im Überstand der Proteingehalt gemessen. Als Eichstandard diente Rinderserumalbumin der Firma Serva.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche mit intakten Zellen

Für Oxidationsversuche mit Zellextrakten wurde ein grobdisperses System aus Elementarschwefel und Wasser als Substrat eingesetzt (s. Kapitel 3.2.4). Um im Vorwege zu testen, wie dieses Substrat von ganzen Zellen acidophiler Laugungsbakterien angenommen wird, wurden entsprechende Oxidationsversuche durchgeführt. Alle untersuchten Schwefeloxidanten (s. Kapitel 3.1.1) oxidierten den verwendeten Elementarschwefel bei pH 3 zu Sulfat, ohne dass dabei freie Zwischenverbindungen wie Sulfid, Sulfit, Thiosulfat oder Polythionate detektierbar waren (Daten nicht dargestellt). So wurde z. B. durch Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1, die lithotroph mit Elementarschwefel angezogen worden waren, bei einer Zelldichte von $10^8/\text{mL}$ und einer Startkonzentration von 1,2 mM Elementarschwefel in den ersten 1 bis 1,5 h Sulfat mit einer konstanten Geschwindigkeit um $200 \mu\text{M/h}$ gebildet (**Abb. 4.1**).

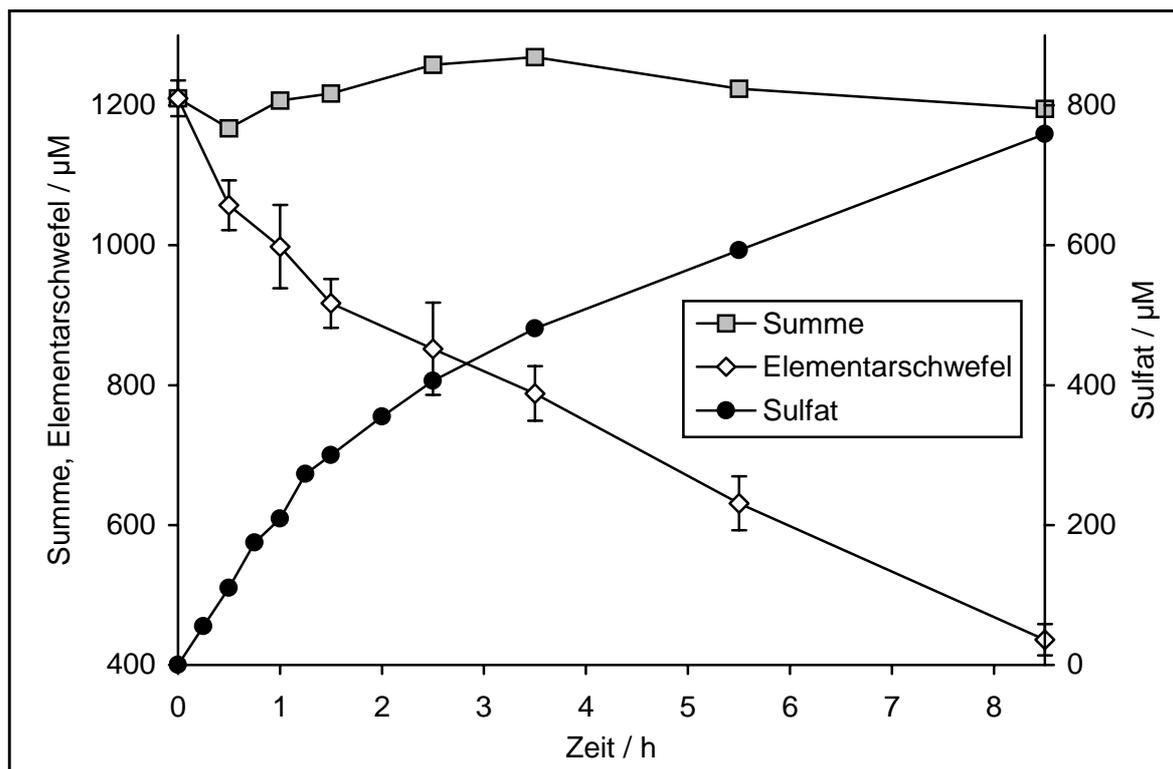


Abb. 4.1: Oxidation von Elementarschwefel durch intakte Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1, die mit Standardschwefelmedium angezogen worden waren. Dargestellt sind die Konzentrationen von Sulfat und Elementarschwefel sowie deren Summe über einen Zeitraum von 8,5 h. Inkubiert wurde bei 30 °C und pH 3,0 mit einer Zelldichte von $10^8/\text{mL}$ (entspricht 3,9 mg/L Zellprotein). Ermittlung der maximalen Oxidationsrate auf der Basis des linearen Anstiegs des Sulfatgehaltes innerhalb der ersten 1,5 h ergibt $(211 \pm 4) \mu\text{M/h}$ ($r = 0,995$, $n = 7$).

Danach verringerte sich die Oxidationsrate zunehmend, und ein vollständiger Abbau des Substrats wurde erst nach 24 h erreicht (Daten nicht dargestellt). Parallel zum Anstieg der Konzentration von Sulfat sank der Gehalt an Elementarschwefel, sodass die Summe aus beiden Schwefelverbindungen unverändert blieb (**Abb. 4.1**).

Die maximalen Oxidationsraten (**Abb. 4.1**) wurden bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 insgesamt für Zelldichten von 10^7 bis 5×10^8 /mL bestimmt (**Abb. 4.2**). Während Ansätze ohne Zellen keinerlei Oxidationsaktivität zeigten, war eine proportionale Zunahme der Rate für die Oxidation von elementarem Schwefel bis zu einer Zelldichte von 10^8 /mL (entspricht 3,9 mg/L Zellprotein) zu beobachten. Hieraus lässt sich eine spezifische Aktivität von etwa $50 \mu\text{mol/h}/(\text{mg Protein})$ berechnen (**Abb. 4.2**).

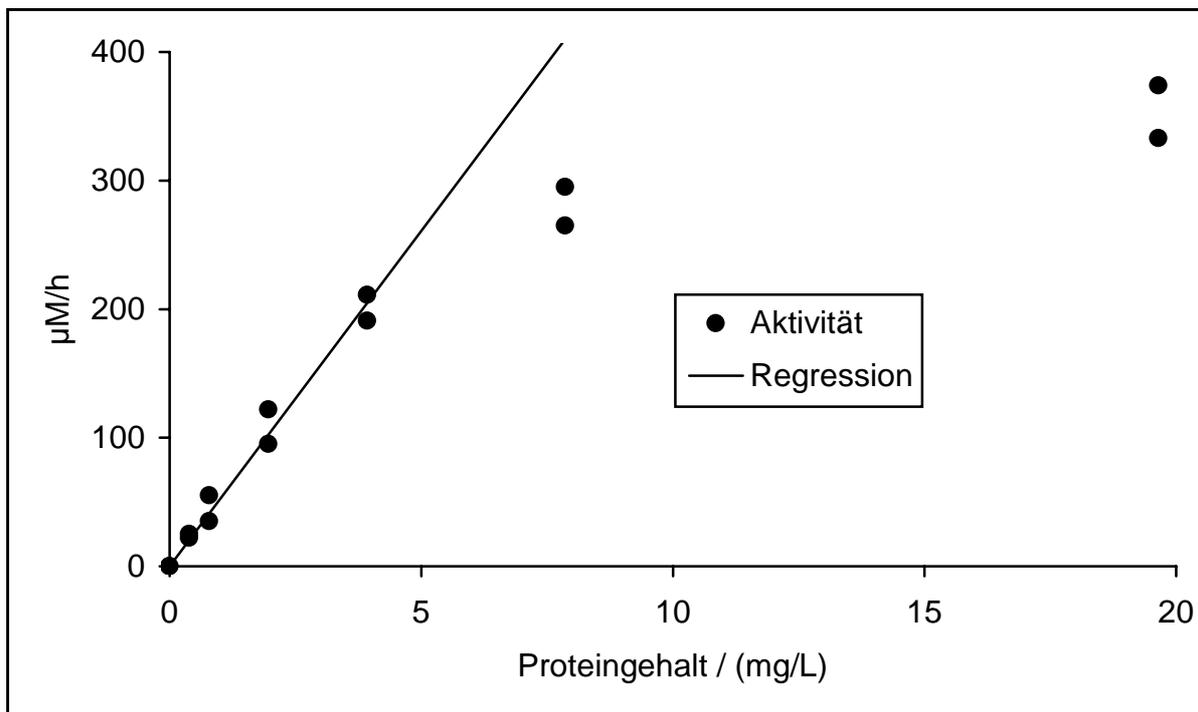


Abb. 4.2: Oxidationsraten für Elementarschwefel von intakten Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1, die mit Standardschwefelmedium angezogen worden waren, in Abhängigkeit von der Zelldichte bzw. dem Proteingehalt. Dargestellt sind die mit 0 bis 19,5 mg/L Zellprotein (entspricht einer Zelldichte von 5×10^8 /mL) erhaltenen maximalen Raten. Für Zelldichten bis 10^8 /mL bzw. einem Proteingehalt von 3,9 mg/L ergibt sich eine spezifische Oxidationsrate von $(52 \pm 2) \mu\text{mol/h}/\text{mg}$ (Regressionsanalyse: $r = 0,991$, $n = 9$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgehend verwendete grobdispergierte Elementarschwefel problemlos und mit hohen Raten von den untersuchten Laugungsbakterien oxidiert wurde. Hierbei wurden keinerlei intermediäre Schwefelverbindungen detektiert, die Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der Schwefel-Dioxygenase geben können.

4.2 Identifizierung der *in vitro* bei der enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel auftretenden Schwefelverbindungen

Im Gegensatz zu den Oxidationsversuchen mit intakten Zellen (s. Kapitel 4.1) wurde Elementarschwefel durch zellfreie Extrakte der verwendeten Schwefeloxidanten nicht allein zu Sulfat oxidiert. Vielmehr kam es zu einer Akkumulation von Zwischenverbindungen. Zur Identifizierung dieser Schwefelverbindungen wurden zunächst aerobe Enzymtests bei pH 6,5 durchgeführt. Generell konnte in Zellextrakten aller untersuchten Schwefeloxidanten nur in Gegenwart von GSH eine enzymatische Oxidation von Elementarschwefel beobachtet werden. In diesen Enzymtests wurden neben aus Elementarschwefel hervorgegangenen Oxidationsprodukten noch eine ganze Reihe weiterer anorganischer und organischer Schwefelverbindungen nachgewiesen, die Aufschluss über den Reaktionsmechanismus der Schwefel-Dioxygenase geben können. Im Folgenden wird deshalb am Beispiel eines repräsentativen Versuchs mit einem Zellextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 beschrieben, welche für das Reaktionsgeschehen relevanten Verbindungen auftraten.

4.2.1 Oxidation von Elementarschwefel durch ein zellfreies System von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1

Die Oxidation von Elementarschwefel in einem aktiven, zellfreien System, das aus mit Elementarschwefel angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 hergestellt worden war, wurde über einen Zeitraum von 12 h verfolgt. Gestartet wurde der Enzymtest durch Zugabe von GSH.

Oxidationsprodukte

Nach einer kurzen Lag-Phase von etwa 10 min wurde der eingesetzte Elementarschwefel über einen Zeitraum von 4 h und bezogen auf die einzelnen Schwefelatome mit einer konstanten Rate von 170 $\mu\text{M}/\text{h}$ fast ausschließlich zu Thiosulfat oxidiert (**Abb. 4.3 A und B**). Danach nahm die Oxidationsgeschwindigkeit bis zum Versuchsende stetig ab. Thiosulfat kann formell als eine Verbindung von einem Elementarschwefelatom und einem Sulfitmolekül aufgefasst werden, es enthält also pro Mol neben einem Mol Edukt ein Mol Sulfit als Oxidationsprodukt. Deshalb wird hier die Konzentration von Thiosulfat nicht auf die in dieser Verbindung enthaltenen Schwefelatome bezogen, sondern als die Anzahl der vorhandenen Sulfitmoleküle angegeben. Während Sulfit und Polythionate wie beispielsweise Tri- oder Tetrathionat nicht nachweisbar waren, wurde neben Sulfat das S-Sulfonat des Glutathions (GSSO_3^-) gebildet. Unter den Versuchsbedingungen entsteht GSSO_3^- entweder durch Reaktion von Sulfit mit dem Disulfid des GSH (GSSG) gemäß **Gl. 3.1** oder als Zwischenprodukt einer GSH-abhängigen Reduktion von Polythionaten nach

Gl. 4.23 (Stedel & Albertsen 1992, Albertsen 1993, s. Kapitel 4.4.2). Außerdem wird eine direkte Oxidation des Glutathion-Persulfids (GSSH) zum S-Sulfonat diskutiert (Stedel & Albertsen 1992). Da direkt oxidiertes Persulfid wie auch Sulfid und Polythionate Oxidationsprodukte des Elementarschwefels darstellen, ist folglich GSSO_3^- ebenfalls eines und wird hier entsprechend bei diesen aufgeführt.

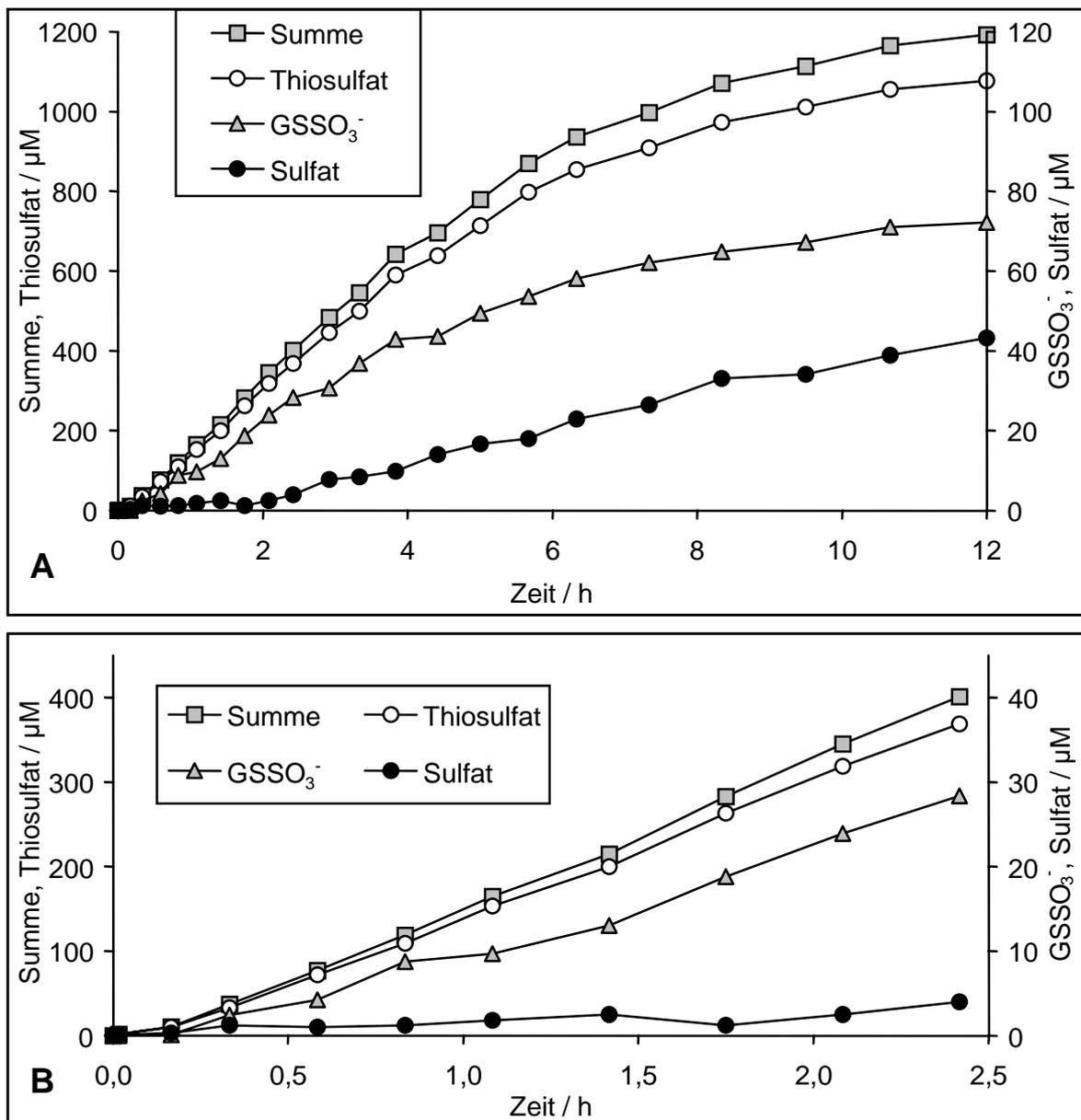


Abb. 4.3: GSH-abhängige Oxidation von Elementarschwefel durch einen aktiven, zellfreien Extrakt, der aus mit Elementarschwefel angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 hergestellt worden war. Inkubiert wurde unter den Bedingungen des aeroben Standardzytmtestes (mit 500 µM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,05 g/L). **A:** Konzentrationen der Oxidationsprodukte Thiosulfat, Sulfat und Glutathion-S-Sulfonat (GSSO_3^-) sowie die Summe dieser Verbindungen über 12 h. **B:** Ausschnitt aus **A** von 0 bis 2,5 h.

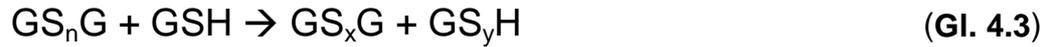
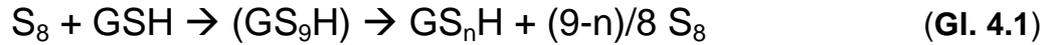
Sulfat wie auch Glutathion-S-Sulfonat entstanden allerdings im Vergleich zum Thio-sulfat nur in geringen Mengen. So betrug der Anteil des S-Sulfonats an den gebildeten Oxidationsprodukten über die gesamte Versuchszeit gleichbleibend um 6 %, während ein Anstieg der Sulfatkonzentration erst nach etwa 2 h einsetzte. Schließlich wurden hier nach 12 h ein Beitrag von fast 4 % erzielt und insgesamt etwa 1200 μM Elementarschwefel oxidiert.

GSH-Verbindungen und Hydrogensulfid

Im Gegensatz zu der über 4 h konstanten Oxidationsaktivität für Elementarschwefel wurde GSH zunächst rasch verbraucht, bis die Konzentration von bei Versuchsstart vorhandenen 500 μM innerhalb von 2 h auf Werte unterhalb von 200 μM fiel (**Abb. 4.3 C**). Im Folgenden war nur noch ein vergleichsweise geringer Rückgang von unter 20 $\mu\text{M}/\text{h}$ zu beobachten. Als Reaktionsprodukt entstand vor allem das Disulfid des GSH, das nahezu parallel zum Verbrauch von GSH gebildet wurde. Daneben wurden etwa 10 % des eingesetzten GSH in das bereits erwähnte GSSO_3^- umgewandelt. Des Weiteren wurden noch als höhere Homologe des GSSG (GS_nG , $n > 2$) das Bisorganyltrisulfan und in geringeren Maßen auch das entsprechende Tetrasulfan detektiert, deren Konzentrationen aber mangels geeigneter Standards nicht bestimmt werden konnten (s. Kapitel 3.3.2). Als Orientierung über die Konzentrationsverhältnisse bei den Polysulfanen werden deshalb hier die mittels HPLC aufgezeichneten Peakflächen dieser Verbindungen angegeben (**Abb. 4.3 D**). Auch das Bisorganylpentasulfan wurde nachgewiesen, allerdings nur mit etwa 5-mal schwächeren Signalen als das Tetrasulfan (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu waren weitere GSH-Derivate wie beispielsweise das Persulfid oder höhere Monoorganylpolysulfane (GS_nH) nicht nachweisbar. Die höchsten Konzentrationen der gefundenen Polysulfane wurden nach einem schnellen Anstieg innerhalb von 0,5 h erzielt, während dann bis zum Versuchsende ein langsamer Rückgang zu beobachten war (**Abb. 4.3 D**). Entsprechend wurde ein maximaler Anteil dieser Verbindungen an der Gesamtmenge von GSH und dessen Derivaten um 20 % in den ersten 1 bis 2 h erreicht, wie aus dem Bilanzdefizit der quantifizierbaren GSH-Verbindungen ersichtlich ist (**Abb. 4.3 C**).

Unter den Versuchsbedingungen findet nur eine geringe Autoxidation des GSH statt. In Kontrollversuchen ohne Elementarschwefel wurden unabhängig von der Anwesenheit aktiver Zellextrakte Raten um 20 $\mu\text{M}/\text{h}$ gemessen (s. Kapitel 4.3.2, **Abb. 4.9 A**). GSH wurde dabei quantitativ in GSSG überführt. Die beobachtete hohe Oxidationsrate in den ersten 2 h des Versuchs und das Auftreten von höheren Polysulfanen ist deshalb nahezu vollständig auf die Oxidation des GSH durch Elementarschwefel zurückzuführen. Dass hierbei neben GSSG auch das Tri- und Tetrasulfan gebildet werden, spricht für einen differenzierteren Reaktionsablauf als er in **Gl. 2.14** wiedergegeben ist. Wie bereits in **Gl. 2.11** angedeutet, kommt es durch einen nukleophilen Angriff des GSH an den S_8 -Ring zur Bildung von höheren Monoorganylpolysulfanen (**Gl. 4.1**, GS_nH , initial $n = 9$), die in polaren Lösungsmitteln sehr

instabil sind und rasch zu niedrigeren Homologen und Elementarschwefel zerfallen (Huxtable 1986).



Die Monoorganylpolysulfane reagieren untereinander bzw. mit GSH (Gl. 4.2) zu Bisorganylpolysulfanen und Hydrogensulfid. Zusätzlich kann es noch zu Umlagerungen kommen, bei denen GSH bzw. dessen Polysulfanhomologe mit den Bisorganylpolysulfanen reagieren (Gl. 4.3).

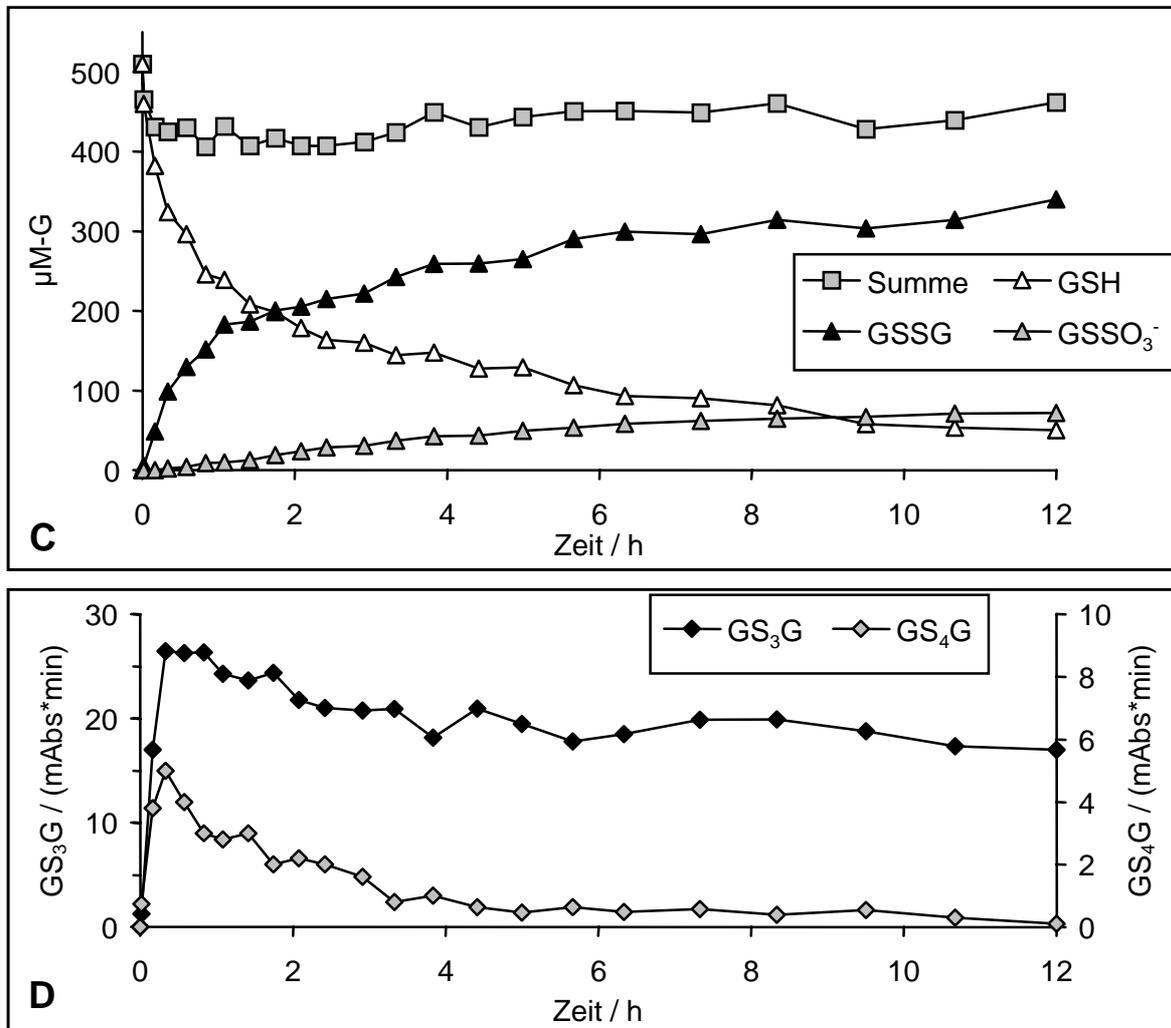


Abb. 4.3 (Fortsetzung): **C**: Konzentrationen der quantifizierbaren GSH-Verbindungen (Glutathion, dessen Disulfid und das Glutathion-S-Sulfonat) sowie deren Summe. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die in den jeweiligen Verbindungen enthaltenen GSH-Reste (µM-G). **D**: Peakflächen der Tri- und Tetrasulfanhomologen des GSSG bei 215 nm.

Die Oxidation von GSH durch Elementarschwefel erfolgt also über das GSH-Persulfid (GS_nH , $n = 2$) und dessen höhere Homologe. Hierbei wird Elementarschwefel zum einen zu Hydrogensulfid reduziert und zusätzlich als Sulfanschwefel in Bisorganylpolysulfane eingebaut. Bei Vernachlässigung der Autoxidation lässt sich somit aus dem Rückgang von GSH gemäß **Gl. 2.14** und **4.2** die im Versuchsansatz gebildete Menge an Hydrogensulfid abschätzen (**Abb. 4.3 E**). Bei Versuchsende waren etwa 400 μM GSH oxidiert worden, was einer Bildung von 200 μM Hydrogensulfid entspricht. Tatsächlich wurden maximale Konzentrationen an Hydrogensulfid von etwa 65 μM gemessen. Nur in den ersten 10 bis 20 min folgte die Bildung von Hydrogensulfid dem aufgrund des GSH-Verbrauchs vorhergesagten Verlauf. Danach ging die Konzentration stetig zurück bis nach 5 h kein Hydrogensulfid mehr nachweisbar war (**Abb. 4.3 E**).

Schwefelbilanz

Aus der Summe der aus Elementarschwefel hervorgegangenen Oxidationsprodukte lässt sich der durch die Oxidationsaktivität bedingte Rückgang der Elementarschwefelkonzentration berechnen. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei der Bildung von Thiosulfat insgesamt 2 Schwefelatome verbraucht werden. Ein Vergleich der so ermittelten und der gemessenen Menge an Elementarschwefel zeigt gute Übereinstimmung (**Abb. 4.3 F**).

Im Gegensatz zu den gelösten organischen und anorganischen Schwefelverbindungen ist die Quantifizierung des Elementarschwefels trotz Vorliegens in Form von grobdispargierten Tröpfchen schwierig und mit einem Messfehler um 10 % behaftet. Bei Inkubationszeiten von mehreren Stunden bei gleichzeitigem, durch die Oxidationsaktivität bedingtem Anstieg des Salzgehaltes kommt es zu einer zunehmenden Aggregatbildung des Elementarschwefels. Dies erschwert zusätzlich eine repräsentative Probenahme und resultiert in einem erhöhten Messfehler (**Abb. 4.3 F**). Trotzdem lagen die gemessenen Werte für Elementarschwefel zumindest in den ersten 5 h nur um maximal 500 μM unter der aufgrund der Summe der Oxidationsprodukte vorhergesagten Konzentration. Eine Differenz in dieser Größenordnung ist zu erwarten, wenn man die Verluste an Elementarschwefel durch Bildung von Hydrogensulfid (ca. 200 μM aufgrund des GSH-Rückgangs geschätzt) und Einbau von Sulfanschwefel in Bisorganylpolysulfane (ca. 50 μM aufgrund des Bilanzdefizits an GSH-Verbindungen geschätzt) berücksichtigt. Auf der Basis dieser Daten kann das signifikante Auftreten von weiteren, bisher nicht erfassten Schwefelverbindungen, die durch die Oxidationsaktivität oder aus begleitenden Reaktionen aus Elementarschwefel hervorgegangen sein könnten, ausgeschlossen werden.

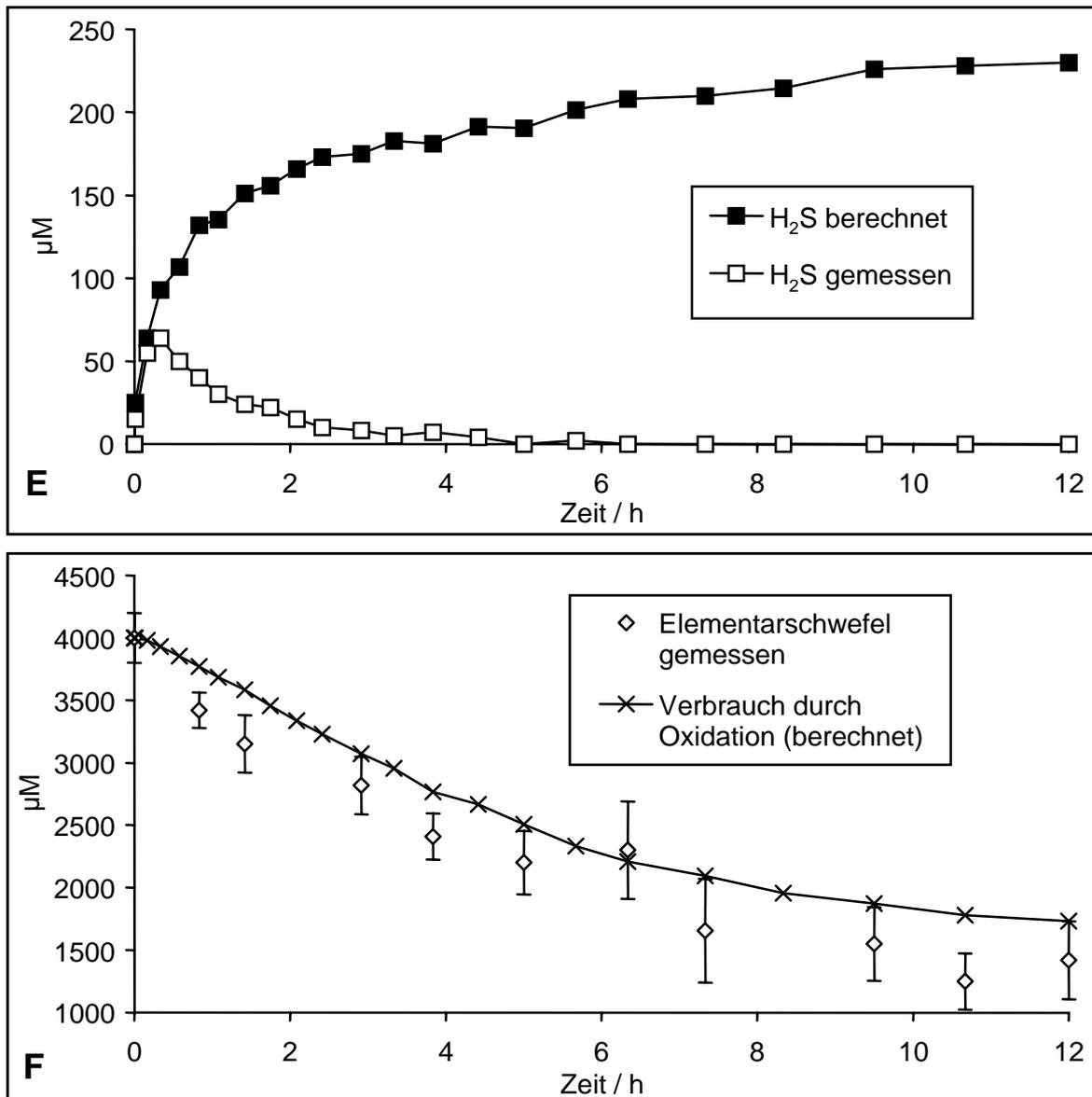


Abb. 4.3 (Fortsetzung): **E**: Aufgrund der GSH-Oxidation berechnete Bildung von Hydrogensulfid und tatsächlich gemessene Konzentration. **F**: Abnahme von Elementarschwefel und auf der Basis der quantifizierten Oxidationsprodukte berechneter Verbrauch (s. Text).

Kontrollversuch mit inaktivem Zellextrakt

Um beurteilen zu können, in welchem Umfang unter den Versuchsbedingungen eine nicht-enzymatische Oxidation von Elementarschwefel und GSH stattfindet, wurde ein entsprechender Kontrollversuch mit hitzeinaktiviertem Zellextrakt durchgeführt. Im Vergleich zu dem Versuch mit aktivem Extrakt war in der Kontrolle nur eine geringe Oxidationsaktivität für Elementarschwefel zu beobachten. Der Elementarschwefel wurde in den ersten 4 bis 5 h zunächst mit nahezu konstanter Rate von etwa 7 $\mu\text{M}/\text{h}$ oxidiert, was etwa 4 % der mit aktivem Zellextrakt beobachteten Aktivität entspricht. Als dominierendes Oxidationsprodukt entstand Thiosulfat mit etwa 75 bis 80 %, daneben wurden noch das Glutathion-S-Sulfonat und Sulfat gebildet, und zwar etwa

zu gleichen Teilen (**Abb. 4.4 A**). Nach 5 h nahm die Oxidationsaktivität merklich ab, sodass bei Versuchsende nach 12 h nur knapp 40 μM Elementarschwefel oxidiert waren, was etwa 3 % der mit aktivem Zellextrakt erzielten Menge entspricht.

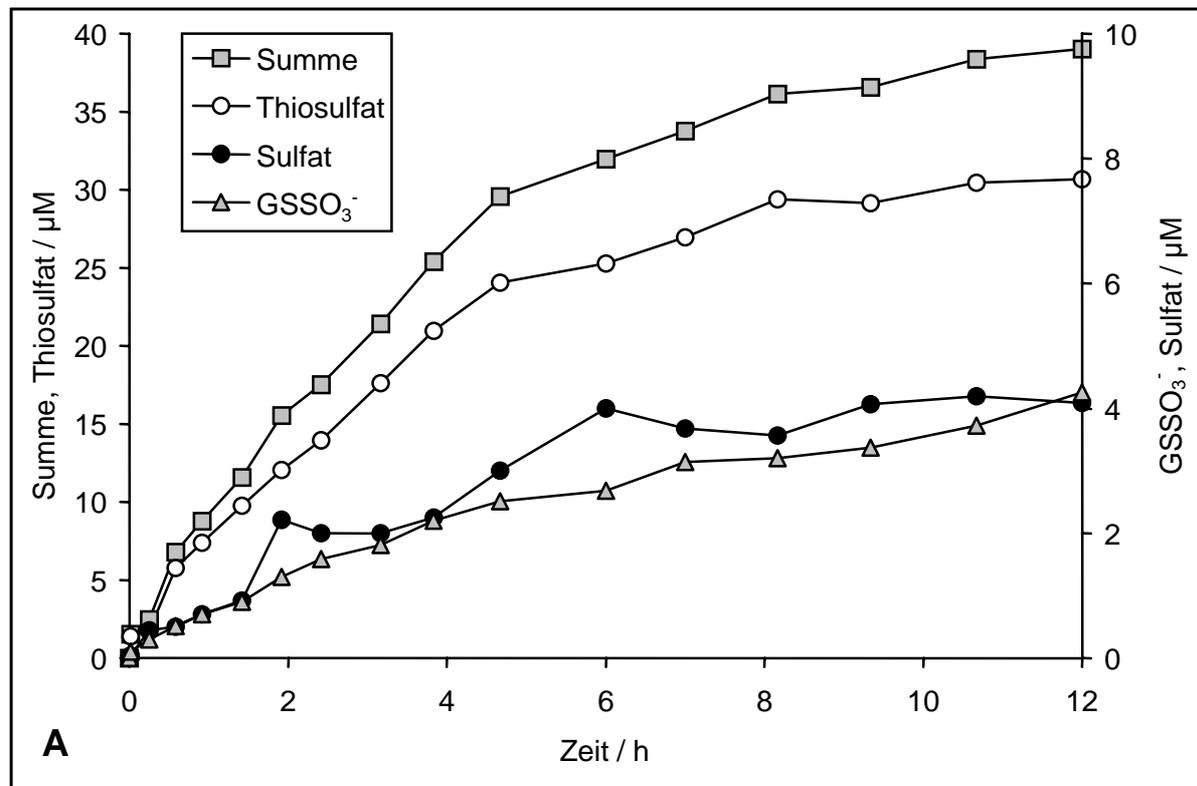


Abb. 4.4: GSH-abhängige Oxidation von Elementarschwefel mit einem hitzeinaktivierten Zellextrakt, der aus mit Elementarschwefel angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 hergestellt worden war. Inkubiert wurde unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (mit 500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,05 g/L). **A:** Konzentrationen der Oxidationsprodukte Thiosulfat, Sulfat und Glutathion-S-Sulfonat sowie die Summe dieser Verbindungen über 12 h.

Im Gegensatz zu den großen Unterschieden bei der Oxidationsaktivität für Elementarschwefel wurde GSH sowohl im Ansatz mit aktivem Zellextrakt als auch in der hitzeinaktivierten Kontrolle mit sehr ähnlichem Verlauf oxidiert (**Abb. 4.4 B**). Im Kontrollansatz war sogar ein etwas höherer GSH-Abbau zu beobachten, sodass hier die GSH-Konzentration nach 2 h von 500 auf 100 μM gefallen war, während mit unbehandeltem Zellextrakt bis zu diesem Zeitpunkt nur etwa 300 μM GSH oxidiert waren. Entsprechend wurde in der Kontrolle auch mehr GSSG gebildet. An höheren Bisorganylpolysulfanen wurde hier GS₃G in nahezu identischen, GS₄G aber mit etwa 2-fach höheren Gehalten detektiert als im Versuch mit aktivem Zellextrakt (**Abb. 4.4 C**). Außerdem war in der Kontrolle auch das Signal für das Pentasulfan des GSSG stärker, allerdings trat es wieder im Vergleich zu den anderen Polysulfanen in sehr geringen Konzentrationen auf. Insgesamt wurden diese nicht-quantifizierten Polysul-

fane in der Summe nicht in höheren Mengen als im unbehandelten Ansatz gebildet, da auch in der Kontrolle das maximale Bilanzdefizit der quantifizierten GSH-Verbindungen nach 1 bis 2 h bei 20 % lag.

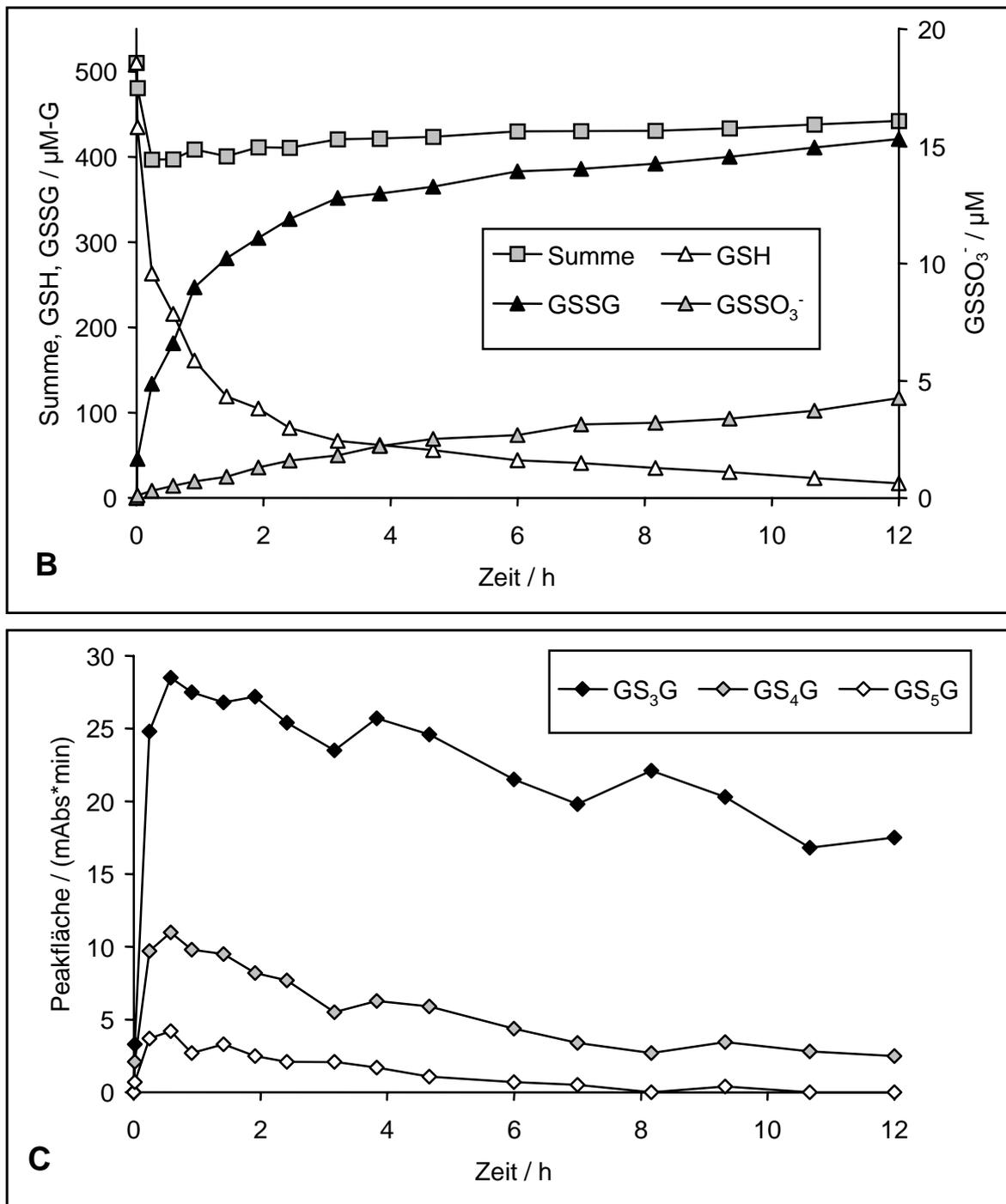


Abb. 4.4 (Fortsetzung): **B**: Konzentrationen der quantifizierbaren GSH-Verbindungen (Glutathion, dessen Disulfid und das Glutathion-S-Sulfonat) sowie deren Summe. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die in den jeweiligen Verbindungen enthaltenen GSH-Reste ($\mu\text{M-G}$). **C**: Peakflächen der Tri-, Tetra- und Pentasulfan-homologen des GSSG bei 215 nm.

Wie aufgrund der GSH-Oxidation zu erwarten war, konnte ebenfalls in der Kontrolle eine Bildung von Hydrogensulfid beobachtet werden, und zwar mit einem zum unbehandelten Ansatz vergleichbaren Verlauf (Daten nicht dargestellt). Die Konzentration stieg zunächst parallel zum GSH-Rückgang an, wobei nach 0,5 h ein maximaler Wert von 70 μM erreicht war, und dann eine stetige Abnahme des Sulfidgehaltes einsetzte. Im Gegensatz zum Versuch mit aktivem Zellextrakt, aber konform mit dem geschätzten, geringen Verbrauch an Elementarschwefel von 400 μM (ca. 250 μM durch Reduktion mit GSH, ca. 70 μM durch Oxidation bzw. Einbau in Thio-sulfat, ca. 50 μM durch Einbau in Bisorganylpolysulfane), blieb die Konzentration von grobdispertem Elementarschwefel über 12 h unverändert bei (4000 ± 600) μM (Daten nicht dargestellt). Auch beim Kontrollansatz kann also davon ausgegangen werden, dass andere als die bereits aufgeführten Schwefelverbindungen nur in vernachlässigbar geringen Mengen aus Elementarschwefel gebildet wurden.

Nur in Anwesenheit von GSH wurde Elementarschwefel mit aktiven Zellextrakten der untersuchten Laugungsbakterien oxidiert, und zwar zu Thiosulfat, Glutathion-S-Sulfonat und Sulfat. Diese Reaktionen werden im Wesentlichen enzymatisch katalysiert, da mit hitzeinaktiviertem Zellextrakt nur vergleichsweise geringe Oxidationsraten für Elementarschwefel erzielt wurden. Elementarschwefel wurde allerdings nicht nur oxidiert, sondern auch unter GSH-Verbrauch zu Sulfid reduziert und als Sulfan-schwefel in höhere Homologe des GSSG eingebaut. Die letzten beiden Reaktionen wurden nicht, wie dies für die Oxidation von Elementarschwefel der Fall war, durch Hitzebehandlung der Zellextrakte verlangsamt. Vielmehr lief die Bildung von Sulfid und Bisorganylpolysulfanen im inaktiven Ansatz verstärkt ab und hat deshalb offenbar keinen enzymatischen Ursprung. Möglicherweise wird aber die nicht-enzymatische Reduktion von Elementarschwefel durch die enzymatische Oxidation desselben beeinflusst, wie durch die geringeren Bildungsraten für GSSG und der höheren Bisorganylpolysulfane im aktiven Ansatz angedeutet wird. Somit könnten sowohl Sulfid als auch organische Schwefelverbindungen am Mechanismus der Schwefel-Dioxygenase beteiligt sein. Um das genaue Zusammenspiel der im Enzymtest ablaufenden enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozesse aufzuklären, wurden deshalb entsprechende kinetische Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden.

4.3 Kinetische Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel

Wie im vorhergehenden Abschnitt anhand von Versuchen mit einem aus Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 gewonnenen Rohextrakt dargestellt, handelt es sich bei der enzymatischen, GSH-abhängigen Elementarschwefel-Oxidation um ein komplexes Reaktionsgeschehen. Zum einen waren als Oxidationsprodukte des Elementarschwefels nicht nur Thiosulfat und Sulfat, sondern auch das S-Sulfonat des GSH nachzuweisen. Zum anderen wurde Elementarschwefel nicht-enzymatisch durch GSH reduziert, wobei Hydrogensulfid und neben GSSG auch höhere Bisorganylpolysulfane entstanden. Aufgrund dieser Ergebnisse kommen sowohl an GSH gebundener Sulfanschwefel als auch Hydrogensulfid als Substrat für das Elementarschwefel oxidierende System infrage. Um die Identität des tatsächlich genutzten Substrates genauer eingrenzen zu können, wurden deshalb Kurzzeitexperimente von maximal 2 h durchgeführt, die zur Untersuchung der Kinetik der Polysulfanbildung und der GSH-Oxidation in Abhängigkeit von der Aktivität des Elementarschwefel oxidierenden Enzyms dienten. Des Weiteren wurden Versuche zur Identifizierung des ersten Oxidationsproduktes durchgeführt.

4.3.1 Bildung von höheren Bisorganylpolysulfanen in Abhängigkeit von der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation

Neben Kontrollansätzen ohne bzw. mit hitzeinaktiviertem Zellextrakt wurden Aufschlüsse von Zellen der Bakterienstämme *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1, *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 und K6 sowie *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T getestet. Da sich keine Unterschiede zwischen den für die Zellaufschlüsse verwendeten Bakterienstämme ergaben, werden im Folgenden die Ergebnisse für alle Extrakte zusammengefasst. Die aktiven Extrakte zeigten innerhalb der Versuchsdauer konstante Oxidationsraten für Elementarschwefel (Daten nicht gezeigt). Unter Variation der Konzentration an aktivem Zellextrakt wurden unterschiedliche Aktivitäten der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation eingestellt, sodass insgesamt 6 Bereiche von 100 bis 600 $\mu\text{M/h}$ untersucht werden konnten. Für jeden Aktivitätsbereich wurden Ergebnisse von mindestens 5 Ansätzen zusammengefasst, deren Oxidationsrate für Elementarschwefel nicht stärker als 10 % vom jeweiligen Bereichswert abwich.

Der zeitliche Verlauf des Auftretens von höheren Homologen des GSSG in den Testansätzen konnte nur sehr bedingt aufgezeichnet werden. Zwar war eine Identifizierung bis zum Pentasulfan aufgrund der spezifischen Laufzeiten und Spektren der Verbindungen mittels Ionenpaarchromatographie möglich (s. Kapitel 3.3.2), jedoch konnte mangels reiner Standards keine Quantifizierung durchgeführt werden. Statt einer Konzentrationsangabe wird hier deshalb wie bereits im vorhergehenden Kapitel

(s. **Abb. 4.3 D** und **Abb. 4.4 C**) als Orientierung die Peakfläche angegeben, welche die Polysulfane im HPLC-Chromatogramm bei 215 nm aufwiesen. Die Konzentrationen quantifizierter GSH-Verbindungen, neben GSH, GSSG und GSSO_3^- , sowie deren Summe werden in „ $\mu\text{M-G}$ “, d. h. bezüglich der in den jeweiligen Verbindungen enthaltenen Zahl an GSH-Resten, ausgewiesen.

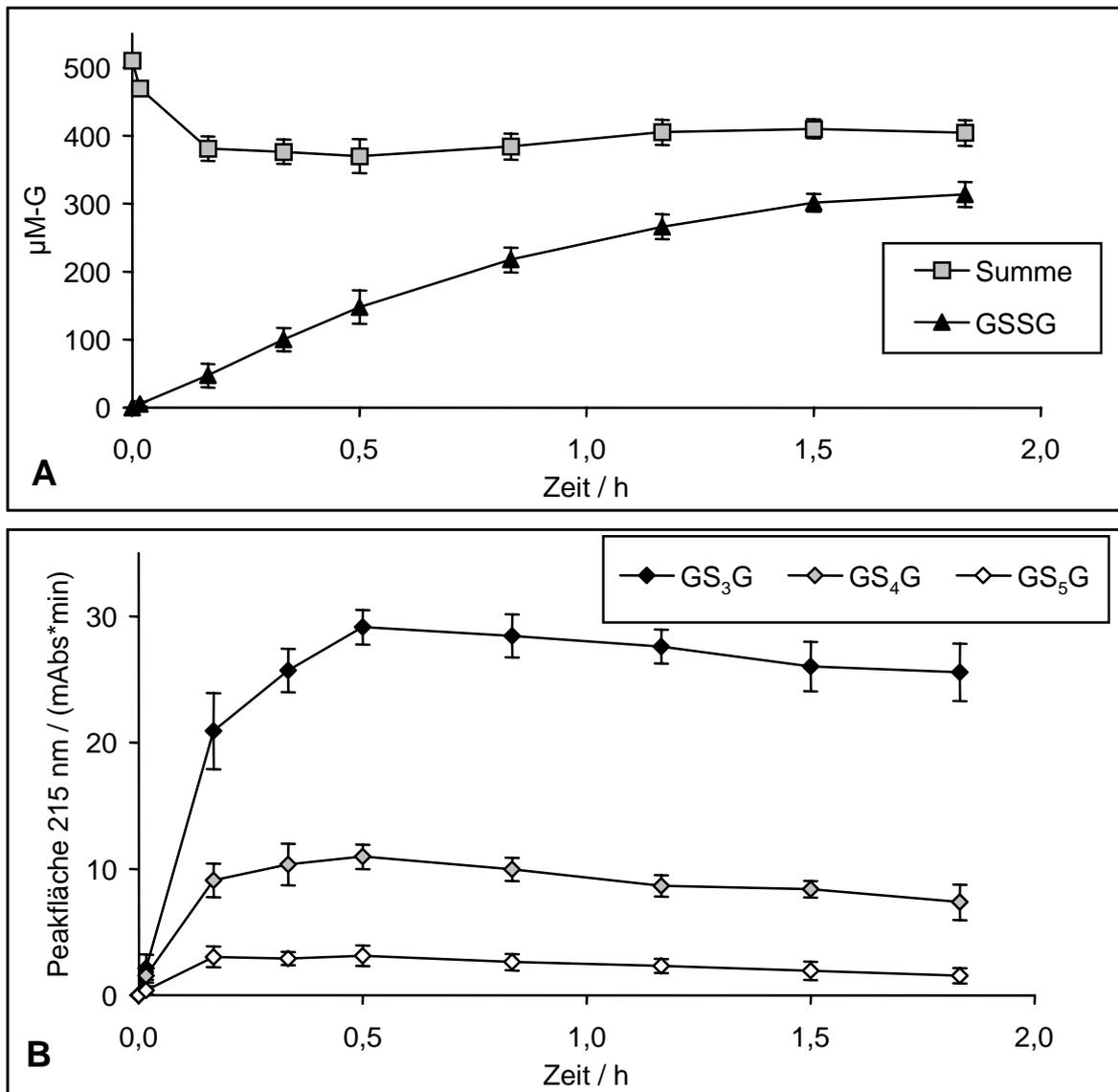


Abb. 4.5: Bildung von GSSG und von höheren Bisorganylpolysulfanen mit hitzeaktivierten Zellextrakten unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,05 g/L). **A:** Konzentration von GSSG und die Summe der quantifizierten GSH-Verbindungen (GSH, GSSG, GSSO_3^-) auf die Zahl der enthaltenen GSH-Reste bezogen ($\mu\text{M-G}$). **B:** Peakflächen der höheren Homologen des GSSG bei 215 nm.

Enzymtest mit Elementarschwefel und inaktivierten Zellextrakten

Wie bereits für den 12-stündigen Versuch geschildert (**Abb. 4.4**), wurde auch in den Kurzzeitexperimenten mit inaktiviertem Zellextrakt eine rasche Oxidation von GSH durch Elementarschwefel beobachtet. Als Oxidationsprodukt des GSH trat GSSG zunächst innerhalb der ersten 0,5 h mit einer konstanten Rate von etwa 300 $\mu\text{M-G/h}$ auf, worauf sich die GSSG-Bildung zunehmend verlangsamte (**Abb. 4.5 A**). Im Gegensatz hierzu wurden bei den höheren Polysulfanen bereits nach 0,2 bis 0,5 h maximale Werte erreicht, die danach bis zum Versuchsende nahezu unverändert blieben (**Abb. 4.5 B**). Insgesamt wurden an höheren Polysulfanen nach 0,5 h etwa 100 bis 150 $\mu\text{M-G}$ gebildet, wie aus dem Bilanzdefizit der quantifizierbaren GSH-Verbindungen geschlossen werden kann (**Abb. 4.5 A**). Die Summe der höheren Polysulfane entsprach also zu diesem Zeitpunkt etwa der Menge an gebildetem GSSG. Obwohl der Einfluss zusätzlicher Sulfanschwefelatome auf die Absorption bei 215 nm nicht bestimmt wurde, kann doch davon ausgegangen werden, dass das Trisulfan schon aufgrund seiner Peakflächen zu allen Zeiten das nach GSSG vorherrschende Polysulfan darstellte. Grundsätzlich steigt die Absorption mit zunehmender Zahl an Sulfanschwefelatomen (s. Kapitel 3.3.2, **Abb. 3.4**), wodurch die Konzentrationen für das Tetra- und Pentasulfan bei der Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten bei 215 nm für alle 3 Polysulfane gegenüber dem Trisulfan eher überschätzt werden. Entsprechend lag die Menge an gebildetem Tetrasulfan sehr wahrscheinlich noch unter 30 % des Trisulfans, wie es sich zunächst bei direktem Vergleich der Peakflächen ergeben würde. Ebenso spielte das Pentasulfan mit einer Peakfläche von etwa 10 % des Trisulfans wahrscheinlich quantitativ betrachtet eine unbedeutende Rolle.

Enzymtest mit Elementarschwefel und aktiven Zellextrakten

Auch in Ansätzen mit Zellextrakten, die eine enzymatische Aktivität für die Elementarschwefel-Oxidation zeigten, wurde die Bildung von Bisorganylpolysulfanen des GSH beobachtet. Der zeitliche Verlauf für diese Verbindungen ist in **Abb. 4.6** exemplarisch für die Aktivitätsbereiche 100, 400 und 600 $\mu\text{M/h}$ aufgezeichnet. Während GSSG, Tri- und Tetrasulfan bei allen getesteten Oxidationsraten gebildet wurden, war das Pentasulfan nur in Ansätzen mit 100 und 200 $\mu\text{M/h}$ nachweisbar (**Abb. 4.6 E**). Wie in den Kontrollansätzen wurden maximale Werte für die höheren Polysulfane innerhalb der ersten 0,5 h erreicht, worauf die Konzentrationen ebenfalls bis zum Versuchsende nahezu konstant blieben. Nur bei dem Pentasulfan verringerte sich die Peakfläche bereits nach 0,3 bis 0,5 h wieder. Im Gegensatz hierzu war bei GSSG über die gesamte Versuchsdauer ein Anstieg in der Konzentration zu verzeichnen (**Abb. 4.6 B**). Der Zuwachs bei GSSG erfolgte in den ersten 0,5 bis 1 h mit konstanter Geschwindigkeit, worauf sich der Anstieg zunehmend verlangsamte. Grundsätzlich nahm die Bildung aller Polysulfane mit steigender Aktivität für die Elementarschwefel-Oxidation ab.

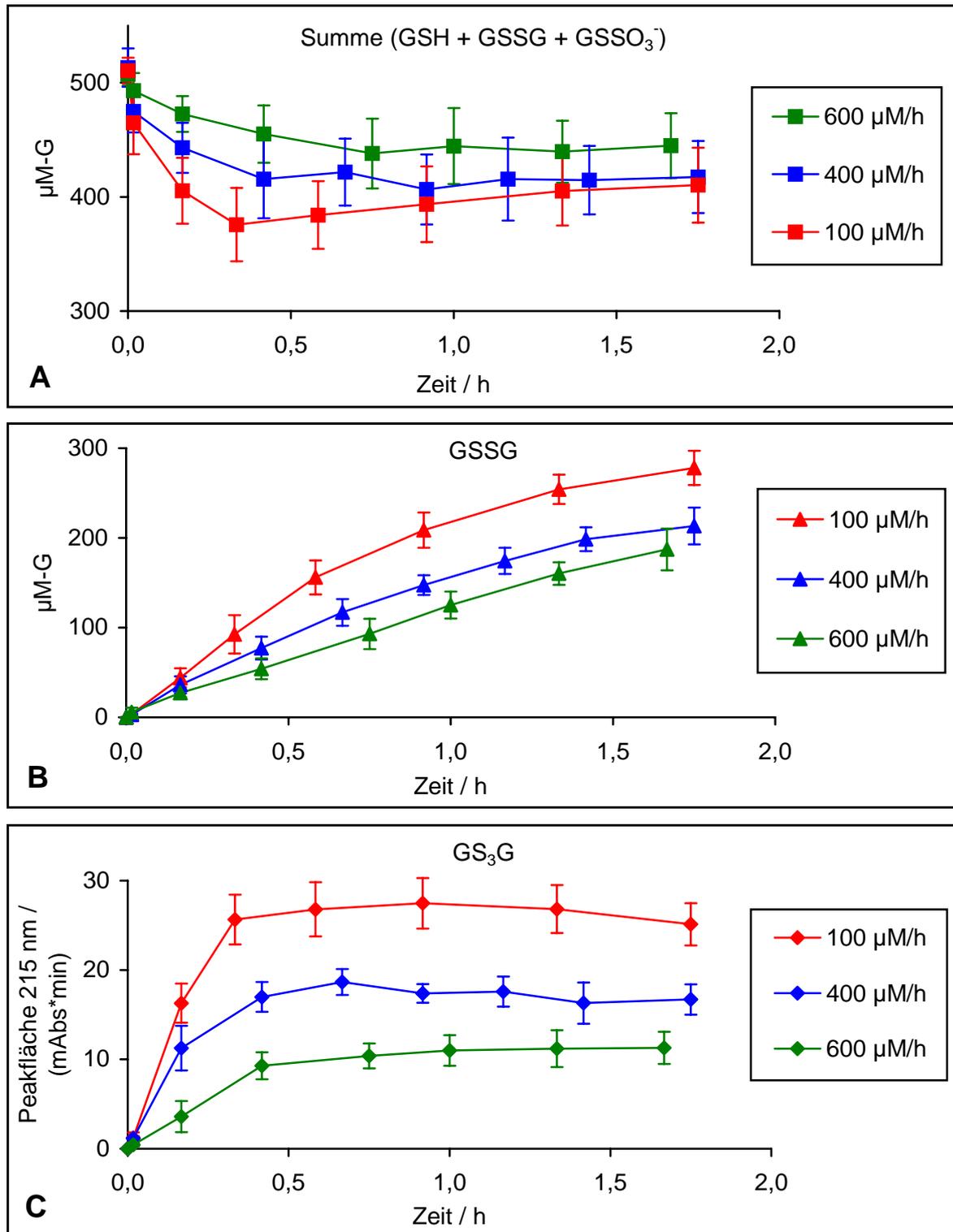


Abb. 4.6: Bildung von GSSG und von höheren Bisorganylpolysulfanen mit aktiven Zellextrakten bei enzymatischen Oxidationsraten für Elementarschwefel von 100, 400 und 600 $\mu\text{M/h}$ unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,01 bis 0,4 g/L). **A:** Summe der quantifizierten GSH-Verbindungen (GSH, GSSG, GS₃G) auf die Zahl der enthaltenen GSH-Reste bezogen ($\mu\text{M-G}$). **B:** Konzentration von GSSG auf die Zahl der enthaltenen GSH-Reste bezogen ($\mu\text{M-G}$). **C:** Peakflächen des GS₃G bei 215 nm.

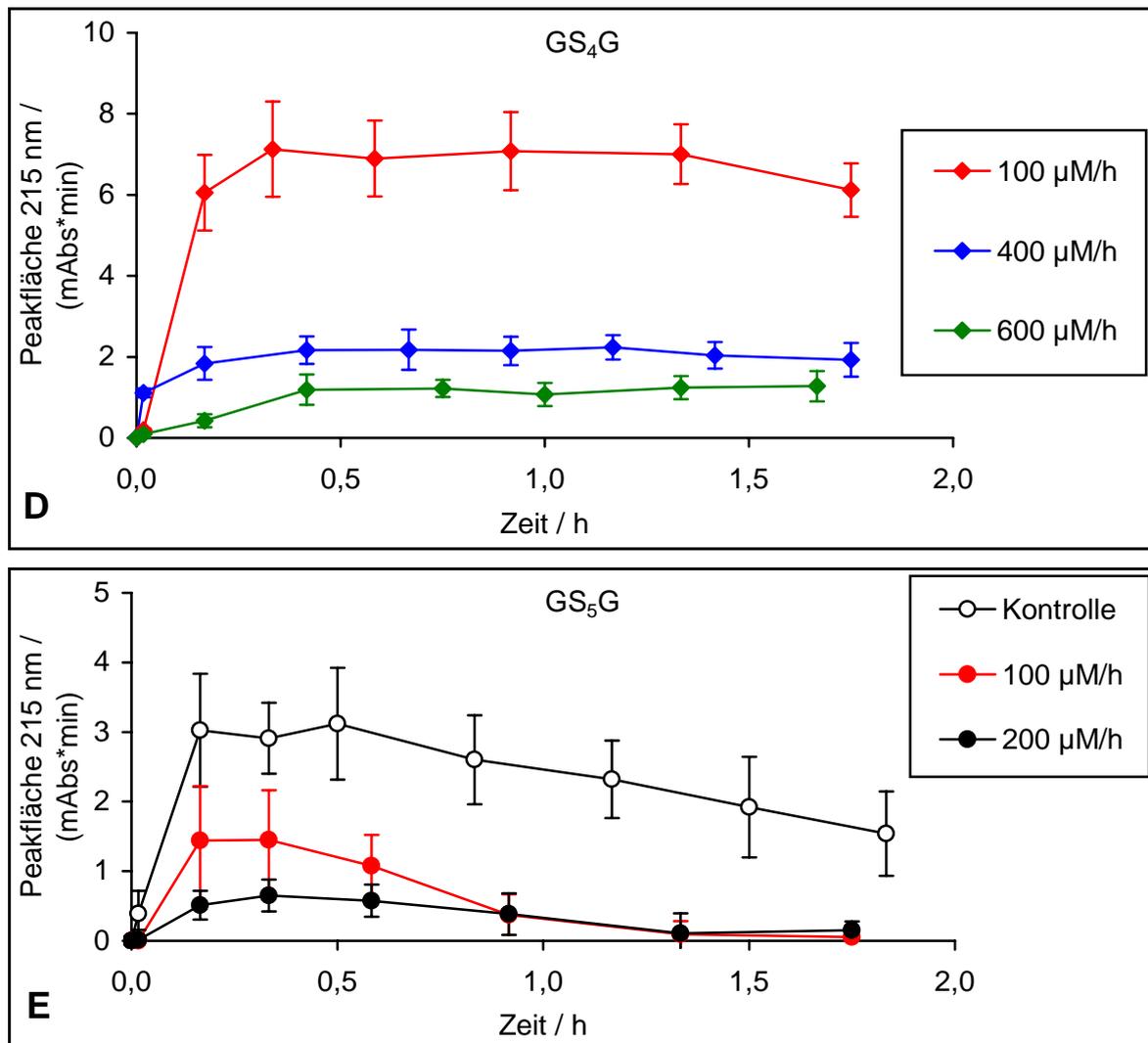


Abb. 4.6 (Fortsetzung): **D:** Peakflächen des GS₄G bei 215 nm für enzymatische Oxidationsaktivitäten von 100, 400 und 600 $\mu\text{M/h}$. **E:** Peakflächen des GS₅G bei 215 nm für Oxidationsaktivitäten von 100 und 200 $\mu\text{M/h}$ sowie für die Kontrollansätze (mit hitzeinaktivierten Extrakten, Oxidationsraten um 7 $\mu\text{M/h}$).

Um die Ergebnisse aller Aktivitätsbereiche inklusive der Kontrollen zu vergleichen, sind in **Abb. 4.7** die nach etwa 0,5 h gemessenen Konzentrationen bzw. Peakflächen der Polysulfane sowie die Summe der quantifizierten GSH-Verbindungen aufgeführt, da zu diesem Zeitpunkt maximale Gehalte an höheren Polysulfanen vorlagen. Die auf der Basis der GSH-Abnahme (s. Kapitel 4.3.2) berechnete Gesamtmenge an Bisorganylpolysulfanen (GS_nG) verringerte sich proportional zur zunehmenden Oxidationsrate für Elementarschwefel (**Abb. 4.7 A**). Dabei lag der Anteil des GSSG an der GS_nG-Summe gleichbleibend bei 50 bis 60 %. Daraus kann gefolgert werden, dass der Anteil der nicht-quantifizierten Polysulfane an GS_nG ebenfalls konstant blieb. Entsprechend verringerte sich tatsächlich auch das Bilanzdefizit bei der Summe der quantifizierten GSH-Verbindungen mit zunehmender Aktivität (**Abb. 4.7 B**).

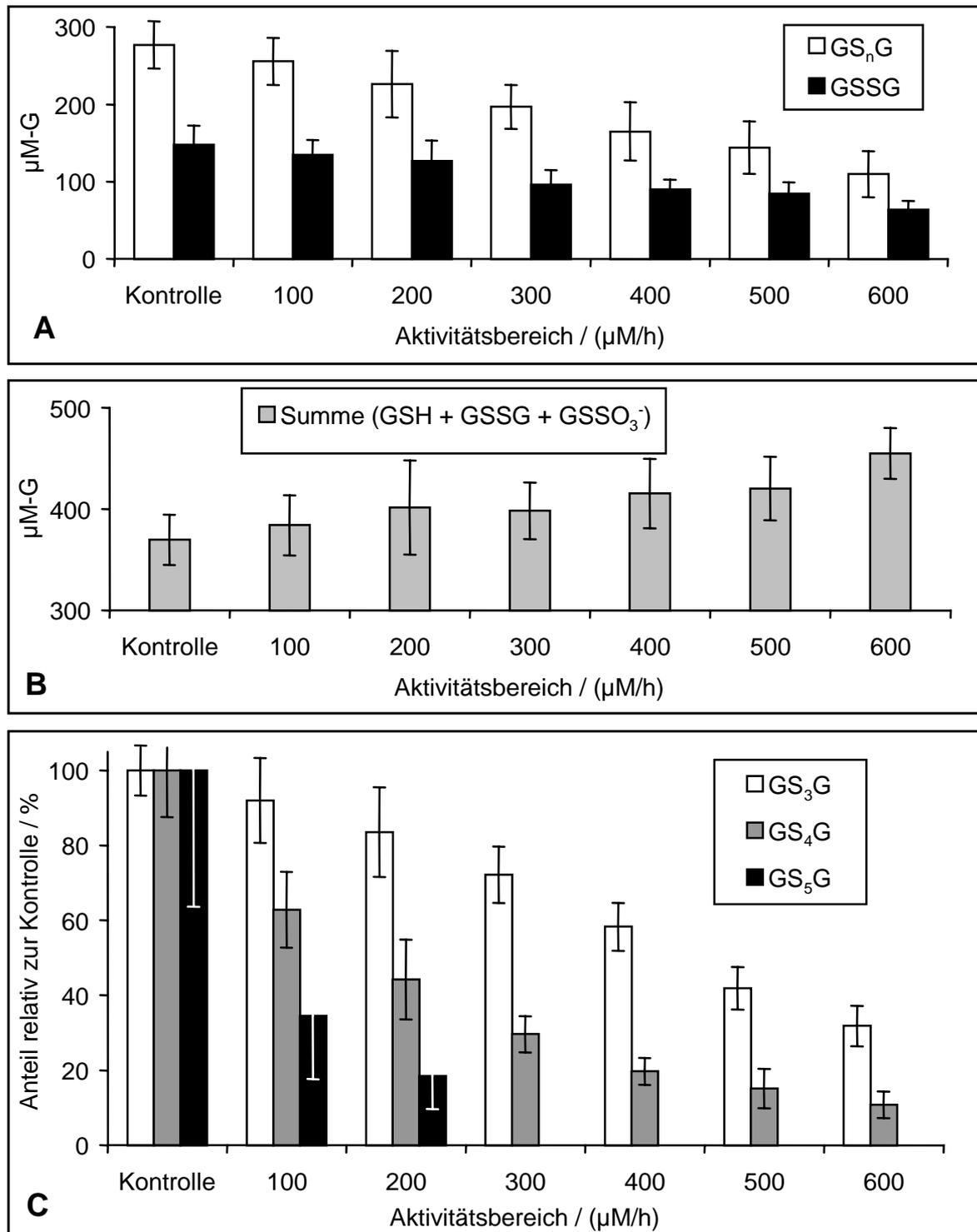


Abb. 4.7: Vergleich der Bildung von Bisorganylpolysulfanen des GSH bei Kontrollen und enzymatischen Oxidationsraten für Elementarschwefel von 100 bis 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). Dargestellt sind die Konzentrationen (bezogen auf die Zahl der enthaltenen GSH-Reste, $\mu\text{M-G}$) bzw. Anteile der Polysulfane nach einer Versuchsdauer von 0,5 h. **A:** Konzentration von GSSG sowie die auf der Basis des Rückgangs von GSH berechnete Summe aller Bisorganylpolysulfane (GS_nG). **B:** Summe aller quantifizierten GSH-Verbindungen (GSH, GSSG, GSSO_3^-). **C:** Anteil der höheren Homologen des GSSG relativ zur Bildung in den Kontrollansätzen.

So fehlten in der Bilanz nach 0,5 h in den Kontrollen von den bei Versuchstart applizierten 500 μM GSH etwa 100 bis 150 μM , während bei Ansätzen mit einer enzymatischen Aktivität von 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ nur 25 bis 75 μM nicht erfasst wurden. Für dieses Bilanzdefizit ist nahezu ausschließlich das Trisulfan verantwortlich, da nur bei diesem Polysulfan die Abnahme ebenfalls etwa direkt proportional zur Aktivität war, während das Tetra- und Pentasulfan sehr viel stärker, etwa mit zweiter bis dritter Ordnung, mit steigender Aktivität zurückgingen (**Abb. 4.7 C**). Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt angesprochen, finden sich also in den Ansätzen höhere Polysulfane als Trisulfan nur in vergleichsweise unbedeutenden Konzentrationen, die sich nicht in der Gesamtbilanz bemerkbar machen. Außerdem kann festgestellt werden, dass das Trisulfan zum Zeitpunkt 0,5 h etwa in der gleichen Größenordnung wie GSSG vorlag.

4.3.2 GSH-Oxidation und Sulfidbildung in Abhängigkeit von der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation

Unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes trat sowohl in aktiven Ansätzen als auch in Kontrollen ohne Zellextrakt oder mit hitzeinaktivierten Aufschlüssen intermediär Hydrogensulfid auf (s. Kapitel 4.2.1, **Abb. 4.3**). Dieses stammt aus der nicht-enzymatischen Reduktion von Elementarschwefel durch GSH. Maximale Konzentrationen wurden nach etwa 0,5 h erreicht, worauf der Gehalt an gelöstem Sulfid stets zurückging. Um zu klären, worauf dieser Rückgang in der Sulfidkonzentration zurückzuführen ist, wurden zunächst Kontrollversuche mit Hydrogensulfid als alleinigem Substrat durchgeführt.

Kontrollversuche mit Hydrogensulfid als Substrat

Bei einem pH-Wert von 6,5 wurde in Ansätzen mit Startkonzentrationen von 80 bzw. 180 μM Hydrogensulfid unabhängig von der Anwesenheit aktiver Zellextrakte und unabhängig von Zugaben von 50 bis 500 μM GSH stets der in **Abb. 4.8** dargestellte Rückgang in der Sulfidkonzentration beobachtet. Innerhalb von 1 h fiel die Konzentration auf etwa 10 % des Ausgangswertes. Sulfid wurde dabei sowohl in Ansätzen mit aktivem Zellextrakt als auch in Kontrollen nur zu etwa 1 % oxidiert, und zwar zu Sulfat und Thiosulfat (Daten nicht dargestellt). Eine Bildung von Elementarschwefel konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Das zugesetzte GSH zeigte nur eine schwache Autoxidation von etwa 1 % nach 1 h, wobei ausschließlich GSSG gebildet wurde (Daten nicht dargestellt). Diese Ergebnisse lassen keinen anderen Schluss zu als den, dass Hydrogensulfid unter den Inkubationsbedingungen des Enzymtestes nahezu ausschließlich als gasförmiges H_2S entweicht. Bei pH 6,5 ist gelöstes Sulfid zu über 75 % vollständig protoniert ($\text{pK}_{\text{S}_1} = 7$, Millero & Hershey 1989, Steudel 2000), sodass es sehr leicht gemäß **Gl. 4.4** entweichen kann. Tatsächlich war der charakteristische Geruch von Schwefelwasserstoff im Gasraum über den Reaktionsgefäßen wahrnehmbar.



Aus **Gl. 4.4** kann geschlossen werden, dass die Geschwindigkeit, mit der gelöstes Sulfid in die Gasphase überträt, direkt proportional zu der Sulfidkonzentration ist (**Gl. 4.5**, $[\text{H}_2\text{S}]$ steht für die Konzentration von gelöstem Sulfid zum Zeitpunkt t und $[\text{H}_2\text{S}]_0$ steht entsprechend für die Ausgangskonzentration).

$$\frac{d[\text{H}_2\text{S}]}{dt} = -k_s [\text{H}_2\text{S}] \quad \text{und} \quad [\text{H}_2\text{S}] = [\text{H}_2\text{S}]_0 e^{-k_s t} \quad (\text{Gl. 4.5})$$

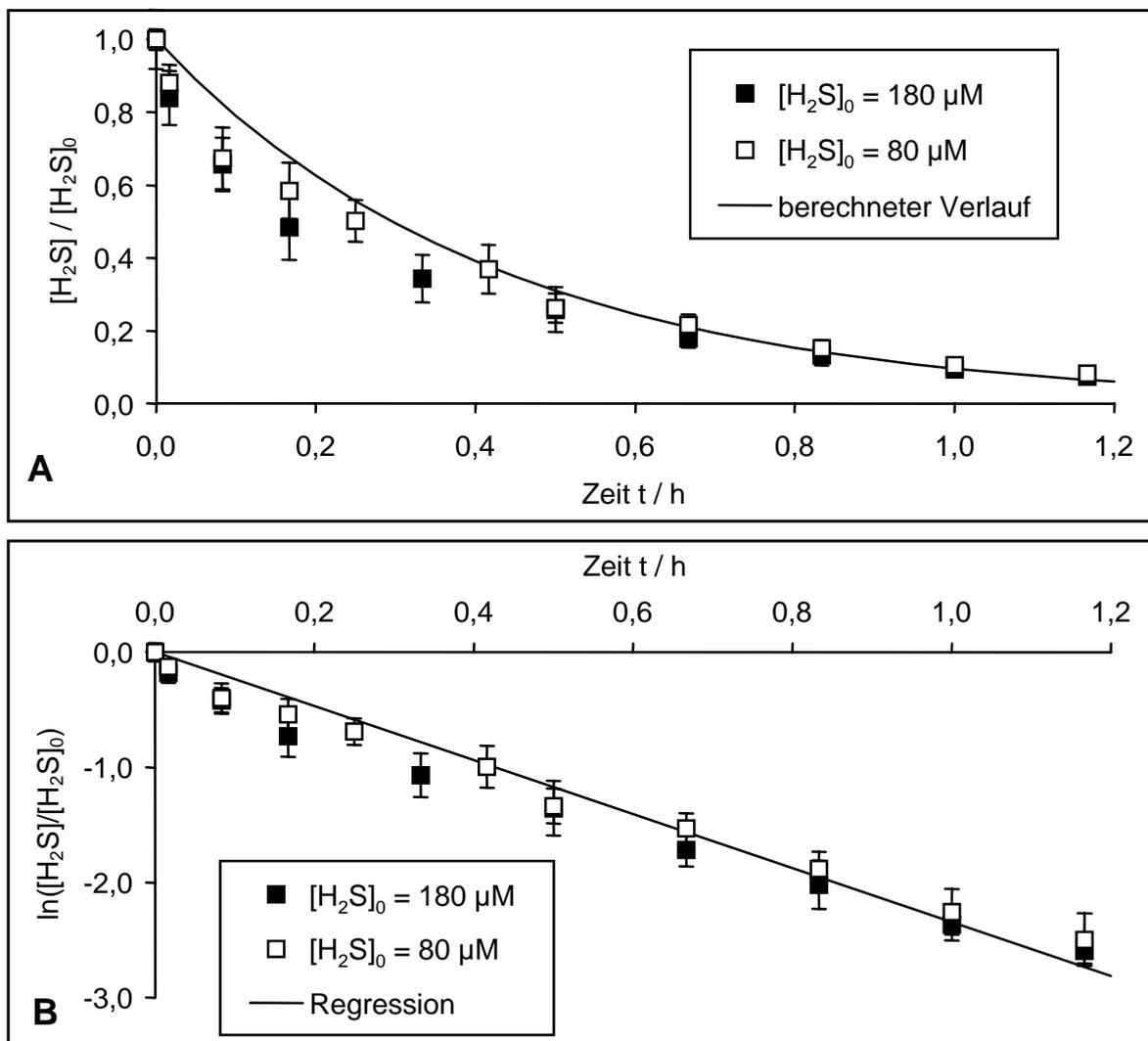


Abb. 4.8: Konzentrationsabnahme von gelöstem Hydrogensulfid unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes ohne Zugabe von Elementarschwefel (0 bis 500 μM GSH, pH 6,5, Proteingehalt 0 bis 0,2 g/L). **A:** Verhältnis des Sulfidgehaltes zur applizierten Ausgangskonzentration ($[\text{H}_2\text{S}]$ bzw. $[\text{H}_2\text{S}]_0$) und aufgrund des Geschwindigkeitsgesetzes erster Ordnung nach **Gl. 4.5** berechneter Verlauf. **B:** Logarithmische Darstellung von **A**, Regressionsanalyse nach **Gl. 4.5** ergibt $k_s = (2,341 \pm 0,061) \text{ h}^{-1}$ ($r = 0,9931$, $n = 21$).

Die in **Gl. 4.5** aufgeführte Geschwindigkeitskonstante k_S für die Abnahme von $[H_2S]$ ergibt sich aus der Steigung der durch logarithmisches Auftragen von $[H_2S]$ bzw. $[H_2S]/[H_2S]_0$ gegen die Zeit t erhaltenen Geraden. Wie aus **Abb. 4.8 B** ersichtlich ist, lässt sich der Sulfidrückgang tatsächlich in guter Näherung durch das in **Gl. 4.5** aufgestellte Geschwindigkeitsgesetz beschreiben. Es ist also festzuhalten, dass die Zellaufschlüsse mit und ohne GSH unter den Versuchsbedingungen keine enzymatische Oxidationsaktivität für Sulfid aufweisen, und dass im Enzymtest intermediär auftretendes Sulfid zu etwa 99 % unoxidiert als gasförmiges Hydrogensulfid entweicht.

Enzymtest mit Elementarschwefel und inaktiven Zellextrakten

Unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes wurde GSH durch Elementarschwefel zu GSSG oxidiert. Außerdem konnten in geringerem Umfang auch höhere Bisorganylpolysulfane detektiert werden (s. Kapitel 4.3.1). Der Elementarschwefel wurde zu Sulfid reduziert. Dabei nahm die GSH-Konzentration in den ersten 1-2 h rasch ab, worauf nur noch eine vergleichsweise geringe Oxidation des GSH folgte, wie bereits für den Kontrollversuch mit hitzeinaktiviertem Zellextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 geschildert (s. Kapitel 4.2.1, **Abb. 4.4 B**). Um ein Geschwindigkeitsgesetz für diese Reaktion aufstellen zu können, wurden Kurzzeitexperimente von knapp 2 h Dauer durchgeführt (vgl. Kapitel 4.3.1).

Zunächst wurde die Kinetik der GSH-Abnahme in Kontrollansätzen untersucht. Hierbei wurden in Bezug auf den Verlauf der GSH-Konzentration mit und ohne hitzeinaktivierten Zellextrakten identische Werte erzielt, sodass im Folgenden diese Ergebnisse zusammengefasst dargestellt werden. Im Gegensatz zu Versuchen ohne Elementarschwefel wurde GSH in den Aktivitätstests schnell oxidiert (**Abb. 4.9 A**). Bei reziproker Darstellung der GSH-Konzentration gegen die Zeit t erhält man eine Gerade (**Abb. 4.9 B**), sodass sich für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Oxidation folgende Abhängigkeit ergibt (**Gl. 4.6**, wobei $[GSH]$ für die bei der Zeit t vorhandene und $[GSH]_0$ für die bei Versuchsstart applizierte GSH-Konzentration steht).

$$\frac{d[GSH]}{dt} = -k_G [GSH]^2 \quad \text{und} \quad \frac{1}{[GSH]} = k_G t + \frac{1}{[GSH]_0} \quad (\text{Gl. 4.6})$$

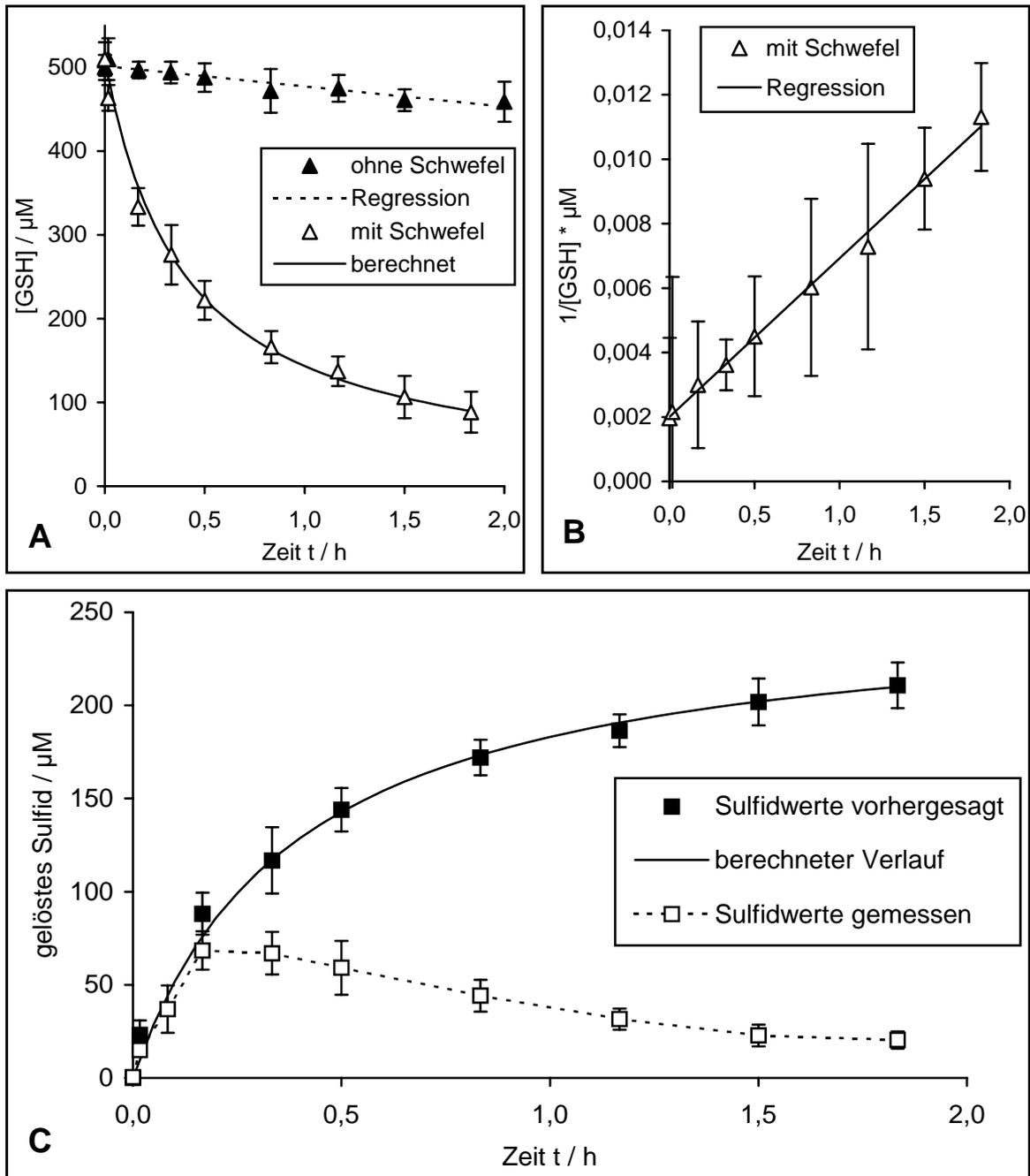


Abb. 4.9: GSH-Oxidation und Bildung von Hydrogensulfid mit hitzeinaktivierten Zellextrakten unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). **A:** Gemessene Konzentrationen von GSH in Gegenwart und Abwesenheit (Autoxidation) von Elementarschwefel („Schwefel“), zusätzlich ist die lineare Regression für die Autoxidation (Steigung = $-24 \mu\text{M}/\text{h}$, $r = 0,955$, $n = 9$) und der mit **Gl. 4.6** berechnete Verlauf für den Elementarschwefel-abhängigen GSH-Rückgang angegeben. **B:** Reziproker Auftrag der GSH-Konzentration bei Inkubation mit Elementarschwefel. Regressionsanalyse ergibt $k_G = (5,01 \pm 0,06) \text{ h}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ($r = 0,9995$, $n = 9$). **C:** Gemessene Konzentrationen von gelöstem Sulfid und auf der Basis der gemessenen GSH-Werte nach **Gl. 2.14** vorhergesagten Konzentrationen sowie der nach **Gl. 4.6** und **4.7** berechnete Sulfid-verlauf.

Die Geschwindigkeitskonstante k_G lässt sich entsprechend **Gl. 4.6** aus **Abb. 4.9 B** ermitteln. Wie aufgrund von **Gl. 2.14** zu erwarten war, wurde GSH also mit einer Geschwindigkeit oxidiert, die proportional zu $[GSH]^2$ war. Da die unter den Versuchsbedingungen ablaufende Autoxidation des GSH sehr gering war (**Abb. 4.9 A**), kann die GSH-Abnahme näherungsweise vollständig auf die Oxidation mit Elementarschwefel zurückgeführt werden. Der Verlauf der aufgrund dieser Reaktion gemäß **Gl. 2.14** und **4.6** zur Zeit t gebildeten Menge an Hydrogensulfid $[H_2S_{\text{gebildet}}]$ ist in **Abb. 4.9 C** neben der tatsächlich gemessenen Konzentration an gelöstem Sulfid $[H_2S]$ dargestellt. Dabei ergeben sich für $[H_2S_{\text{gebildet}}]$ folgende Gesetzmäßigkeiten (**Gl. 4.7** und **4.8**).

$$[H_2S_{\text{gebildet}}] = \frac{[GSH]_0 - [GSH]}{2} \quad (\text{Gl. 4.7})$$

$$\frac{d[H_2S_{\text{gebildet}}]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[GSH]}{dt} = \frac{k_G}{2} \left(\frac{[GSH]_0}{[GSH]_0 k_G t + 1} \right)^2 \quad (\text{Gl. 4.8})$$

Die Werte für $[H_2S]$ lagen nur in den ersten 5 bis 10 min gleichauf mit der vorhergesagten Konzentration $[H_2S_{\text{gebildet}}]$. Während $[H_2S]$ bereits nach 20 bis 30 min ein Maximum von etwa 70 μM erreichte und dann abnahm, stieg $[H_2S_{\text{gebildet}}]$ entsprechend der sinkenden GSH-Konzentration weiter an (**Abb. 4.9 A**). Folglich vergrößerte sich der Unterschied zwischen gemessener und vorhergesagter Sulfidkonzentration mit zunehmender Versuchszeit. Aufgrund der Ergebnisse der zum Oxidationsverhalten von Hydrogensulfid durchgeführten Kontrollversuche (**Abb. 4.8**) kann davon ausgegangen werden, dass die Differenz zwischen $[H_2S_{\text{gebildet}}]$ und $[H_2S]$ allein auf das ständige Entweichen von gelöstem Hydrogensulfid durch Übertritt desselben in die Gasphase zurückzuführen ist. Der Verlauf des zur Zeit t in Lösung befindlichen Sulfids $[H_2S]$ setzt sich somit aus einem Bildungsterm gemäß **Gl. 4.8** sowie aus einem Abbauterm nach **Gl. 4.5** zusammen, und man erhält **Gl. 4.9**.

$$\frac{d[H_2S]}{dt} = \frac{d[H_2S_{\text{gebildet}}]}{dt} - k_S [H_2S] \quad (\text{Gl. 4.9})$$

Zur Lösung dieser Differenzialgleichung (**Gl. 4.9**) kann die folgende Näherung für $d[H_2S]$ herangezogen werden, wenn der Zeitabschnitt Δt ausreichend klein gewählt wird (**Gl. 4.10**).

$$d[H_2S] \approx \Delta[H_2S] = \frac{d[H_2S_{\text{gebildet}}]}{dt} \Delta t - k_S [H_2S] \Delta t \quad (\text{Gl. 4.10})$$

Für die Konzentration von gelöstem Sulfid zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ kann dann mithilfe von **Gl. 4.8** und **4.10** die Beziehung **Gl. 4.11** formuliert werden, wobei im Abbauterm aus **Gl. 4.10** anstelle von $[H_2S]_{t+\Delta t}$ als Näherung $[H_2S]_t$ eingesetzt wird.

$$[H_2S]_{t+\Delta t} = [H_2S]_t + \Delta[H_2S]$$

und

$$[H_2S]_{t+\Delta t} = [H_2S]_t + \frac{k_G}{2} \left(\frac{[GSH]_0}{[GSH]_0 k_G t + 1} \right)^2 \Delta t - k_S [H_2S]_t \Delta t$$

(Gl. 4.11)

Unter Verwendung von **Gl. 4.11** wurde für **Abb. 4.10** die unter Berücksichtigung der oben diskutierten Bildungs- und Abbauraten gemäß **Gl. 4.5** und **4.8** anzunehmende Konzentration an gelöstem Sulfid berechnet. Hierfür wurden in **Gl. 4.11** die für die Kontrollansätze ermittelte Geschwindigkeitskonstante für den GSH-Abbau $k_G = (5,01 \pm 0,06) \text{ h}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (**Abb. 4.9 B**), die Konstante für die Sulfidabnahme $k_S = (2,34 \pm 0,06) \text{ h}^{-1}$ (**Abb. 4.8 B**) und die Startkonzentration $[GSH]_0 = (500 \pm 20) \mu\text{M}$ eingesetzt. Für das Zeitintervall erwies sich ein Wert von $\Delta t = 10 \text{ s}$ als völlig ausreichend (Abweichung gegenüber kleineren $\Delta t \ll 1 \text{ ‰}$). Der Vergleich der so berechneten Sulfidkonzentration mit der gemessenen Menge an gelöstem Sulfid zeigt, dass **Gl. 4.9** eine gute Beschreibung für den Verlauf der Sulfidbildung und des -abbaus darstellt (**Abb. 4.10**). Die geringen Abweichungen zwischen berechneter und gemessener Konzentration ergeben sich vor allem durch die vergleichsweise hohe Messgenauigkeit für das gelöste Sulfid. Da es sich unter den Versuchsbedingungen um einen leicht flüchtigen Stoff handelte, wurden trotz rascher Fixierung (s. Kapitel 3.3.5) Messfehler von bis zu 30 % erreicht. Die in **Gl. 4.9** nicht berücksichtigten Rückreaktionen für **Gl. 2.14** und **4.4**, d.h. die Reduktion von GSSG durch Sulfid und das erneute Lösen von gasförmigem Sulfid, sowie die Autoxidation des GSH haben dagegen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Konzentration an gelöstem Sulfid.

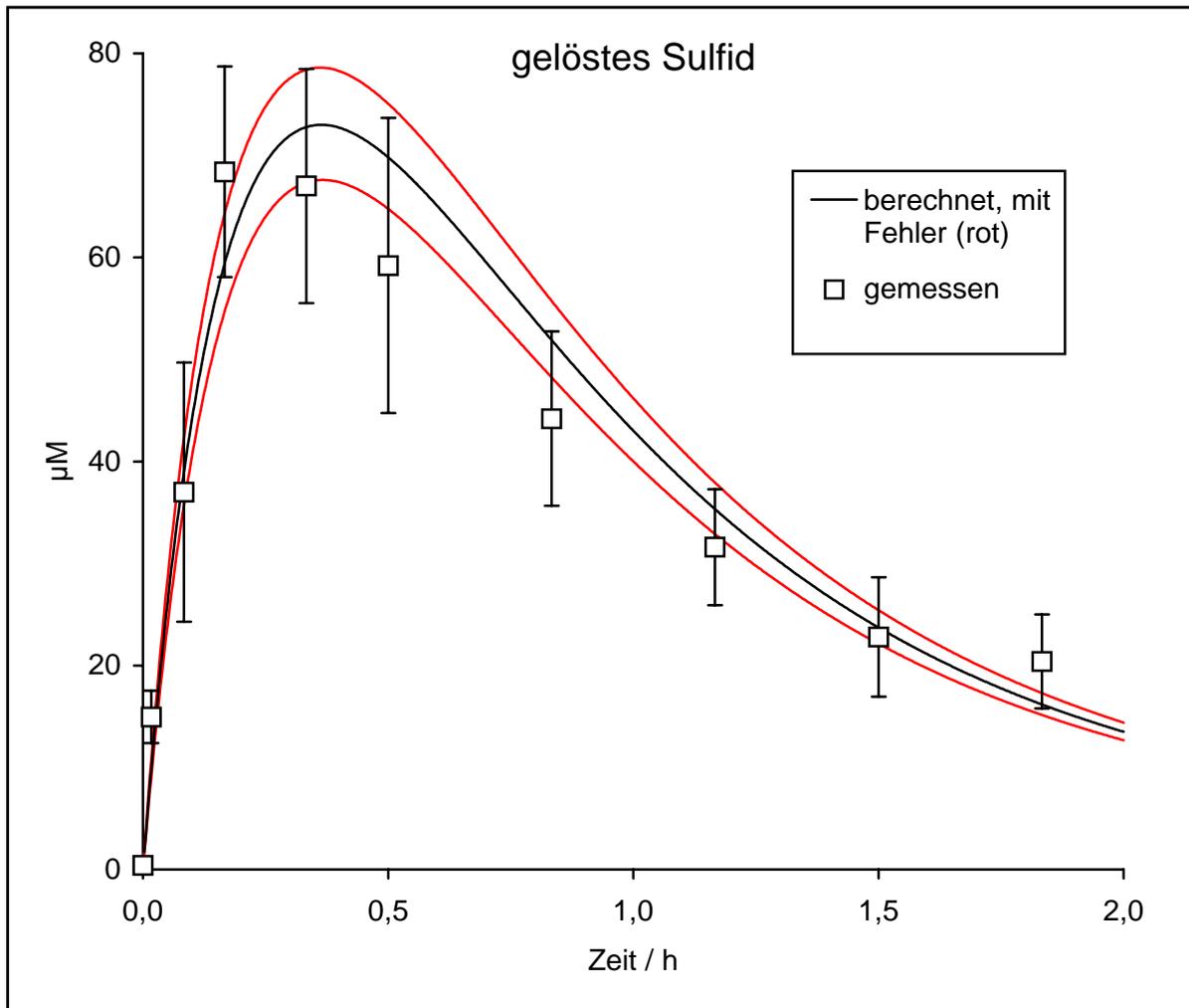


Abb. 4.10: Tatsächlicher Verlauf der Konzentration von gelöstem Sulfid sowie mithilfe der Gl. 4.9 und 4.11 berechnete Konzentrationen mit inaktiven Zellextrakten unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 µM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). Für die berechneten Konzentrationen sind zusätzlich die aufgrund der Messfehler für $[GSH]_0$, k_S und k_G maximal zu erwartenden Abweichungen angegeben (s. Text).

Enzymtest mit Elementarschwefel und aktiven Zellextrakten

Wie aus dem vorhergehenden Abschnitt zu entnehmen ist, kann das intermediäre Auftreten von Sulfid in den Testansätzen ohne aktiven Zellextrakt aufgrund der Kinetik der GSH-abhängigen Reduktion von Elementarschwefel und des Entweichens des dabei gebildeten Sulfids in die Gasphase beschrieben werden (**Abb. 4.10**). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde auch der Verlauf der GSH- und Sulfidkonzentrationen in Ansätzen mit aktiven Zellextrakten analysiert. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wurden dafür unter Variation des Gehaltes an aktivem Zellextrakt unterschiedliche Aktivitäten der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation eingestellt, sodass die Umsetzung von GSH und gelöstem Sulfid für insgesamt 6 Aktivitätsbereiche von 100 bis 600 µM/h ermittelt werden konnte.

In Übereinstimmung mit den Kontrollversuchen (**Abb. 4.9**) wurden auch in den Ansätzen mit aktiven Zellextrakten GSH-Abnahmen beobachtet, die dem in **Gl. 4.6** aufgestellten Geschwindigkeitsgesetz folgten. Allerdings wurden für die Geschwindigkeitskonstante k_G aktivitätsabhängig geringere Werte bestimmt. Je höher die Oxidationsrate für Elementarschwefel war, desto geringer war k_G und desto geringer entsprechend die GSH-Abnahme (**Abb. 4.11** und **Tab. 4.1**). Auch für Sulfid wurden geringere Werte als in den Kontrollen gemessen. Diese lassen sich aber ebenfalls mit **Gl. 4.9** unter Berücksichtigung der aktivitätsabhängig verringerten Werte für k_G beschreiben (**Abb. 4.12**). Mit zunehmender Oxidationsrate für Elementarschwefel wurden also abnehmende Mengen an gelöstem Sulfid gemessen, die sich aber trotzdem auf die für die Kontrollversuche postulierten Prozesse gemäß **Gl. 4.9** zurückführen lassen.

Die verringerten Konzentrationen an Sulfid basieren also nicht auf einer verstärkt ablaufenden Sulfidoxidation. Vielmehr wird mit zunehmender Aktivität für die enzymatische Elementarschwefel-Oxidation weniger Schwefel durch GSH reduziert und somit auch weniger Sulfid produziert. So wurden beispielsweise beim Aktivitätsbereich 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ maximale Sulfidkonzentrationen um 30 μM nach 30 min erreicht (**Abb. 4.12**), während in Kontrollansätzen zum selben Zeitpunkt etwa 70 μM Sulfid gelöst vorlagen (**Abb. 4.10**). Diese Werte korrespondieren mit GSH-Abnahmen von 100 μM nach 30 min bei den Ansätzen mit einer Aktivität von 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ (**Abb. 4.11**) und einer Abnahme von fast 300 μM in den inaktiven Kontrollansätzen (**Abb. 4.9**).

In **Tab. 4.1** sind die für alle Aktivitätsbereiche ermittelten Werte für k_G aufgeführt. Diese Geschwindigkeitskonstante stellt in **Gl. 4.6** den konzentrationsunabhängigen Term dar, der abgesehen von reaktionsspezifischen Faktoren vor allem durch die Aktivierungsenergie bestimmt wird. Es ist aber unwahrscheinlich, dass durch die aktiven Zellextrakte in Abhängigkeit von ihrer Oxidationsrate für Elementarschwefel der molekulare Reaktionsmechanismus für die nicht-enzymatische, GSH-abhängige Elementarschwefel-Reduktion verändert oder dessen Aktivierungsenergie erhöht wird. Die verringerte GSH-Abnahme und die damit verbundene geringere Bildung von Sulfid lassen sich vielmehr durch eine in Abhängigkeit von der Elementarschwefel-Oxidation verringerte, effektiv an der Elementarschwefel-Reduktion beteiligte GSH-Menge beschreiben. Diese kann aus der GSH-Abbaurate ermittelt werden. So erhält man beim Versuchsstart, also zum Zeitpunkt $t = 0$, eine Abnahme für GSH von V_0 gemäß **Gl. 4.12**.

$$V_0 = \frac{d[\text{GSH}]_0}{dt} = -k_G [\text{GSH}]_0^2 \quad (\text{Gl. 4.12})$$

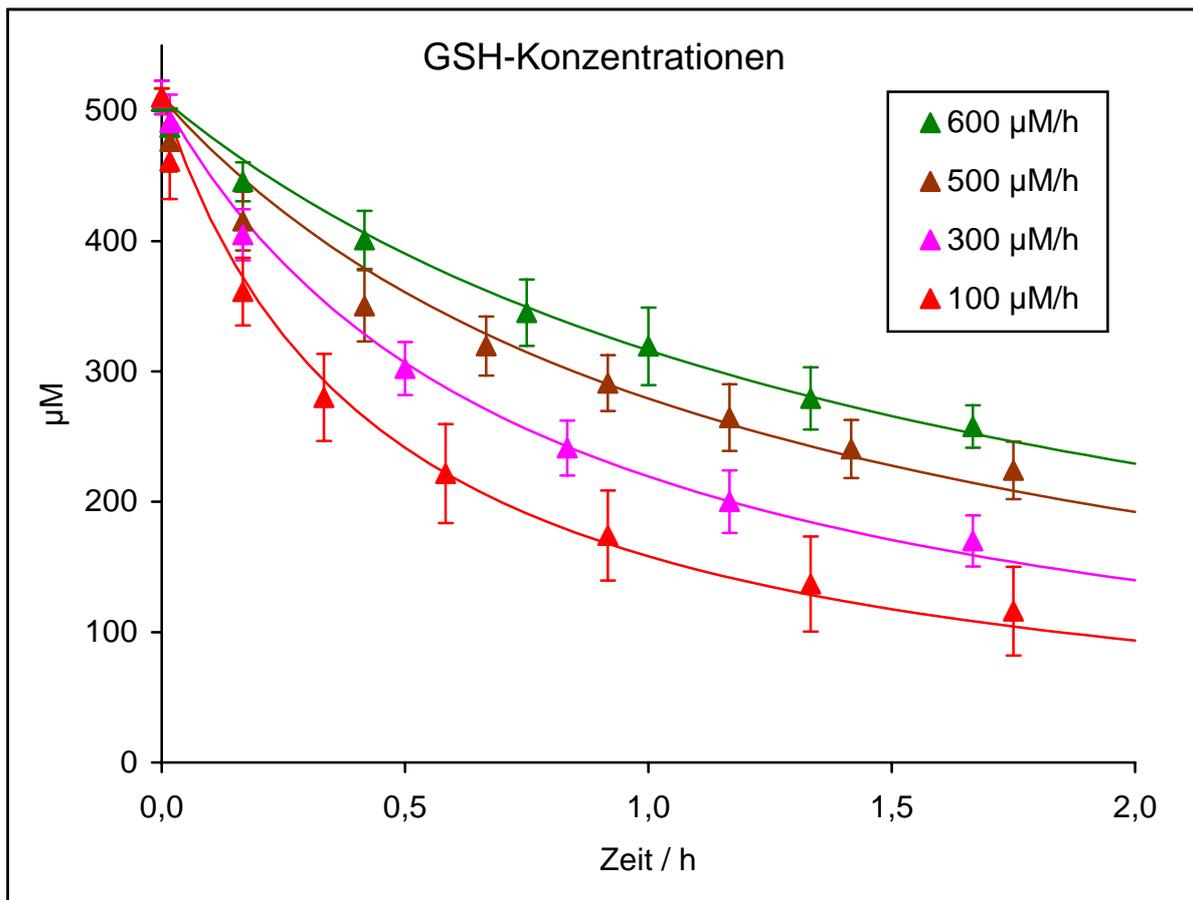


Abb. 4.11: GSH-Oxidation in Abhängigkeit von der enzymatischen Oxidationsaktivität für Elementarschwefel unter den Bedingungen des aeroben Standard-enzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,01 bis 0,4 g/L). Dargestellt sind die Werte für die Aktivitätsbereiche 100, 300, 500 und 600 μM/h. Zusätzlich sind die mithilfe des Geschwindigkeitsgesetzes zweiter Ordnung (Gl. 4.6) berechneten Verläufe angegeben (durchgehende Linien).

Werte für V_0 mit $[GSH]_0 = (500 \pm 20) \mu\text{M}$ sind in **Tab. 4.1** für alle untersuchten Aktivitätsbereiche, also mithilfe der jeweiligen Werte für k_G , berechnet worden. Geht man davon aus, dass nicht k_G variiert, sondern weniger GSH für die Elementarschwefel-Reduktion zur Verfügung steht, so ergibt sich eine GSH-Startkonzentration $[GSH_{\text{effektiv}}]_0$ mit $k_G = k_{\text{Kontrolle}}$ nach **Gl. 4.13**.

$$[GSH_{\text{effektiv}}]_0 = \sqrt{\frac{V_0}{k_{\text{Kontrolle}}}} \quad (\text{Gl. 4.13})$$

Die an der Elementarschwefel-Reduktion beteiligte GSH-Menge nimmt also mit zunehmender Aktivität für die Elementarschwefel-Oxidation ab (**Tab. 4.1**).

Tab. 4.1: Nicht-enzymatische GSH-Oxidation durch Elementarschwefel in Abhängigkeit von der Aktivität für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0 bis 0,4 g/L). Die Geschwindigkeitskonstante k_G für den GSH-Rückgang wurde mithilfe von **Gl. 4.6** ermittelt (vgl. **Abb. 4.11**). Die Abbaurrate von GSH zum Zeitpunkt $t = 0$ (V_0) wurde nach **Gl. 4.12** mit $[\text{GSH}]_0 = (500 \pm 20) \mu\text{M}$ berechnet, und die effektiv zu diesem Zeitpunkt an der GSH-Oxidation beteiligte Konzentration $[\text{GSH}_{\text{effektiv}}]_0$ ergibt sich aus **Gl. 4.13** mit $k_G = k_{\text{Kontrolle}} = (5,01 \pm 0,06) \text{h}^{-1}\text{mM}^{-1}$.

Aktivitätsbereich $\mu\text{M/h} \pm 10 \%$	k_G $\text{h}^{-1}\text{mM}^{-1}$	V_0 $\mu\text{M/h}$	$[\text{GSH}_{\text{effektiv}}]_0$ μM
Kontrolle (=def. 0)	$5,01 \pm 0,06$	1250 ± 101	500 ± 20
100	$4,36 \pm 0,21$	1090 ± 102	466 ± 22
200	$3,39 \pm 0,33$	848 ± 107	411 ± 26
300	$2,60 \pm 0,08$	650 ± 56	360 ± 15
400	$1,97 \pm 0,13$	493 ± 51	314 ± 16
500	$1,62 \pm 0,09$	405 ± 39	284 ± 14
600	$1,20 \pm 0,05$	300 ± 27	245 ± 11

Wie das Auftreten von höheren Homologen des GSSG belegt (Kapitel 4.3.1), verläuft die GSH-abhängige Elementarschwefel-Reduktion unter den Versuchsbedingungen des Enzymtestes über das GSH-Persulfid bzw. dessen höhere Homologe nach **Gl. 4.1** und **4.2**. Dabei und durch andere Abbaureaktionen wird das Persulfid rasch verbraucht und liegt sicherlich unter den Versuchsbedingungen nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Hierfür spricht, dass es mit den eingesetzten Untersuchungsmethoden nicht detektiert werden konnte. Aus **Gl. 4.1** kann aber geschlossen werden, dass die Geschwindigkeit, mit der das Persulfid und höhere Homologe gebildet werden, näherungsweise proportional zur GSH-Konzentration ist (**Gl. 4.14**).

$$\frac{d[\text{GS}_n\text{H}]}{dt} \propto [\text{GSH}] \quad (\text{Gl. 4.14})$$

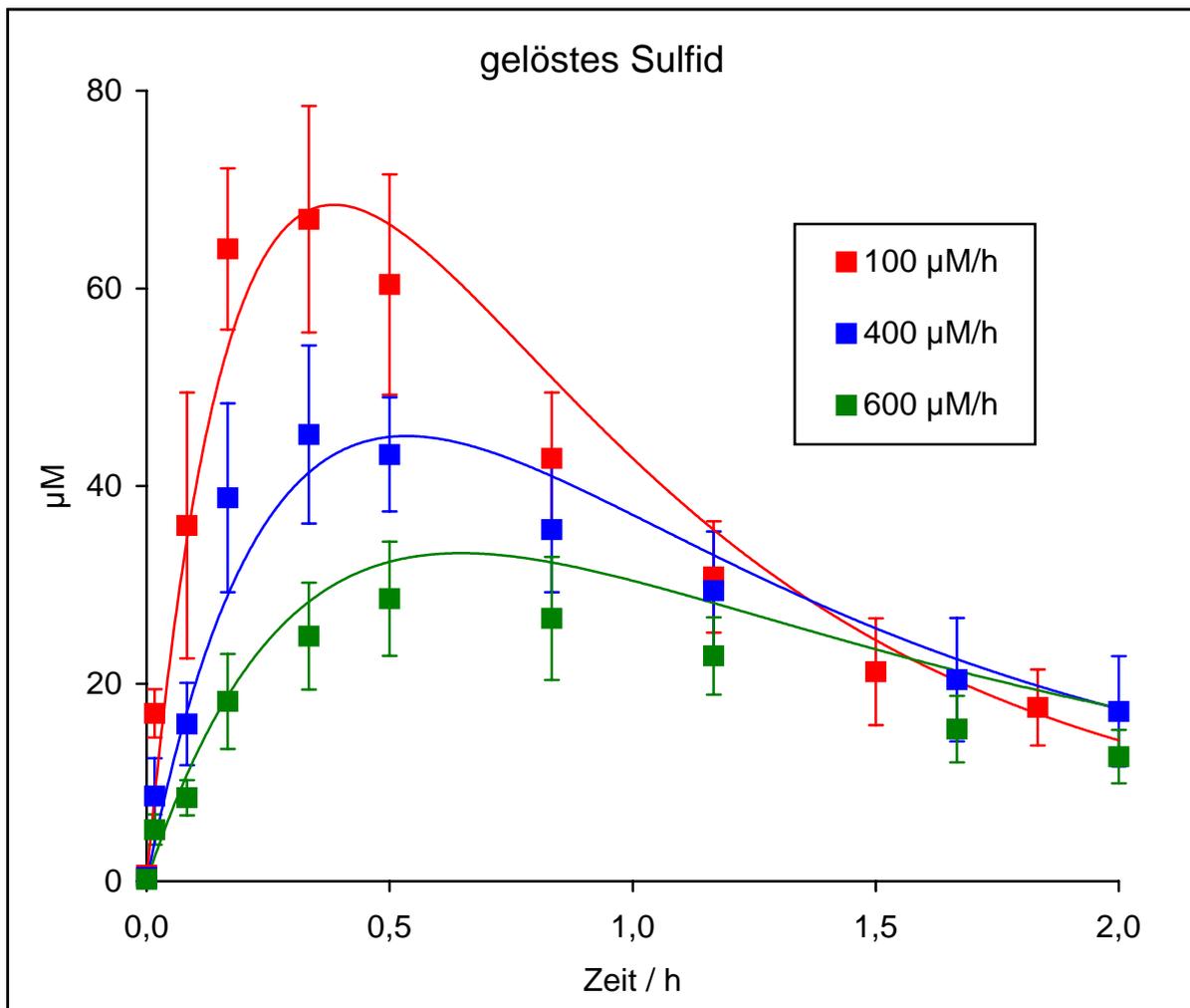


Abb. 4.12: Tatsächlicher Verlauf der Konzentration von gelöstem Sulfid (Einzelwerte) sowie mithilfe der **Gl. 4.9** und **4.11** berechnete Konzentration (durchgehende Kurven) bei Aktivitäten für die enzymatische Elementarschwefel-Oxidation von 100, 400 und 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ unter den Bedingungen des aeroben Standardenzymtestes (500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5, Proteingehalt 0,01 bis 0,4 g/L). Für die Berechnungen nach **Gl. 4.11** wurden die in **Tab. 4.1** aufgeführten Werte für die Geschwindigkeitskonstante des GSH-Rückgangs k_G verwendet.

Angenommen, das Persulfid des GSH und dessen höhere Homologe stellen tatsächlich das Substrat für die Schwefel-Dioxygenase dar, wie bereits von Suzuki (1965b) postuliert (**Gl. 2.12**), dann kann die mit zunehmender Oxidationsrate für Elementarschwefel verringerte effektiv an der Reduktion von Elementarschwefel beteiligte GSH-Konzentration (**Tab. 4.1**) wie folgt erklärt werden. Sowohl bei der nicht-enzymatischen Elementarschwefel-Reduktion als auch bei der enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation reagiert der Sulfanschwefel des Persulfids. Folglich konkurrieren beide Systeme miteinander um das vorhandene Monoorganylpoly-sulfan. Durch die Aktivität des Elementarschwefel oxidierenden Enzyms wurde also nicht die GSH-Menge, sondern die Persulfid-Konzentration im Versuchsansatz reduziert.

Die gefundene Abhängigkeit zwischen der Elementarschwefel-Oxidation und der Sulfidbildung sind also neben dem ebenfalls mit steigender Oxidationsrate für Elementarschwefel verringerten Auftreten von höheren Homologen des GSSG (Kapitel 4.3.1) ein weiterer Beleg dafür, dass der Sulfanschwefel der GSH-Monoorganylpolysulfane das eigentliche Substrat der Schwefel-Dioxygenase ist.

Enzymtest mit Elementarschwefel unter GSH-limitierten Bedingungen

Im Vergleich zur Kontrolle wurde in Ansätzen mit 500 μM GSH und einer Oxidationsrate für Elementarschwefel von 600 $\mu\text{M}/\text{h}$ der GSH-Verbrauch bei Versuchstart (V_0) von über 1200 $\mu\text{M}/\text{h}$ auf 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ reduziert (**Tab. 4.1**). Schreibt man diese Tendenz fort, so würde bei Aktivitäten von etwa 1200 $\mu\text{M}/\text{h}$ die GSH-Oxidation vollständig zum Erliegen kommen. Versuche mit derart hohen Aktivitäten konnten allerdings mit dem Enzymtest nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden, da die maximale Startkonzentration von Elementarschwefel bei 4 bis 5 mM lag und außerdem aus messtechnischen Gründen nur eine geringe Pufferung verwendet wurde (s. Kapitel 3.2.4). Somit stellten sich bei Aktivitäten über 1000 $\mu\text{M}/\text{h}$ in Bezug auf Substrat und pH-Wert sehr schnell limitierende Bedingungen ein. Nach Betrachtung der für $[\text{GSH}_{\text{effektiv}}]$ berechneten Werte (**Tab. 4.1**) kann man allerdings postulieren, dass Aktivitäten um 200 bis 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ ausreichen müssten, um etwa 100 μM GSH vor der Oxidation durch Elementarschwefel zu schützen. Denn bei Aktivitäten in dieser Höhe wurde im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion von $[\text{GSH}_{\text{effektiv}}]$ um 100 μM erzielt.

Um diese Hypothese zu testen, wurden deshalb Versuche mit GSH-Startkonzentrationen von 100 μM durchgeführt. Hierfür wurden in aktiven Ansätzen exemplarisch nur Zellextrakte verwendet, die durch Aufschluss von Zellen des Stammes *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 gewonnen worden waren. Unter den Versuchsbedingungen war die Autoxidation von GSH mit 15 $\mu\text{M}/\text{h}$ relativ hoch. Zur Vermeidung dieser Reaktion wurden den Ansätzen deshalb 100 μM EDTA zugegeben. Bei dieser niedrigen EDTA-Konzentration wurde eine vollständige Unterbrechung der GSH-Autoxidation erreicht, ohne dass eine Hemmung des Elementarschwefel oxidierenden Systems auftrat. Die Versuchsdauer betrug 1,5 bis 2 h. Innerhalb dieser Zeit wurden sowohl in Kontrollen als auch in aktiven Ansätzen konstante Oxidationsraten für Elementarschwefel beobachtet. Während dabei mit inaktiviertem Zellextrakt unabhängig von der Proteinkonzentration Aktivitäten für die Elementarschwefel-Oxidation um 3 $\mu\text{M}/\text{h}$ auftraten, wurde in aktiven Ansätzen bis zu Proteingehalten von etwa 0,04 g/L und Aktivitäten bis etwa 140 $\mu\text{M}/\text{h}$ ein linearer Anstieg der Aktivität mit zunehmender Zellextraktmenge erzielt (**Abb. 4.13**). Für diesen Bereich wurde durch Regression eine spezifische Aktivität von $(3,35 \pm 0,07)$ $\mu\text{mol}/\text{h}/(\text{mg Protein})$ ermittelt. Oberhalb einer Proteinkonzentration von 0,04 g/L war dagegen keine proportionale Abhängigkeit zwischen Aktivität und Zellextraktmenge mehr vorhanden. Die spezifische Aktivität verringerte sich stattdessen mit steigenden Proteingehalten. Dabei wurden bei einer Proteinmenge von über 0,15 g/L maximale Oxi-

dationsraten um $350 \mu\text{M/h}$ erreicht. Mit Startkonzentrationen von $100 \mu\text{M}$ GSH ließen sich also bei pH 6,5 nur Aktivitäten bis etwa $140 \mu\text{M/h}$ unter nicht-limitierten Bedingungen erzielen, und die maximal mögliche Oxidationsrate war auf Werte um $350 \mu\text{M/h}$ beschränkt.

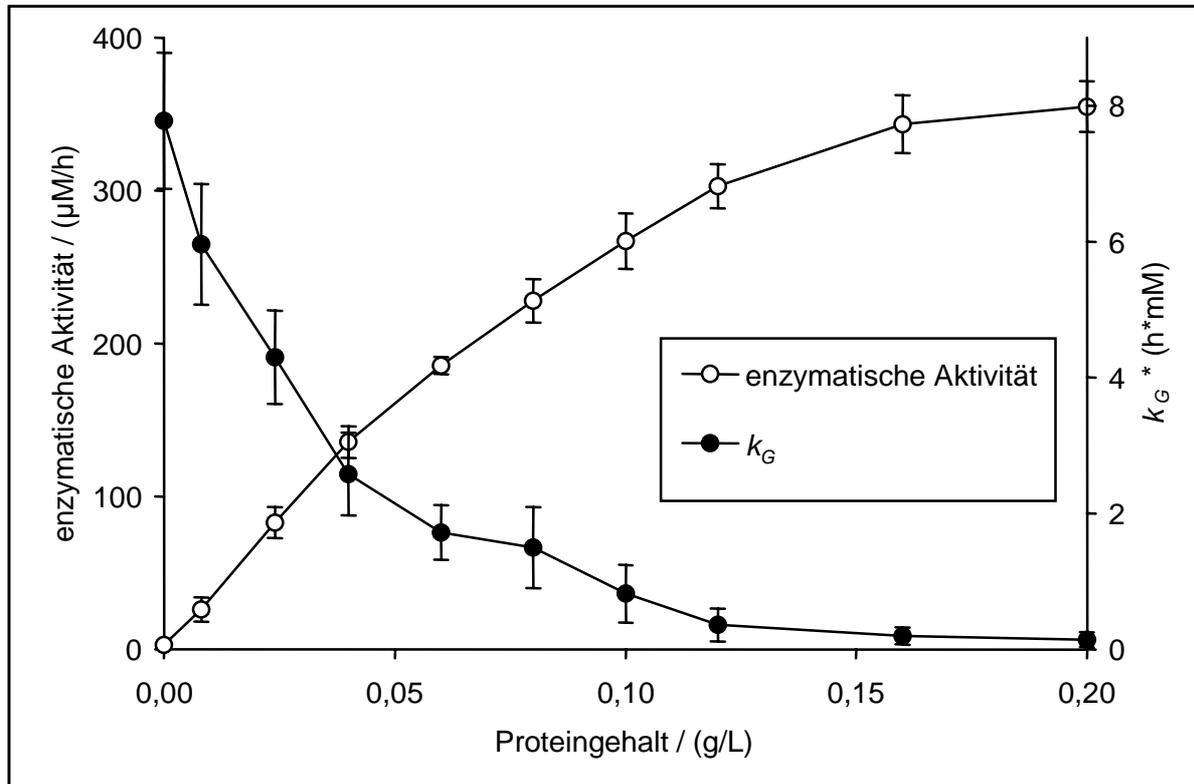


Abb. 4.13: Enzymatische Oxidationsaktivität für Elementarschwefel und nicht-enzymatische Oxidationsrate für GSH in Abhängigkeit von der Zellextraktmenge. Die Versuche wurden mit $100 \mu\text{M}$ GSH und Zellextrakten von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit $100 \mu\text{M}$ EDTA, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5) durchgeführt. Als Größe für die GSH-Oxidation ist die nach **Gl. 4.6** berechnete Geschwindigkeitskonstante k_G angegeben.

Parallel zum Anstieg der Aktivität für die Elementarschwefel-Oxidation ging der GSH-Verbrauch zurück, wie aus dem Verlauf der gemäß **Gl. 4.6** ermittelten Geschwindigkeitskonstante k_G für den GSH-Abbau ersichtlich wird (**Abb. 4.13**). Gleiches galt für die Hydrogensulfidbildung (Daten nicht dargestellt). Während in den Kontrollen mit k_G um $8 \text{ h}^{-1}\text{mM}^{-1}$ noch der Rückgang von GSH bei Versuchsstart mit einer Geschwindigkeit V_0 von $80 \mu\text{M/h}$ erfolgte, blieb bei Oxidationsraten für Elementarschwefel von $350 \mu\text{M/h}$ die GSH-Konzentration im Rahmen der Messgenauigkeit über die gesamte Versuchsdauer unverändert ($V_0 \leq 2 \mu\text{M/h}$). Bei dieser Aktivitätsobergrenze wurde, wie postuliert, GSH vollständig vor einer Oxidation durch Elementarschwefel geschützt, d. h., der gesamte GS_nH -Pool wurde als Substrat des Elementarschwefel

oxidierenden Systems genutzt und stand deshalb nicht für die Bildung von Hydrogensulfid nach **Gl. 4.2** zur Verfügung. Dabei lag die Aktivität sogar oberhalb der vorhergesagten 200 bis 300 $\mu\text{M}/\text{h}$. Diese Differenz kann dadurch erklärt werden, dass in den Ansätzen mit 100 μM GSH relativ zur GSH-Konzentration höhere Abbauraten als bei 500 μM erreicht wurden, wie der Vergleich der für die Kontrollen ermittelten Werte für k_G verdeutlicht (**Tab. 4.1** und **Abb. 4.13**, $k_G = (7,8 \pm 1,0) \text{ h}^{-1}\text{mM}^{-1}$ bei 100 μM GSH und $(5,0 \pm 0,1) \text{ h}^{-1}\text{mM}^{-1}$ bei 500 μM GSH). Offenbar ist der für $[\text{GSH}]_0 = 500 \mu\text{M}$ ermittelte Wert für k_G nicht für Konzentrationsbereiche um 100 μM gültig. Möglicherweise kommt es hier aufgrund der sehr viel niedrigeren Konzentrationen an Polysulfanen in geringerem Maße zu Umlagerungsreaktionen (**Gl. 4.3**), sodass im Vergleich zu den Ansätzen mit 500 μM letztendlich bei 100 μM GSH relativ mehr Monoorganylpolysulfane miteinander unter Hydrogensulfidbildung reagieren bzw. als Substrat der Elementarschwefel-Oxidation genutzt werden können.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Startkonzentrationen von 10 bis 200 μM GSH unter limitierenden Bedingungen getestet. Zur Vermeidung der GSH-Autoxidation wurden ebenfalls 100 μM EDTA zugegeben. Zusätzlich wurden dabei neben Extrakten von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 auch Aufschlüsse von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T verwendet. Die zellfreien Systeme wiesen zwar unterschiedliche spezifische Aktivitäten auf (s. Kapitel 4.6.1, **Tab. 4.3**), zeigten aber die gleiche Abhängigkeit zwischen $[\text{GSH}]_0$ und der maximal erreichten Oxidationsrate für Elementarschwefel. Dabei stieg dieser Grenzwert nahezu proportional mit zunehmenden $[\text{GSH}]_0$ -Werten an (**Abb. 4.14**). So wurden bei GSH-Konzentrationen von 50, 100 und 200 μM Aktivitäten von 100, 360 und 800 $\mu\text{M}/\text{h}$ erzielt. In allen Fällen wurde im Sättigungsbereich kein GSH verbraucht und auch keine Hydrogensulfidbildung beobachtet (Daten nicht dargestellt). Die Annahme, dass durch eine entsprechende Oxidationsrate für Elementarschwefel der gesamte GS_nH -Pool als Substrat dient und nicht mehr für andere, nicht-enzymatische Reaktionen zur Verfügung steht, gilt also zumindest für einen Konzentrationsbereich bis 200 μM GSH. Die erzielte maximale Aktivität kann hier somit als Wert für die Bildungsrate der Monoorganylpolysulfane angesehen werden (**Gl. 4.15**), die proportional zu der GSH-Konzentration ist (**Gl. 4.14**).

$$\text{maximale Aktivität} = \frac{d[\text{GS}_n\text{H}]}{dt} \quad (\text{Gl. 4.15})$$

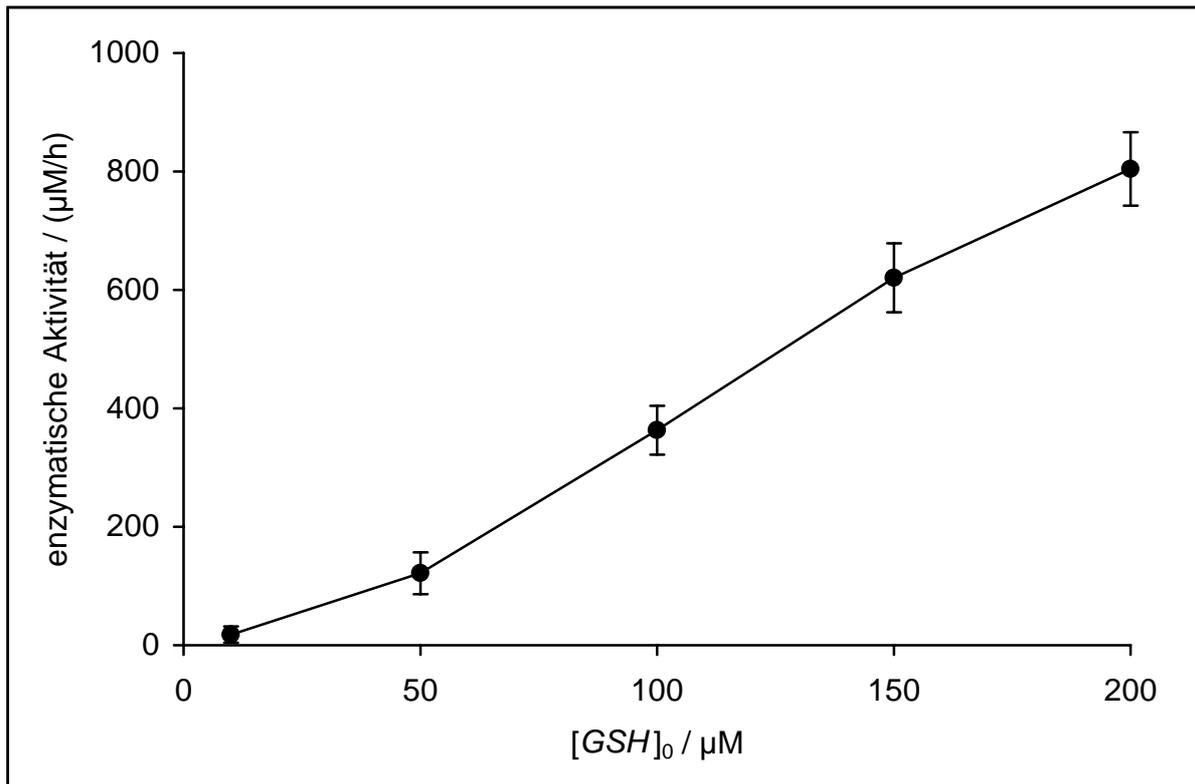


Abb. 4.14: Enzymatische Oxidation von Elementarschwefel durch Zellextrakte von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T unter GSH-limitierten Bedingungen. Dargestellt ist die bei einer gegebenen GSH-Startkonzentration $[\text{GSH}]_0$ maximal unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes erzielte enzymatische Oxidationsrate (mit 100 μM EDTA, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5).

4.3.3 Produkte der Elementarschwefel-Oxidation

Unter den Bedingungen des Enzymtestes wurde Elementarschwefel enzymatisch überwiegend zu Thiosulfat oxidiert (s. Kapitel 4.2.1, **Abb. 4.3**). Daneben wurden in geringen Mengen auch das S-Sulfonat des GSH und Sulfat gebildet. Sulfit konnte dagegen nicht detektiert werden, obwohl es als das eigentliche Produkt der GSH-abhängigen Elementarschwefel-Oxidation gilt (Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968a). Es kann also vermutet werden, dass die 3 nachgewiesenen Produkte aus nachgeschalteten Reaktionen des Sulfits hervorgegangen sind. Aber auch Alternativen wären denkbar, wie z. B. die direkte Bildung von Thiosulfat durch die Oxidation von Monoorganylpolysulfanen des GSH. Deshalb wurden Untersuchungen zur Identifizierung des unmittelbaren Produktes der Schwefel-Dioxygenase durchgeführt.

Sulfat

Sulfat wurde sehr wahrscheinlich durch die Autoxidation des Sulfits gebildet. Aber auch eine teilweise enzymatisch katalysierte Oxidation kann nicht ausgeschlossen werden. Innerhalb von 2 h stieg die Sulfatkonzentration sowohl im 12-stündigen Experiment (s. Kapitel 4.2.1, **Abb. 4.3 B**) als auch in den zur Kinetik der Polysulfan- und Sulfidbildung durchgeführten Kurzzeitversuchen (Daten nicht gezeigt) nur in sehr geringem Umfang an. Unabhängig vom Aktivitätsbereich für die Elementarschwefel-Oxidation wurden Bildungsraten von 0 bis 2 $\mu\text{M/h}$ gemessen, sodass Sulfat im Test als Produkt quantitativ keine Rolle spielt. Deshalb wurde dessen Bildung nicht weiter untersucht.

Glutathion-S-Sulfonat

Für die Bildung des Glutathion-S-Sulfonats kommen prinzipiell 2 Prozesse infrage. Zum einen könnte es durch Reaktion von GSH mit Polythionaten wie Tetrathionat entstehen (**Gl. 4.20**), und als zweite Möglichkeit wäre eine Reaktion zwischen Sulfit und GSSG denkbar (**Gl. 3.1**). Theoretisch könnte auch noch die Autoxidation des GSH-Persulfids zur Bildung des S-Sulfonats führen (Steudel & Albertsen 1992). Dann müssten aber in Kontrollen ohne enzymatische Oxidationsaktivität die höchsten Mengen an Glutathion-S-Sulfonat gefunden werden, da im Vergleich zu aktiven Ansätzen die Konzentrationen des Persulfids hier am höchsten sind (s. Kapitel 4.3.2). Dies trifft aber nicht zu, wie ein Vergleich von **Abb. 4.3** und **Abb. 4.4** verdeutlicht, sodass eine Autoxidation des Persulfids zum S-Sulfonat ausgeschlossen werden kann. Aber auch Reaktionen von GSH mit Polythionaten sind unwahrscheinlich. Im Aktivitätstest traten weder Tetrathionat noch höhere Polythionate als Oxidationsprodukte des Elementarschwefels auf (Kapitel 4.2.1). Außerdem wurde Thiosulfat unter den Versuchsbedingungen nicht zu Tetrathionat oxidiert (s. Kapitel 4.4.1).

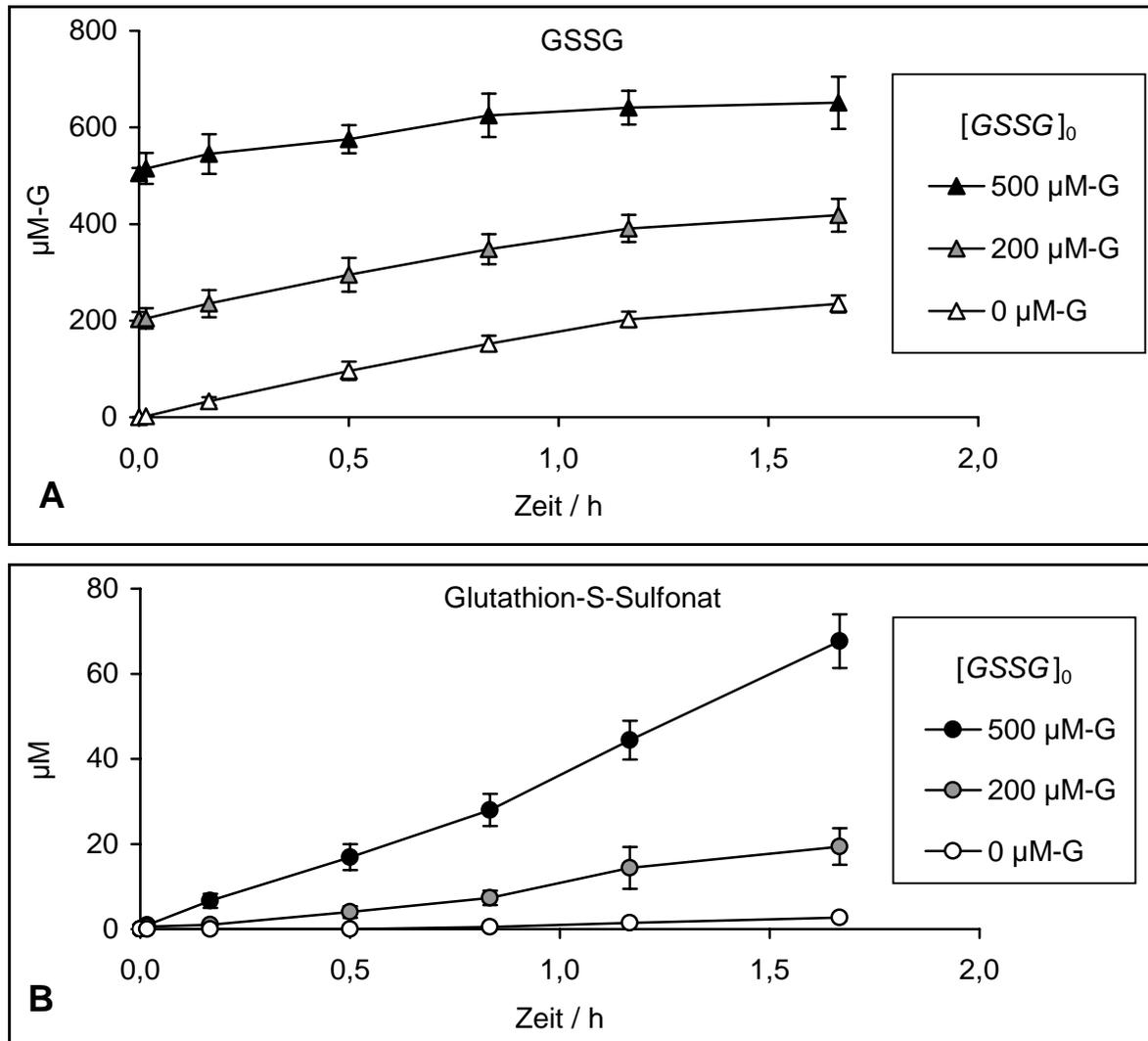


Abb. 4.15: Bildung des Glutathion-S-Sulfonats bei einer enzymatischen Oxidationsaktivität für Elementarschwefel von 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ in Abhängigkeit von der GSSG-Konzentration unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit 500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). **A:** Verlauf des Gehalts an GSSG für Versuche mit unterschiedlichen Startkonzentrationen $[\text{GSSG}]_0$, die GSSG-Konzentrationen sind auf die Anzahl der enthaltenen GSH-Reste bezogen ($\mu\text{M-G}$). **B:** Bildung des Glutathion-S-Sulfonats für Versuche mit unterschiedlichen Startkonzentrationen $[\text{GSSG}]_0$.

Vielmehr ist die beobachtete Bildung des Glutathion-S-Sulfonats auf die Reaktion von GSSG mit Sulfid gemäß **Gl. 3.1** zurückzuführen. In den Kurzzeitexperimenten (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) wurde Elementarschwefel mit einem maximalen Anteil von 5 bis 8 % zu Glutathion-S-Sulfonat oxidiert, und zwar bei enzymatischen Gesamt-oxidationsraten von 100 bis 200 $\mu\text{M}/\text{h}$ (Daten nicht gezeigt). Bereits im Bereich von 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ (**Abb. 4.15**) und darüber wurden dagegen nur Raten unter 2 $\mu\text{M}/\text{h}$ beobachtet. Diese geringe Bildung des Glutathion-S-Sulfonats ließ sich durch Zugabe von GSSG bei Versuchsstart deutlich steigern (**Abb. 4.15 B**). So wurden in Ansätzen mit

Aktivitäten von 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ bei GSSG-Startkonzentrationen von 0, 200 und 500 $\mu\text{M-G}$ nach 1,7 h respektive etwa 3, 20 und fast 70 μM Glutathion-S-Sulfonat gefunden. Offenbar wurde das S-Sulfonat nur dann in nennenswerten Mengen gebildet, wenn über 300 $\mu\text{M-G}$ GSSG vorlagen. Aufgrund der verringerten GSH-Oxidation bei höheren Aktivitäten für die Elementarschwefel-Oxidation (s. Kapitel 4.3.2, **Tab. 4.1**) wurden bei 300 $\mu\text{M}/\text{h}$ derart hohe Konzentrationen an GSSG erst bei Versuchsende (**Abb. 4.15 A**) und bei höheren Aktivitäten überhaupt nicht erreicht (**Abb. 4.6 B**).

Denkbar wären auch Reaktionen von Sulfit mit höheren Bisorganylpolysulfanen. Wenn sich dabei der nukleophile Angriff des Sulfits gegen ein Sulfanschwefelatom richtet, können auch höhere Homologe des S-Sulfonats entstehen. Diese wurden allerdings in keinem Ansatz nachgewiesen.

Thiosulfat

In Übereinstimmung mit dem nach Suzuki (1965a) bei pH-Werten um 8 durchgeführten Aktivitätstest wurde auch in den eigenen Versuchen Thiosulfat als dominierendes Produkt der Elementarschwefel-Oxidation vorgefunden (**Abb. 4.3**). Offensichtlich findet ein Schwefelkettenabbau (**Gl. 4.16**) durch Sulfit mit der hier verwendeten Elementarschwefel-Form (s. Kapitel 3.2.4) bereits bei pH 6,5 mit ausreichender Geschwindigkeit statt, um weitere Sulfitabbauwege (s. o.) nahezu vollständig auszuschließen.

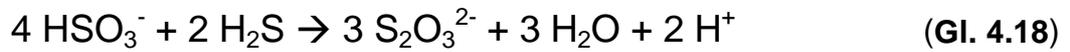


In entsprechenden Testversuchen wurden 500 μM Sulfit bei anaerober Inkubation mit 4 mM Elementarschwefel rasch und quantitativ in Thiosulfat überführt (**Abb. 4.16**). Die Geschwindigkeit der Umwandlung war dabei proportional zur Sulfitkonzentration (**Gl. 4.17**).

$$\frac{d[\text{SO}_3^{2-}]}{dt} = -k_A [\text{SO}_3^{2-}] \quad \text{und} \quad [\text{SO}_3^{2-}] = [\text{SO}_3^{2-}]_0 e^{-k_A t} \quad (\text{Gl. 4.17})$$

Eine geringe Beschleunigung des Sulfitabbaus wurde durch Zugabe von GSH erzielt (**Abb. 4.17**). Während bei einer GSH-Startkonzentration von 200 μM noch keine Veränderung bezüglich des Sulfitrückgangs zu beobachten war, vergrößerte sich bei $[\text{GSH}]_0 = 500 \mu\text{M}$ die Geschwindigkeitskonstante des Abbaus k_A nach **Gl. 4.17** von 3,6 auf 4,5 h^{-1} (**Abb. 4.17 B**). Diese Erhöhung basierte allerdings kaum auf einer vermehrten Thiosulfatbildung, sondern resultierte aus einem verstärkten Auftreten von Glutathion-S-Sulfonat (**Abb. 4.17 C** und **D**). In hohen Konzentrationen beeinflusste GSH also den Schwefelkettenabbau (**Gl. 4.16**) vor allem dadurch, dass

GSSG-Moleküle, die durch die GSH-bedingte Elementarschwefel-Reduktion entstanden waren, Sulfitmoleküle weggingen. Weitere GSH-bedingte Reaktionen, wie die Synproportionierung von Sulfid mit dem aus der Elementarschwefel-Reduktion resultierenden Hydrogensulfid (Gl. 4.18, Steudel 2000), können unter den Versuchsbedingungen vernachlässigt werden.



Es ist also festzuhalten, dass Sulfid als unmittelbares Produkt der GSH-abhängigen enzymatischen Elementarschwefel-Oxidation bestätigt werden kann. Im Enzymtest bildete dieses auch bei dem relativ niedrigen pH-Wert von 6,5 mit Elementarschwefel rasch Thiosulfat. Daneben reagierte das Disulfid des GSH mit Sulfid zu dem entsprechenden S-Sulfonat, allerdings nur bei ausreichend hoher GSSG-Konzentration.

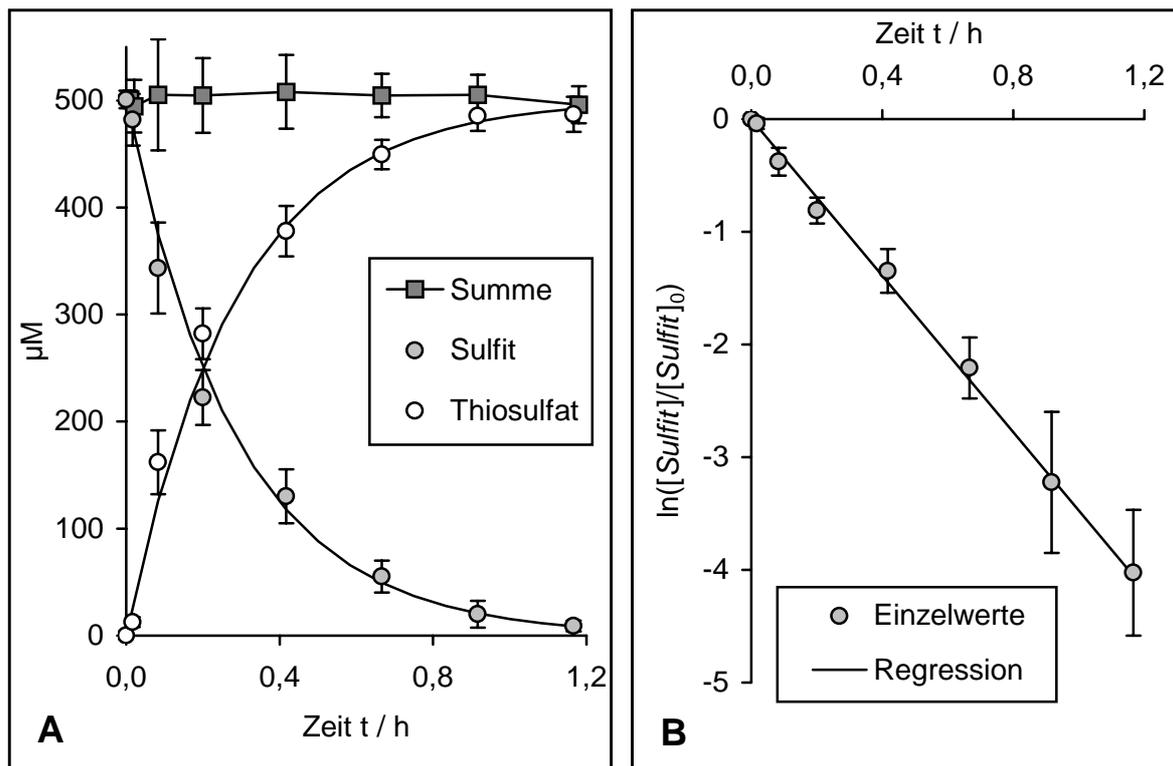


Abb. 4.16: Nicht-enzymatischer Schwefelkettenabbau zu Thiosulfat durch Sulfid unter den Bedingungen des anaeroben Enzymtestes ohne Zugabe von GSH (mit 500 μM Sulfid, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). **A:** Konzentrationen von Sulfid und Thiosulfat sowie die Summe beider Verbindungen und der nach den Gl. 4.16 und 4.17 berechnete Verlauf für Sulfid und Thiosulfat (durchgehende Linien). **B:** Logarithmischer Auftrag der Konzentration von Sulfid im Verhältnis zur Ausgangskonzentration $[\text{Sulfid}]_0$, Regressionsanalyse nach Gl. 4.17 ergibt $k_A = (3,47 \pm 0,13) \text{ h}^{-1}$ ($r = 0,9957$, $n = 8$).

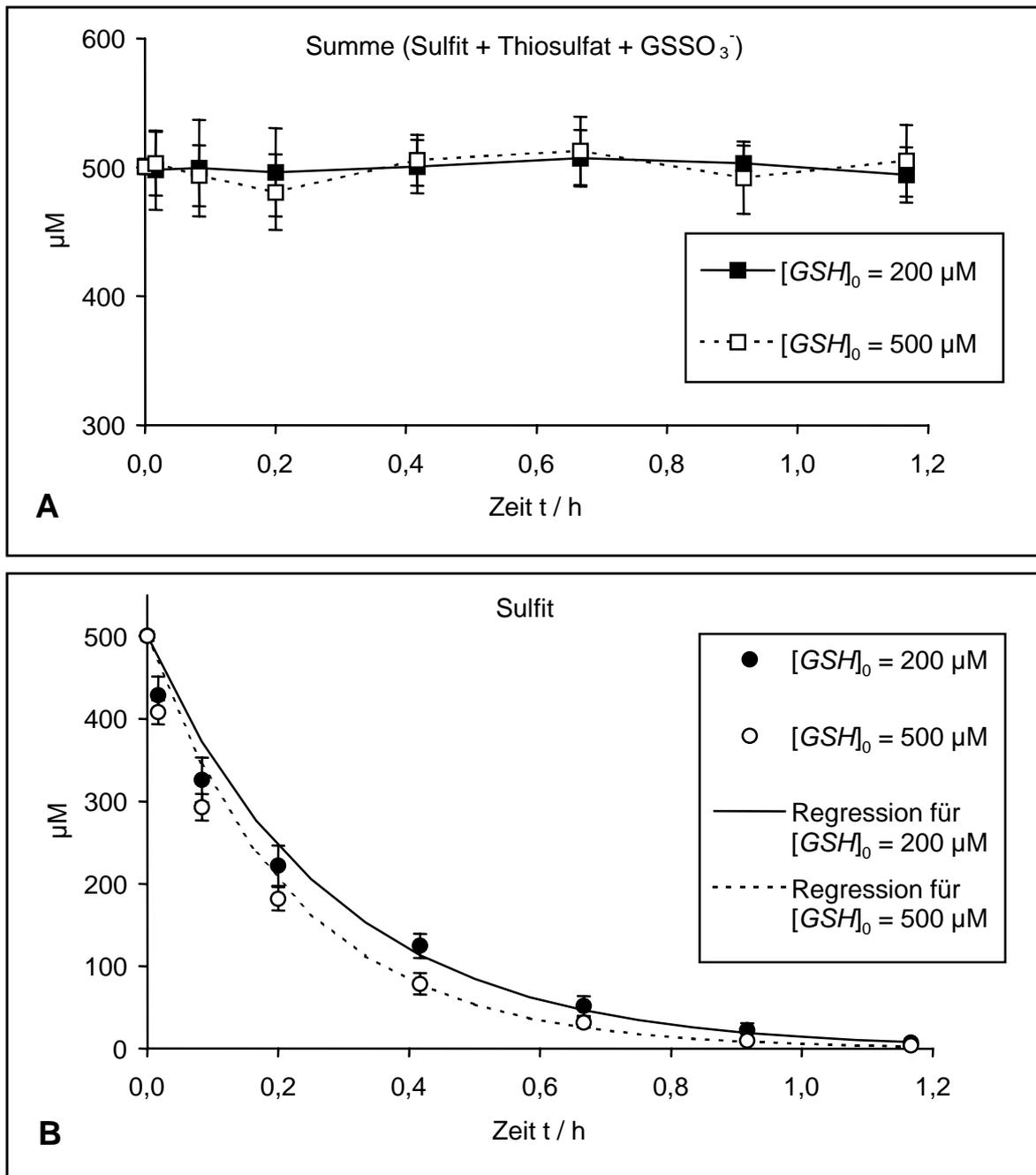


Abb. 4.17: Nicht-enzymatischer Schwefelkettenabbau zu Thiosulfat durch Sulfit und Bildung des Glutathion-S-Sulfonats in Abhängigkeit von der GSH-Startkonzentration $[GSH]_0$ unter den Bedingungen des anaeroben Enzymtestes (mit 500 µM Sulfit, 4 mM Elementarschwefel, pH 6,5). **A:** Summe aus Sulfit, Thiosulfat und Glutathion-S-Sulfonate. **B:** Konzentration von Sulfit sowie die mithilfe von **Gl. 4.17** ermittelten Verläufe (Regressionsanalysen: $k_A = (3,56 \pm 0,16) \text{ h}^{-1}$, $r = 0,993$, $n = 8$ bei $[GSH]_0 = 200 \text{ µM}$; $k_A = (4,48 \pm 0,27) \text{ h}^{-1}$, $r = 0,988$, $n = 8$ bei $[GSH]_0 = 500 \text{ µM}$).

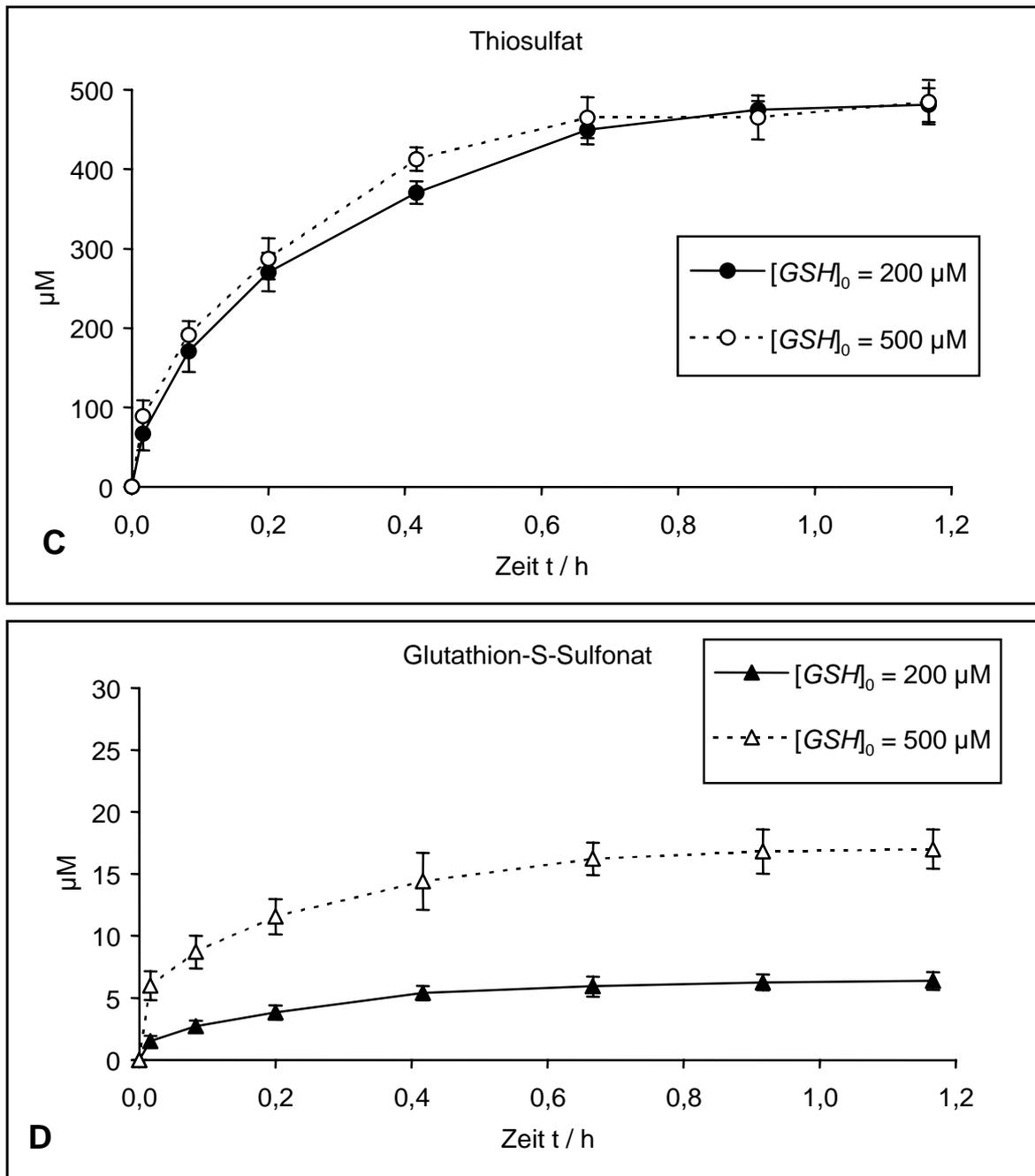


Abb. 4.17 (Fortsetzung): **C:** Konzentration von Thiosulfat. **D:** Konzentration von Glutathion-S-Sulfonat.

4.4 Untersuchungen zur Substratspezifität der Schwefel-Dioxygenase

Aufgrund der Ergebnisse zur Kinetik der im Enzymtest mit Elementarschwefel und GSH auftretenden Schwefelverbindungen (s. Kapitel 4.3) kann gefolgert werden, dass das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem bei den 4 untersuchten Stämmen von *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium* nur den Sulfanschwefel von Monoorganylpolysulfanen oxidiert, nicht aber Hydrogensulfid als Substrat nutzen kann. In weiteren Versuchen wurden alternative Sulfanverbindungen (**Abb. 4.18**) auf ihre Oxidierbarkeit durch zellfreie Systeme der erwähnten Bakterienstämme getestet.

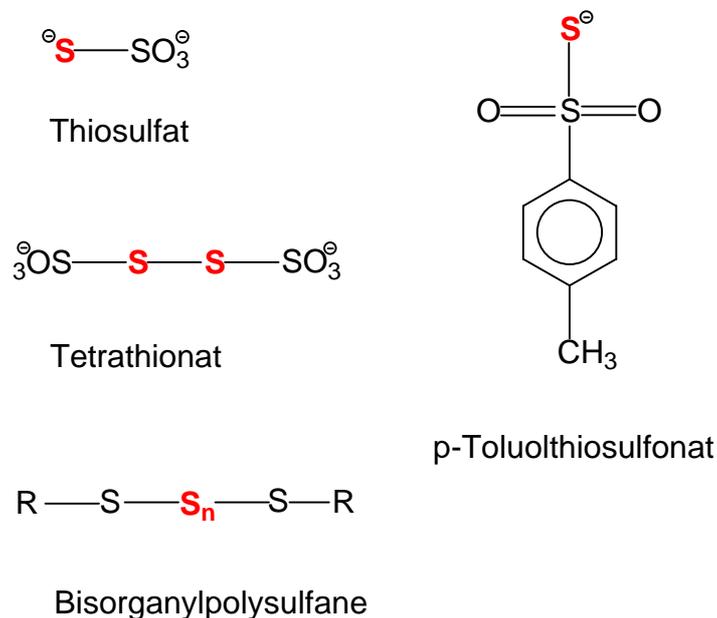


Abb. 4.18: Strukturformeln der als alternative Substrate für das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem getesteten Verbindungen (R = organischer Rest, z. B. G bei GSH-Derivaten). Die Sulfanschwefelatome sind rot dargestellt.

4.4.1 Thiosulfat als Substrat

Thiosulfat kann als Verbindung mit einer Sulfan- und einer Sulfonschwefelgruppe angesehen werden (**Abb. 4.18**). Unter den Bedingungen des aeroben Aktivitätstestes mit 500 bis 1000 μM Thiosulfat als Substrat anstelle von Elementarschwefel plus GSH wurde keine Oxidationsaktivität beobachtet. Die Konzentration von Thiosulfat blieb vielmehr über die gesamte Versuchsdauer von 2 h auch bei Zugabe von 200 bis 500 μM GSH unverändert (Daten nicht dargestellt). Wie bereits durch die Akkumulation von Thiosulfat im Enzymtest mit Elementarschwefel belegt (Kapitel 4.2 und 4.3), konnte Thiosulfat also nicht als Substrat des Elementarschwefel oxi-

dierenden Enzyms dienen. Außerdem war GSH unter den Versuchsbedingungen nicht in der Lage, den Sulfanschwefel des Thiosulfats zu mobilisieren und das Persulfid des GSH zu bilden (Gl. 4.19), was zum Abbau des Substrats hätte führen müssen.



4.4.2 Tetrathionat als Substrat

Tetrathionat enthält zwei miteinander verbundene Sulfanschwefelatome, die jeweils noch mit einer Sulfonatgruppe verknüpft sind (Abb. 4.18). Wie beim Versuch mit Thiosulfat konnte auch mit 500 bis 1000 μM Tetrathionat als Substrat unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes keinerlei Oxidationsaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Durch GSH wurde Tetrathionat allerdings rasch zu Thiosulfat reduziert. So wurden beispielsweise 500 μM GSH unabhängig von der Anwesenheit von aktivem Zellextrakt innerhalb von 30 min quantitativ zu GSSG oxidiert (Abb. 4.19 A), während andererseits gemäß Gl. 4.20 von den eingesetzten 500 μM Tetrathionat etwa 250 μM zu Thiosulfat reduziert wurden (Abb. 4.19 B). Intermediär trat dabei in geringen Mengen das S-Sulfonat des GSH auf.



Für die nicht-enzymatische Reaktion von Thiolen wie GSH mit Tetrathionat werden mehrere Möglichkeiten diskutiert (Albertsen 1993). So kann die Thiolgruppe entweder mit einer Sulfan- oder Sulfongruppe des Tetrathionats reagieren, entsprechend entstehen als unmittelbare Produkte das Disulfansulfonat des GSH und Thiosulfat (Gl. 4.21) bzw. das S-Sulfonat und die sehr instabile Disulfanmonosulfonsäure (Gl. 4.23). Das Glutathion-S-Sulfonat und höhere Homologe werden durch GSH abgebaut, wobei schließlich GSSG, Thiosulfat und Sulfit gebildet werden (Gl. 4.22 und 4.24). Sulfit kann dann mit der Disulfanmonosulfonsäure zu Thiosulfat weiterreagieren (Gl. 4.25).





Letztendlich traten aber bei der GSH-vermittelten Reduktion von Tetrathionat keine Sulfanverbindungen auf, die als Substrat für das Elementarschwefel oxidierende Enzym nutzbar waren. Auch bei GSH-Überschuss (500 μM GSH mit 100 bis 250 μM Tetrathionat) wurde nur eine Umsetzung nach **Gl. 4.20** beobachtet (Daten nicht gezeigt).

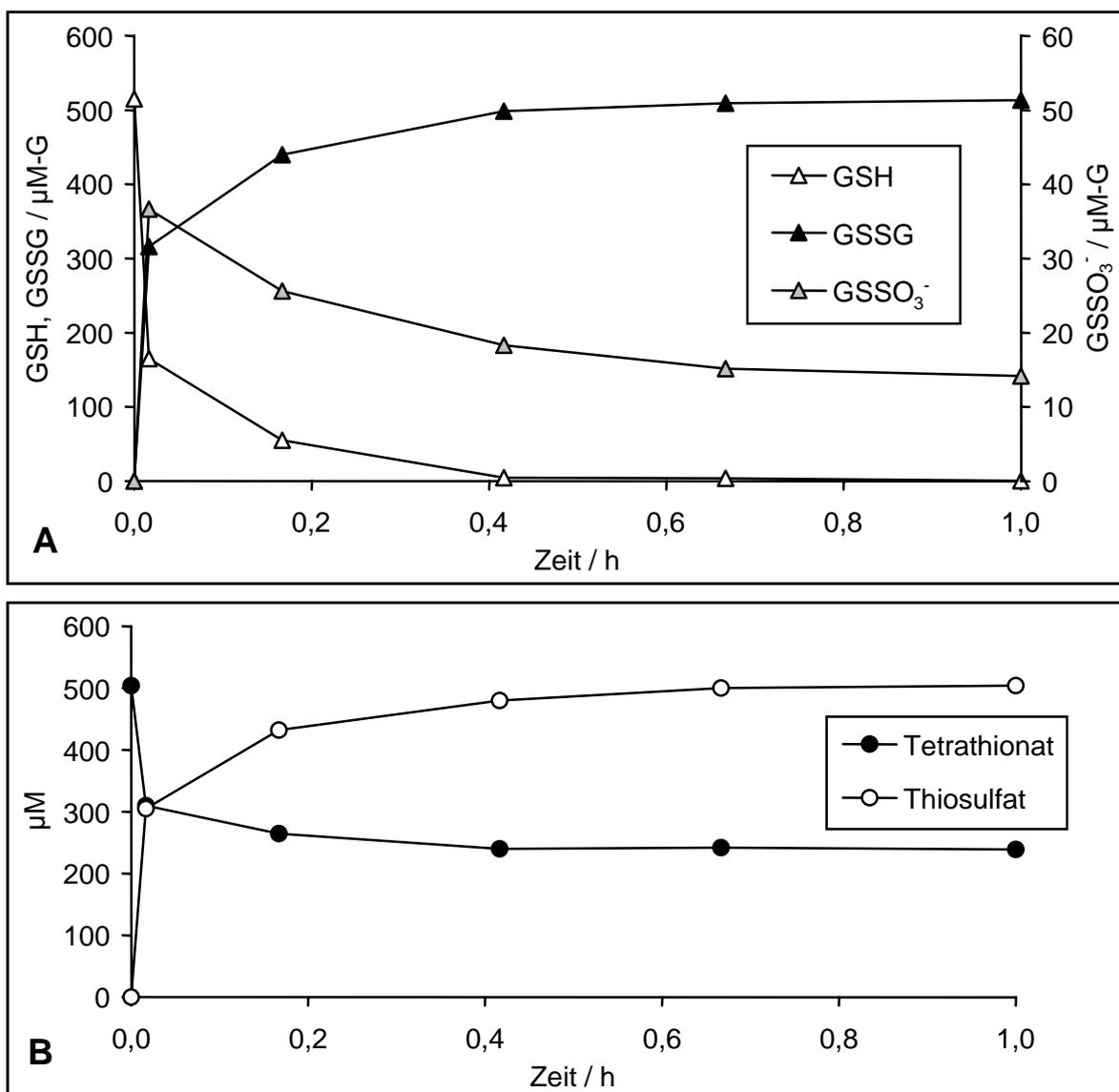
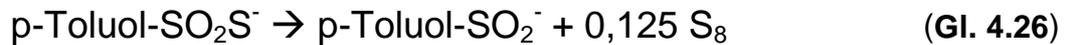


Abb. 4.19: Nicht-enzymatische Reduktion von Tetrathionat durch GSH unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit 500 μM GSH und 500 μM Tetrathionat anstelle von Elementarschwefel, pH 6,5). **A:** Die Konzentrationen von GSH, GSSG und Glutathion-S-Sulfonat wurden auf die Anzahl der enthaltenen GSH-Reste bezogen ($\mu\text{M-G}$). **B:** Verlauf von Tetrathionat und Thiosulfat.

4.4.3 p-Toluolthiosulfonat als Substrat

Monoorganylthiosulfonate besitzen eine Sulfonatgruppe, bei der ein Sauerstoffatom durch Schwefel ersetzt ist (**Abb. 4.18**). Dieses Sulfanschwefelatom ist insbesondere bei aromatischen Thiosulfonaten sehr reaktiv. So erfolgt hier die Cyanolyse im Gegensatz zu Thiosulfat bereits bei Raumtemperatur und ohne Katalysator und auch leichter als bei Tetrathionat (Wood 1987, Ip et al. 1997). Untersucht wurde die Oxidierbarkeit von p-Toluolthiosulfonat unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes. In Abwesenheit von GSH zerfällt das Thiosulfonat zwar langsam zu dem korrespondierenden Sulfinat und Elementarschwefel gemäß **Gl. 4.26**, eine Oxidation des Sulfanschwefels wurde aber in Ansätzen mit 500 bis 2000 μM p-Toluolthiosulfonat nicht beobachtet (Daten nicht dargestellt). Das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem konnte also auch den Sulfanschwefel des aromatischen Thiosulfonats nicht als Substrat nutzen.



In Gegenwart von GSH war dagegen eine geringe Oxidationsaktivität messbar. So wurde beispielsweise in einem Ansatz mit einem aktiven Rohextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und 2000 μM p-Toluolthiosulfonat plus 200 μM GSH der Sulfanschwefel des Thiosulfonats mit einer Rate von 50 bis 60 $\mu\text{M}/\text{h}$ vor allem zu Thiosulfat und in geringerem Maße auch zu Sulfat oxidiert (**Abb. 4.20**). Parallel zur Bildung der Oxidationsprodukte entstand das p-Toluolsulfinat, dessen Konzentration äquimolar zu derjenigen Schwefelmenge war, die in Thiosulfat und Sulfat enthalten war. Die GSH-Konzentration nahm nur gering, und zwar in der Größenordnung der Autoxidation ab, wobei ausschließlich GSSG gebildet wurde. Die Sulfanschwefel-Oxidation konnte nicht durch weitere Zugaben von aktivem Rohextrakt oder GSH gesteigert werden (Daten nicht dargestellt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass GSH zumindest bei einem pH-Wert von 6,5 den Sulfanschwefel des p-Toluolthiosulfonats kaum mobilisieren kann. Oxidiert wurde vielmehr der nach **Gl. 4.26** durch den langsamen Zerfall des Thiosulfonats freiwerdende Elementarschwefel, wie bereits ausführlich untersucht (s. Kapitel 4.3). Thiosulfat wurde dann aus dem zunächst entstehenden Sulfit (**Gl. 2.13**) entweder mit Elementarschwefel (**Gl. 4.16**) oder möglicherweise durch Reaktion mit Thiosulfonat gebildet (**Gl. 4.27**). Ein Teil des Sulfits wurde vermutlich nicht-enzymatisch zu Sulfat oxidiert.



Weder GSH noch das Elementarschwefel oxidierende Enzym waren also in der Lage, den Sulfanschwefel des p-Toluolthiosulfonats direkt zu mobilisieren. Die beobachtete geringe Aktivität in Anwesenheit von GSH war auf die Oxidation von Elementarschwefel zurückzuführen, der aus dem nicht-enzymatischen Zerfall des Thiosulfonats stammte.

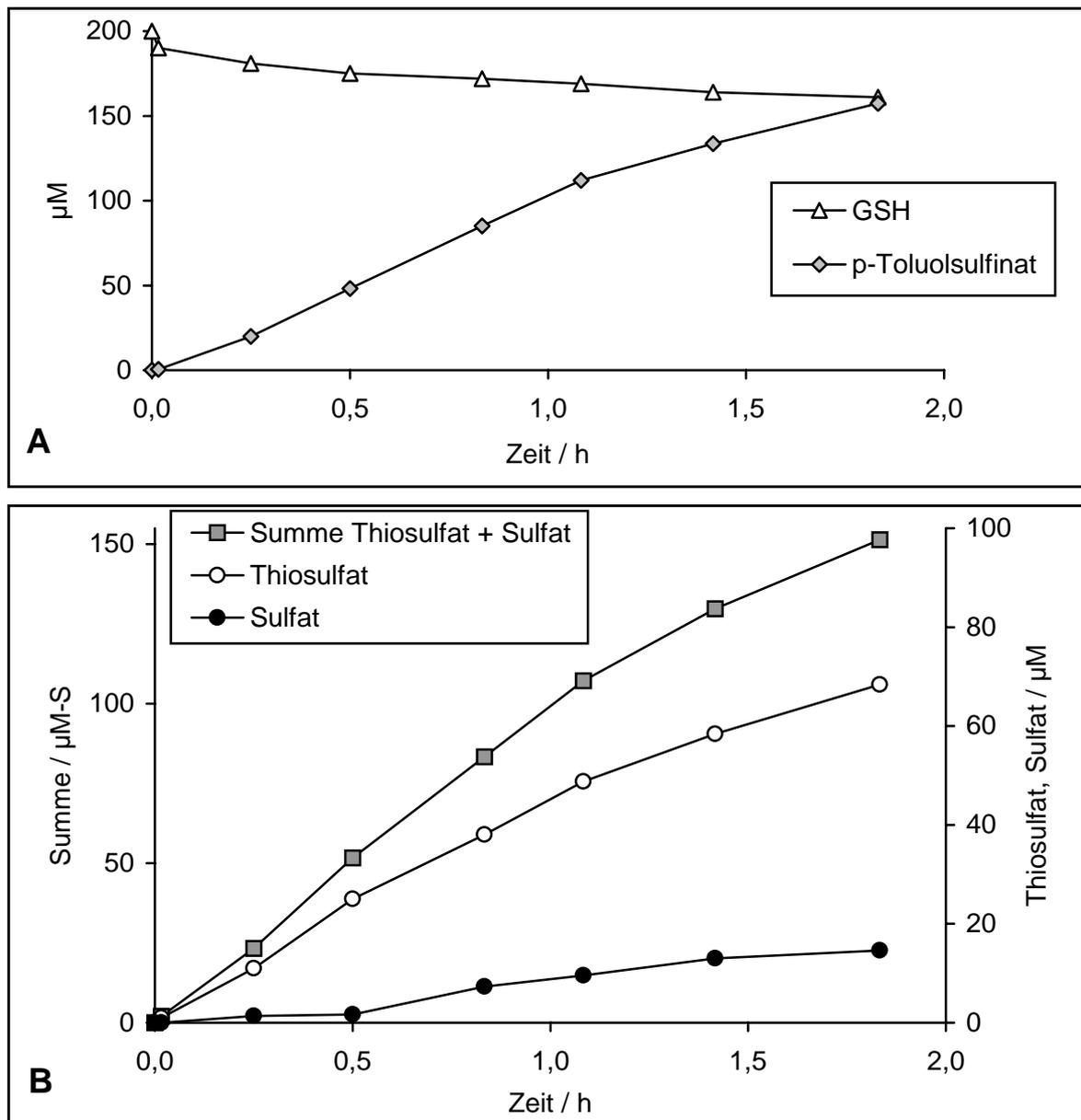


Abb. 4.20: Enzymatische Oxidation von p-Toluolthiosulfonats durch einen aktiven Rohextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit 200 μM GSH und 2 mM p-Toluolthiosulfonats anstelle von Elementarschwefel; Proteinkonzentration 0,08 g/L, pH 6,5). **A:** Konzentrationen von GSH und p-Toluolsulfinat. **B:** Thiosulfat- und Sulfatbildung sowie die Summe der in diesen beiden Verbindungen enthaltenen Schwefelatome ($\mu\text{M-S}$).

4.4.4 Höhere Bisorganylpolysulfane des GSSG als Substrat

Der Sulfanschwefel in Bisorganylpolysulfanen (**Abb. 4.18**) ist reaktiver als der in Polythionaten und Monoorganylthiosulfonaten enthaltene (Wood 1987). Unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes wurden Gemische von höheren Homologen des GSSG auf ihre Oxidierbarkeit getestet. Diese Gemische wurden durch Inkubation von GSH mit Elementarschwefel hergestellt (s. Kapitel 3.2.4) und enthielten neben GSSG das Tri-, Tetra- und das Pentasulfan als detektierbare Sulfanverbindungen. Nur in Gegenwart von GSH und nur mit aktiven Extrakten konnte eine Oxidationsaktivität beobachtet werden, die hier beispielhaft an einem Ansatz mit einem zellfreien System aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 beschrieben ist (**Abb. 4.21**). Als Oxidationsprodukte des Sulfanschwefels wurden Thiosulfat und das S-Sulfonat des GSH zu fast gleichen Teilen gebildet. Innerhalb von 2 h wurde der gesamte Pool an höheren Polysulfanen verbraucht (**Abb. 4.21 B**), wobei neben Thiosulfat und Glutathion-S-Sulfonat auch die Konzentrationen von GSSG und GSH anstiegen. Der Zuwachs bei GSSG lässt sich durch die Mobilisierung des Sulfanschwefels aus den Polysulfanen mit GSH erklären (**Gl. 4.3**). Generell entstehen dabei Gemische aus Mono- und Bisorganylpolysulfanen. Der Sulfanschwefel der Monoorganylpolysulfane wird enzymatisch oxidiert und GSH regeneriert (**Gl. 2.12** und **2.13**). Schließlich reagiert GSH mit dem Bisorganyltrisulfan zu GSSG und dem GSH-Persulfid (**Gl. 4.28**).



Der ungewöhnlich hohe Anteil des S-Sulfonats an den Oxidationsprodukten (**Abb. 4.21 A**) ist wahrscheinlich auf den hohen Gehalt an GSSG (etwa 1000 μM) und auf die Abwesenheit von Elementarschwefel zurückzuführen. Im Gegensatz zu dem Standardtest mit Elementarschwefel kann sich hier Thiosulfat also nur durch Reaktion von Sulfid mit Monoorganylpolysulfanen wie dem Persulfid bilden (**Gl. 4.29**), die wahrscheinlich nur eine geringe Poolgröße besitzen. Dagegen steht GSSG als Reaktionspartner für Sulfid in ausreichender Menge zur Verfügung. GSH wird dabei parallel zu Glutathion-S-Sulfonat gemäß **Gl. 3.1** gebildet (**Abb. 4.21 A**).



Eine Oxidation des Sulfanschwefels in höheren Homologen des GSSG erfolgte nur in Anwesenheit von GSH, also sehr wahrscheinlich über Monoorganylpolysulfane wie im Standardtest mit Elementarschwefel. Die getesteten Bisorganylpolysulfane können somit nicht direkt durch das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem angegriffen werden.

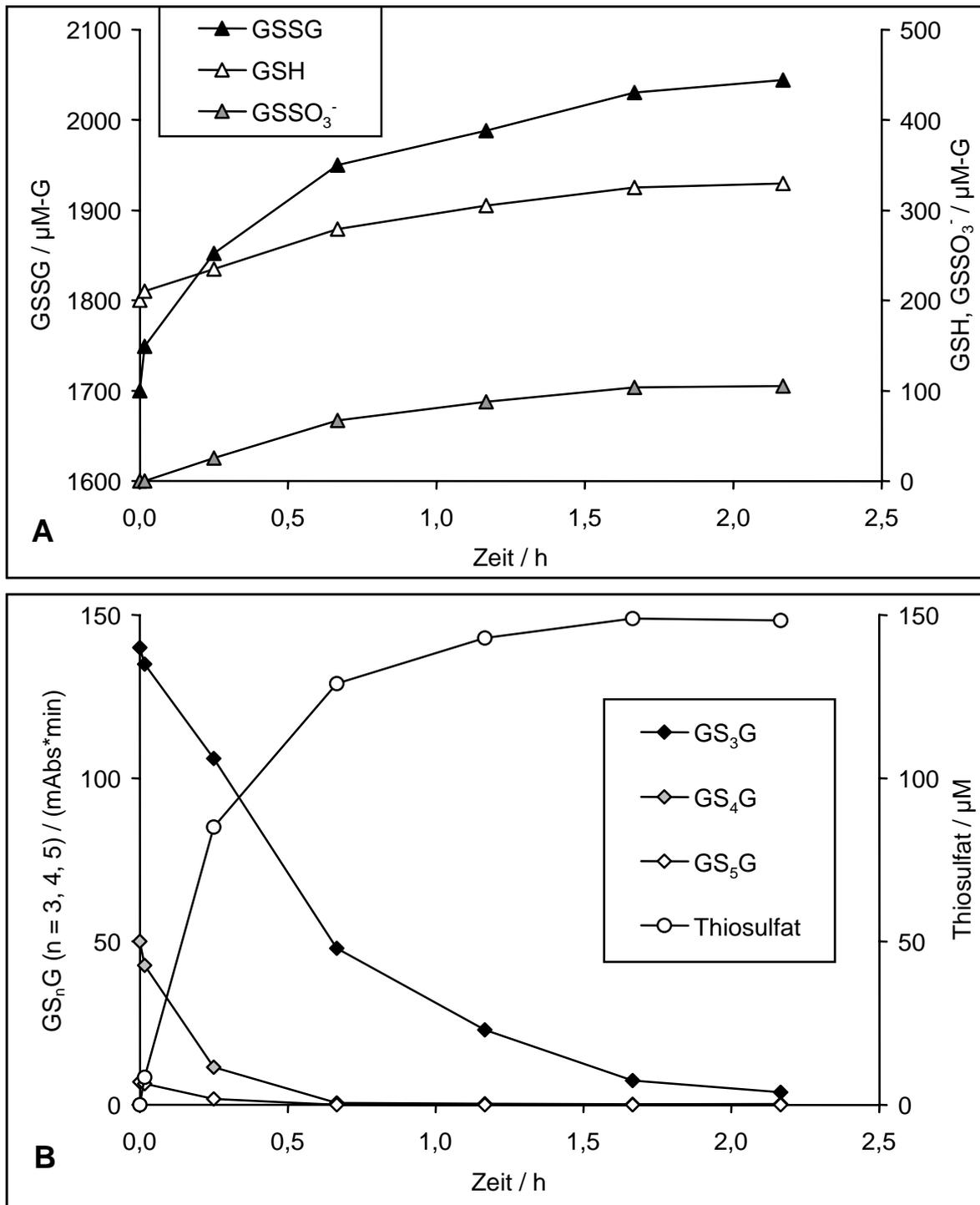


Abb. 4.21: Enzymatische Oxidation eines Gemisches von höheren Homologen des GSSG (GS_nG , $n=3$ bis 5) durch einen aktiven Rohextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit $200 \mu\text{M}$ GSH und einem GS_nG -Gemisch von $2300 \mu\text{M-G}$ anstelle von Elementarschwefel; der Gehalt an GSH-Verbindungen beträgt somit insgesamt $2500 \mu\text{M-G}$; Proteinkonzentration $0,08 \text{ g/L}$, pH 6,5). **A:** Konzentrationen von GSSG, GSH und Glutathion-S-Sulfonat. **B:** Thiosulfatbildung und die bei 215 nm chromatographisch gemessenen Peakflächen der Tri-, Tetra- und Pentasulfanhomologen des GSSG.

4.4.5 Hydrogensulfid plus GSSG als Substrat

Unter den Bedingungen des aeroben Aktivitätstestes wurde Hydrogensulfid allein oder zusammen mit GSH nicht durch Rohextrakte der untersuchten Arten oxidiert (s. Kapitel 4.3.2). Jedoch wurden sehr geringe Aktivitäten in Gegenwart hoher Konzentrationen von GSSG beobachtet. So wurden z. B. in Ansätzen mit einem Rohextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und 180 μM Sulfid plus 1 mM GSSG innerhalb von 1 h etwa 7 bis 8 μM Thiosulfat und Glutathion-S-Sulfonat gebildet (**Abb. 4.22**). Diese Aktivität konnte nicht durch Erhöhung der Rohextraktmenge gesteigert werden. Bei 500 μM GSSG betrug die Oxidationsrate unter 5 $\mu\text{M}/\text{h}$, und mit niedrigeren Konzentrationen von GSSG war keine Aktivität nachzuweisen (Daten nicht dargestellt). Der größte Teil des Sulfids entwich aus den Reaktionsansätzen durch Übertritt in die Gasphase (**Abb. 4.22 A**), wie bereits im Rahmen der kinetischen Untersuchungen beschrieben (Kapitel 4.3.2). Offensichtlich wurde auch hier nur der Sulfanschwefel vom GSH-Persulfid enzymatisch oxidiert (**Gl. 4.30**), das durch Reaktion von Sulfid mit GSSG gebildet wurde (**Gl. 4.31**). Diese nicht-enzymatische Oxidation des Sulfids zum Sulfanschwefel des Persulfids erfolgte bei pH 6,5 sehr langsam, sodass nur eine sehr geringe enzymatische Oxidation des Persulfids zum Sulfit beobachtet wurde.



Das Sulfit reagierte v. a. mit überschüssigem GSSG zum Glutathion-S-Sulfonat (**Gl. 3.1**), sodass das S-Sulfonat des GSH hier sogar das vorherrschende Oxidationsprodukt darstellte (**Abb. 4.22**). Es entstanden neben 6 μM Glutathion-S-Sulfonat innerhalb 1 h nur noch etwa 1 bis 2 μM Thiosulfat. Vernachlässigt man die Thiosulfatbildung, so lässt sich für die GSSG-abhängige, enzymatische Oxidation von Sulfid folgende Summengleichung formulieren (**Gl. 4.32**).



Tatsächlich betrug das Verhältnis von gebildetem GSH zu Glutathion-S-Sulfonat 2,5 bis 2,8 und kommt somit der aus **Gl. 4.32** abzuleitenden Ratio von 3 ziemlich nahe (**Abb. 4.22 B**).

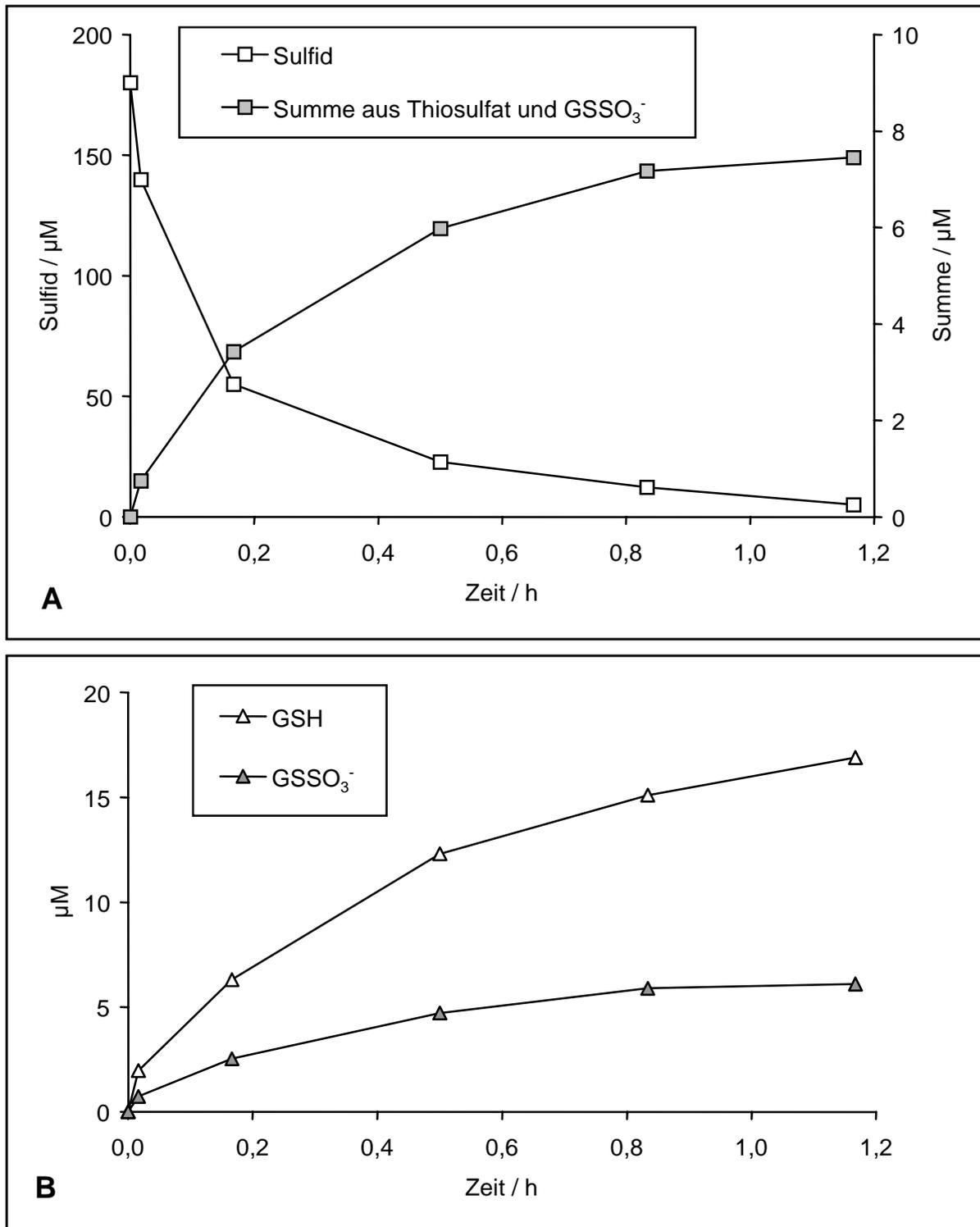


Abb. 4.22: GSSG-abhängige, enzymatische Oxidation von Hydrogensulfid durch einen aktiven Rohextrakt von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit 180 μM Sulfid und 1 mM GSSG anstelle von Elementarschwefel und GSH; Proteinkonzentration 0,08 g/L, pH 6,5). **A:** Konzentration von gelöstem Sulfid sowie die Summe aus gebildetem Thiosulfat und gebildetem Glutathion-S-Sulfonat. **B:** Bildung von GSH und Glutathion-S-Sulfonat.

4.5 Untersuchungen zu alternativen Elektronenakzeptoren

Rohextrakte der 4 untersuchten Schwefeloxidanten zeigten regelmäßig eine Oxidationsaktivität für Elementarschwefel im aeroben Test. Um auch die Aktivität zu alternativen Elektronenakzeptoren zu überprüfen, wurden anaerobe Versuche mit den in **Tab. 4.2** aufgeführten Elektronenmediatoren durchgeführt, wobei Konzentrationen von jeweils 100 und 500 μM eingesetzt wurden. In keinem Fall konnte eine Aktivität für das GSH-abhängige Elementarschwefel oxidierende Enzymssystem nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vielmehr wurde durch die verschiedenen Eisen(III)-Komplexe das eingesetzte GSH zu GSSG oxidiert. Insbesondere bei Cytochrom c und dem Eisen-Phenanthrolin-Komplex verlief diese Reaktion sehr rasch, sodass diese alternativen Elektronenakzeptoren bereits nach einer Versuchszeit von 10 bis 20 min verbraucht waren.

Tab. 4.2: Alternative Elektronenakzeptoren im anaeroben Enzymtest (mit 500 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel und einem pH-Wert von 6,5). Angegeben sind neben den Verbindungen die Redoxpaare sowie das entsprechende Redoxpotenzial (E). Die Werte für E beziehen sich auf das Potenzial gegenüber der Wasserstoffelektrode unter Standardbedingungen, wobei die Werte nicht für pH 0, sondern für pH 7 berechnet wurden. Bei Redoxpaaren mit mehr als einem Elektronenübergang sind Durchschnittswerte pro Elektron aufgeführt (nach Angaben von Thauer et al. 1977, Fultz & Durst 1982).

Stoffklasse	Verbindung (Redoxpaar)	$E^{\text{0/pH } 7} / \text{mV}$
Nicotinsäureamide	$\beta\text{-NAD (NAD}^+/\text{NADH)}$	-320
Flavine	$\text{FAD (FAD/FADH}_2\text{)}$	-220
Quinone (Q)	2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinon (Q/QH ₂)	ca. +100
	1,2-Naphthoquinon-4-sulfonat (Q/QH ₂)	+217
Eisen(III)-Komplexe	$\text{Fe(EDTA) (Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}\text{)}$	+96
	Cytochrom c, bovine heart ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)	ca. +250
	$\text{Fe(Citrat) (Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}\text{)}$	+372
	$\text{Fe(1,10-Phenanthrolin)}_3 (\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}\text{)}$	ca. +1000
sonstige	Nitrat (Nitrat/Nitrit)	+430

4.6 Weitere Eigenschaften der Schwefel-Dioxygenase

4.6.1 Spezifische Aktivitäten und K_m -Werte für GSH

Für die Bedingungen des Standardenzymtestes mit Elementarschwefel und GSH als Substrat und einem pH-Wert von 6,5 wurden spezifische Aktivitäten für die Oxidation von Elementarschwefel ermittelt (s. z. B. Kapitel 4.3.2, **Abb. 4.13**). Außerdem wurden die K_m -Werte für GSH bestimmt (**Abb. 4.23**). Alle hierbei erhaltenen Daten sind in **Tab. 4.3** aufgeführt. Bei den bisherigen Untersuchungen wurden ausschließlich Rohextrakte eingesetzt, die aus mit Elementarschwefel angezogenen Zellen hergestellt worden waren. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität und des K_m -Wertes für GSH wurden zusätzlich Extrakte getestet, die aus mit Eisen(II)-Ionen angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und heterotroph gewachsenen Zellen von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T gewonnen worden waren. Auch diese zellfreien Systeme besaßen bezüglich der Elementarschwefel oxidierenden Enzymaktivität die in den vorhergehenden Kapiteln (s. Kapitel 4.3 bis 4.5) beschriebene Substratspezifität, Produktpalette und Inaktivität gegenüber alternativen Elektronenakzeptoren (Daten nicht gezeigt). In **Tab. 4.3** sind außerdem Ergebnisse angegeben, die mit den Stämmen *Acidiphilium cryptum* DSM 2389^T und *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T erhalten wurden. Beide Stämme können nicht mit Elementarschwefel als Energiequelle wachsen und wurden deshalb nur mit Glucose bzw. Eisen(II)-Ionen angezogen (s. Kapitel 3.1.2).

Die mit Abstand höchsten Aktivitäten für das Elementarschwefel oxidierende System wurden mit Rohextrakten von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T erzielt (**Tab. 4.3**). So wurden mit Rohextrakten, die aus autotroph mit Elementarschwefel angezogenen Zellen gewonnen worden waren, Oxidationsraten um 20 $\mu\text{mol/h}/(\text{mg Protein})$ gemessen. Noch etwa ein Drittel dieses Wertes wurde mit heterotroph gewachsenen Zellen erzielt. Mit spezifischen Oxidationsraten um 3 bis 5 $\mu\text{mol/h}/(\text{mg Protein})$ wiesen Extrakte von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 deutlich niedrigere Aktivitäten auf, wobei keine Unterschiede zwischen mit Elementarschwefel und Eisen(II)-Ionen angezogenen Zellen beobachtet wurden. Von den getesteten Stämmen, die autotroph mit Elementarschwefel zu wachsen vermögen, besaßen die beiden untersuchten Stämme von *Acidithiobacillus thiooxidans* die geringsten Aktivitäten für das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem. Wie aufgrund seiner ausgeprägten Substratspezifität für Eisen(II)-Ionen zu erwarten gewesen war (Hippe 2000), konnte bei dem Stamm *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T keine Elementarschwefel oxidierende Aktivität nachgewiesen werden. Dagegen wurde in Rohextrakten von *Acidiphilium cryptum* DSM 2389^T mit Oxidationsraten um 0,3 $\mu\text{mol/h}/(\text{mg Protein})$ etwa 10 bzw. 20 % der für *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 und *Acidithiobacillus thiooxidans* K6 ermittelten Aktivität beobachtet.

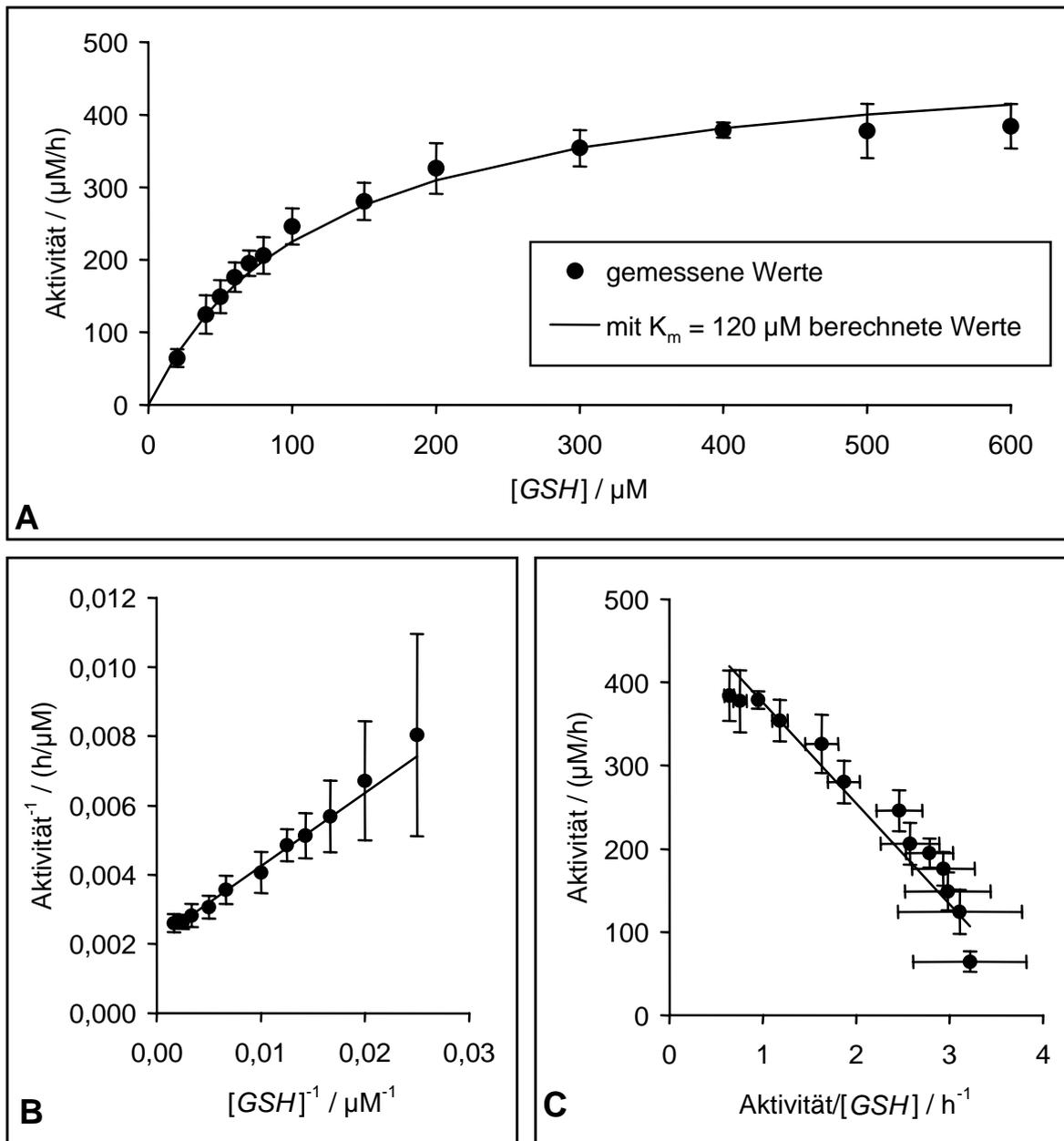


Abb. 4.23: Bestimmung des K_m -Wertes für GSH unter aeroben Bedingungen und mit aktivem Rohextrakt von mit Eisen(II)-Ionen angezogenen Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 (mit 4 mM Elementarschwefel, Proteingehalt 0,1 g/L, pH 6,5). **A:** Beziehung zwischen der enzymatischen Aktivität für die Elementarschwefel-Oxidation und der GSH-Konzentration und mit einem $K_m = 120 \mu\text{M}$ berechnete Abhängigkeit. **B:** Auftrag nach Lineweaver-Burk mit Werten für 40 bis 600 μM GSH ergibt $K_m = (100 \pm 5) \mu\text{M}$. **C:** Auftrag nach Eadie-Hofstee mit Werten für 20 bis 600 μM GSH ergibt $K_m = (120 \pm 10) \mu\text{M}$.

Die Michaelis-Menten-Konstante für GSH wurde für die 4 Stämme bestimmt, die autotroph mit Elementarschwefel zu wachsen vermögen (**Tab. 4.3**). Berechnet wurden die Werte nach der Methode von Eadie-Hofstee (Bailey & Ollis 1977), da hiermit im Gegensatz zu der Methode von Lineweaver-Burk auch die niedrigsten getesteten Konzentrationen von GSH berücksichtigt werden konnten (**Abb. 4.23 C**). Die erhaltenen K_m -Werte lagen zwischen 110 und 250 μM , wobei Extrakte von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 die höchsten und Extrakte von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T die niedrigsten Affinitäten für GSH aufwiesen. Signifikante Unterschiede, die auf den bei der Zellanzucht verwendeten Substraten basieren könnten, wurden nicht festgestellt.

Tab. 4.3: Spezifische Aktivitäten für die enzymatische Elementarschwefel-Oxidation sowie deren Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für GSH in zellfreien Systemen von unterschiedlich angezogenen Laugungsbakterien unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes (mit 4 mM Elementarschwefel und einem pH-Wert von 6,5). Die Aktivität gibt diejenige Menge Elementarschwefel an, die innerhalb 1 h von 1 mg Zellprotein enzymatisch mindestens bis zur Oxidationsstufe des Sulfits oxidiert wurde. Die K_m -Werte wurden nach der Methode von Eadie-Hofstee berechnet (s. **Abb. 4.23 C**) (n.n. nicht nachweisbar; n. b. nicht bestimmt).

	Anzucht mit	Aktivität $\mu\text{mol/h/mg}$	K_m für GSH μM
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> R1	Elementarschwefel	$3,8 \pm 1,4$	140 ± 20
	Eisen(II)-Ionen	$3,5 \pm 0,6$	120 ± 10
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 504	Elementarschwefel	$2,4 \pm 0,8$	160 ± 20
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> K6	Elementarschwefel	$1,5 \pm 0,5$	190 ± 10
<i>Acidiphilium acidophilum</i> DSM 700 ^T	Elementarschwefel	$22,4 \pm 5,4$	230 ± 20
	Glucose	$7,8 \pm 2,5$	240 ± 10
<i>Acidiphilium cryptum</i> DSM 2389 ^T	Glucose	$0,3 \pm 0,1$	n. b.
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T	Eisen(II)-Ionen	n. n.	n. b.

4.6.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität

Für Extrakte lithotroph angezogener Zellen von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T wurde exemplarisch die pH-Abhängigkeit der Elementarschwefel oxidierenden Enzymaktivität bestimmt. Hierfür wurde zum einen eine definierte Extraktmenge mit 500 μM GSH und Elementarschwefel bei pH-Werten von 4 bis 9 inkubiert. Maximale Oxidationsraten wurden im pH-Bereich 7,5 bis 8 ermittelt (**Abb. 4.24 A**). Bei pH 6,5 und 9 wurden nur noch etwa 50 % der maximalen Raten erzielt, und unterhalb von pH 5,5 war keine enzymatische Aktivität nachweisbar. Oberhalb von pH 7 wurden konstante Aktivitäten nur 30 bis 60 min lang beobachtet, da GSH rasch durch Oxidation mit Elementarschwefel und Sauerstoff verbraucht wurde. Entsprechend der erhöhten Reaktivität von GSH im Alkalischen und der hier ebenfalls verstärkten Autoxidation von Hydrogensulfid (Luther 1990) stieg die nicht-enzymatische Bildungsrate der Oxidationsprodukte Thiosulfat und Sulfat kontinuierlich mit dem pH-Wert an (**Abb. 4.24 B**). Diese liegt bei pH 9 sogar gleichauf mit der enzymatischen Aktivität. Zusätzlich spielen im Alkalischen möglicherweise zu Thiosulfat und Sulfat führende Disproportionierungen des Elementarschwefels eine Rolle (Steudel 2000). Derartige Reaktionen wurden unterhalb von pH 7 unter den Versuchsbedingungen nicht beobachtet. Hier konnten auch über Zeiträume von 2 bis 3 h stabile Aktivitäten für die enzymatische Elementarschwefel-Oxidation erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchungen wurde eine Extraktmenge verwendet, deren Aktivität bei pH 6,5 und 500 μM GSH nicht GSH-limitiert war. Aufgrund der mit dem pH-Wert steigenden Nukleophilie des GSH kann davon ausgegangen werden, dass diese Menge auch oberhalb von pH 6,5 ausreichte, die maximal mit der eingesetzten Enzymmenge erzielbare Aktivität zu ermitteln. Da allerdings zu erwarten war, dass sich die Reaktivität des GSH mit abnehmendem pH-Wert verringert, wurden im Sauren zusätzlich höhere Konzentrationen von GSH getestet. Es zeigte sich, dass bereits bei pH 6 die Aktivität durch Inkubation mit 1000 statt 500 μM GSH fast verdoppelt werden konnte (**Abb. 4.24 A**). Diese Menge an GSH war bis pH 5 ausreichend, um in Bezug auf GSH nicht-limitierte Oxidationsraten für Elementarschwefel zu erzielen. Darunter, bis zu einem pH-Wert von 4, musste die Konzentration auf 2000 μM gesteigert werden. Unterhalb von pH 4 wurden schließlich 5000 μM GSH eingesetzt. Durch die Anpassung des Gehalts an GSH wurde im Vergleich zur Versuchsreihe mit 500 μM GSH insgesamt ein abgeschwächter Rückgang der enzymatischen Oxidationsaktivität mit fallendem pH-Wert erhalten. Durch die Erhöhung auf 5000 μM GSH waren bei pH 3,8 noch etwa 3 % der maximalen Enzymaktivität nachzuweisen. Bei pH 3,5 und darunter dagegen war das Enzymsystem inaktiv. Dieser Ausfall war nicht auf eine mangelnde Reaktivität des GSH zurückzuführen, wie die Bildung von GSSG und von höheren Homologen noch bei einem pH-Wert von 3,2 belegt (**Abb. 4.25**). Der Rückgang von GSH betrug hier bei einer Ausgangskonzentration von 5000 μM etwa 100 bis 200 $\mu\text{M}/\text{h}$, was der Reaktivität von 150 μM GSH bei pH 6,5 entspricht (s. Kapitel 4.3). Auch bei niedrigen pH-Werten um 3 ist GSH also immer noch in der Lage, den S_8 -Ring nukleophil anzugreifen und Sulfan-

schwefel enthaltende Verbindungen zu bilden. Enzymatische Oxidationsaktivitäten (**Abb. 4.24**) oder abiotische Umsetzungen zu Thiosulfat, Sulfid oder Sulfat (Daten nicht gezeigt) wurden bei derart niedrigen pH-Werten allerdings nicht mehr beobachtet.

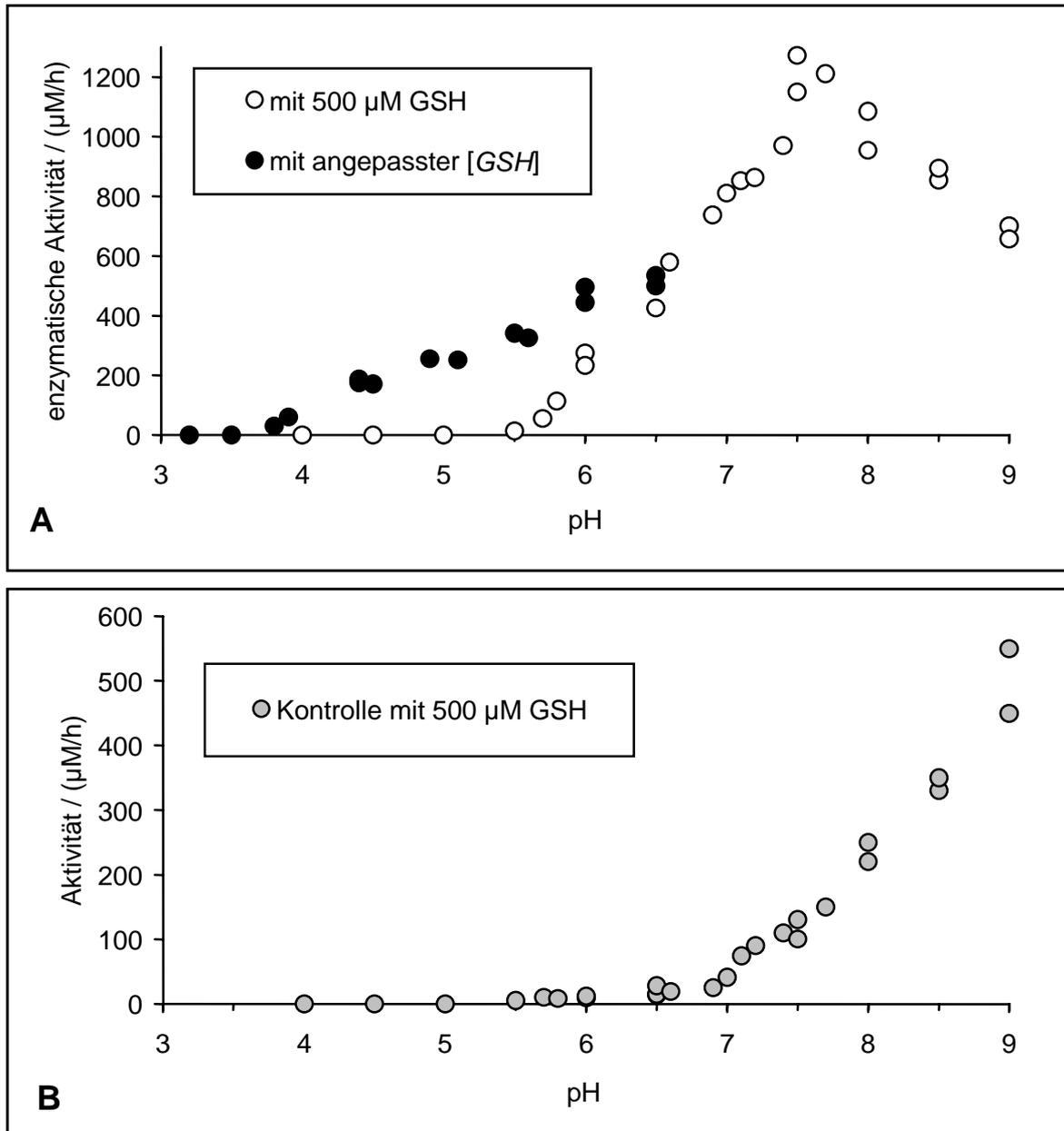


Abb. 4.24: pH-Abhängigkeit der Elementarschwefel oxidierenden Enzymaktivität im aeroben Aktivitätstest mit Extrakten lithotroph angezogener Zellen von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T. Ermittelt wurden die Bildungsrate von Thiosulfat, Glutathion-S-Sulfonat und Sulfat mit 4 mM Elementarschwefel und einer Proteinkonzentration von 0,02 g/L (bei pH ≤ 5,5 wurden 0,2 g/L BSA zugegeben). **A:** Enzymatische Aktivität bei einer Startkonzentration von 500 µM GSH sowie die Aktivität bei angepasster GSH-Konzentration (1000 µM GSH bei pH von 5 bis < 6,5; 2000 µM bei pH 4 bis < 5; 5000 µM bei pH < 4). **B:** Nicht-enzymatische Aktivität in Kontrollansätzen mit abgetöteten Extrakten und einer Startkonzentration von 500 µM GSH.

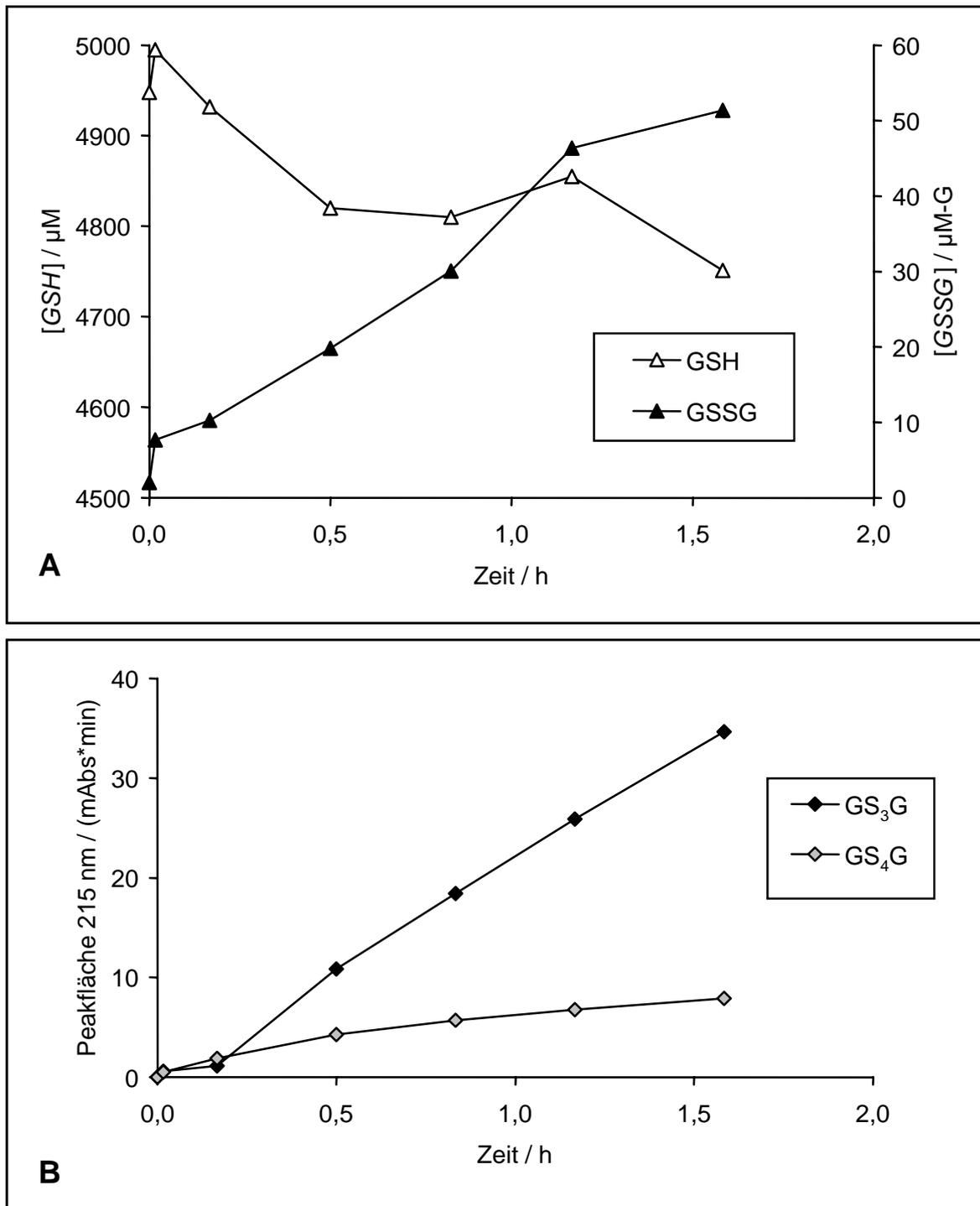


Abb. 4.25: Nicht-enzymatische Bildung von GSSG und von höheren Homologen unter den Bedingungen des aeroben Enzymtestes bei pH 3,2 (mit 5000 μM GSH, 4 mM Elementarschwefel, 0,2 g/L BSA). **A:** Verlauf von GSH und GSSG (die Konzentration von GSSG ist als $\mu\text{M-G}$ auf die Menge der enthaltenen GSH-Reste bezogen). **B:** Bildung von GS_3G und GS_4G .

5 Diskussion

Um den bislang nicht zweifelsfrei geklärten Mechanismus der enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei acido-mesophilen Laugungsbakterien im Detail verstehen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Schwefelchemie der so genannten GSH-abhängigen Schwefel-Dioxygenase untersucht. Diese stellt das einzige bisher bei Laugungsbakterien charakterisierte zum oxidativen Abbau von Elementarschwefel befähigte System dar (Suzuki 1994b). Für die Untersuchungen wurden zellfreie Ansätze von insgesamt 4 Schwefeloxidanten verwendet. Es handelte sich um einen Stamm von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und zwei Stämmen von *Acidithiobacillus thiooxidans*. Darüber hinaus wurde zum ersten Mal ein Stamm von *Acidiphilium acidophilum* untersucht. Im Gegensatz zu allen vorhergehenden Studien zu diesem Thema (Suzuki & Werkman 1959, Suzuki 1965a, 1965b, Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968a, Chahal 1986, Sugio et al. 1987, 1988a, 1989) war durch eine konsequente Analyse aller in den Testansätzen auftretenden organischen und anorganischen Schwefelverbindungen eine eindeutige Identifizierung des von der Oxygenase tatsächlich genutzten Substrates wie auch des aus der Oxidation hervorgehenden Produktes möglich. Des Weiteren wurden alternative Elektronenakzeptoren getestet und die bei den verschiedenen Stämmen gemessenen Werte der Oxidationsaktivität für Elementarschwefel miteinander verglichen.

5.1 Verwendung von grobdispertem Elementarschwefel

Für die Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel wurde ein Substrat verwendet, das aus einem grobdispersen System von Elementarschwefel und Wasser bestand. Aufgrund der Aggregatgröße handelte es sich nicht mehr um ein kolloidales System nach Weimarn (Steudel & Albertsen 1999). Andererseits waren noch keine rhombischen Einkristalle vorhanden, sodass man von amorphen oder mikrokristallinen Elementarschwefeltröpfchen sprechen könnte (Hageage et al. 1970, Pasteris et al. 2001).

Zunächst wurde in Vorversuchen die Oxidierbarkeit des grobdispertigen Schwefels durch intakte Zellen getestet. Alle untersuchten Schwefeloxidanten bauten dieses Substrat problemlos zu Sulfat ab. Exemplarisch wurde mit Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 bei 30 °C und pH 3 eine spezifische Oxidationsrate von etwa 50 µmol/h/(mg Zellprotein) bestimmt. Mit dem üblicherweise verwendeten Pulver aus kristallinem Schwefel (Schwefelblume) mit und ohne weitere Behandlung durch Mahlen, Ultraschall oder Zugabe von Tensiden wurden bisher mit verschiedenen *Acidithiobacillus*-Stämmen unter sonst vergleichbaren Bedingungen Oxidationsraten von maximal 10 bis 15 µmol/h/(mg Zellprotein) erzielt (Arkesteyn 1979, Suzuki et al. 1990, Lorbach et al. 1993). Erwartungsgemäß handelt es sich bei dem grobdispertigen Elementarschwefel also um ein sehr reaktives Substrat, das auf-

grund seiner hohen spezifischen Oberfläche und Abwesenheit größerer kristalliner Abschnitte leicht durch intakte Zellen abbaubar war. Eine abiotische Oxidation war dagegen nicht nachweisbar. Gleichzeitig belegen die durchgeführten Analysen, dass der grobdispergierte Schwefel aus reinem Elementarschwefel bestand, der nicht durch Sulfid, Sulfit, Thiosulfat oder Polythionate kontaminiert war. Noch höhere Aktivitäten könnten wahrscheinlich mit einem kolloidalen System erzielt werden. Hierzu würde in einer organischen Phase gelöster Elementarschwefel direkt in die Reaktionsansätze gegeben. Da aber entsprechende Lösungsmittel wie Methanol oder Aceton hemmend auf die Zellen wirken, können nur Konzentrationen von maximal 100 μM Elementarschwefel appliziert werden (Hazeu et al. 1988, Pronk et al. 1991, Fuseler & Cypionka 1995, Hallberg et al. 1996). Die mit dieser Menge erzielbaren Umsätze sind jedoch zu gering, um detaillierte Studien zur Schwefelchemie durchführen zu können. Dagegen kann mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten System eine Konzentration von Elementarschwefel bis etwa 5 mM eingestellt werden.

Ein großer Vorteil gegenüber dem Einsatz von Schwefelpulver ist die gute Standardisierbarkeit des Substrates. Während die Behandlung von kristallinem Elementarschwefel durch Ultraschall, Tenside u. ä. nicht zwangsläufig zu definierten Aggregaten führt, ergibt sich bei der Herstellung des grobdispergierten Schwefels stets ein einheitliches Bild, das auch leicht mikroskopisch überprüft werden kann. Schließlich ist es bei Verwendung dieses Substrates genauso wie bei kolloidalen Schwefelsystemen möglich, direkt dessen Abbau durch Messung der Konzentration zu verfolgen. Somit können bei entsprechender Erfassung auch der löslichen Oxidationsprodukte lückenlose Bilanzen der im Rahmen von Enzymtests umgesetzten Schwefelverbindungen aufgestellt werden.

5.2 Monoorganylpolysulfane als exklusive Substrate der Schwefel-Dioxygenase

Während ohne reduziertes Glutathion erwartungsgemäß kein enzymatischer, oxidativer Abbau von Elementarschwefel zu verzeichnen war, konnte eine GSH-abhängige, enzymatische Oxidation bei allen 4 acidophilen Laugungsbakterien nachgewiesen werden. Hierbei wurden eine Reihe von organischen und anorganischen Schwefelverbindungen detektiert, die auf ein komplexes Reaktionsgeschehen deuten. Von zentraler Bedeutung ist die nicht-enzymatische Reduktion des Elementarschwefels durch das Thiol (Huxtable 1986). Wie das Auftreten von höheren Bisorganylpolysulfanen des GSSG (GS_nG , $n > 2$) in den Versuchsansätzen belegt, läuft diese Reaktion über Monoorganylpolysulfane (RS_nH bzw. GS_nH , $n \geq 2$), im einfachsten Fall über das Persulfid des GSH (GSSH) ab (s. **Gl. 2.11**, **4.1** und **4.2**). Elementarschwefel wird also nicht nur zu Sulfid reduziert (s. **Gl. 2.14**), sondern auch als Sulfanschwefel in organische Verbindungen eingebaut. Als mögliche Substrate

des Enzymsystems kommen neben Sulfid also Verbindungen infrage, die wie der S_8 -Ring ebenfalls Schwefel mit der Oxidationszahl 0 enthalten, aber eine sehr viel höhere Reaktivität aufweisen.

Um zu klären, welches Substrat durch das Enzymsystem tatsächlich genutzt wird, wurden kinetische Untersuchungen zur Bildung von Sulfid und GSSG sowie dessen höheren Homologen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen dieser Verbindungen in Kontrollansätzen mit inaktiven Zellextrakten am höchsten waren. Mit zunehmender enzymatischer Oxidationsaktivität jedoch verringerte sich die Geschwindigkeit, mit der Elementarschwefel reduziert wurde. Für eine gegebene Konzentration von GSH konnte sogar unabhängig vom verwendeten Bakterienstamm eine bestimmte maximale Enzymaktivität erzielt werden, bei der die Reduktion von Elementarschwefel und die damit verbundene Oxidation von GSH vollständig zum Erliegen kam. Sulfid wurde in keinem Fall enzymatisch oxidiert, sondern entwich mit einer Kinetik erster Ordnung in Form von gasförmigem Hydrogensulfid aus den Testansätzen. Die Konzentration von gelöstem Sulfid wies dabei einen charakteristischen Verlauf auf, der in guter Näherung durch die Geschwindigkeitsgesetze, wie sie hier für die Bildung durch Reduktion von Elementarschwefel und für den Übertritt in die Gasphase formuliert wurden (s. **Gl. 4.9** und **4.11**), beschrieben werden konnte.

Die gefundene Abhängigkeit zwischen enzymatischer Oxidation und nicht-enzymatischer Reduktion von Elementarschwefel beweist, dass Monoorganylpolysulfane das Substrat für das Enzymsystem darstellen. Beide Reaktionen konkurrieren um diese sehr reaktiven Verbindungen, die unmittelbar bei der nukleophilen Aufspaltung des S_8 -Rings durch GSH gebildet werden. Unter den Versuchsbedingungen sind dabei vermutlich nicht die im Mechanismus von Suzuki (1965b, 1974) vorgeschlagenen höheren Homologen des GSH (GS_nH) mit $n > 2$ das Hauptsubstrat für das Elementarschwefel oxidierende Enzym, da diese im polaren Milieu bei saurem bis neutralem pH-Wert extrem instabil sind (Klamann 1985). Allein das Persulfid ($n = 2$) ist wahrscheinlich stabil genug, um unter den Versuchsbedingungen durch das Enzymsystem gebunden zu werden oder ein Sulfanschwefelatom an dieses zu übertragen. Freie Persulfide niedermolekularer Thiole wurden bereits in einer Reihe von biologischen Systemen bei neutralen bis schwach alkalischen pH-Werten nachgewiesen (Hylin & Wood 1959, Bartsch et al. 1996, Lang & Kessler 1999, Clausen et al. 2000).

Dagegen können andere Sulfanschwefel enthaltende Verbindungen durch die Schwefel-Dioxygenase nicht genutzt werden, wie die negativen Ergebnisse mit den alternativen Substraten Thiosulfat, Tetrathionat und p-Toluolthiosulfonat belegen. Selbst höhere Homologe des GSSG können ohne GSH nicht abgebaut werden. Allein Persulfide, als die in dieser Reihe reaktivsten Sulfanverbindungen (Wood 1987, Iciek & Włodek 2001), werden oxidiert. Auch ein von Suzuki (1965a)

getestetes Polysulfangemisch, das durch Inkubation von Elementarschwefel mit GSH hergestellt worden war, enthielt vermutlich neben Bisorganylpolysulfanen noch ausreichende Mengen an GSH, sodass sich das für die enzymatische Oxidation benötigte Persulfid bilden konnte (s. **Gl. 4.3** und **4.28**). Die hohe Substratspezifität ist ein gemeinsames Merkmal der Enzymsysteme aller 4 untersuchten Stämme der Gattungen *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium*.

Selbst Sulfid wurde von den zur Oxidation von Elementarschwefel befähigten Zellextrakten nicht oxidiert, wie bereits von Suzuki (1965a) und Chahal (1986) für *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 gezeigt wurde. Allein das von Sugio et al. (1987) beschriebene GSH-abhängige System von *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP19-3 soll neben Elementarschwefel auch Sulfid als Substrat nutzen können (Sugio et al. 1989), sodass von den Autoren der Begriff Sulfid:Eisen(III)-Oxidoreduktase geprägt und Sulfid als eigentliches Substrat definiert wurde. Eine Oxidation von Sulfid wurde allerdings nur in Gegenwart von 8 mM GSH beobachtet. Warum GSH für diese Reaktion nötig war, wurde nicht geklärt. Die eigenen Versuche mit Sulfid als Substrat ergaben, dass auch mit GSH keine Oxidationsaktivität messbar war. Allerdings wurden in Anwesenheit von GSSG geringe Aktivitäten nachgewiesen, die auf die Bildung des Persulfids durch Reaktion des Sulfids mit GSSG gemäß **Gl. 4.31** zurückgeführt werden können (Rao & Gorin 1959, Steudel & Albertsen 1992, Zal et al. 1998). Sehr wahrscheinlich enthielt der Testansatz von Sugio et al. (1989) bei einem pH-Wert von 6,5 neben den relativ hohen Konzentrationen an GSH durch Autoxidation entstandenes GSSG, sodass sich auch hier das Persulfid entsprechend **Gl. 4.31** bilden konnte. Die Autoren geben an, dass bereits der pH-Wert der verwendeten GSH-Stammlösung auf 6,5 eingestellt wurde, was ebenfalls die Autoxidation zum GSSG fördert. Grundsätzlich beschleunigt eine Erhöhung des pH-Wertes die Oxidation von Thiolen (Oae & Doi 1991). In *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP19-3 wurde außerdem ein membrangebundenes Protein nachgewiesen, das Sulfid zu binden vermag (Sugio et al. 1991). Derart gebundenes Sulfid wurde durch das aus demselben Stamm isolierte, Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem als Substrat genutzt, allerdings wiederum nur in Gegenwart von GSH (Sugio et al. 1991, Suzuki et al. 1993). Auch hier wurde wahrscheinlich durch vorhandenes GSSG das Persulfid bereitgestellt.

Die im Zusammenhang mit diesen Studien auftretenden Unklarheiten zeigen deutlich, wie wichtig eine möglichst lückenlose Analyse der Schwefelchemie für die Bewertung der Ergebnisse ist. In dem komplexen System, wie es sich durch Inkubation von Elementarschwefel und Sulfid mit GSH bzw. GSSG ergibt, kann nur durch eine Identifizierung und Bilanzierung aller relevanten Schwefelspezies, wie sie erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte, zwischen angebotenem und tatsächlich enzymatisch oxidiertem Substrat unterschieden werden. Zusammenfassend ist also mit Berechtigung davon auszugehen, dass alle bisher bei acidomesophilen Laugungsbakterien charakterisierten Enzymsysteme, die zur Oxidation

von Elementarschwefel befähigt sind, exklusiv Monoorganylpolysulfane, namentlich Persulfide, als Substrate nutzen. Eine Aktivierung von Elementarschwefel ist zwar nötig, oxidiert wird aber trotzdem eine Schwefelverbindung mit der Oxidationsstufe 0.

Die Rolle von GSH, also die Aufspaltung des S_8 -Ringsystems und die Bereitstellung von reaktivem Sulfanschwefel in Form eines Persulfids, wird dabei *in vivo* offensichtlich nicht von freien, niedermolekularen Thiolen oder Proteinen übernommen. Schließlich wurde sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in allen vergleichbaren Fällen in Rohextrakten, die neben dem Elementarschwefel oxidierenden System im Wesentlichen alle übrigen löslichen Zellbestandteile enthielten, keine von externen Thiolen unabhängige Oxidationsaktivität beobachtet (Suzuki 1965a, Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968a, Chahal 1986, Sugio et al. 1987, 1989). Die fraglichen Thiolgruppen liegen also wahrscheinlich membrangebunden vor, worauf auch die Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel mit Membranfragmenten aus Stämmen von *Acidithiobacillus thiooxidans* durch Adair (1966) und Kodama & Mori (1968) hindeuten. Allerdings wurden in diesen Studien keine Angaben zu vorhandenen Thiolgruppen gemacht. Ein konkreter Hinweis für das Vorkommen derartiger Gruppen ist das intermediäre Auftreten von membrangebundenem Sulfanschwefel bei der Oxidation von Hydrogensulfid zu Sulfat in Aufschlüssen von *Acidithiobacillus thiooxidans* NCIMB 9514, ATCC 8085 und *Thiobacillus thioparus* NCIMB 8349 (Moriarty & Nicholas 1969, 1970). Dass eine Aktivierung von Elementarschwefel zu Polysulfanen auch in intakten Zellen stattfinden könnte, wurde aufgrund von Beobachtungen durch Bacon & Ingledew (1989) gefolgert. In diesen Experimenten wurden mit Elementarschwefel bzw. elementarem Selen inkubierten Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T durch Strippen mit Stickstoff oder Luft geringe Mengen von Hydrogensulfid bzw. -selenid entzogen. Diese Verbindungen könnten durch Reaktionen von überschüssigen Thiolgruppen mit dem aktivierten Schwefel bzw. Selen entstanden sein. Auch in zellfreien Systemen von mesophilen Laugungsbakterien wurde bereits eine auf die Reduktion von Elementarschwefel zurückgeführte Bildung von Sulfid beobachtet. So wurde in Extrakten von *Acidithiobacillus thiooxidans* ON 106 mit kolloidalem Elementarschwefel, der neben dem elementaren Schwefel allerdings sehr wahrscheinlich noch höhere Polythionate enthielt (Steudel et al. 1988), neben der Oxidation zum Thiosulfat auch eine Reduktion zum Sulfid nachgewiesen (Tano & Imai 1968).

Ein möglicher Kandidat für die durch Thiolgruppen vermittelte Aktivierung von Elementarschwefel könnte das so genannte Sulfidbindende Protein sein, das in *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP 19-3 entdeckt wurde (Sugio et al. 1991). Denkbar wäre, dass dieses Protein in einem oxidierten Zustand Disulfidbrücken enthält, die mit Sulfid unter gleichzeitiger Bildung von jeweils einer Thiol- und Persulfidgruppe reagieren könnten. In einer reduzierten Form mit freien Thiolgruppen wäre dann auch eine Aktivierung von elementarem Schwefel möglich, was allerdings nicht untersucht

wurde. Interessanterweise wurde bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T ein auf der Zelloberfläche befindliches Protein nachgewiesen, das mithilfe von Thiolen an Elementarschwefel zu binden vermag (Ohmura et al. 1996). Vorstellbar ist eine regelrechte Kette von Proteinen, die in Form von Persulfiden aktivierten Elementarschwefel durch die äußere und möglicherweise auch durch die cytoplasmatische Membran zur Oxygenase transportiert (s. auch **Abb. 5.1**). So sind weitere Proteine der Zelloberfläche und äußeren Membran bei Stämmen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* gefunden worden, die nur oder zumindest verstärkt in mit Elementarschwefel angezogenen Zellen synthetisiert werden (Buonfiglio et al. 1993, 1999, Ohmura et al. 1996) und eventuell an dieser Transportkette beteiligt sein können. Zur Funktion dieser Proteine sind allerdings noch keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt worden (Buonfiglio et al. 1999), sodass ein derartiger Mechanismus zurzeit rein spekulativ ist.

In diesem Zusammenhang sind auch die früher unter der Bezeichnung Rhodanese geführten Sulfanschwefel transferierenden Enzyme zu erwähnen. Diese Enzymgruppe ist zwar ubiquitär in pro- und eukaryotischen Systemen vertreten (Westley 1973, 1981, Bordo & Bork 2002), wird aber immer wieder in Beziehung zu speziellen, oxidativen Abbauegen für Schwefelverbindungen gebracht (Tabita et al. 1969, Suzuki 1974, Kelly 1988, Brüser et al. 2000, Ramírez et al. 2002). Die Sulfanschwefel-Transferasen besitzen im aktiven Zentrum eine besonders reaktive Thiolgruppe, die selbst den Sulfanschwefel des Thiosulfats mobilisieren kann. Letzteres wird hierdurch in Sulfit und in als Persulfid gebundenen Elementarschwefel gespalten. Im üblichen Aktivitätstest wird der Sulfanschwefel auf Cyanid übertragen, wodurch Thiocyanat (Rhodanid) entsteht, was mit Eisen(III)-Ionen einen roten Komplex bildet (Westley 1981). Den Sulfanschwefel-Transferasen werden Funktionen im generellen Stoffwechsel für Sulfanschwefel zugeschrieben, z. B. als Schwefeldonor für die Synthese und Reparatur von Eisen-Schwefel-Komplexen (Pagani et al. 1982, Tse Sum Bui et al. 2000). Möglicherweise spielen sie außerdem eine Rolle beim Transfer von Selen (Ogasawara et al. 2001). Auch eine Bildung von Persulfiden mit Elementarschwefel durch die Transferasen wäre denkbar, spielt aber offensichtlich bei der enzymatischen Oxidation desselben keine Rolle, da in Rohextrakten keine Aktivität ohne Zugabe von externen Thiolen beobachtet wurde. Genomuntersuchungen lassen darauf schließen, das *Acidithiobacillus ferrooxidans* mindestens 3 verschiedene für Sulfanschwefel-Transferasen codierende Gene besitzt (Ramírez et al. 2002). Ein periplasmatisches Protein mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten Transferasen wird hier sogar durch Schwefelverbindungen induziert und dient möglicherweise der Synthese von spezifischen Redoxzentren, die für ihre Oxidation benötigt werden.

5.3 Sulfit als exklusives Produkt der Schwefel-Dioxygenase

Ein charakteristisches Merkmal der bisher bei Laugungsbakterien gefundenen Elementarschwefel oxidierenden Systeme ist die unvollständige Oxidation des Schwefels zur Oxidationsstufe +4, also zum Sulfit. Auch für die Oxidation von Sulfid oder Elementarschwefel durch die reverse Sulfit-Reduktase neutrophiler Schwefeloxidanten wird Sulfit als Produkt vorgeschlagen (Schedel & Trüper 1979, Schedel et al. 1979). Allein beim Sox-Multienzymkomplex wird von einer Oxidation bis zum Sulfat ausgegangen (Friedrich et al. 2001). Aber auch hier wurde z. B. mit den gereinigten Komponenten aus *Paracoccus pantotrophus* LMD 82.5^T nur eine Reduktion von 4 mol Cytochrom c pro Mol appliziertem Elementarschwefel beobachtet. Das ist ein starker Hinweis darauf, dass ebenfalls nur eine Oxidation bis zum Sulfit erfolgt (Rother et al. 2001). Da eine Analyse der entstehenden Schwefelverbindungen unterlassen wurde, können hier keine sicheren Aussagen über die tatsächlichen Oxidationsprodukte getroffen werden.

Freigesetztes Sulfit kann abiotisch mit überschüssigem Elementarschwefel Thiosulfat bilden (s **Gl. 2.10** mit $n = 2$ und **Gl. 4.16**). Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, nimmt mit steigendem pH-Wert zu und überwiegt i. d. R. gegenüber der Rückreaktion ab pH-Werten ≥ 7 (Holleman et al. 1985). Außerdem wird die Rate des Schwefelkettenabbaus naturgemäß durch die Aggregatgröße des Elementarschwefels beeinflusst. Entsprechend erwies sich der grobdispergierte Elementarschwefel, wie er in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, als äußerst reaktiv. So ist es nicht verwunderlich, dass in den eigenen Untersuchungen auch bei pH 6,5 und selbst bei noch viel niedrigeren pH-Werten bis etwa 3,5 Thiosulfat als dominierendes Oxidationsprodukt gefunden wurde. Obwohl sofort bei der Probenahme ein entsprechender Fixierungsschritt durchgeführt wurde, konnte freies Sulfit nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Suzuki & Silver (1966) und Silver & Lundgren (1968a), wo eine feine Verteilung des Elementarschwefels durch Tensid- und Ultraschallbehandlung erreicht wurde. In diesen Arbeiten konnte das bei der Oxidation freigesetzte Sulfit nur durch direkt in die Reaktionsansätze gegebenes Formaldehyd abgefangen werden. Analog wurde in den eigenen Versuchen die Bildung des Glutathion-S-Sulfonats (GSSO_3^-) durch Reaktion von Sulfit mit GSSG gemäß **Gl. 3.1** nachgewiesen, das ebenfalls zugegeben wurde oder durch Oxidation von GSH entstanden war. Dass Sulfit tatsächlich das Produkt der GSH-abhängigen Oxidation von Elementarschwefel ist, zeigen auch die Studien von Sugio et al. (1987, 1989), wo unbehandelter, kristalliner Elementarschwefel eingesetzt worden war. Aufgrund der geringeren Reaktivität dieses elementaren Schwefels gegenüber Sulfit konnte hier Sulfit als Hauptprodukt direkt in den Reaktionsansätzen nachgewiesen werden.

Eine Oxidation von elementarem Schwefel zum Sulfit wurde auch bei den GSH-unabhängigen Enzymen der extrem thermophilen *Sulfolobales* gefunden. Während

das aus *Acidianus brierleyi* Stamm 3 isolierte System nur Sulfit bildet (Emmel et al. 1986, Emmel 1987), konnte bei *Acidianus ambivalens* DSM 3772 (Kletzin 1989, 1992) und *Acidianus spec. S5* (He et al. 2000) eine so genannte Oxygenase-Reduktase nachgewiesen werden, bei der eine Disproportionierung von Elementarschwefel und die Oxidation kombiniert ablaufen und dabei gleichzeitig Sulfid und Sulfit entstehen.

5.4 Reaktivität der Schwefel-Dioxygenase gegenüber alternativen Elektronenakzeptoren

Im Gegensatz zu anderen Enzymen, die anorganische Schwefelverbindungen oxidieren, sind die GSH-abhängigen, Elementarschwefel oxidierenden Systeme wie auch die entsprechenden Enzyme der *Sulfolobales* bereits in Gegenwart von Sauerstoff als einzigem Elektronenakzeptor aktiv. Sulfit- und Thiosulfat-Dehydrogenasen sowie der Sox-Multienzymkomplex benötigen stets externe Eisen(III)-Verbindungen wie den entsprechenden Hexacyanokomplex oder oxidierte Cytochrome als Elektronenakzeptoren (Suzuki 1994a, Nakamura et al. 2001, Kappler & Dahl 2001, Rother et al. 2001), sodass hier für die *in vivo* stattfindenden Prozesse die Beteiligung von Komponenten der Atmungskette angenommen wird. Auch die enzymatische Oxidation von Sulfid gelingt nicht mit molekularem Sauerstoff, sondern verläuft über die Reduktion von Quinonen oder Cytochromen (Schütz et al. 1998, Yamanaka 1994).

Eine Sonderstellung des Elementarschwefel oxidierenden Systems erscheint in diesem Zusammenhang überraschend. Trotzdem konnten bisher mit Cytochromen oder künstlichen Elektronenmediatoren und aus Laugungsbakterien isolierten Enzymen keine Aktivitäten beobachtet werden (Suzuki 1965a, Suzuki & Silver 1966, Suzuki 1994b). Die einzige Ausnahme stellen die Studien von Sugio et al. (1987, 1988a) dar, in denen unter anaeroben Bedingungen Eisen(III)- und sogar Molybdän(VI)-Ionen geringe Oxidationsraten für Elementarschwefel bewirkten. Ein grundsätzliches Problem derartiger Untersuchungen ist neben der Notwendigkeit, strikt anaerob arbeiten zu müssen, das unvermeidliche Auftreten nicht-enzymatischer Redoxreaktionen. So werden die im Testansatz entstehenden organischen Sulfanverbindungen und das Sulfid sowie auch das GSH rasch durch viele alternative Elektronenakzeptoren oxidiert, während Sauerstoff alleine vergleichsweise reaktionsträge ist (Elstner 1990). Bekannt ist die Oxidation von GSH durch Eisen(III)-Verbindungen, namentlich Cytochrome (Froede & Hunter 1970, Massey et al. 1971, Everse & Kujundzic 1979, Oae & Doi 1991). Diese Reaktion wird durch eine Reihe von Sulfanverbindungen, wahrscheinlich über radikalische Stufen, katalysiert (Prütz 1993). Versuche mit entsprechenden Verbindungen im System Elementarschwefel plus GSH erscheinen deshalb aussichtslos. Auch in den eigenen Tests mit verschiedenen Eisen(III)-Komplexen wurde i. d. R. nur eine rasche Oxidation des GSH

erzielt, ohne dass eine Oxidationsaktivität für Elementarschwefel festgestellt werden konnte. Aber auch mit den übrigen untersuchten Elektronenakzeptoren (NAD, FAD, Quinone, Nitrat) wurde keine enzymatische Aktivität gefunden.

Diese Studien können bei weitem nicht als vollständig bezeichnet werden, zumal insbesondere artspezifische Redoxkomponenten nicht überprüft wurden. So ist davon auszugehen, dass ein möglicher physiologischer Elektronenakzeptor über spezifische Bindungsstellen mit dem Elementarschwefel oxidierenden Enzym in Wechselwirkung tritt. Diese Aufgabe kann sicherlich von keiner bisher getesteten Verbindung erfüllt werden. *Acidithiobacillus ferrooxidans* besitzt z. B. etwa 11 Cytochrome des c-Typs. Zumindest eines wird allein von mit Elementarschwefel gewachsenen Zellen synthetisiert (Yarzabal et al. 2002), sodass eine mögliche Beteiligung dieses Cytochroms an der Oxidation von elementarem Schwefel vermutet werden kann. Aber auch mit diesen artspezifischen Cytochromen ist die spontane Oxidation von GSH nicht zu vermeiden. Denkbar wäre, dass *in vivo* die Elementarschwefel aktivierenden Thiolgruppen und die entstehenden Persulfide sehr viel besser gegen eine nicht-enzymatische Oxidation durch Cytochrome oder andere Redoxpartner geschützt sind, als es für das im Enzymtest verwendete GSH zutrifft. Immerhin wird z. B. SoxY, das im Sox-Multienzymkomplex für die Bindung von Schwefelspezies zuständige Thiolprotein, offenbar nicht durch Cytochrome oxidiert (Rother et al. 2001). Abschließend ist diese Frage wohl erst zu klären, wenn die in Laugungsbakterien für die Bindung von Sulfanschwefel verantwortlichen Thiolkomponenten identifiziert worden sind.

Im aeroben Enzymtest funktioniert das GSH-abhängige, Elementarschwefel oxidierende System sehr wahrscheinlich als Dioxygenase (s. **Gl. 2.12** und **4.30**). Eine Reduktion von Sauerstoff zu Wasser erscheint aufgrund der Komplexität dieser Reaktion (Elstner 1990) und des einfachen Aufbaus der bisher isolierten Enzyme (Chahal 1986, Sugio et al. 1987) unwahrscheinlich. Andererseits gibt es auch keine Hinweise dafür, dass reaktive Sauerstoffspezies, wie sie durch eine unvollständige Reaktion durch Ein- oder Zweielektronenschritte entstehen müssten, stöchiometrisch zur Oxidation von Elementarschwefel auftreten. Tatsächlich konnte dagegen in zellfreien Systemen ein Einbau von $^{18}\text{O}_2$ nachgewiesen werden. So wurde eine Anreicherung des schweren Sauerstoffisotops im Oxidationsprodukt Thiosulfat beobachtet (Suzuki 1965b), wenn auch nur zu einem geringen Prozentsatz. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Oxygenase-Tests mit dem aus *Acidianus brierleyi* Stamm 3 isolierten, Elementarschwefel oxidierenden Enzym erhalten (Emmel et al. 1986, Emmel 1987).

Der geringe Einbau von $^{18}\text{O}_2$ ist möglicherweise durch Austauschreaktionen zu erklären, die zwischen Sauerstoffatomen von intermediär auftretenden Verbindungen wie dem Polysulfansulfinat (RS_nSO_2^-) und Wassermolekülen stattfinden (Suzuki 1965b). Das in entsprechenden Kontrollversuchen mit intakten Zellen von *Acidithio-*

bacillus thiooxidans ATCC 8085 gebildete Sulfat enthielt allerdings kein ^{18}O . Möglicherweise fungiert also nur das isolierte Enzym als Dioxygenase. Beispiele für organische Schwefelverbindungen oxidierende Oxygenasen sind die Cystein- und Cysteamin-Dioxygenasen (Huxtable 1986), die im Aminosäuremetabolismus die Bildung von Sulfinatgruppen bewirken. Der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme (Dupré et al. 1975) scheint sich aber von dem der Elementarschwefel-Dioxygenase grundlegend zu unterscheiden. So wird das Persulfid des Cysteamins nicht zum S-Sulfinat (R-S-SO_2^-), sondern zum Thiosulfonat (Thiotaurin, $\text{R-SO}_2\text{-S}^-$) oxidiert (Cavallini et al. 1961).

Die Existenz von zu Oxygenasen alternativen Oxidationswegen bei Laugungsbakterien ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T (Pronk et al. 1992, Pronk & Johnson 1992, Das et al. 1992) und JCM 7811 (Ohmura et al. 2002) anaerob mit Elementarschwefel und Eisen(III)-Ionen als Elektronendonator bzw. -akzeptor zu wachsen vermögen. Gleiches gilt möglicherweise für Stämme von *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock & Gustafson 1976). Hier und bei der aeroben Oxidation von Elementarschwefel werden zumindest streckenweise identische Elektronentransportwege genutzt, wie aus Hemmversuchen mit intakten Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T geschlossen werden kann (Corbett & Ingledew 1987). Denn die Oxidation von Elementarschwefel wurde hier durch Entkoppler und Quinonanalogue sowohl aerob als auch anaerob im gleichen Umfang inhibiert. Zur Überprüfung der Hypothese einer an die Atmungskette gekoppelten Oxidation von Elementarschwefel könnten auch Untersuchungen zu Zellerträgen herangezogen werden (Kelly 1999). Entsprechende Experimente mit Chemostatkulturen acidophiler Laugungsbakterien wurden jedoch bisher nicht unternommen, und auch mit neutrophilen Schwefeloxidanten wurden mit Elementarschwefel und Sulfit als separaten Substraten nur ungenaue Ergebnisse erzielt (Kelly & Syrett 1966, Wood & Kelly 1986), sodass keine Aussagen über den Oxidationsmechanismus getroffen werden können.

5.5 Weitere Eigenschaften der Schwefel-Dioxygenase

Vergleich der spezifischen Oxidationsraten

Für die GSH-abhängige Oxidation von Elementarschwefel wurden spezifische Aktivitäten für zellfreie Systeme der 4 untersuchten Schwefeloxidanten bestimmt. Dabei wurden für Elementarschwefel spezifische Oxidationsraten von 1 bis fast 30 $\mu\text{mol/h}/(\text{mg Protein})$ erhalten. Überraschenderweise zeigten die beiden Stämme von *Acidithiobacillus thiooxidans*, DSM 504 und K6, die geringsten Aktivitäten, obwohl sich gerade Vertreter dieser Art und auch speziell diese Stämme im Vergleich zu *Acidithiobacillus ferrooxidans* durch ausgesprochen hohe Oxidationsleistungen auszeichnen (Göksel 2000). Ebenfalls kaum zu erwarten war, dass Zellextrakte von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T die mit Abstand höchsten Aktivi-

täten aufweisen würden, da es sich hier nicht um einen obligaten Schwefeloxidanten handelt. Die stammspezifischen Unterschiede der hier betrachteten zellfreien Systeme bezüglich der Abbauraten für Elementarschwefel korrelieren also nicht mit den für ganze Zellen gemessenen Oxidationsleistungen. Wahrscheinlich sind die relevanten Enzyme der einzelnen Stämme unterschiedlich stabil gegenüber der verwendeten Aufschlussmethode. Auch könnten die Systeme bei den beiden Stämmen von *Acidithiobacillus thiooxidans* membranassoziiert sein oder zumindest stärker an die Cytoplasmamembran gebunden sein, als dies bei den anderen Schwefeloxidanten der Fall ist. Da aufgrund des hohen methodischen Aufwandes, Zellaufschlüsse und deren Fraktionierung unter anaeroben Bedingungen durchzuführen, nur eine Fraktion mit überwiegend löslichen Zellbestandteilen getestet wurde, wurde möglicherweise auch nur ein Teil der Aktivität erfasst.

Aber auch die niedrigsten hier erzielten Oxidationsraten liegen mit 1 bis 2 $\mu\text{mol/h/mg}$ etwa gleichauf mit den höchsten bisher veröffentlichten Werten vergleichbarer Ansätze (Suzuki 1994b). Als geradezu spektakulär sind diejenigen Aktivitäten zu bezeichnen, die bei dem in diesem Zusammenhang erstmals untersuchten Stamm *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T gemessen wurden. So wurde hier bereits in Rohextrakten mit Höchstwerten von 20 bis 30 $\mu\text{mol/h/mg}$ fast ein Drittel der Oxidationsrate erhalten, wie sie bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP 19-3 für das gereinigte Enzym angegeben wird (Sugio et al. 1987). Ein Hauptgrund für diese Diskrepanz ist sicherlich die bereits erwähnte höhere Reaktivität des in den eigenen Studien verwendeten Substrates. So liegen die für GSH bestimmten K_m -Werte mit 110 bis 250 μM mehr als eine Zehnerpotenz unterhalb der in allen vorhergehenden Arbeiten gemessenen 2 bis 6 mM (Suzuki 1994b). Da nicht das Glutathion selbst, sondern dessen Persulfid das eigentliche Substrat des Enzyms darstellt, ist auch die vermeintlich für Glutathion ermittelte Affinität von der Bildung des Persulfids und damit von der Reaktivität des eingesetzten Elementarschwefels abhängig. Außerdem gibt es, wie schon erwähnt, offensichtlich große stammspezifische Unterschiede bezüglich der Stabilität des Enzymsystems und dessen Auffindung in der löslichen Zellfraktion.

Da *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T nur obligat mit Eisen(II)-Ionen wächst und keine Schwefelverbindungen zu oxidieren vermag (Hippe 2000), wurde erwartungsgemäß in Kontrollversuchen mit Rohextrakten dieses Stammes auch keine Aktivität detektiert. Dieses Ergebnis widerspricht den Arbeiten von Sugio et al. (1992) und (1994), wo für *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T und für eine Reihe weiterer *Leptospirillum*-Stämme das GSH-abhängige Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem nachgewiesen wurde. Wahrscheinlich basieren die positiven Untersuchungsergebnisse auf mit acidophilen Schwefeloxidanten kontaminierten Kulturen und sind deshalb anzuzweifeln. Grundsätzlich ist bei gleichzeitigem Arbeiten mit verschiedenen Eisenoxidanten sorgfältigst auf Kulturreinheit zu achten. Insbesondere können *Leptospirillum*-Kulturen leicht durch Kontaminanten wie *Acidithiobacillus ferrooxidans*

überwachsen werden, da letztere eine deutlich kürzere Generationszeit auf Eisen(II)-Medium aufweisen (Zenneck 1988, Rohwerder 1995).

Zellfreie Ansätze des obligat heterotrophen *Acidiphilium cryptum* DSM 2389^T zeigten geringe Oxidationsaktivitäten für Elementarschwefel. Die Fähigkeit zur Oxidation von Schwefelverbindungen ist für die Arten der Gattung *Acidiphilium* noch nicht vollständig geklärt worden (Hiraishi et al. 1998). So ist bis auf die Art *Acidiphilium acidophilum* kein weiterer Vertreter dieser Gattung bekannt, der autotroph mit Elementarschwefel oder anderen Schwefelverbindungen zu wachsen vermag. Es existieren aber Hinweise darauf, dass einige heterotrophe Stämme wie *Acidiphilium cryptum* DSM 2389^T und *Acidiphilium rubrum* ATCC 35905^T in Gegenwart eines organischen Substrates auch Elementarschwefel oxidieren können (Harrison 1983, 1984, Hallberg et al. 2001). Möglicherweise sind also bei *Acidiphilium cryptum* und anderen heterotrophen *Acidiphilium*-Arten Rudimente eines Elementarschwefel oxidierenden Systems vorhanden, das die in den eigenen Versuchen beobachteten Aktivitäten bewirkt.

Die Art des Substrats, mit dem die für die Aufschlüsse verwendeten Zellen angezogen worden waren, hatte nur einen geringen Einfluss auf die spezifischen Aktivitäten für das Elementarschwefel oxidierende Enzymsystem. So wurden bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* R1 identische Aktivitäten erhalten, unabhängig davon, ob die Zellen mit Elementarschwefel oder Eisen(II)-Ionen gewachsen waren. Ebenso wurden in Extrakten aus heterotrophen Zellen von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T hohe Oxidationsraten erhalten, die etwa ein Drittel der mit Elementarschwefel angezogenen Zellen erzielten Aktivitäten ausmachten. Zumindest bei diesen beiden Stämmen scheint das Elementarschwefel oxidierende System also konstitutiv vorzuliegen bzw. nur in geringem Umfang reguliert zu sein. Der Einfluss des Wachstums-substrates auf die Oxidationsleistung bei Laugungsbakterien wird kontrovers diskutiert (Suzuki et al. 1990). In den meisten Fällen können mit Eisen(II)-Ionen angezogene Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* noch Elementarschwefel oxidieren, wenn auch oft mit etwas geringerer Aktivität als die mit Schwefelverbindungen gewachsenen (Margalith et al. 1966, Sugio et al. 1986, Corbett & Ingledew 1987, Suzuki et al. 1990). Tatsächlich gibt es zahlreiche Arbeiten, die bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* eine Induktion bestimmter Proteine durch Elementarschwefel einerseits und Eisen(II)-Ionen andererseits dokumentieren. Hierbei handelt es sich aber überwiegend um Oberflächenproteine (Mjoli & Kulpa 1988, Buonfiglio et al. 1993, 1999, Ohmura et al. 1996, Coto et al. 1999, Guiliani & Jerez 1999, 2000), die zumindest nicht unmittelbar an der Oxidation von Eisen(II)- bzw. Schwefelverbindungen beteiligt sind. Dagegen weisen die meisten der bisher identifizierten Komponenten der Atmungskette, die bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* für die Eisenoxidation zuständig sind, ähnliche Gehalte in Zellen auf, die mit Eisen(II)-Ionen oder Schwefelkomponenten angezogen wurden (Espejo et al. 1988, Sugio et al. 1988b, Mansch & Sand 1992, Bengrine et al. 1998, Appia-Ayme et al. 1999, Rawlings 1999). Gleiches

gilt aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse offensichtlich auch für das Elementarschwefel oxidierende System.

Für *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T ist bekannt, dass die Enzyme für die Oxidation von Thiosulfat und Tetrathionat auch in heterotroph angezogenen Zellen nachzuweisen sind (Guay & Silver 1975, Pronk et al. 1990a). Außerdem wird die Sulfit-Dehydrogenase von autotroph und mixotroph gewachsenen Zellen im gleichen Umfang synthetisiert (de Jong et al. 2000). Erwartungsgemäß konnten also auch in den eigenen Untersuchungen Aktivitäten des Elementarschwefel oxidierenden Enzyms in zellfreien Ansätzen beobachtet werden, die mit heterotrophen Zellen von *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T hergestellt worden waren.

Im natürlichen Lebensraum von *Acidithiobacillus ferrooxidans* kommen durch die Oxidation von Pyrit und anderen Metallsulfiden stets Eisen(II)-Ionen und reduzierte Schwefelverbindungen zusammen vor, sodass die simultane Expression der dissimilatorischen Systeme zum Abbau beider Substrate von Vorteil ist. Entsprechendes gilt für *Acidiphilium acidophilum*. Diese Art lebt zusammen mit obligat chemolithotrophen Bakterien wie Vertretern der Gattung *Acidithiobacillus* in Laugungsbiotopen. Als Substrate dienen sowohl die bei der Laugung frei werdenden Schwefelverbindungen als auch von den obligat autotrophen Bakterien ausgeschiedene, organische Substanzen (Harrison 1984, Johnson 1998). Auch hier ist es also sinnvoll, gleichzeitig Oxidasen für Schwefelverbindungen und heterotrophe Abbauewege bereitzuhalten.

pH-Abhängigkeit

Völlig unklar ist die Lokalisierung des Elementarschwefel oxidierenden Enzymsystems. Thermodynamisch sinnvoll wäre das Periplasma, da bei der Oxidation von Elementarschwefel zu Sulfit Protonen frei werden. Gleiches gilt für die weitere Oxidation zum Sulfat durch die Sulfit-Dehydrogenase. In beiden Fällen sind für *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium* allerdings nur Enzyme bekannt, die *in vitro* bei niedrigen pH-Werten keine Aktivitäten aufweisen und Optima zwischen pH 6 bis 8 besitzen (Silver & Lundgren 1968a, Vestal & Lundgren 1971, Chahal 1986, Suzuki 1994a, 1994b, Nakamura et al. 1995, de Jong et al. 2000). Diese Befunde sprechen eher für eine cytoplasmatische Lokalisierung.

Zumindest bei der Oxidation von Elementarschwefel können als Kritik an dieser Bewertung die unphysiologischen Bedingungen des üblicherweise verwendeten Enzymtestes angeführt werden. So ist die Thiolgruppe des GSH bei pH 3 oder niedriger aufgrund der starken Protonierung nur noch sehr eingeschränkt in der Lage, durch nukleophilen Angriff des S₈-Rings Sulfanschwefel zu mobilisieren. Wichtig ist auch, dass das entstehende Persulfid bei derart niedrigen pH-Werten extrem instabil ist und wieder in GSH und Elementarschwefel zerfällt. Andererseits können bei pH-Werten um 3 noch höhere Bisorganylpolysulfane des GSSG, die über das Persulfid

oder höhere Homologe gebildet werden, nachgewiesen werden, wie die eigenen Analysen der Reduktion von Elementarschwefel durch GSH in diesem pH-Bereich belegen. Trotzdem wurde mit Extrakten aus *Acidiphilium acidophilum* DSM 700^T als unterste Grenze für enzymatische Aktivitäten ein pH-Wert von 3,5 bis 3,8 ermittelt. Der Isoelektrische Punkt von GSH und dessen Derivaten liegt um 3 (Pirie & Pinhey 1929), sodass bei dem niedrigsten getesteten pH-Bereich diese Moleküle kaum noch negativ geladen sind. Hiermit fällt womöglich eine Ladungsbarriere, die bei höheren pH-Werten den Abbau des Persulfids durch Umlagerungsreaktionen mit anderen GSH-Verbindungen verzögert (s. **Gl. 4.2** und **4.3**), sodass auch eine Reaktion mit der Schwefel-Dioxygenase stattfinden kann. Die im Vergleich zum GSH bei Cystein fehlende negative Ladung ist möglicherweise auch die Ursache dafür, dass mit dieser Aminosäure alleine meist keine Aktivität beobachtet wird (Chahal 1986, Sugio et al. 1989). Interessant wären Versuche mit maßgeschneiderten Oligopeptiden, die noch bei pH-Werten von 2 bis 3 in der Nähe der Thiolgruppe negative Ladungen aufweisen und somit auch das Persulfid etwas gegen nukleophile Angriffe abschirmen. Für genauere Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der Schwefel-Dioxygenase ist es sicherlich nötig, die *in vivo* reagierenden Thiole zu identifizieren. Möglicherweise handelt es sich um Proteine mit reaktiven Zentren, die auch im Sauren eine hohe Nukleophilie aufweisen und gleichzeitig die resultierenden Polysulfanverbindungen stabilisieren können.

Hinweise auf die Lokalisierung des Elementarschwefel oxidierenden Enzyms liefern Versuche von Sugio et al. (1987), bei denen durch einen selektiven Aufschluss die Aktivität in der periplasmatischen Fraktion angereichert wurde. Dagegen sprechen die mit 3,5 und 4,6 niedrigen Isoelektrischen Punkte der bisher isolierten Enzyme (Chahal 1986, Sugio et al. 1987). Vergleichende Untersuchungen durch Ramírez et al. (2002) ergaben nämlich zumindest für *Acidithiobacillus ferrooxidans*, dass die meisten bei dieser Art identifizierten periplasmatischen Proteine hohe Werte um 9 bis 10 aufweisen, was von diesen Autoren als Anpassung an das hier vorherrschende saure Milieu gewertet wird.

5.6 Synopse: Mechanismus für die Oxidation von Elementarschwefel bei acidophilen Laugungsbakterien

Trotz der verbleibenden Unklarheiten bezüglich des Mechanismus der enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei Laugungsbakterien soll hier versucht werden, die bisher zu diesem Thema erhaltenen Ergebnisse zu bewerten und zu einem Bild zusammenzufügen. In **Abb. 5.1** sind die Verhältnisse wiedergegeben, wie sie wahrscheinlich bei den Gram-negativen Laugungsbakterien der Gattungen *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium* vorhanden sind. Als Reaktionsraum für das Elementarschwefel oder genauer gesagt Sulfanschwefel oxidierende Enzym, der Schwefel-Dioxygenase, und für die Sulfit-Dehydrogenase wird das Periplasma vorgeschlagen.

Für diese Lokalisierung spricht, dass auch andere Enzyme der dissimilatorischen Oxidation von Schwefelverbindungen wie Thiosulfat, Trithionat und Tetrathionat periplasmatisch sein sollen (Meulenberg et al. 1992, 1993, de Jong et al. 1997a, 1997b). Ein Zusammenspiel mit der Schwefel-Dioxygenase wäre auf diese Weise möglich. So wurde z. B. in Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* beim Abbau von Tetrathionat die Bildung von Elementarschwefel beobachtet (Hazeu et al. 1988), der dann direkt im Periplasma weiteroxidiert werden könnte. Des Weiteren müssten bei einer cytoplasmatischen Lokalisierung gebildete Protonen sowie Sulfit bzw. Sulfat exportiert werden, um zu verhindern, dass sich diese Endprodukte der Schwefeloxidation in der Zelle anhäufen. Dabei wäre eine Protonentranslokation nur über aktive Prozesse zu erreichen. Schließlich wird grundsätzlich angenommen, dass APS-unabhängige Sulfit-Dehydrogenasen bei Gram-negativen Bakterien periplasmatisch lokalisiert sind (Kappler & Dahl 2001). Da bei der Oxidation von Sulfanschwefel Sulfit entsteht, kann davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft vorliegen.

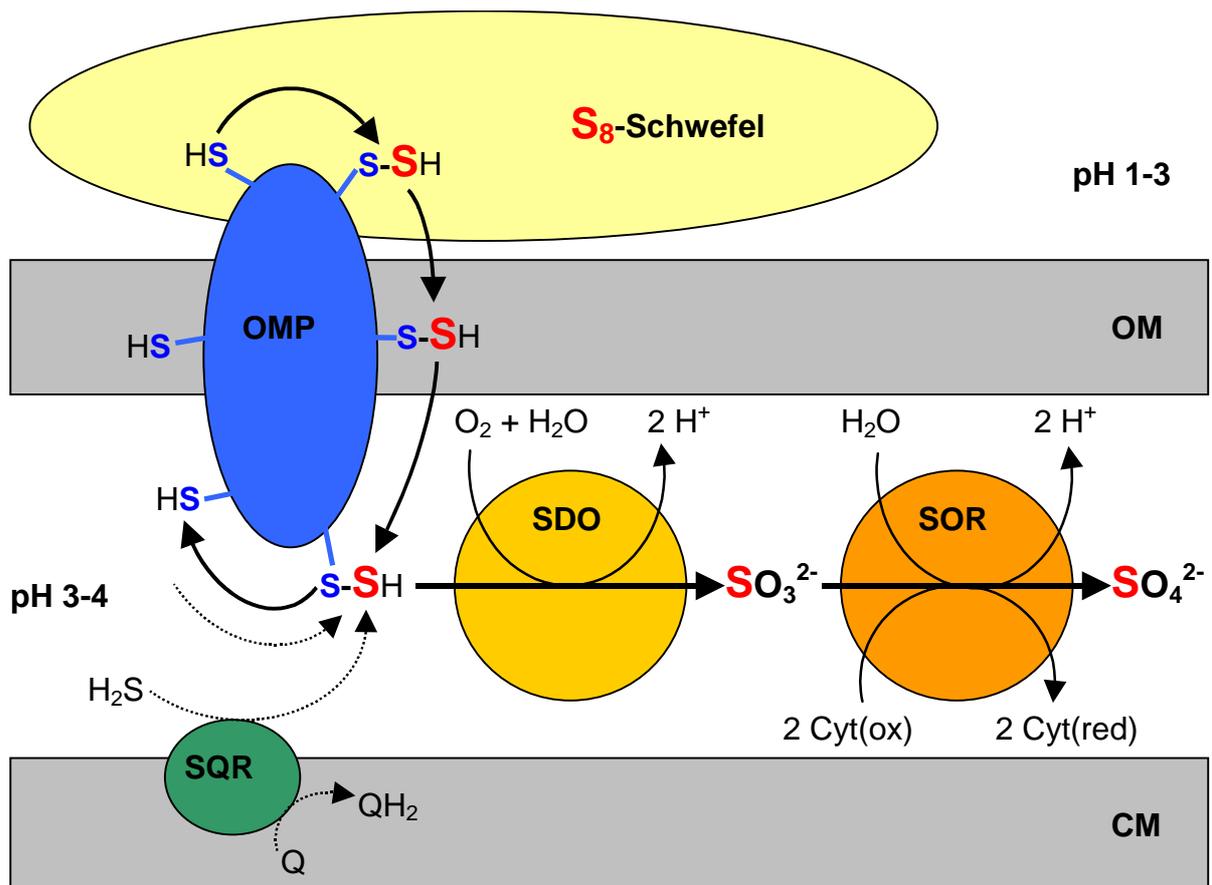


Abb. 5.1: Diskussionsvorschlag für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel zu Sulfat bei acidophilen Laugungsbakterien der Gattungen *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium*, Erläuterungen s. Text (OM: äußere Zellmembran, CM: Cytoplasmamembran, OMP: Thiolgruppen enthaltende Proteine in der äußeren Membran, SDO: Schwefel-Dioxygenase, SOR: Sulfit-Dehydrogenase, SQR: Sulfid-Dehydrogenase, Q/QH₂: oxidierte bzw. reduzierte Quinone, Cyt(ox/red): oxidierte bzw. reduzierte Cytochrome).

Bei dem in **Abb. 5.1** dargestellten extrazellulären Elementarschwefel handelt es sich sehr wahrscheinlich um bereits durch biogene, tensid-ähnliche Substanzen modifizierte Schwefelkristalle. So wurden aus Kulturüberständen von *Acidithiobacillus thiooxidans* oberflächenaktive Verbindungen isoliert (Schaeffer & Umbreit 1963, Knoche & Shively 1972). Diese Substanzen bewirken vermutlich die feine Verteilung des Elementarschwefels, wie sie stets nach einigen Tagen in mit Schwefelpulver inkubierten Kulturen von Schwefeloxidanten zu beobachten ist. Außerdem ist anzunehmen, dass auch die Bindung des Elementarschwefels an die Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran erleichtert wird. Ausreichend kleine Schwefeltröpfchen können sogar in die Zellwand eindringen, wie bereits für den bei der Pyritoxidation durch *Acidithiobacillus ferrooxidans* R2 intermediär auftretenden Elementarschwefel nachgewiesen wurde (Rojas et al. 1995, Rojas-Chapana et al. 1996, 1998).

Das Substrat der Schwefel-Dioxygenase ist organisch gebundener Schwefel der Oxidationsstufe 0. Dieser Sulfanschwefel wird wahrscheinlich durch bisher noch nicht identifizierte Proteine der Zelloberfläche und äußeren Membran mithilfe von Thiolgruppen mobilisiert und ins Periplasma transportiert. Diese Proteine müssten katalytische Zentren besitzen, die trotz der niedrigen pH-Werte außerhalb der Zelle mit Elementarschwefel reagieren und den als Persulfid gebundenen Sulfanschwefel stabilisieren können. Mögliche Kandidaten sind die von Buonfiglio et al. (1993, 1999) und Ohmura et al. (1996) bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* entdeckten Proteine der Zelloberfläche bzw. äußeren Membran und das von Sugio et al. (1991) charakterisierte Sulfidbindende Protein. Der Sulfanschwefel wird im Periplasma an die Schwefel-Dioxygenase übergeben, die ihn mithilfe von Sauerstoff zu Sulfit oxidiert. Zumindest bei der Art *Acidithiobacillus ferrooxidans* wird die Oxidation unter anaeroben Bedingungen auch über alternative Elektronenakzeptoren wie Cytochrom b oder c katalysiert (Corbett & Ingledew 1987). Sulfit wird dann durch eine Sulfit: Cytochrom c-Oxidoreduktase zu Sulfat oxidiert (Vestal & Lundgren 1971, Nakamura et al. 1995, de Jong et al. 2000). Die Oxidation von Hydrogensulfid wird nicht durch die Schwefel-Dioxygenase, sondern durch eine Sulfid: Quinon-Oxidoreduktase katalysiert (Moriarty & Nicholas 1969, 1970, Nübel et al. 2000, Bronstein et al. 2000). Dieses Enzym soll ebenfalls periplasmatisch orientiert sein (Schütz et al. 1998) und kann somit die Schwefel-Dioxygenase zusätzlich mit Sulfanschwefel beliefern. Der Transport des Sulfanschwefels wird hierbei möglicherweise durch weitere, Thiolgruppen enthaltende Proteine der Cytoplasmamembran durchgeführt (nicht in **Abb. 5.1** dargestellt).

Widersprüche zu dem in **Abb. 5.1** vorgestellten Schema, wie sie sich z. B. aus den bisher gefundenen pH-Abhängigkeiten der beteiligten Enzyme ergeben (Silver & Lundgren 1968a, Chahal 1986, de Jong et al. 2000), sind wahrscheinlich auf die unphysiologischen Bedingungen der bisher durchgeführten Enzymtests zurückzuführen. Im Falle der Schwefel-Dioxygenase scheint das Persulfid des als essenzielle

Thiolgruppe üblicherweise verwendeten Glutathions bei pH-Werten um 3 und niedriger nicht stabil genug zu sein, um einen Transfer des Sulfanschwefels zur Dioxxygenase zu ermöglichen. Bei den bisher untersuchten Sulfid-Dehydrogenasen wurden entweder der Eisen(III)-Hexacyano-Komplex oder aus Mitochondrien isolierte Cytochrome als Elektronenakzeptoren eingesetzt. Möglicherweise ist aber nur mit art-spezifischen Cytochromen, die an das in Zellen von *Acidithiobacillus*- und *Acidiphilium*-Arten anzutreffende, acidophile Periplasma angepasst sind, ein Elektronentransfer bei niedrigen pH-Werten zu erreichen (Mansch 1989).

5.7 Ausblick: Gibt es ein universelles System für die enzymatische Oxidation von Elementarschwefel?

Die Annahme einer Beteiligung des GSH-abhängigen Systems an der *in vivo* stattfindenden Oxidation von Elementarschwefel erscheint berechtigt, wenn auch der abzuleitende Mechanismus noch Ungereimtheiten bezüglich der *in vivo* aktiven Thiolgruppen, der Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren und der Lokalisierung des Enzyms aufweist. Es handelt sich um das einzige relevante System, das in acidophilen Laugungsbakterien in diesem Kontext nachgewiesen wurde. Der Anteil der Schwefel-Dioxygenase am Zellprotein von *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 8085 beträgt etwa 2 % (Chahal 1986), sodass auch hierdurch die Bedeutung dieses Enzyms für den dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel unterstrichen wird. Leider sind noch keine molekularbiologischen Daten verfügbar, mit denen geklärt werden könnte, ob es sich bei den Enzymen der bisher untersuchten Arten überhaupt um homologe Systeme handelt. Ebenso fehlen insgesamt systematische Untersuchungen über deren Verbreitung bei prokaryotischen Schwefeloxidanten.

Im Gegensatz hierzu gibt es für den bei *Paracoccus*-Arten gefundenen Sox-Multienzymkomplex bereits genauere Angaben über dessen Präsenz bei anderen Schwefel oxidierenden Bakterien. So wurden die Sequenzen einiger für Sox-Proteine codierender Gene in den Genomen vieler chemo- und photolithotropher Schwefeloxidanten identifiziert (Friedrich et al. 2001, Petri et al. 2001, Verté et al. 2002), sodass man eine universelle Verbreitung des mit dem Sox-Enzymkomplex verbundenen Reaktionsmechanismus vermutet. Allerdings gibt es keinen Fall, in dem bei acidophilen Laugungsbakterien wie *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* oder *Sulfobacillus* Sox-ähnliche Proteine oder Gensequenzen nachgewiesen wurden.

Die einzige bekannte Sequenz für ein bei acidophilen Schwefeloxidanten vorhandenes Elementarschwefel oxidierendes Enzym ist die der Oxygenase-Reduktase der extrem thermophilen *Sulfolobales*. Die entsprechende Gensequenz und das Genprodukt wurden nicht nur bei *Acidianus ambivalens* DSM 3772 (Kletzin 1992), sondern auch bei *Acidianus spec. S5* gefunden (He et al. 2000). Das Gen ist ebenfalls im vollständig sequenzierten Genom von *Sulfolobus tokodaii* Stamm 7 enthalten

(Kawarabayasi et al. 2001). Allerdings ist eine Sequenz für die Oxygenase-Reduktase nicht im Genom von *Sulfolobus solfataricus* P2 zu finden (She et al. 2001), während überraschenderweise ein entsprechendes Gen bei *Aquifex aeolicus* VF5 nachzuweisen ist (Deckert et al. 1998). Bei letzterem Organismus handelt es sich zwar ebenfalls um einen extrem thermophilen Schwefeloxidanten, dieser ist aber im Gegensatz zu den *Sulfolobales* neutrophil und gehört zu den Eubakterien.

Sowohl aus taxonomischer Sicht als auch bezüglich der verschiedenen Lebensweisen ergibt sich also kein einheitliches Bild der für die Oxidation von Elementarschwefel und anderen Schwefelverbindungen zuständigen Enzyme. Insbesondere für den oxidativen Abbau von Elementarschwefel können mindestens 4 Kandidaten genannt werden: der Sox-Multienzymkomplex, die bei *Chromatiaceae* und *Thiobacillus denitrificans* gefundene reverse Sulfit-Reduktase (Pott & Dahl 1998, Dahl et al. 1999), die Oxygenase-Reduktase extrem thermophiler Schwefeloxidanten und das GSH-abhängige System acido-mesophiler Laugungsbakterien. Dabei besitzen viele Schwefeloxidanten gleichzeitig mehrere dieser Systeme. So ist im Genom von *Aquifex aeolicus* nicht nur die Oxygenase-Reduktase nachzuweisen, sondern es sind auch viele Elemente des Sox-Komplexes vorhanden (Friedrich et al. 2001). In *Paracoccus pantotrophus* LMD 82.5^T gibt es neben dem Sox-System eine zusätzliche Sulfid:Quinon-Oxidoreduktase (Schütz et al. 1998) und in *Starkeya novella* DSM 506^T wurde eine mit SoxCD zwar verwandte, aber separate Sulfit-Dehydrogenase (SorAB) gefunden (Kappler et al. 2001, Kappler & Dahl 2001).

Es existieren also offensichtlich mehrere Abbauwege für Schwefelverbindungen, und sogar in einem einzelnen Organismus können gleichzeitig verschiedene Systeme exprimiert werden (Kappler et al. 2001). Vielleicht lassen sich zumindest zwei Prinzipien hervorheben. So können z. B. bei *Allochromatium vinosum* sehr wahrscheinlich Elementarschwefel und Sulfit im Cytoplasma durch die reverse Sulfit-Reduktase und eine entsprechende APS-Reduktase oxidiert werden. Gleichzeitig fungieren der auch hier nachgewiesene Sox-Multienzymkomplex (Friedrich et al. 2001) und möglicherweise noch weitere Einzelenzyme im Periplasma als Schwefeloxidasen. Denkbar ist, dass sich beide Systeme ergänzen. So wird wahrscheinlich der cytoplasmatische Abbauweg bei optimaler Substratversorgung und entsprechender Auslastung der periplasmatischen Oxidasen zugeschaltet (Sánchez et al. 2001). Mit dem APS-Weg stehen auch von Molybdän unabhängige Schwefeloxidasen zur Verfügung. Können bei Mangel an diesem Spurenelement die Molybdän enthaltenden, periplasmatischen Enzyme nur in unzureichenden Mengen synthetisiert werden, würde ebenfalls auf das cytoplasmatische System zurückgegriffen werden.

Weitere Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei den für die biotechnologische Laugung relevanten, acidophilen Schwefeloxidanten müssen deshalb unter der Berücksichtigung geschehen, dass auch hier mehrere Systeme parallel agieren könnten. Insbesondere die Aufklärung des molekularbio-

logischen Hintergrundes der Schwefeloxidation bei wichtigen Gattungen wie *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* oder *Sulfobacillus* ist überfällig. Entscheidende Informationen könnte die Sequenzierung des Genoms von *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T liefern, die allerdings noch nicht abgeschlossen ist (Selkov et al. 2000, <http://www.tigr.org>). Auf biochemischer Ebene wären als Forschungsschwerpunkt Studien bei *Acidiphilium acidophilum* zu empfehlen. Während hier bereits mehrere Enzyme des cyclischen Abbauweges für Thiosulfat und Tetrathionat sowie auch eine Sulfit-Dehydrogenase charakterisiert wurden (Meulenberg et al. 1992, 1993, de Jong et al. 1997b, 2000), wurde bei diesem Organismus bisher die Erforschung des Elementarschwefel oxidierenden Enzymsystems vernachlässigt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit dieser Art sind aber ermunternd, da sehr hohe spezifische Aktivitäten beobachtet werden konnten.

6 Literatur

- Adair, W. A. (1966). Membrane-associated sulfur oxidation by autotroph *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **92**:899-904.
- Albertsen, A. (1993). Synthese und Charakterisierung von Schwefel-Sauerstoff-Verbindungen und Modelluntersuchungen zum Stoffwechsel von Schwefelbakterien. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin.
- Anonymus (1984). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V. (1999). Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa₃-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4781-4787.
- Arieli, B., Shahak, Y., Taglicht, D., Hauska, G., Padan, E. (1994). Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *J. Biol. Chem.* **269**:5705-5711.
- Arkesteyn, G. J. M. W. (1979). Pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* with special reference to the sulphur moiety of the mineral. *Antonie van Leeuwenhoek* **45**:423-435.
- Bacon, M. & Ingledew, W. J. (1989). The reductive reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulphur and selenium. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:189-194.
- Bailey, J. E. & Ollis, D. F. (1977). Biochemical engineering fundamentals, McGraw-Hill, Tokyo, 753 S.
- Barton, L. L. (1995). Biotechnology handbooks. Sulfate-reducing bacteria, Bd. 8, Plenum Press, New York, 336 S.
- Bartsch, R. G., Newton, G. L., Sherrill, C., Fahey, R. C. (1996). Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *J. Bacteriol.* **178**(15):4742-4746.
- Bengrine, A., Guiliani, N., Appia-Ayme, C., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Chippaux, M., Bonnefoy, V. (1998). Sequence and expression of the rusticyanin structural gene from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 strain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1443**:99-112.
- Bordo, D. & Bork, P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* **3**(8):741-746.
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:591-604.
- Boulegue, J. (1978). Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. *Phosphorus Sulfur* **5**:127-128.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

- Brezesinski G., Mögel H.-J. (1993). Grenzflächen und Kolloide, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Brock, T. D. & Gustafson, J. (1976). Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**(4):567-571.
- Bronstein, M., Schütz, M., Hauska, G., Padan, E., Shahak, Y. (2000). Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: cloning and heterologous expression. *J. Bacteriol.* **182**(12):3336-3344.
- Brune, D. C. (1995). Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. (Hrsg.). Anoxygenic photosynthetic bacteria, Kluwer, Dordrecht, S. 847-970.
- Brüser, T., Lens, P. N. L., Trüper, H. G. (2000). The biological sulfur cycle. In: Lens, P. N. L. & Hulshoff Pol, L. (Hrsg.) Environmental technologies to treat sulfur pollution, Kap. 3, IWA Publishing, London, S. 47-85.
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Flora, L., Citro, G., Valenti, P., Orsi, N. (1993). Identification of two outer membrane proteins involved in the oxidation of sulphur compounds in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**:43-50.
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Soyer, F., Valenti, P., Shively, J. (1999). A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **72**:85-93.
- Cavallini, D., de Marco, C., Mondovì, B. (1961). The enzymic conversion of cystamine and thiocysteamine into thiotaurine and hypotaurine. *Enzymologia* **23**:101-110.
- Cecil, R. & McPhee, J. R. (1955). A kinetic study of the reactions on some disulphides with sodium sulphite. *Biochem. J.* **60**:496-506.
- Chahal, B. S. (1986). A further study on the purification of the sulfur-oxidizing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. M. Sc. Thesis, University of Manitoba, Winnipeg.
- Charles A. M. (1969). Mechanism of thiosulphate oxidation by *Thiobacillus intermedius*. *Arch. Biochem. Biophys.* **129**:124-130.
- Charles M. A., Suzuki I. (1966). Mechanism of thiosulfate oxidation by *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **128**:510-521.
- Chen, K. Y. & Morris, J. C. (1972). Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂. *Environ. Sci. Technol.* **6**(6):529-537.
- Clarke, H. T. (1932). The action of sulfite upon cystine. *J. Biol. Chem.* **97**(1):235-248.
- Clausen, T., Kaiser, J. T., Steegborn, C., Huber, R., Kessler, D. (2000). Crystal structure of the cystine C-S lyase from *Synechocystis*: stabilization of cysteine persulfide for FeS cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(8):3856-3861.
- Coram, N. J. & Rawlings, D. E. (2002). Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2):838-845.

- Corbett, C. M. & Ingledew, W. J. (1987). Is $\text{Fe}^{3+}/^{2+}$ cycling an intermediate in sulfur oxidation by Fe^{2+} -grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol. Lett.* **41**:1-6.
- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., von Herzen, R. P., Ballard, R. D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., van Andel, T. H. (1979). Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* **203**(4385):1073-1083.
- Coto, O., Gómez, Y., Varela, P., Falcon, V., Reyes, J., Jerez, C. A. (1999). The use of immunoelectron microscopy to analyse surface components of *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. In: Amils, R. & Ballester, A. (Hrsg.). Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century (Proceedings IBS'99), Process Metallurgy, Bd. 9 B, Kap. 3, Elsevier, Amsterdam, S. 59-67.
- Cunningham, K. I., Northup, D. E., Pollastro, R. M., Wright, W. G., LaRock, E. J. (1995). Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ. Geol.* **25**:2-8.
- Dahl, C. & Trüper, H. G. (1994). Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. *Methods Enzymol.* **243**:400-421.
- Dahl, C., Rákhely, G., Pott-Sperling, A. S., Fodor, B., Takács, M., Tóth, A., Krealing, M., Gyórfi, K., Kovács, A., Tusz, J., Kovács, K. L. (1999). Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:317-324.
- Das, A., Mishra, A. K., Roy, P. (1992). Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**:167-172.
- de Donato P., Mustin C., Benoit R., Erre R. (1993). Spatial distribution of iron and sulphur species on the surface of pyrite. *Appl. Surf. Sci.* **68**:81-93.
- de Jong, G. A. H., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1997a). Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**:499-504.
- de Jong, G. A. H., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1997b). Isolation of the tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. *Eur. J. Biochem.* **243**:678-683.
- de Jong, G. A. H., Tang, J. A., Bos, P., de Vries, S., Kuenen, J. G. (2000). Purification and characterization of a sulfite:cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Mol. Catal. B* **8**:61-67.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J., Swanson, R. V. (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**:353-358.
- Dew, D. W., Lawson, E. N., Broadhurst, J. L. (1997). The BIOX[®] process for biooxidation of gold-bearing ores or concentrates. In: Rawlings, D. E. (Hrsg.). Biomining: theory, microbes and industrial processes, Kap. 3, Springer, Berlin, S. 45-80.

- Dopson, M., Lindström, E. B., Hallberg, K. B. (2002). ATP generation during reduced inorganic sulfur compound oxidation by *Acidithiobacillus caldus* is exclusively due to electron transport phosphorylation. *Extremophiles* **6**:123-129.
- Drobner, E., Huber, H., Stetter, K. O. (1990). *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(9):2922-2923.
- Dupré, S., Federici, G., Santoro, L., Rossi, Fanelli, M. R., Cavallini, D. (1975). The involvement of superoxide anions in the autoxidation of various cofactors of cysteamine-oxygenase. *Mol. Cell. Biochem.* **9**(3):149-154.
- Ehrlich, H. L. & Brierley, C. L. (1990). Microbial mineral recovery, McGraw-Hill, New York.
- Ehrlich, H. L. (2002). Geomicrobiology, 4. Aufl., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Elstner, E. F. (1990). Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim.
- Emmel, T., Sand, W., König, W. A., Bock, E. (1986). Evidence for the existence of a sulphur oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:3415-3420.
- Emmel T. (1987). Untersuchungen des Schwefel oxidierenden Systems von *Sulfolobus brierleyi*. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Espejo, R. T., Escobar, B., Jedlicki, E., Uribe, P., Badilla-Ohlbaum, R. (1988). Oxidation of ferrous iron and elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(7):1694-1699.
- Evangelou, V. P. B. (1995). Pyrite oxidation and its control, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Everse, J. & Kujundzic, N. (1979). Kinetics and mechanism of the reduction of horse heart ferricytochrome c by glutathione. *Biochemistry* **18**(12):2668-2673.
- Fehér, F. (1975). Schwefel, Selen, Tellur. In: Brauer, G. (Hrsg.). Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie, 3. Aufl., Bd. 1, Teil II, Abschnitt 6, Enke Verlag, Stuttgart, S. 356-441.
- Ferguson, S. J. (1988). The redox reactions of the nitrogen and sulphur cycles. In: Cole, J. A. & Ferguson, S. J. (Hrsg.). The nitrogen and sulphur cycles (SGM 42nd symposium), Cambridge University Press, New York, S. 1-30.
- Fowler T. A., Holmes P. R., Crundwell F. K. (1999). Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7):2987-2993.
- Fowler, T. A. & Crundwell, F. K. (1999). Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5285-5292.
- Friedrich, A. (1991). Untersuchungen zur Überlebensrate ruhender Zellen bei stark acidophilen Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.
- Friedrich, C. G. (1998). Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **39**:235-289.

- Friedrich C. G., Quentmeier A., Bradischewsky F., Rother D., Kraft R., Kostka S., Prinz H. (2000). Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB 17. *J. Bacteriol.* **182**(17):4677-4687.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bradischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2873-2882.
- Froede, H. C. & Hunter, F. E. Jr. (1970). Catalytic effect of GSSG on reduction of cytochrome c by GSH - possible model for facilitation of electron transfer and energy conservation by sulfonium ion formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**:954-961.
- Fultz, M. L. & Durst, R. A. (1982). Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. *Anal. Chim. Acta.* **140**:1-18.
- Fuseler, K. & Cypionka, H. (1995). Elemental sulfur as an intermediate of sulfide oxidation with oxygen by *Desulfobulbus propionicus*. *Arch. Microbiol.* **164**:104-109.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2743-2747.
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W. (2001). The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* - a model for structure-function relationship of attached bacteria and their physiology. *Water Sci. Technol.* **43**(6):159-167.
- Göbel, T. (1988). Synthese und Analyse von kettenförmigen Polyschwefelverbindungen: Modelluntersuchungen zum Stoffwechsel der Schwefelbakterien. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin.
- Goebel, B. M. & Stackebrandt, E. (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1614-1621.
- Göksel, A. (2000). Einfluss der extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) auf die Oxidation von Elementarschwefel von acidophilen Laugungsbakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.
- Golovacheva, R. S. & Karavaiko, G. I. (1978). *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic spore-forming bacteria. *Mikrobiologiya* **47**:815-822.
- Grabovich M. Y., Dul'tseva N. M., Dubinina G. A. (2002). Carbon and sulfur metabolism in representatives of two clusters of bacteria of the genus *Leucothrix*: a comparative study. *Mikrobiologiya* **71**(3):301-307; (2002). *Microbiology MAIK* **71**(3): 255-261.
- Guay, R. & Silver, M. (1975). *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. *Can. J. Microbiol.* **21**:281-288.
- Guiliani, N. & Jerez, C. A. (1999). Protein genes from *Thiobacillus ferrooxidans* that change their expression by growth under different energy sources. In: Amils, R. & Ballester, A. (Hrsg.). Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century (Proceedings IBS'99), Process Metallurgy, Bd. 9 B, Kap. 3, Elsevier, Amsterdam, S. 79-87.

- Guiliani, N. & Jerez, C. A. (2000). Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene cloning for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6):2318-2324.
- Hackl, R. P. & Jones, L. (1997). Bacterial sulfur oxidation pathways and their effect on the cyanidation characteristics of biooxidized refractory gold concentrates. In: Australian Mineral Foundation (Hrsg.). Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium '97 / Biomine '97, Glenside, South Australia, S. M14.2.1-M14.2.10.
- Hageage, G. J. Jr., Eanes, E. D., Gherna, R. L. (1970). X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by *Chromatium* species. *J. Bacteriol.* **101**(2):464-469.
- Hallberg, K. B. & Lindström, E. B. (1994). Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* **140**:3451-3456.
- Hallberg, K. B., Dopson, M., Lindström, E. B. (1996). Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**:6-11.
- Hallberg, K. B., Thomson, H. E. C., Boeselt, I., Johnson, D. B. (2001). Aerobic and anaerobic sulfur metabolism by acidophilic bacteria. In: Ciminelli, V. S. T. & Garcia, O. Jr. (Hrsg.). Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development (Proceedings IBS'01), Process Metallurgy, Bd. 11 A, Elsevier, Amsterdam, S. 423-431.
- Hallmann, R., Friedrich, A., Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A., Rhode, K., Zenneck, C., Sand, W. (1993). Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching. *Geomicrobiol. J.* **10**:193-206.
- Hallmann, R. (1996). Einfluss extracellulärer, polymerer Substanzen von *Leptospirillum ferrooxidans* R3 auf dessen Biocoenose mit *Acidiphilium* spec. RB8. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Harrison, A. P. Jr. (1981). *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**(3):327-332.
- Harrison, A. P. Jr. (1982). Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* **131**:68-76.
- Harrison, A. P. Jr. (1983). Genomic and physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**(2):211-217.
- Harrison, A. P. Jr. (1984). The acidophilic Thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**:265-292.
- Hazeu, W., Batenburg-van der Vegte, W. H., Bos, P., van der Pas, R. K., Kuenen, J. G. (1988). The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **150**:574-579.

- He, Z., Li, Y., Zhou, P., Liu, S. (2000). Cloning and heterologous expression of a sulfur oxygenase/reductase gene from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus* sp. S5 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:217-221.
- Hipp W. M., Pott A. S., Thum-Schmitz N., Faath I., Dahl C., Trüper H. G. (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **143**:2891-2902.
- Hippe, H. (2000). *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev, and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992). *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **50**:501-503.
- Hiraishi, A., Nagashima, K. V. P., Matsuura, K., Shimada, K., Takaichi, S., Wakao, N., Katayama, Y. (1998). Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1389-1398.
- Holleman, A. F., Wiberg, E., Wiberg, N. (1985). Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Hollemann-Wiberg, 91.-100. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin.
- Hose, L. D., Pisarowicz, J. A. (1999). Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: Reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. *J. Cave Karst Studies* **61**(1):13-21.
- Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A., Brierley, C. L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:311-336.
- Hutchinson, M., Johnstone, K. J., White, D. (1965). The taxonomy of certain thiobacilli. *J. Gen. Microbiol.* **41**:357-366.
- Huxtable, R. J. (1986). Biochemistry of sulfur. In: Frieden, E. (Hrsg.). Biochemistry of elements, Bd. 6, Plenum Press, New York.
- Hysin, J. W. & Wood, J. L. (1959). Enzymatic formation of polysulfides from mercaptopyruvate. *J. Biol. Chem.* **234**(8):2141-2144.
- Iciek, M. & Włodek, L. (2001). Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* **53**:215-225.
- Inglis, A. S. & Liu, T.-Y. (1970). The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* **245**(1):112-116.
- Ip, Y. K., Tan, G. Q., Kuah, S. S. L., Chew, S. F. (1997). Detoxification of environmental sulfide to sulfane sulfur in the intertidal sipunculid *Phascolosoma arcuatum*. *J. Comp. Physiol. B* **167**:213-220.
- Jannasch, H. W. & Mottl, M. J. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* **229**:717-725.
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:301-317.
- Jones, G. E., Starkey, R. L., Feeley, H. W., Kulp, J. L. (1956). Biological origin of native sulfur in salt domes of Texas and Louisiana. *Science* **123**:1124-1125.

- Jørgensen, B. B. & Revsbech, N. P. (1983). Colorless sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp. and *Thiovulum* spp., in O₂ and H₂S microgradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(4):1261-1270.
- Justin P., Kelly D. P. (1978). Metabolic changes in *Thiobacillus denitrificans* accompanying the transition from aerobic to anaerobic growth in continuous chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.* **107**:131-137.
- Kappler, U. & Dahl, C. (2001). Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:1-9.
- Kappler, U., Friedrich, C. G., Trüper, H. G., Dahl, C. (2001). Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**:102-111.
- Kawarabayashi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T., Kikuchi, H. (2001). Complete genome sequence of an aerobic thermophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* **8**(4):123-140.
- Kelly, D. P. & Syrett P. J. (1966). Energy coupling during sulphur compound oxidation by *Thiobacillus* sp. strain C. *J. Gen. Microbiol.* **43**:109-118.
- Kelly, D. P. (1985). Physiology of the thiobacilli: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiol. Sci.* **2**:105-109.
- Kelly, D. P. (1988). Oxidation of sulphur compounds. In: Cole, J. A. & Ferguson, S. J. (Hrsg.). The nitrogen and sulphur cycles (SGM 42nd symposium), Cambridge University Press, New York, S. 65-98.
- Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W.-P., Wood, A. P. (1997). Oxidative metabolism in inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**:95-107.
- Kelly, D. P. (1999). Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch. Microbiol.* **171**:219-229.
- Kelly, D. P. & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **50**:511-516.
- Klamann, D. (1985). Organische Schwefel-Verbindungen, 4. Aufl., Bd. E11, 1+2, Thieme, Stuttgart.
- Kletzin, A. (1989). Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.* **171**:1638-1643.
- Kletzin, A. (1992). Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase/reductase of the thermoacidophilic archaeum *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.* **174**:5854-5859.

- Knoche, H., W., Shively, J., M. (1972). The structure of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem.* **247**(1):170-178.
- Kodama, A., Mori, T. (1968). Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium V. Comparative studies on sulfur and sulfite oxidizing systems of *Thiobacillus thiooxidans*. *Plant Cell Physiol.* **9**:725-734.
- Kodama, A. (1969). Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium VI. Fractionation and reconstruction of the elementary sulfur-oxidizing system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Plant Cell Physiol.* **10**:645-655.
- Krasil'nikova, E. N., Bogdanova, T. I., Zakharchuk, L. M., Tsaplina, I. A., Karavaiko, G. I. (1998). Metabolism of reduced sulfur compounds in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, strain 1269. *Mikrobiologiya* **67**(2):156-164; (1998). *Microbiology MAIK* **67**(2): 125-132.
- Lane, D. J., Stahl, D. A., Olsen, G. J., Heller, D. J., Pace, N. R. (1985). Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **163**(1):75-81.
- Lane, D. J., Harrison, A. P. Jr., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S. J., Olsen, G. J., Pace, N. R. (1992). Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**:269-278.
- Lang, T. & Kessler, D. (1999). Evidence for cysteine persulfide as reaction product of L-cyst(e)ine C-S-Lyase (C-DES) from *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **274**(1):189-195.
- Lawry, N. H., Jani, V., Jensen, T. E. (1981). Identification of sulfur inclusion body in *Beggiatoa alba* B18LD by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Curr. Microbiol.* **6**:71-74.
- Lindgren, M., Cedergren, A., Lindberg, J. (1982). Conditions for sulfite stabilization and determination by ion chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **141**:279-286.
- Lorbach, S. C., Buonfiglio, V., Bauld, J. M., Shively, J. M. (1993). Oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus*. In: Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (Hrsg.). *Biohydrometallurgical Technologies, The Minerals, Metals & Materials Society, Warrendale, S.* 443-451.
- Lundgren, D. G. & Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **34**:263-283.
- Luther, G. W. III (1987). Pyrite oxidation and reduction: molecular orbital theory considerations. *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**:3193-3199.
- Luther, G. W. III (1990). The frontier-molecular-orbital theory approach in geochemical processes. In: Stumm, W. (Hrsg.). *Aquatic chemical kinetics: reaction rates of processes in natural waters*, John Wiley & Sons, New York, S. 173-198.
- Mackintosh, M. E. (1978). Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* **105**:215-218.
- Mansch, R. (1989). Entwicklung eines enzymatischen Tests zur Bestimmung der Eisenoxidationsaktivität bei *Thiobacillus ferrooxidans*. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.

- Mansch, R. & Sand, W. (1992). Acid-stable cytochromes in ferrous ion oxidizing cell-free preparations from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**:83-88.
- Margalith, P. M., Silver, M., Lundgren, D. G. (1966). Sulfur oxidation by the iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **92**(6):1706-1709.
- Markosyan, G. E. (1972). A new iron-oxidizing bacterium - *Leptospirillum ferrooxidans* gen. nov. sp. nov. *Biol. J. Armenia* **25**:26-29.
- Massey, V., Williams, C. H. Jr., Palmer, G. (1971). The presence of S⁰-containing impurities in commercial samples of oxidized glutathione and their catalytic effect on the reduction of cytochrome c. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**:730-738.
- Meulenberg, R., Pronk, J. T., Frank, J., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1992). Purification and partial characterization of a thermostable trithionate hydrolase from the acidophilic sulphur oxidizer *Thiobacillus acidophilus*. *Eur. J. Biochem.* **209**:367-374.
- Meulenberg, R., Pronk, J. T., Hazeu, W., van Dijken, J. P., Frank, J., Bos, P., Kuenen, J. G. (1993). Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2033-2039.
- Meyer, B. (1964). Solid allotropes of sulfur. *Chem. Rev.* **64**:429-451.
- Meyer, B. (1976). Elemental sulfur. *Chem. Rev.* **76**:367-388.
- Milde, K., Sand, W., Wolf, W., Bock, E. (1983). Thiobacilli of the corroded concrete walls of the Hamburg sewer system. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1327-1333.
- Millero, F. J. & Hershey, J. P. (1989). Thermodynamics and kinetics of hydrogen sulfide in natural waters. In: Saltzman, E. S. & Cooper, J. W. (Hrsg.). Biogenic sulfur in the environment, ACS Symposium Series 393, Kap. 18, S. 282-313.
- Mitchell, D. (2002). Untersuchungen zum Verwandtschaftsverhältnis verschiedener Stämme von *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Leptospirillum ferrooxidans*. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.
- Miura, Y. & Kawaoi, A. (2000). Determination of thiosulfate, thiocyanate and polythionates in a mixture by ion-pair chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* **884**:81-87.
- Mjoli, N. & Kulpa, C. F. (1988). Identification of a unique outer membrane protein required for iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Norris, P. R. & Kelly, D. P. (Hrsg.). Biohydrometallurgy (Proceedings IBS'87), Science and Technology Letters, Kew Surrey, S. 89-102.
- Moriarty, D. J. W. & Nicholas, D. J. D. (1969). Enzymic sulphide oxidation of *Thiobacillus concretivorus*. *Biochim. Biophys. Acta* **184**:114-123.
- Moriarty, D. J. W. & Nicholas, D. J. D. (1970). Products of sulphide oxidation in extracts of *Thiobacillus concretivorus*. *Biochim. Biophys. Acta* **197**:143-151.
- Moses, C. O., Nordstrom, D. K., Herman, J. S., Mills, A. L. (1987). Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochim. Cosmochim. Acta* **51**:1561-1571.
- Murr, L. E. (1980). Theory and practice of copper sulphide leaching in dumps and in-situ. *Minerals Sci. Eng.* **12**(3):121-189.

- Mustin, C., de Donato, P., Berthelin, J., Marion, P. (1993). Surface sulphur as promoting agent of pyrite leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**:71-78.
- Nakamura, K., Kuribayashi, S., Kurosawa, H., Amano, Y. (1992). Pathway of sulfite oxidation in *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(2):261-263.
- Nakamura, K., Yoshikawa, H., Okubo, S., Kurosawa, H., Amano, Y. (1995). Purification and properties of membrane-bound sulfite dehydrogenase from *Thiobacillus thiooxidans* JCM 7814. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(1):11-15.
- Nakamura, K., Nakamura, M., Yoshikawa, H., Amano, Y. (2001). Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM 7814. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(1):102-108.
- Nordstrom, D. K. & Alpers, C. N. (1999). Negative pH, efflorescent mineralogy, and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain Superfund site, California. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3455-3462.
- Nordstrom, D. K. (2000). Advances in the hydrogeochemistry and microbiology of acid mine waters. *Int. Geol. Rev.* **42**(6):499-515.
- Norris, P. R., Clark, D. A., Owen, J. P., Waterhouse, S. (1996). Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* **142**(4):775-783.
- Norris, P. R., Burton, N. P., Foulis, N. A. M. (2000). Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* **4**:71-76.
- Northup, D. E. & Lavoie, K. H. (2001). Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiol. J.* **18**:199-222.
- Nübel, T., Klughammer, C., Huber, R., Hauska, G., Schütz, M. (2000). Sulfide:quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5). *Arch. Microbiol.* **173**:233-244.
- O'Brien, D. J. & Birkner, F. B. (1977). Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **11**(12):1114-1120.
- Oae, S. & Doi, J. T. (1991). Organic sulfur chemistry: structure and mechanism, CRC Press, Boca Raton.
- Ogasawara, Y., Lacourciere, G., Stadtman, T. C. (2001). Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(17):9494-9498.
- Oh, J. K. & Suzuki, I. (1977a). Isolation and characterization of a membrane-associated thiosulphate-oxidizing system of *Thiobacillus novellus*. *J. Gen. Microbiol.* **99**:397-412.
- Oh, J. K. & Suzuki, I. (1977b). Resolution of a membrane-associated thiosulphate-oxidizing complex of *Thiobacillus novellus*. *J Gen Microbiol* **99**:413-423
- Ohmura, N., Tsugita, K., Koizumi, J., Saiki, H. (1996). Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **178**(19):5776-5780.

- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N., Saiki, H. (2002). Anaerobic respiration using Fe^{3+} , S^0 , and H_2 in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **184**(8):2081-2087.
- Pagani, S., Bonomi, F., Cerletti, P. (1982). Sulfide insertion into spinach ferredoxin by rhodanese. *Biochim. Biophys. Acta* **700**:154-164.
- Parker, C. D. (1947). Species of sulphur bacteria associated with corrosion of concrete. *Nature* **159**:439-440.
- Pasteris, J. D., Freeman, J. J., Goffredi, S. K., Buck, K. R. (2001). Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria. *Chem. Geol.* **180**:3-18.
- Pattaragulwanit, K., Brune, D. C., Trüper, H. G., Dahl, C. (1998). Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **169**:434-444.
- Petri, R., Podgorosek, L., Imhoff, J. F. (2001). Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**:171-178.
- Pfennig, N. & Biebl, H. (1976). *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov. a new anaerobic sulfur-reducing acetate-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* **110**:3-12.
- Pickering, I. J., George, G. N., Yu, E. Y., Brune, D. C., Tuschak, C., Overmann, J., Beatty, J. T., Prince, R. C. (2001). Analysis of sulfur biochemistry of sulfur bacteria using X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* **40**:8138-8145.
- Pirie, N. W. & Pinhey, K. G. (1929). The titration curve of glutathione. *J. Biol. Chem.* **84**:321-333.
- Pott, A. S. & Dahl, C. (1998). Siroheme sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144**:1881-1894.
- Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., Schumann, O., Trüper, H. G., Steudel, R., Dahl, C., Hormes, J. (1999). In situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**:446-454.
- Prange, A., Chauvistré, R., Modrow, H., Hormes, J., Trüper, H. G., Dahl, C. (2002). Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology* **148**:267-276.
- Pronk, J. T., Meesters, P. J. W., van Dijken, J. P., Bos, P., Kuenen, J. G. (1990a). Heterotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* in batch and chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* **153**:392-398.
- Pronk, J. T., Meulenbergh, R., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J. G. (1990b). Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:293-306.
- Pronk, J. T., Meijer, W. M., Hazeu, W., van Dijken, J. P., Bos, P., Kuenen, J. G. (1991). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2057-2062.

- Pronk, J. T. & Johnson, D. B. (1992). Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. *Geomicrobiol. J.* **10**:153-171.
- Pronk, J. T., de Bruyn, J. C., Bos, P., Kuenen, J. G. (1992). Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7):2227-2230.
- Prütz, W. A. (1993). Sulfane-activated reduction of cytochrome c by glutathione. *Free Rad. Res. Commun.* **18**(3):159-165.
- Quentmeier, A. & Friedrich, C. G. (2001). The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett.* **503**:168-172.
- Ramírez, P., Toledo, H., Guiliani, N., Jerez, C. A. (2002). An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(4):1837-1845.
- Rao, G. S. & Gorin, G. (1959). Reaction of cystine with sodium sulfide in sodium hydroxide solution. *J. Org. Chem.* **24**:749-753.
- Rawlings, D. E. & Silver, S. (1995). Mining with microbes. *Bio/Technology* **13**:773-778.
- Rawlings, D. E. (1997). *Biomining: theory, microbes and industrial processes*, Springer, Berlin, 302 S.
- Rawlings, D. E. (1999). The molecular genetics of mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing microorganisms. In: Amils, R. & Ballester, A. (Hrsg.). *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century* (Proceedings IBS'99), Process Metallurgy, Bd. 9 B, Kap. 3, Elsevier, Amsterdam, S. 3-20.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H. G., Dahl, C. (1998). Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**:59-68.
- Richter, D. (1992). *Allgemeine Geologie*, 4. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin.
- Rohwerder, T. (1995). Entwicklung eines kalorimetrischen Aktivitätstestes zur Quantifizierung der Schwermetallmobilisierung durch acidophile Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.
- Rohwerder, T., Schippers, A., Sand, W. (1998). Determination of reaction energy values for biological pyrite oxidation by calorimetry. *Thermochim. Acta* **309**:79-85.
- Rohwerder, T., Jozsa, P.-G., Gehrke, T., Sand, W. (2002). Bioleaching. In: Bitton, G. (Hrsg.). *Encyclopedia of environmental microbiology*, Bd. 2, John Wiley & Sons, New York, S. 632-641.
- Rojas, J., Giersig, M., Tributsch, H. (1995). Sulfur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation. *Arch. Microbiol.* **163**:352-356.
- Rojas-Chapana, J., A., Giersig, M., Tributsch, H. (1996). The path of sulfur during the bio-oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fuel* **75**(8):923-930.

- Rojas-Chapana, J., A., Bärtels, C., C., Pohlmann, L., Tributsch, H. (1998). Co-operative leaching and chemotaxis of thiobacilli studied with spherical sulphur / sulphide substrates. *Process. Biochem.* **33**(3):239-248.
- Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*, McGraw-Hill, Hamburg.
- Rossi, G. (1993). Biodepyritization of coal: achievements and problems. *Fuel* **72**:1581-1592.
- Rother, D., Henrich, H.-J., Quentmeier, A., Bradischewsky, F., Friedrich, C. G. (2001). Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **183**:4499-4508.
- Roy, A. B., Trudinger, P. A. (1970). *The biochemistry of inorganic compounds of sulfur*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Sánchez, O., Ferrera, I., Dahl, C., Mas, J. (2001). *In vivo* role of adenosine-5'-phosphosulfat reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **176**:301-305.
- Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:85-92.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R., Schippers, A. (1995). Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:961-966.
- Sand, W. (2001). Microbial corrosion and its inhibition. In: Rehm, H.-J. & Reed, G. (Hrsg.). *Biotechnology*, 2. Aufl., Bd. 10, Kap. 10, Wiley-VCH, Weinheim, S. 265-316.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.-G., Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* **59**:159-175.
- Sarbu, S. M., Kinkle, B. K., Vlasceanu, L., Kane, T. C. (1994). Microbiological characterization of a sulfide-rich groundwater ecosystem. *Geomicrobiol. J.* **12**:175-182.
- Sarbu, S. M., Kane, T. C., Kinkle, B. K. (1996). A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science* **272**:1953-1955.
- Schaeffer, W., I., Umbreit, W., W. (1963). Phosphatidylinositol as a wetting agent in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **85**:492-493.
- Schedel, M. & Trüper, H. G. (1979). Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **568**:454-467.
- Schedel, M., Vanselow, M., Trüper, H. G. (1979). Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. *Arch. Microbiol.* **121**:29-36.
- Schippers, A., Hallmann, R., Wentzien, S., Sand, W. (1995). Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2930-2935.
- Schippers, A., Jozsa, P.-G., Sand, W. (1996). Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(9):3424-3431.

- Schippers A. (1998). Untersuchungen zur Schwefelchemie der biologischen Laugung von Metallsulfiden. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Schippers, A. & Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfide proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1):319-321.
- Schippers, A., Rohwerder, T., Sand, W. (1999). Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**(1):104-110.
- Schippers, A., Jozsa, P.-G., Sand, W., Kovacs, Z. M., Jelea, M. (2000). Microbiological pyrite oxidation in a mine tailings heap and its relevance to the death of vegetation. *Geomicrobiol. J.* **17**(2):151-162.
- Schippers, A. & Bosecker, K. (2002). Bakterien in Bergbauhalden gefährden die Umwelt - Bildung von schwermetallhaltigen Sauerwässern und Maßnahmen zu deren Hemmung. *Z. Angew. Geol.* **48**(1):38-43.
- Schmidt, M. (1973). Elementarer Schwefel - ein aktuelles Problem in Theorie und Praxis. *Angew. Chem.* **11**:474-484.
- Schütz, M., Klughammer, C., Griesbeck, C., Quentmeier, A., Friedrich, C. G., Hauska, G. (1998). Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch. Microbiol.* **170**:353-360.
- Selenska-Pobell, S., Kampf, G., Flemming, K., Radeva, G., Satchanska, G. (2001). Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**:149-161.
- Selkov, E., Overbeek, R., Kogan, Y., Chu, L., Vonstein, V., Holmes, D., Silver, S., Haselkorn, R., Fonstein, M. (2000). Functional analysis of gapped microbial genomes: amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(7):3509-3514.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. S.-Y., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M. K., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W., van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(14):7835-7840.
- Silver, M. & Lundgren, D. G. (1968a). Sulfur-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **46**:457-461.
- Silver, M. & Lundgren, D. G. (1968b). The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **46**:1215-1220.
- Silver, M. & Kelly, D. P. (1976). Rhodanese from *Thiobacillus* A2: catalysis of reactions of thiosulphate with dihydrolipoate and dihydrolipoamide. *J. Gen. Microbiol.* **97**:277-284.

- Singer, P. C. & Stumm, W. (1970). Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* **167**:1121-1123.
- Sinha, D. B. & Walden, C. C. (1966). Formation of polythionates and their interrelationship during oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **12**:1041-1054.
- Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G. O., Holst, O., Kristjansson, J. K. (2001). Isolation and characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* **5**:45-51.
- Spector, T. (1978). Refinement of coomassie-blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.* **86**:142-146.
- Stedel, R., Mäusle, H.-J., Rosenbauer, D., Möckel, H., Freyholdt, T. (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; (1981). *Angew. Chem.* **93**(4): 402-404.
- Stedel, R., Holdt, G., Goebel, T., Hazeu, W. (1987). Chromatographic separation of higher polythionates $S_nO_6^{2-}$ ($n=3...22$) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur excretions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26**:151-153.
- Stedel, R., Göbel, T., Holdt, G. (1988). The molecular composition of hydrophilic sulfur sols by acid decomposition of thiosulfate. *Z. Naturforsch.* **43b**:203-218.
- Stedel, R. & Albertsen, A. (1992). Sulphur compounds CLVII. Determination of cysteine-S-sulphonate by ionpair chromatography and its formation by autoxidation of cysteine persulphide. *J. Chromatogr.* **606**:260-263.
- Stedel, R., Albertsen, A., Kustos, M., Pickardt, J. (1993). X-ray structural analysis and vibrational spectra of sodium cysteine-S-sulfonate, ${}^+H_3NCH(COO^-)CH_2S_2O_3Na \cdot 3/2 H_2O$. *Z. Naturforsch.* **48b**:555-560.
- Stedel, R. & Kustos, M. (1994). Sulfur: organic polysulfanes. In: King, R. B. (Hrsg.). *Encyclopedia of inorganic chemistry*, Bd. 7, Wiley, Chichester, S. 4009-4038.
- Stedel, R. (1996). Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**:1417-1423.
- Stedel, R. & Albertsen, A. (1999). The chemistry of aqueous sulfur sols - models for bacterial sulfur globules. In: Steinbüchel, A. (Hrsg.). *Biochemical principles and mechanisms of biosynthesis and biodegradation of polymers*, Wiley-VCH, Weinheim, S. 17-25.
- Stedel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. In: Lens, P. N. L. & Hulshof Pol, L. (Hrsg.). *Environmental technologies to treat sulfur pollution*, Kap. 1, IWA Publishing, London, S. 1-31.
- Sugio, T., Mizunashi, W., Tano, T., Imai, K. (1986). Production of ferrous ions as intermediates during aerobic sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agric. Biol. Chem.* **50**(11):2755-2761.

- Sugio, T., Mizunashi, W., Inagaki, K., Tano, T. (1987). Purification and some properties of sulfur:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **169**:4916-4922.
- Sugio, T., Tsujita, Y., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T. (1988a). Reduction of Mo⁶⁺ with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **170**(12):5956-5959.
- Sugio, T., Wada, K., Mori, M., Inagaki, K., Tano, T. (1988b). Synthesis of an iron-oxidizing system during growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulfur-basal salts medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(1):150-152.
- Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T. (1989). Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur:ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **973**:250-256.
- Sugio, T., Suzuki, H., Oto, A., Inagaki, K., Tanaka, H., Tano, T. (1991). Purification and some properties of a hydrogen sulfide-binding protein that is involved in sulfur oxidation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agric. Biol. Chem.* **55**(8):2091-2097.
- Sugio, T., White, K. J., Shute, E. A., Choate, D., Blake, R. C. II (1992). Existence of a hydrogen sulfide:ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(1):431-433.
- Sugio, T., Uemura, S., Makino, I., Iwahori, K., Tano, T., Blake, R. C. II (1994). Sensitivity of iron-oxidizing bacteria, *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, to bisulfite ion. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(2):722-725.
- Sugio, T., Kanao, T., Furukawa, H., Nagasawa, T., Blake, R. C. II (1996). Isolation and identification of an iron-oxidizing bacterium which can grow on tetrathionate medium and the properties of a tetrathionate-decomposing enzyme isolated from the bacterium. *J. Ferment. Bioeng.* **82**:233-238.
- Suzuki, H., Tanaka, T., Tano, T., Sugio, T. (1993). Existence of sulfide-binding protein in iron-oxidizing bacteria. In: Torma, A. E., Apel, M. L., Brierley, C. L. (Hrsg.). Biohydrometallurgical technologies, The Minerals, Metals & Materials Society, Warrendale, S. 423-431.
- Suzuki, I. & Werkman, C. H. (1959). Glutathione and sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**:239-244.
- Suzuki, I. (1965a). Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **104**:359-371.
- Suzuki, I. (1965b). Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **110**:97-101.
- Suzuki, I. & Silver, M. (1966). The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. *Biochim. Biophys. Acta* **122**:22-33.
- Suzuki, I. (1974). Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling. *Annu. Rev. Microbiol.* **28**:85-101.

- Suzuki, I., Takeuchi, T. L., Yuthasastrakosol, T. D., Oh, J. K. (1990). Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur, or a sulfide ore. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6):1620-1626.
- Suzuki, I. (1994a). Sulfite: cytochrome c oxidoreductase of thiobacilli. *Methods Enzymol.* **243**:447-454.
- Suzuki, I. (1994b). Sulfur-oxidizing enzymes. *Methods Enzymol.* **243**:455-462.
- Suzuki, I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**:97-105.
- Swan, J. M. (1957). Thiols, disulfides and thiosulphates: some new reactions and possibilities in peptide and protein chemistry. *Nature* **180**(4587):643-645.
- Tabita, R., Silver, M., Lundgren, D. G. (1969). The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **47**:1141-1145.
- Takakuwa, S. (1975). Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium VIII. Purification and characterization of soluble components indispensable for sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Plant Cell Physiol.* **16**:1027-1035.
- Takakuwa, S. (1992). Biochemical aspects of microbial oxidation of inorganic sulfur compounds. In: Oae, S. & Okuyama, T. (Hrsg.). Organic sulfur chemistry: biochemical aspects, Kap. 1, CRC Press, Boca Raton, S. 1-43.
- Tano, T. & Imai, K. (1968). Physiological studies on thiobacilli Part II. The metabolism of colloidal sulfur by the cell-free enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Agric. Biol. Chem.* **32**:51-54.
- Tano, T., Kitaguchi, H., Harada, M., Nagasawa, T., Sugio, T. (1996). Purification and some properties of a tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**:224-227.
- Temple, K. L. & Colmer, A. R. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **62**:605-611.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**:100-180.
- Trüper, H. G. (1975). The enzymology of sulfur metabolism in phototrophic bacteria, a review. *Plant Soil* **43**(1):29-40.
- Tse Sum Bui, B., Escalettes, F., Chottard, G., Florentin, D., Marquet, A. (2000). Enzyme-mediated sulfide production for the reconstitution of [2Fe-2S] clusters into apo-biotin synthase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **267**:2688-2694.
- Verté, F., Kostanjevecki, V., de Smet, L., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., van Beeumen, J. J. (2002). Identification of thiosulfate utilization gene cluster from the green phototrophic bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochemistry* **41**:2932-2945.
- Vestal, J. R. & Lundgren, D. G. (1971). The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **49**:1125-1130.

- Vincke, E., Boon, N., Verstraete, W. (2001). Analysis of the microbial communities on corroded concrete sewer pipes - a case study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:776-785.
- Vishniac, W. & Santer, M. (1957). The thiobacilli. *Bacteriol. Rev.* **21**:195-213.
- Vishniac, W. & Trudinger, P. A. (1962). Carbon dioxide fixation and substrate oxidation in the chemosynthetic sulfur and hydrogen bacteria. *Bacteriol. Rev.* **26**(2):168-175.
- Visscher, P. T. & van Gemerden, H. (1991). Photoautotrophic growth of *Thiocapsa roseopersicina* on dimethyl sulfide. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**:247-250.
- Visser, J. M., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1997). A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **167**:295-301.
- Waksman, S. A. & Joffe, J. S. (1922). Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in soil. II. The *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur oxidizing organism isolated from soil. *J. Bacteriol.* **7**:239-256.
- Weiß, J. (1991). Ionenchromatographie, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Wentzien, S., Sand, W., Albertsen, A., Steudel, R. (1994). Thiosulfate and tetrathionate degradation as well as biofilm generation by *Thiobacillus intermedius* and *Thiobacillus versutus* studied by microcalorimetry, HPLC, and ion-pair chromatography. *Arch. Microbiol.* **161**:116-125.
- Wentzien, S. (2002). Thiosulfat- und Polythionatstoffwechsel bei *Thiomonas intermedia* K12. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Westley, J. (1973). Rhodanese. *Adv. Enzymol.* **39**:327-368.
- Westley, J. (1981). Thiosulfate:cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Methods Enzymol.* **77**:285-291.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder, A. J. B. (Hrsg.). *Biology of anaerobic bacteria*, John Wiley & Sons, New York, S. 469-585.
- Willscher, S. & Bosecker, K. (2001). Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump. In: Chiminelli, V. S. T. & Garcia, O. Jr. (Hrsg.). *Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development (Proceedings IBS'01)*, Process Metallurgy, Bd. 11 B, Elsevier, Amsterdam, S. 513-521.
- Wood, A. P. & Kelly, D. P. (1986). Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarius*. *Arch. Microbiol.* **144**:71-77
- Wood, J. L. (1987). Sulfane sulfur. *Methods Enzymol.* **143**:25-29.
- Yamanaka, T. (1994). Sulfide-cytochrome c reductase (flavocytochrome c). *Methods Enzymol.* **243**:463-474.
- Yarzabal, A., Bresseur, G., Bonnefoy, V. (2002). Cytochromes c of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**(2):189-195.

- Zal, F., Leize, E., Lallier, F. H., Toulmond, A., van Dorsselaer, A., Childress, J. J. (1998). S-Sulfohemoglobin and disulfide exchange: the mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8997-9002.
- Zenneck, C. (1988). Mikrobiologische Bestandsaufnahme in zwei rumänischen Erzbergwerken und Charakterisierung der lithotrophen Flora. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Hamburg.

7 Liste der eigenen Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften und -büchern

T. Rohwerder, A. Schippers, W. Sand (1998). Determination of reaction energy values for biological pyrite oxidation by calorimetry. *Thermochim. Acta* **309**: 79-85.

A. Schippers, T. Rohwerder, W. Sand (1999). Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: Implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:104-110.

W. Sand, H. v. Rège, T. Rohwerder, A. Schippers, S. Wentzien (1999). Kalorimetrische Quantifizierung der Schwermetallmobilisierung in Laugungsbiotopen. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung, Spektrum, Heidelberg, S. 190-212.

T. Rohwerder, P.-G. Jozsa, T. Gehrke, W. Sand (2002). Bioleaching. In: G. Bitton (Hrsg.). Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 2, Wiley, New York, S. 632-641.

Tagungsbeiträge

T. Rohwerder, W. Sand (1996). Quantification of metal sulfide dissolution (leaching). VAAM-Jahrestagung, Bayreuth, Biospektrum, KB 014.

T. Rohwerder, A. Kahl, S. Wentzien, W. Sand (1997). Microcalorimetric determination of bioleaching activity. VAAM-Jahrestagung, Hamburg, Biospektrum, PU 215.

T. Rohwerder, A. Schippers, W. Sand (1997). Mikrokolorimetrische Quantifizierung der mikrobiologischen Laugung von Metallsulfiden. 12. Ulm-Freiburger Kalorimetrie-tage, Freiberg, GEFTA/TU Bergakademie Freiberg.

T. Rohwerder, A. Schippers, A. Kahl, S. Wentzien, W. Sand (1997). Microcalorimetric quantification of microbial leaching activity. 10th ISBC Conference Biothermodynamics: from human beings to molecules, Monte Verità, Ascona.

T. Rohwerder, W. Sand, A. Schippers (1997). Quantification of metal sulfide oxidation by microcalorimetry. In: A. Ziegler, K. H. van Heek, J. Klein, W. Wanzl (Hrsg.). Proceedings of the 9th International Conference on Coal Science (ICCS), Essen, Vol. 3, DGMK, Hamburg, S. 1659-1662.

T. Rohwerder, A. Schippers, W. Sand (1997). Microcalorimetric quantification of bioleaching. In: H. Hoberg, H. v. Blottnitz (Hrsg.). Proceedings of the XX. International Mineral Processing Congress (IMPC), Aachen, Vol. 4: Solid-liquid, hydro- and biohydrometallurgy, GDMB, Clausthal-Zellerfeld, S. 475-483.

T. Rohwerder, A. Kahl, S. Wentzien, W. Sand (1998). Microcalorimetric determination of bioleaching activity and temperature dependence. Euroconference: bacterial-metal/radionuclide interaction: basic research and bioremediation (BMRI-1), FZR, Dresden/Rosendorf.

W. Sand, A. Kahl, T. Rohwerder, S. Wentzien, E. Gock, M. Reiß (1999). Entwicklung eines mikrokalorimetrischen Aktivitätstestes zur Quantifizierung der biologischen Laugung in Bergbauabfällen/Rozwój mikrokalorymetrycznego testu aktywności do ilościowego ujęcia biologicznego ługowania w starych odpadach górniczych. In: T. Przybylski, B. Merkel, H. Kurzydło, M. Althaus (Hrsg.): Rekultywacja i ochrona środowiska w regionach górniczo-przemysłowych/Rekultiwierung und Umweltschutz in Bergbauindustrieregionen. Bd. II, Towarzystwo Przyjaciół Nauk, Legnica, S. 323-327 (deutsch), S. 328-332 (polnisch).

T. Rohwerder, A. Kahl, S. Wentzien, W. Sand (1999). Microcalorimetric determination of bioleaching activity and temperature dependence. In: A. Ballester, R. Amils (Hrsg.). Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, Process Metallurgy, Vol. 9A, Elsevier, Amsterdam, S. 551-557.

A. Schippers, P.-G. Jozsa, T. Gehrke, T. Rohwerder, W. Sand (2000). Bacterial metal sulfide degradation – pathways, inhibition measures, and monitoring. In: ICARD 2000, SME, Littleton, USA, S. 75-82.

T. Rohwerder, A. Schippers, P.-G. Jozsa, T. Gehrke, W. Sand (2000). Bacterial metal sulfide degradation - pathways, inhibition measures, and monitoring. In: Proceedings of the 7th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, Leipzig, Vol. 2, Thomas Telford Publishing, London, S. 769-770.

B. Elberling, G. Asmund, T. B. Zunic, T. Rohwerder, W. Sand (2001). Reactivity of covered sulfidic waste near Maarmorilik in West Greenland. In: H. K. Olsen, L. Lorentzen, O. Rendal (Hrsg.). Mining in the Arctic - Proceedings of the 6th ISMA, A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.

T. Rohwerder, W. Sand (2002). Sulfane-sulfur of persulfides is the exclusive substrate in elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* species. VAAM-Jahrestagung, Göttingen, Biospektrum, KC 017.

Danksagung

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

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

Michi, Sus und Angela danke ich für die gute Zusammenarbeit im DBU-Projekt. Sie waren für mich eine wirkliche Hilfe und Entlastung, sodass ich mich auch den Geheimnissen der Elementarschwefel-Oxidation widmen konnte.

Axel, Peter und Jürgen möchte ich für die Hilfe beim Basteln und Herumdoktern an den Chromatographiegeräten danken. Besonders Axel verdanke ich viele hilfreiche Tricks, wenn er auch nicht immer alle Karten auf den Tisch legte.

Gaby, Sus, Angela und Axel danke ich für wertvolle Anregungen und fürs kritische Lesen. Peter danke ich für das Vorhaben, meine Arbeit zu lesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen der Mikrobiologie für die tolle Zeit und die angenehme Atmosphäre sowie ihre stetige Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich hier Carsten, mit dem man wunderbar und beinahe fanatisch und auch bis in den nächsten Tag hinein forschen konnte. Ebenfalls erwähnen möchte ich Regine, Tilman, Henry, Heike, Manu, Steffi, Britta, 2 x Katja, Tanja, Gabi, Jan-Peter, Dounia, Martina, Nicole, Nathalie, Stephanie, Anna, Petra, Henrike, Ahmet, 2 x Eva, Daniell, Florian, Alina und Kerstin.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern sowie Angela.

Wissenschaftlicher Werdegang

1975-1979	Grundschule in Norderstedt
1979-1988	Lessing-Gymnasium in Norderstedt Abschluss Abitur
1990-1996	Diplomstudium der Biologie an der Universität Hamburg, Fachrichtungen: Mikrobiologie, Biochemie, Genetik Diplomarbeit zum Thema: Entwicklung eines kalori- metrischen Aktivitätstestes zur Quantifizierung der Schwermetallmobilisierung durch acidophile Bakterien
1996-2002	Promotionsarbeit an der Universität Hamburg im Fach Mikrobiologie zum Thema: Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von Elementarschwefel bei acidophilen Laugungsbakterien Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie, Mitarbeit in zwei Drittmittelprojekten zur Umweltproblematik der bak- teriellen Erzlaugung, Zusammenarbeit mit der TU Clausthal und der BGR in Hannover

