

**Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Elementarschwefel und
biogenem Schwefel und zur biotechnologischen Sulfidentfernung durch
Grüne- und Purpurschwefelbakterien**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie/ Chemie
der Universität Bremen
vorgelegt von

Clemens G. Borkenstein
Graz, Österreich

Oktober 2006

47

Datum des Promotionskolloquiums: 21. Dezember 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunter Otto Kirst
1. Prüfer: Prof. Dr. Rudolf Amann
2. Prüfer: PD Dr. Jens Harder

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Summary	1
2 Zusammenfassung	3
3 Einleitung	5
3.1 Die Bioverfügbarkeit von chemischem Elementarschwefel und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	5
3.1.1 Das gelbe Element	5
3.1.2 Begriffsdefinitionen: das Element Schwefel, der Elementarschwefel und der biogene Elementarschwefel	7
3.1.3 Herkunft und Einsatz von Elementarschwefel	8
3.1.4 Der biologische Schwefelkreislauf	9
3.1.5 Anoxygene phototrophe Schwefelbakterien	11
3.1.6 Biogener Schwefel	14
3.1.7 Bioverfügbarkeit von Elementarschwefel	16
3.2 Biotechnologische Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	17
3.2.1 Die Entstehung von Sulfid und seine Toxizität	17
3.2.2 Konventionelle Verfahren zur Sulfidentfernung	18
3.2.3 Alternative mikrobiologische Verfahren zur Sulfidentfernung	19
3.3 Ziele der vorliegenden Arbeit	22
4 Material, Methoden und Methodenentwicklung	23
4.1 Mikrobiologische Methoden	23
4.1.1 Untersuchte Mikroorganismen	23
4.1.2 Kulturmedien und Kulturbedingungen	24
4.1.2.1 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für Grüne- und Purpurschwefelbakterien	24
4.1.2.2 Kulturbedingungen und Anzucht von <i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	26
4.1.2.3 Kulturbedingungen und Anzucht von Purpurschwefelbakterien	27

4.1.3 Langzeitkonservierung von Anoxyphotobakterien	28
4.1.4 Anlegen von Reinkulturen von Anoxyphotobakterien mittels Agarverdünnungsreihen	28
4.1.5 Versuchsansätze zu Wachstumsuntersuchungen von Anoxyphotobakterien mit unterschiedlichen Schwefelspezies als photosynthetische Elektronendonatoren	29
4.2 Präparative Methoden	30
4.2.1 Herstellung von sterilem anoxischem Aqua dest.	30
4.2.2 Isolation von intrazellulärem biogenem S ⁰ aus <i>A. vinosum</i>	30
4.2.3 Präparation von extrazellulärem biogenem S ⁰ von <i>P. vibrioformis</i>	31
4.3 Analytische Methoden	32
4.3.1 Bestimmung von biogenem S ⁰ mittels HPLC	32
4.3.2 Bestimmung von Sulfat mittels HPLC	32
4.3.3 Bestimmung von Sulfid mittels HPLC	33
4.3.4 Trockengewichtsbestimmung	34
4.3.5 Bestimmung des Gehalts an Bacteriochlorophyll <i>a</i> bzw. <i>d</i>	35
4.3.6 Messung der Oberflächenspannung	35
4.4 Mikroskopische Untersuchungen	37
4.4.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen	37
4.4.2 Präparation von Proben für die Transmissions- Elektronenmikroskopie (TEM)	37
4.5 Molekularbiologische Methoden	38
4.5.1 SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)	38
4.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)	40
4.5.3 Trennung von <i>P. vibrioformis</i> Zellen und S ⁰ durch eine Dialysemembran	47
4.6 Photobioreaktor und Prozessbedingungen für die biotechnologischen Verfahren zur Anwendung von Anoxyphotobakterien als Biokatalysatoren zur Sulfideliminierung	48
4.7 Herkunft der Chemikalien	50
5 Ergebnisse	51
5.1 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Elementar- und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	51

5.1.1 Vorbereitende Experimente	51
5.1.1.1 Detektion von Sulfid mittels HPLC	51
5.1.1.2 Anlegen von Reinkulturen von <i>A. vinosum</i>	52
5.1.2 Untersuchungen zum Wachstum von Anoxyphotobakterien	53
5.1.2.1 Photomixotrophes Wachstum von <i>A. minutissimum</i> mit biogenem S ⁰ und Acetat	53
5.1.2.2 Photolithoautotrophes Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> mit Sulfid	54
5.1.2.3 Vergleich des Wachstums von <i>P. vibrioformis</i> mit S ⁰ bzw. Sulfid	55
5.1.2.4 Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> und <i>A. vinosum</i> mit biogenem S ⁰	56
5.1.2.5 Vergleich des Wachstums von <i>P. vibrioformis</i> mit S ⁰ und vom Organismus selbst produziertem biogenem S ⁰	58
5.1.2.6 Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> Zellen mit S ⁰ , die mit S ⁰ vorkultiviert worden waren	59
5.1.2.7 Trennung von <i>P. vibrioformis</i> Zellen und S ⁰ durch eine Dialysemembran	61
5.1.2.8 Wachstum von <i>A. vinosum</i> 21D mit S ⁰	62
5.1.3 Makroskopische Beobachtungen	63
5.1.3.1 Biologische Hydrophilisierung des hydrophoben S ⁰	63
5.1.4 Mikroskopische Untersuchungen	65
5.1.4.1 Anlagerung von <i>P. vibrioformis</i> Zellen an S ⁰ - Partikel	65
5.1.5 Chemisch analytische Untersuchungen	66
5.1.5.1 Oberflächenspannung der Kulturmedien bei Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> und <i>A. vinosum</i> mit biogenem S ⁰	66
5.1.5.2 Sulfid als Intermediat bei Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> mit S ⁰	67
5.1.5.3 Sulfid als Intermediat bei Wachstum von <i>P. vibrioformis</i> mit biogenem S ⁰	69
5.1.5.4 Wachstum von <i>A. vinosum</i> 21D mit S ⁰	70
5.1.6 Molekularbiologische Untersuchungen	71
5.1.6.1 Vergleich des Proteinmusters von <i>P. vibrioformis</i> bei Wachstum mit S ⁰ , biogenem S ⁰ und Sulfid	71
5.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	76
5.2.1 Biotechnologisches Verfahren zur kombinierten Sulfidentfernung und Produktion von biogenem S ⁰ mittels Grünen Schwefelbakterien	76
5.2.2 Biotechnologisches Verfahren zur kombinierten Sulfidentfernung und	

Produktion von biogenem S ⁰ mittels <i>A. vinosum</i> 21D	79
6 Diskussion	84
6.1 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Elementar- und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	84
6.1.1 Kontakt zwischen Zellen und gering wasserlöslichem S ⁰	84
6.1.2 Biogener S ⁰ von Anoxyphotobakterien	89
6.1.3 Lag- Phasen bei Wachstum von Anoxyphotobakterien mit S ⁰	90
6.1.4. Chemische Möglichkeiten der Bioverfügbarmachung von gering wasserlöslichen Substanzen	91
6.1.5 An der Bioverfügbarmachung von S ⁰ beteiligte Enzyme	94
6.1.6 Modellvorschlag zur initiellen photosynthetischen Nutzung von S ⁰ durch <i>P. vibrioformis</i>	96
6.1.7 Bioverfügbarmachung von S ⁰ durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	97
6.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien	98
6.2.1 Grüne Schwefelbakterien als Biokatalysatoren zur Sulfidentfernung	101
6.2.2 <i>A. vinosum</i> 21D als Biokatalysator zur Sulfidentfernung	103
7. Literaturverzeichnis	106
8. Veröffentlichungen	119
8.1 Liste der Veröffentlichungen	120
8.2 Biotechnological Sulfide Removal and Elemental Sulfur Recycling from a Sulfide Polluted Medium by the Phototrophic Sulfur Bacterium <i>Allochromatium vinosum</i> strain 21D	121
8.3 Bioavailability of Elemental Sulfur by the Green Sulfur Bacterium <i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	135

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BChl <i>a, d</i>	Bacteriochlorophyll <i>a, d</i>
biogener S ⁰	Schwefel biogenen Ursprungs, Oxidationsstufe Null
BSA	Rinderserumalbumin
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Exopolysaccharid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	(N[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-Ethanosulfonsäure])
HPLC	high performance liquid chromatography
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
mM	millimolar
mV	Millivolt
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung
ppm	parts per million

RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
S ⁰	Elementarschwefel
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis
sec	Sekunde
SOR	sulfur oxygenase reductase
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymehtyl)aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
v.l.	von links nach rechts
v/v	volume per volume
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	weight per volume
WCP	whole cell proteins
XANES	X- Ray absorption near edge structure

1 Summary

“Bioavailability of Elemental- and Biogenic Sulfur and Biotechnological Sulfide Removal by Green and Purple Sulfur Bacteria”

1- The following model organisms were used to study bioavailability of both elemental sulfur (S^0) and biologically produced sulfur (biogenic S^0) by anoxygenic phototrophic bacteria: *Prosthecochloris vibrioformis* (green sulfur bacterium), *Allochromatium vinosum* and *A. vinosum* 21D (purple sulfur bacteria).

2- During photolithoautotrophic growth of *P. vibrioformis* with S^0 it could be observed that cells attached to the S^0 -particles 24 h after the addition of the latter. The S^0 became hydrophilic, which was not attributed to abiotic reactions.

3- In cross-feeding-experiments, *A. vinosum* and *P. vibrioformis* used biogenic S^0 from *P. vibrioformis* and *A. vinosum*, respectively, for growth. During these cross-feeding-experiments, biodetergents were not detected in the medium.

4- If cells of *P. vibrioformis* were separated from S^0 by a dialysis membrane (exclusion size: 12-14 kDa), growth was not observed. If S^0 was added directly to the medium, growth of *P. vibrioformis* was dependent on the S^0 concentration in the medium.

5- Sulfide was detected in the medium during growth of *P. vibrioformis* with S^0 and with self-produced biogenic S^0 .

6- The protein pattern of extracellular enzymes from growth of *P. vibrioformis* with S^0 and sulfide was compared by SDS PAGE but no differences were observed. Furthermore, the protein pattern of whole cell proteins (WCP) from growth of *P. vibrioformis* with S^0 , biogenic S^0 and sulfide, respectively, was compared. Two bands (ca. 38 kDa and ca. 40 kDa) were detected, which were only expressed during growth on S^0 and biogenic S^0 , respectively.

7- Furthermore, the protein pattern of soluble and membrane-associated proteins from *P. vibrioformis* growing with S^0 and sulfide, respectively, was compared. 45 and 23 protein spots, respectively, were detected, which were expressed depending on the specific offered sulfur compound.

8- *P. vibrioformis* growing with biogenic S^0 showed a 24 h lag-phase, compared to growth with sulfide. The lag-phase, when growing with S^0 was 48 h, regardless of whether the preculture was grown with sulfide or with S^0 .

9- The mutant strain *A. vinosum* 21D, which was unable to oxidise intracellular biogenic S⁰, used S⁰ that was externally added to the medium for growth. During S⁰ oxidation, intracellular biogenic S⁰-globules were formed and no sulfide was detected in the medium.

10- Based on the obtained results, a model for the initial use of S⁰ by *P. vibrioformis* was proposed.

11- *P. vibrioformis* was used as a biocatalyst to remove sulfide from synthetic wastewater in a 5 L photobioreactor. The process type was semicontinuous and the running time 101 h. A sulfide removal of 99.4 % and a biogenic S⁰ recycling of 53.2 % was achieved initially.

12- During this process, biogenic S⁰, formed by *P. vibrioformis*, attached to the inner glass wall of the reactor. This caused a reduction of the biogenic S⁰-yield and of the light input into the reactor.

13- The unintentional enzymatic oxidation of biogenic S⁰ to sulfate could not be avoided in this process.

14- *A. vinosum* mutant strain 21D was used as a biocatalyst to remove sulfide from synthetic wastewater in the same 5 L photobioreactor. The process type was semicontinuous with three fed-batch periods. Running time of the experiment was 1464 h.

15- Due to a genetic modification in *A. vinosum* 21D and the intracellular localisation of the formed biogenic S⁰, the formation of sulfate, which was unwanted in this process, and the attachment of biogenic S⁰ on the glass wall, were circumvented.

16- The average sulfide removal rate was 49.3 μM/h and the maximal sulfide removal 98.7 %. An average sulfide removal of 91.7 % and an overall biogenic S⁰ recycling of 60.4 % was achieved.

17- By means of these results, it was shown that the use of *A. vinosum* 21D for sulfide elimination and recycling of biogenic S⁰ is a competitive alternative to the currently dominating physicochemical methods.

2 Zusammenfassung

1- Zur Untersuchung der Bioverfügbarmachung von Elementarschwefel (S^0) und von dem von Anoxyphotobakterien gebildetem Schwefel der Oxidationsstufe Null (biogener S^0) wurden das Grüne Schwefelbakterium *Prosthecochloris vibrioformis* (DSM 263) und die beiden Purpurschwefelbakterien *Allochromatium vinosum* (DSM 180) bzw. *A. vinosum* Stamm 21D als Modellorganismen ausgewählt.

2- Während des photolithoautotrophen Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 lagerten sich 24 h nach dem Zusetzen von S^0 zum Medium Zellen an die S^0 -Partikel an und eine Hydrophilisierung der anfänglich hydrophoben S^0 -Partikel wurde beobachtet. Die Hydrophilisierung war nicht auf einen abiotischen Vorgang zurückzuführen.

3- Der durch Sulfidoxidation gebildete, extern abgelagerte biogene S^0 von *P. vibrioformis*, sowie der intrazellulär gespeicherte von *A. vinosum* wurden präpariert bzw. isoliert und dem jeweils anderen Organismus als Elektronendonator angeboten. Sowohl *P. vibrioformis* als auch *A. vinosum* waren in der Lage, den biogenen S^0 des jeweils anderen Organismus zum Wachstum zu nutzen. Dabei wurden die Oberflächenspannungen der Kulturmedien analysiert und keine Unterschiede festgestellt.

4- Eine Trennung von S^0 und *P. vibrioformis* Zellen durch eine Dialysemembran mit Ausschlussgröße 12-14 kDa verhinderte ein Wachstum. Wurde S^0 direkt zum Medium zugesetzt, zeigte *P. vibrioformis* Wachstum in Abhängigkeit der zugesetzten S^0 -Konzentration.

5- Während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 sowie mit selbst gebildetem biogenem S^0 wurde Sulfid im Kulturmedium detektiert.

6- Das Proteinmuster der extrazellulären Enzyme von *P. vibrioformis* aus dem Wachstum mit S^0 bzw. Sulfid wurde mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) verglichen und es wurden keine unterschiedlichen Proteinbanden vorgefunden. Des Weiteren wurde das Proteinmuster der ganzen Zellen von *P. vibrioformis* bei Wachstum mit S^0 bzw. biogenem S^0 mit Sulfid mittels SDS PAGE verglichen. Dabei wurden eine ca. 38 kDa und eine ca. 40 kDa große Proteinbande detektiert, welche ausschließlich bei Wachstum mit S^0 bzw. mit biogenem S^0 exprimiert wurden.

7- Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese der löslichen und membranassoziierten Proteine wurde das Proteinmuster von *P. vibrioformis* bei Wachstum mit S^0 bzw. Sulfid verglichen. Dabei wurden bei Wachstum mit S^0 45 und bei Wachstum mit Sulfid 23 zusätzliche Proteinspots inkubationsabhängig detektiert.

8- *P. vibrioformis* zeigte bei Wachstum mit selbst gebildetem biogenem S^0 im Vergleich zu Wachstum mit Sulfid eine 24 h Verzögerungsphase. Diese lag-Phase betrug 48 h bei Wachstum mit S^0 , unabhängig davon, ob die Vorkultur mit S^0 oder mit Sulfid kultiviert worden war.

9- *A. vinosum* 21D konnte den zum Medium zugesetzten S^0 zum Wachstum nutzen, trotz seiner Unfähigkeit zur Oxidation intrazellulär gespeichertem biogenem S^0 . Dabei wurde die Bildung von intrazellulären biogenen S^0 -Globuli beobachtet. Sulfid wurde nicht im Medium detektiert.

10- Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell der initialen photosynthetischen Nutzung von S^0 durch *P. vibrioformis* erstellt.

11- *P. vibrioformis* wurde als Biokatalysator zur Entfernung von Sulfid aus synthetischem Abwasser in einem 5 L Photobioreaktor eingesetzt. Der Prozess wurde semikontinuierlich mit einer Versuchsdauer von 101 h betrieben. Initial wurden eine 99,4 % Sulfidoxidation und ein Recycling des biogenen S^0 von 53,2 % erreicht.

12- Der von *P. vibrioformis* gebildete biogene S^0 lagerte sich während dieses Prozesses an der Reaktorglaswand an, was die Ausbeute an biogenem S^0 verringerte und den Lichteintrag in den Reaktorraum wachstumsbeeinflussend senkte.

13- Die enzymatische Oxidation des biogenen S^0 zu - in diesem Prozess unerwünschtem - Sulfat konnte nicht verhindert werden.

14- Die Mutante *A. vinosum* 21D wurde als Biokatalysator zur Sulfidentfernung ebenfalls im selben 5 L Photobioreaktor eingesetzt. Der Bioprozess wurde semikontinuierlich mit drei einzelnen fed-batch Abschnitten betrieben.

15- Die Bildung von in diesem Prozess unerwünschtem Sulfat wurde durch eine gentechnische Veränderung des Organismus vermieden. Des Weiteren kam es auf Grund der intrazellulären Speicherung des biogenen S^0 zu keinen Ablagerungen des letzteren an der Reaktorglaswand.

16- Während des 1464 h Versuchslaufs wurden eine maximale Sulfidentfernungsrate von 49,3 $\mu\text{M/h}$ und eine maximale Sulfidentfernung von 98,7 % erreicht. Die durchschnittliche Sulfidentfernung für das Gesamtexperiment betrug 91,7 %. Während des gesamten Versuchslaufs wurde ein Recycling des biogenen S^0 von 60,4 % erreicht.

17- Durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von *A. vinosum* 21D zur Sulfideliminierung eine konkurrenzfähige Alternative zu den in der Industrie vorherrschenden physikalisch-chemischen Verfahren darstellt.

3 Einleitung

3.1 Die Bioverfügbarkeit von chemischem Elementarschwefel und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

3.1.1 Das gelbe Element

Obwohl Schwefel seit Urzeiten bekannt ist und seit Hunderten von Jahren wissenschaftlich untersucht wird, gibt es noch viel über das *gelbe Element* zu erforschen. Schwefel ist eines der interessantesten, aber auch eines der komplexesten Elemente. Die Komplexität der Schwefelchemie wird zum einen durch die vielen Oxidationszustände erklärt, welche Schwefel einnehmen kann (Tab. 3.1) und zum anderen durch die Tendenz des Schwefels, mit der Oxidationsstufe „0“ Ketten und Ringe in vielfältigen Formen zu bilden. Lösungen von reduzierten Schwefelverbindungen sind einer ständigen Autoxidation ausgesetzt und sind thermisch instabil. Darüber hinaus interagieren die komplizierten chemischen, geochemischen und biologischen (biochemischen) Schwefelkreisläufe untereinander [Stuedel, 2000].

Tab. 3.1: Oxidationszahlen von ausgewählten Schwefelverbindungen [Stuedel, 2000].

Oxidationszahl	Schwefelverbindung
-2	Schwefelwasserstoff H_2S , Hydrogensulfid HS^- , Sulfid S^{2-} , Eisensulfid FeS
-1	Disulfan H_2S_2 , Disulfid S_2^{2-} , Pyrit FeS_2
0	Kettenförmiger Elementarschwefel S_μ (bzw. S_n), ringförmiger Elementarschwefel (z. B. Cyclooctaschwefel S_8), innere S-Atome in Polysulfid ($^-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}^-$), in Polythionat ($^-\text{O}_3\text{S}-\text{S}_n-\text{SO}_3^-$), und in organischem Polysulfan $\text{R}-\text{S}_n-\text{R}$
+1	Dichlordisulfan $\text{Cl}-\text{S}-\text{S}-\text{Cl}$
+2	Schwefeldichlorid SCl_2 , Sulfoxylat SO_2^{2-}
+3	Dithionit $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$
+4	Schwefeldioxyd SO_2 , Sulfit SO_3^{2-}
+5	Dithionat $\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$, Sulfonat RSO_3^-
+6	Schwefeltrioxyd SO_3 , Sulfat SO_4^{2-} , Peroxosulfat SO_5^{2-}

Nach dem heutigen Wissensstand wird ein Großteil der Forschungsarbeiten der letzten 200 Jahre über Schwefel auf Grund von unstandardisierten Untersuchungsmethoden und falschen Ergebnisinterpretationen als unzuverlässlich bezeichnet [Steudel, 2003].

Das Nicht-Metall Element Schwefel wird mit dem chemischen Symbol „S“ abgekürzt und hat ein Atomgewicht von 32,06. Der Name Schwefel stammt vermutlich vom Sanskrit „*silvere*“ bzw. vom lateinischen „*sulphur, sulphur*“ oder „*sulfur*“ [Kelly, 1995]. Schwefel belegt in der Liste der am häufigsten in der Erdkruste vorkommenden Elemente den 15. Platz und tritt in 9 Oxidationszuständen auf. Tab. 3.1 zeigt eine Auswahl einiger Schwefelverbindungen von Sulfid (am stärksten reduzierte Form, Oxidationszahl -2) bis zu Sulfat (am höchsten oxidierte Form, Oxidationszahl +6) [Middelburg, 2000; Steudel, 2000]. Unter Standarddruck und -temperatur kommt Elementarschwefel in verschiedenen großen Ringen (S_n) und verschiedenen langen Ketten (S_μ) vor [Steudel, 1996]. Von all diesen hydrophoben Schwefelallotropen ist der orthorhombische α - S_8 -Elementarschwefel (S_8) der thermodynamisch Stabilste [Steudel, 1996]. Der S_8 macht den größten Bestandteil von technischem Elementarschwefel aus. Weitere Bestandteile dieser „Schwefelblüte“ sind polymere Schwefelketten (S_μ) und S_7 -Schwefelringe, wobei die letzteren auch für die charakteristische Gelbfärbung verantwortlich sind [Steudel, 1996]. Das Verhältnis der einzelnen Bestandteile - Länge der Schwefelringe und Schwefelketten - variiert bei kommerziell erhältlichen Elementarschwefelprodukten [Steudel und Holdt, 1988; Steudel, 1996; Franz et al., 2006].

3.1.2 Begriffsdefinitionen: das Element Schwefel, der Elementarschwefel und der biogene Elementarschwefel

In der Schwefelchemie sind zwei Begriffsdefinitionen zu unterscheiden. Der Schwefel als das **Element Schwefel** und der **Elementarschwefel**, also der Schwefel mit der Oxidationsstufe „0“ (S^0). Häufig wird in der Literatur auf diese Unterscheidung verzichtet, was zu Missverständnissen führt. Darüber hinaus muss zwischen käuflich erwerbbaarem, technisch großtechnisch hergestelltem **chemischem** Elementarschwefel, wie ihn die Abb. 3.1 in gepresster Form und als Pulver zeigt, und Elementarschwefel mit **biogenem** Ursprung unterschieden werden [Steudel et al., 1988].



Abb. 3.1: „Gelbes Gold“: Gepresster Elementarschwefel in Barrenform und als Pulver.

Da in der vorliegenden Arbeit diese beiden Formen des Elementarschwefels als Protagonisten auftreten, wird der chemische Elementarschwefel hier als Elementarschwefel (S^0) bezeichnet, während der von Mikroorganismen in Form von Schwefelglobuli gebildete, intra- bzw. extrazellulär abgelagerte Schwefel, hier „biogener Schwefel“ (**biogener S^0**) genannt wird.

In der vorliegenden Arbeit werden für eingesetzte Typen des Elementarschwefels folgende Bezeichnungen verwendet:

» S^0 = chemischer Elementarschwefel

» **biogener S^0** = biogener Schwefel

3.1.3 Herkunft und Einsatz von Elementarschwefel

In der Natur kommt Elementarschwefel in vulkanischer Umgebung, heißen Quellen und in geologischen Lagerstätten vor. Der Elementarschwefel in solchen Lagerstätten wie an den Küstenregionen des Golfs von Mexiko und in Polen ist biologischen Ursprungs und wird auf die Aktivität von sulfatreduzierenden Bakterien, gefolgt von einem Oxidationsschritt durch vermutlich chemotrophe Schwefelbakterien, zurückgeführt [Fischer, 1988; Dahl und Prange, 2006].

Technischer Elementarschwefel (S^0) wird heute ausschließlich nur noch bei der so genannten Entschwefelung von Erdöl und Erdgas als Nebenprodukt hergestellt [Ober, 2004]. Schwefel ist in fossilen Brennstoffen meist in Form von Schwefelwasserstoff (H_2S) zu finden, welcher aus Umweltschutzgründen vor der Verbrennung entfernt werden muss. Bei der Verbrennung von Erdöl und Erdgas entsteht sonst Schwefeldioxid (SO_2), welches den sogenannten „sauren Regen“ verursacht [Alloway und Ayres, 1996]. Von den vielen verschiedenen Möglichkeiten der Entschwefelung von fossilen Brennstoffen wird meist eine dem Claus-Prozess zugrunde liegende Technologie eingesetzt. So werden u. a. in Großenkneten, im Oldenburger Land, in einer von Exxon Mobil betriebenen Entschwefelungsanlage 800.000 t S^0 pro Jahr erzeugt [Exxon Mobil, 2006].

Die Menge an dem durch den Claus-Prozess produzierten S^0 ist abhängig von dem Bedarf an Erdöl und Erdgas und nicht am S^0 -Bedarf [Ober, 2004]. Die weltweit gestiegene Nachfrage an fossilen Brennstoffen und die dadurch gestiegene Produktion an S^0 führte zu einer S^0 -Überproduktion und damit zu einem nachfolgenden Preisverfall. Obwohl in geologischen Lagerstätten noch große Vorkommen an Elementarschwefel zu finden sind, ist ein Abbau unwirtschaftlich [Ober, 2001].

Schwefel zählt zu den wichtigsten Elementen, die in der Industrie als Rohstoffe eingesetzt werden. Der Verbrauch an Schwefelsäure, dem bedeutendsten Schwefelprodukt, ist einer der aussagekräftigsten Indizes über den Industrialisierungszustand eines Landes [Meyer, 1977; Ober, 2004]. Bis auf die Anwendung von S^0 -Pulver als pH-Senkungsmittel in basischen Böden und als Fungizid im Weinbau, wird S^0 sonst fast ausschließlich nur als Rohmaterial eingesetzt und weiterverarbeitet. Außerdem findet man S^0 in Düngemitteln, Farben, Kunststofffasern, Autoreifen, Asphalt, Sprengstoff und Feuerwerkskörpern [Fischer, 1988; Madigan und Martinko, 2006].

3.1.4 Der biologische Schwefelkreislauf

In der Natur unterliegt Schwefel, bedingt durch Reduktionen und Oxidationen, einem ständigen Kreislauf, hervorgerufen durch chemisch, geochemisch und biologisch ablaufende Prozesse [Fischer, 1986]. Der biologische Schwefelkreislauf kann in assimilatorische und dissimilatorische Reaktionen unterteilt werden und besteht aus einer oxidativen und einer reduktiven Hälfte (Abb. 3.2).

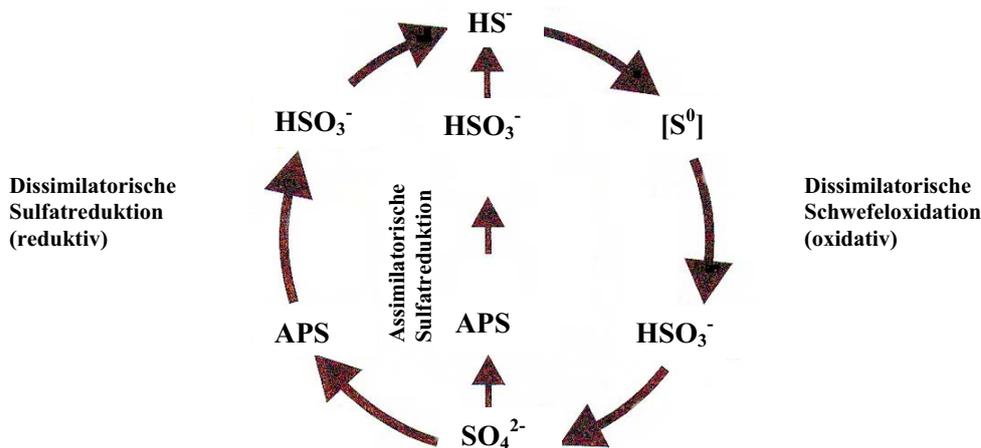


Abb. 3.2: Der biologische Schwefelkreislauf [modifiziert nach Brüser et al., 2000]. $[\text{S}^0]$: Schwefelverbindungen in denen der Schwefel u.a. in der Oxidationsstufe Null vorkommt (ketten- oder ringförmiger (biogener) S^0 , Polythionat, Polysulfid, siehe Tab 3.1). APS: Adenosin-5-Phosphosulfat.

Für **biosynthetische** Zwecke werden anorganische Schwefelverbindungen zum Aufbau von verschiedenen organischen schwefelhaltigen Verbindungen genutzt, welche in allen Organismen als Zellkomponenten vorkommen. Zu diesen schwefelhaltigen Zellkomponenten gehören Aminosäuren (Cystein und Methionin), Sulfolipide, Eisen-Schwefel-Proteine, Coenzyme (Coenzym A), Vitamine (Biotin) und Antibiotika. Diese organischen Schwefelverbindungen besitzen entweder strukturelle, katalytische oder regulatorische Funktion. Wie Abb. 3.2 zeigt, wird Sulfat, die stabilste Schwefelverbindung, für die assimilatorische und dissimilatorische Sulfatreduktion mittels ATP-Verbrauch zuerst zu Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) aktiviert [Fischer, 1986].

Anorganische Schwefelverbindungen können außerdem als Elektronendonatoren oder Elektronenakzeptoren in **dissimilatorischen** Prozessen zur Energieerzeugung oder Reduktion von NAD verwendet werden [Brüser et al., 2000].

Tab. 3.2: Einteilung der Bakterien, die für ihren Stoffwechsel anorganische Schwefelverbindungen nutzen [zusammengestellt nach Trüper, 1984; Fischer, 1989].

Prozess der Schwefel-Nutzung	Bakteriengruppe	Stoffwechsel	C-Quelle	e-Donor	e-Akzeptor	Produkt
Reduktion	Anaerobe dissimilatorische Sulfatreduzierer	chemotroph	Organische Verbindung oder CO ₂	Organische Verbindung, H ₂	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻	H ₂ S
	Anaerobe dissimilatorische S ⁰ -Reduzierer				S ⁰	
Oxidation	Aerobe chemotrophe Schwefeloxidierer	chemotroph	Organische Verbindung oder CO ₂	S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰	O ₂	SO ₄ ²⁻ , (biogener S ⁰)
	Anaerobe chemotrophe Schwefeloxidierer				NO ₃ ²⁻	
	Anaerobe phototrophe Schwefeloxidierer	phototroph		-		

In der **reduktiven Hälfte** des Schwefelkreislaufs (dissimilatorische Sulfatreduktion) kommt eine Vielzahl von anaeroben dissimilatorischen Sulfat- und S⁰-Reduzierern vor, denen Sulfat oder S⁰ als Elektronenakzeptoren dienen, darunter *Wolinella*, *Desulfuromonas* und *Desulfurella* [Rabus et al., 2000]. Das Endprodukt dieses Stoffwechsels ist meist Sulfid. In der **oxidativen Hälfte** (dissimilatorische Schwefeloxidation) dienen reduzierte Schwefelverbindungen wiederum anaeroben phototrophen Mikroorganismen als Elektronendonatoren und chemotrophen Mikroorganismen als Energiequelle. Zu den letzteren, welche auch „farblose Schwefelbakterien“ genannt werden, zählen u.a. die Genera *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiobacterium*, *Macromonas*, *Achromatium*, *Thiomargarita* und die Archaea *Sulfolobus* und *Acidianus*. Die meisten dieser Schwefelkomponenten-oxidierenden-Organismen nutzen Sauerstoff für eine aerobe Atmung, jedoch sind einige Vertreter auch zu einer anaeroben Atmung mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor befähigt [Robertson und Kuenen, 1999; Schulz et al., 1999; Brüser et al., 2000; Rabus et al., 2000]. Tab. 3.2 zeigt eine Einteilung der Bakterien, die für ihren Stoffwechsel anorganische Schwefelverbindungen nutzen.

3.1.5 Anoxygene phototrophe Schwefelbakterien

Die anoxygenen phototrophen Schwefelbakterien nutzen reduzierte Schwefelverbindungen (Sulfid, Thiosulfat, S^0 , Polysulfide) als Elektronendonatoren für die photosynthetische CO_2 - Reduktion. Das auffälligste Merkmal der anoxygenen phototrophen Bakterien ist ihre Fähigkeit zur Durchführung eines Licht-abhängigen, Bacteriochlorophyll-vermittelten Energietransferprozesses unter anoxischen Bedingungen. Ihre natürlichen Standorte sind die anaeroben Zonen in Gewässern (Tümpel, Teiche, Seen, Flüsse, Lagunen, Meeresarme, Meer, Kläranlagen, Salz- und Sodaseen) sowie in feuchten Böden, Schlamm und im Watt, dort wo sowohl Sulfid als auch Licht vorhanden sind [Trüper und Fischer, 1982; Fischer, 1989; Imhoff et al., 2005; Imhoff, 2005a].

Zu diesen Bakterien zählen die Familien der Purpurschwefelbakterien (*Chromatiaceae*), Purpur Nichtschwefelbakterien (*Rhodospirillaceae*), Ectothiorhodospiraceae, Grünen Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*), Filamentöse Anoxyphotobakterien (*Chloroflexaceae*) und die der *Heliobacteria* [Kondratieva et al., 1999; Overmann und Garcia-Pichel, 2000; Imhoff et al., 2005]. Bei anoxygenen phototrophen Schwefelbakterien verläuft die Oxidation von Sulfid über das Intermediat biogener S^0 , welcher bei den Purpurschwefelbakterien intrazellulär im Periplasma gespeichert, und bei den Grünen Schwefelbakterien, den Grünen Nichtschwefelbakterien, einigen Purpur Nichtschwefelbakterien, Heliobakterien und den *Extothiorhodospiraceae* extrazellulär abgelagert wird. Bei den meisten Anoxyphotobakterien ist das Endprodukt der Schwefeloxidation Sulfat, manchmal ist biogener S^0 das Endprodukt [Dahl und Prange, 2006]. Durch die verschiedenen photosynthetischen Pigmente erscheinen Kulturen von anoxygenen phototrophen Bakterien grün, gelbgrün, dunkelgrün, rot, rosa oder violett [Imhoff, 2005a].

Die Gram-negativen **Purpurschwefelbakterien** zählen zu den Gammaproteobakterien und es sind hauptsächlich aquatische Bakterien. Die am häufigsten vorkommenden photosynthetischen Pigmente sind Bacteriochlorophyll *a* und *b* und verschiedene Carotinoide der Spirilloxanthin-, Rhodopinal-, Spheroiden- und Okenon-Serie. Die photosynthetischen Pigmente und die Strukturen des photosynthetischen Apparats befinden sich auf einem ausgedehnten System von internen Membranen, welche der Cytoplasmamembran entstammen und mit dieser verbunden sind. Diese intrazellulären Membranen bestehen meistens aus Vesikeln (bei *Thiocapsa pfennigii* bestehen die Membranen aus Tubuli [Overmann und Garcia-Pichel, 2000]). Liegen Membranstapel vor, so können diese parallel oder in einem

bestimmten Winkel zur Cytoplasmamembran angeordnet sein. Auf ihnen befinden sich der photosynthetische Apparat, die photosynthetischen Reaktionszentren, und die Licht-erntenden Pigment-Protein Komplexe, welche die Reaktionszentren umgeben [Imhoff, 2005a; 2005b]. Für ihre Photosynthese können Purpurschwefelbakterien nicht H₂O als Elektronendonator verwenden, sondern müssen auf stärker reduzierte Verbindungen wie die bereits erwähnten reduzierten Schwefelverbindungen, aber auch auf H₂ und einige einfache organische Verbindungen zurückgreifen. Purpurschwefelbakterien zeichnen sich durch einen flexiblen Stoffwechsel aus. Während einige Vertreter strikt anaerob und obligat phototroph leben, können andere im Dunkeln unter aeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen chemolithoautotroph oder chemoorganoheterotroph wachsen und unter anaeroben Bedingungen gespeicherte Kohlenhydratreservestoffe fermentieren. Photosynthese findet nur unter anoxischen Bedingungen statt, da O₂ die Synthese der photosynthetischen Pigmente und des photosynthetischen Apparats unterdrückt. Tab. 3.3 zeigt eine Aufstellung der physiologischen Funktionen von Schwefelverbindungen für phototrophe Bakterien.

Tab. 3.3: Physiologische Funktionen von Schwefelverbindungen in phototrophen Bakterien [zusammengestellt nach Fischer, 1986; 1989].

	Metabolismus	Schwefelverbindung	Funktion der Schwefelverbindung
1.	Dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel	Sulfid, S ⁰ , Thiosulfat	Elektronendonator für anaerobe Photosynthese
2.	Assimilatorische Sulfatreduktion	Sulfat	Ausgangsstoff zur Biosynthese von schwefelhaltigen Zellkomponenten
3.	Aerober/ mikroaerober Dunkelstoffwechsel	Thiosulfat, S ⁰	Energiequelle für chemolithotrophes/ heterotrophes Wachstum
4.	Fermentativer Dunkelstoffwechsel	S ⁰	Elektronenakzeptor zur Fermentation von Kohlenhydratspeicherstoffen

Zur Familie der Purpurschwefelbakterien zählen 23 Genera. Einige sind durch den Besitz von Flagellen beweglich und besitzen Gasvesikeln. Die Zellen können kugelig, vibrioid, ei-, oder stäbchenförmig sein. CO₂ wird über den reduktiven Pentosephosphatweg fixiert [Imhoff, 2005a].

Grüne Schwefelbakterien sind ebenfalls wie die Purpurschwefelbakterien Gram-negative hauptsächlich aquatische Bakterien, die zur Photosynthese unter anoxischen Bedingungen befähigt sind. Wie bei den Purpurschwefelbakterien unterscheidet sich ihr photosynthetischer Metabolismus von dem der Cyanobakterien, Algen und grünen Pflanzen insofern, als H_2O nicht als photosynthetischer Elektronendonator dienen kann und daher kein O_2 gebildet wird. Wie die Purpurschwefelbakterien benötigen die Grünen Schwefelbakterien für die photosynthetische CO_2 -Assimilation z. B. reduzierte Schwefelverbindungen (Sulfid und S^0 , sowie einige Thiosulfat) oder H_2 [Overmann, 2000].

Sie besitzen spezielle sehr empfindliche Licht-erntende Strukturen, die Chlorosomen, die es den Zellen ermöglichen, bereits bei einer Lichtstärke von nur $0,25 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ photosynthetisch aktiv zu sein [Overmann, 2005]. Die Zelle eines Grünen Schwefelbakteriums besitzt zwischen 200 und 250 Chlorosomen. Ein Chlorosom kann aus mehr als 200.000 BChl *c*, *d* oder *e* Molekülen bestehen [Bryant und Frigaard, 2004; 2006]. Die Zellen sind kugel- und eiförmig, länglich oder gebogen stäbchenförmig und die meisten Genera sind unbeweglich. Kulturen von Grünen Schwefelbakterien erscheinen entweder dunkelgrün oder braun. Für die grüne Färbung sind Bacteriochlorophylle des *c* oder *d* Typs, sowie Chlorobacten, OH-Chlorobacten und γ -Carotin verantwortlich, während die braune Färbung durch Bacteriochlorophyll *e* und *a* und die Carotinoide Isorenieraten und β -Isorenieraten verursacht wird [Overmann, 2005].

Grüne Schwefelbakterien unterscheiden sich von den Purpurschwefelbakterien durch ihre strikt anaerob phototrophe Lebensweise. Unter mixotrophen Bedingungen sind sie in der Lage, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und CO_2 , eine Reihe von einfachen organischen Verbindungen zu photoassimilieren. Im Gegensatz zu den Purpurschwefelbakterien fixieren Grüne Schwefelbakterien CO_2 über den reduktiven Zitronensäurezyklus und sind nicht in der Lage, assimilatorische Sulfatreduktion zu betreiben [Overmann, 2000; 2005]. Bezüglich des Besitzes von Gasvesikeln können die Grünen Schwefelbakterien in 2 Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe (die Genera *Prosthecochloris* und *Chlorobium*) besitzt keine Gasvesikeln und hat dadurch einen Vorteil in Medien mit hoher Sulfidkonzentration (bis 7 mM) und starken Lichtintensitäten (bis $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Die zweite Gruppe, die im Besitz von Gasvesikeln ist, hat einen selektiven Vorteil in Medien mit schwachen Sulfidkonzentrationen (bis 0,4 mM) und geringen Lichtintensitäten (bis $5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) [Overmann, 2000; 2005].

3.1.6 Biogener Schwefel

Der von phototrophen und chemotrophen Mikroorganismen gebildete biogene S^0 , der auch als „Schwefelkugel“ bezeichnet wird, unterscheidet sich grundlegend vom technischen S^0 [Prange, 2001; Dahl et al. 2002]. Ein historischer Rückblick und der aktuelle Wissensstand über den biogenen S^0 werden hier kurz zusammengefasst.

Das erste Schwefelbakterium mit Schwefelein Schlüssen wurde von Warming [1875, zitiert in Dahl und Prange, 2006] beschrieben (*Monas muelleri*, heute *Thiovulum muelleri*). Der biogene S^0 wurde bei der ersten detaillierten Charakterisierung von Schwefelbakterien von Winogradsky [1887, zitiert in Prange, 2001] als *amorph* bezeichnet. In der Folgezeit wurden viele verschiedene Techniken angewandt, um die molekulare Struktur des biogenen S^0 aufzuklären. So beschrieben Hageage und Mitarbeiter [1970] den intrazellulären biogenen S^0 in Purpurschwefelbakterien als meta-stabile flüssige Modifikationen von Cyclooctaschwefel (S_8). Später wurde von Guererro und Mitarbeitern [1984] angenommen, dass es sich dabei um *hydrierten* S^0 handelte. Um die Hydrophilität des biogenen S^0 zu erklären, postulierten Steudel und Mitarbeiter [1987], dass der biogene S^0 mit amphiphilen Komponenten versehen sein müsste.

Der aktuelle Stand der Forschung beschreibt drei verschiedene Formen des biogenen S^0 , welche mittels Röntgenabsorptions-Nahkantenstruktur Spektroskopie (X-Ray Absorption Near Edge Structure, XANES) nachgewiesen werden konnten [Prange et al., 2002]:

- i) Bei Anoxyphotobakterien besteht sowohl der intrazellulär gespeicherte als auch der extrazellulär abgelagerte biogene S^0 zu 80 % aus längeren S^0 -Ketten und zu 20 % aus organischem Polysulfan mit der Struktur C-S-H/C-S-S-C. In *A. vinosum* ist der biogene S^0 periplasmatisch lokalisiert [Pattaragulwanit et al., 1998].
- ii) Bei den chemotrophen *Beggiatoa alba* und *Thiomargarita namibiensis* wurde der biogene S^0 als Cyclooctaschwefel (S_8) identifiziert. Während *B. alba* biogenen S^0 periplasmatisch abgelagert [Larkin und Strohl, 1983], geschieht dies bei *T. namibiensis* cytoplasmatisch [Schulz et al., 1999; Schulz und Jørgensen, 2001].
- iii) Der biogene S^0 beim chemotrophen *Acidithiobacillus ferrooxidans* kommt in Form von Polythionaten vor, die aus langen S^0 -Ketten mit SO_3^{2-} -Enden bestehen (Tab. 3.1).

Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass der biogene S^0 in Purpurschwefelbakterien von einer 2,5 nm dicken Hülle umgeben ist [Nicolson und Schmidt,

1971], die als Proteinhülle identifiziert und deren einzelne Proteine charakterisiert wurden [Brune, 1995a]. Diese Schwefelkugelhülle besteht bei *A. vinosum* aus drei verschiedenen hydrophoben Proteinen, wobei das „Sulfur globule protein A“ (SgpA) eine Größe von 10,5 kDa, das SgpB eine Größe von 10,6 kDa und das SgpC eine Größe von 8,5 kDa aufweist.

Dagegen besteht die Hülle bei *Thiocapsa roseopersicina* nur aus zwei Proteinen mit Größen von 10,7 und 8,7 kDa. Da sowohl die kleineren Hüllproteine als auch die größeren aus beiden Organismen zueinander und untereinander homolog sind, schloss Brune [1995a] daraus, dass die Hüllproteine stark konserviert sind. Die Hüllproteine aus *Beggiatoa* bestehen aus 3 verschiedenen Proteinen mit molekularen Größen von 11 kDa, 13 kDa und 15 kDa [Schmidt und DiSpirito, 1990].

Die Funktion der Hüllproteine ist bislang unbekannt [Dahl und Prange, 2006]. Da sie aber Ähnlichkeiten zu einigen Zellwandproteinen von Pflanzen oder zum Keratin aufweisen, wird eine strukturelle Funktion angenommen [Brune, 1995a]. Das SgpC wurde für die Elastizität der Schwefelkugeln verantwortlich gemacht [Prange et al., 2004]. Es wurde zunächst vermutet, dass der biogene S^0 durch die Hüllproteine in seiner chemischen Form geschützt wird [Prange, 2001]. Da aber die chemische Struktur des intrazellulären und extrazellulären biogenen S^0 identisch ist, kann diese Hypothese nicht länger aufrecht gehalten werden [Dahl und Prange, 2006].

Puchkova und Mitarbeiter [1975] konnten durch mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass der extrazellulär abgelagerte biogene S^0 von Grünen Schwefelbakterien durch nicht näher bestimmte *Säcke* eingeschlossen wird. Bisher konnte keine Homologie zu den für die Schwefelkugelhüllproteine von *A. vinosum* codierenden Genen nachgewiesen werden [Pattaragulwanit et al., 1998]. Dies bedeutet jedoch nur, dass Grüne Schwefelbakterien nicht die gleichen Hüllproteine exprimieren wie *A. vinosum*, lässt aber die Frage offen, ob der extrazellulär abgelagerte biogene S^0 von einer anders zusammengesetzten Proteinhülle oder einem Lipidmonolayer umgeben ist.

Aufgrund der dargestellten Vielfältigkeit an biogenem S^0 ist auch die große Anzahl an unterschiedlichen Stoffwechselwegen zur Metabolisierung von biogenem S^0 verständlich [Dahl und Prange, 2006].

3.1.7 Bioverfügbarkeit von Elementarschwefel

Die Wasserlöslichkeit von Elementarschwefel ist mit 5 µg/L bei 25°C extrem gering [Boulégué, 1978] und der Gehalt des im Wasser gelösten S⁰ reicht in der Regel für ein bakterielles Wachstum nicht aus. Da der Stofftransport über die wässrige Phase erfolgt, müssen Mikroorganismen auf spezielle Mechanismen zurückgreifen, mit denen sie den S⁰ bioverfügbar machen. Unter Bioverfügbarkeit wird die Zugänglichkeit und Aufnehmbarkeit von Substanzen verstanden, wobei die Zellen mit den Substraten in Kontakt kommen müssen [Fritsche, 1998]. Hauptsächlich wird der Begriff in der Literatur für die toxische Wirkung von Schwermetallen in Böden und Gewässern verwendet, kann jedoch auch für ungiftige schwerlösliche Substanzen angewandt werden [Michel und Ludwig, 2005].

Dennoch gibt es verschiedene Mikroorganismen, die Mechanismen entwickelt haben, um das Problem der geringen Löslichkeit von S⁰ zu umgehen und die dieses Substrat nutzen können. Einige Bakterien, wie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, greifen S⁰ enzymatisch an [Bacon und Ingledew, 1989]. Am Beispiel von *Acidithiobacillus thiooxidans* zeigten Schaeffer und Umbreit [1963], dass einige Mikroorganismen biologische Tenside bilden, um den S⁰ bioverfügbar zu machen. Die Löslichkeit von S⁰ erhöht sich bei Zugabe von neutralen Tensiden um den Faktor 5000 [Steudel und Holdt, 1988].

Einige Prokaryoten benötigen zur Bioverfügbarmachung von schwer löslichen Substanzen direkten Kontakt zu diesen Stoffen. Solcher Organismen bedient man sich u. a. im so genannten „*biomining*“, ein im Bergbau zur Metallgewinnung von erzhaltigem Gestein angewandtes biotechnologisches Verfahren, um unlösliche Metallsulfide in wasserlösliche Sulfate zu konvertieren [Rawlings, 2005]. Das Grüne Schwefelbakterium *Chlorobium limicola* bildet für einen solchen Kontakt „Haftfüßchen“ zu biogenen S⁰-Kristallen aus [Pibernat und Arbella, 1996]. Für die Bioverfügbarmachung von S⁰ nutzt *Wolinella succinogenes* die Tatsache, dass durch eine chemische Reaktion bei gleichzeitiger Anwesenheit von S⁰ und Sulfid im Medium wasserlösliche Polysulfide entstehen. Polysulfide sind unterschiedlich lange Ketten von Schwefelatomen der Oxidationsstufe Null, die auf beiden Seiten von negativ geladenen Sulfidionen flankiert werden. Mit diesen gelösten Polysulfiden betreibt *W. succinogenes* eine Polysulfidatmung [Klimmek et al., 1998; Lin et al., 2004].

Bei Anoxyphotobakterien waren die Mechanismen, mit denen die Zellen den schwer wasserlöslichen S⁰ als photosynthetischen Elektronendonator nutzen können, bislang unbekannt [Brune, 1995b; Frigaard und Bryant, 2004; Dahl und Prange, 2006].

3.2 Biotechnologische Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

3.2.1 Die Entstehung von Sulfid und seine Toxizität

Der physikalische Zustand von Sulfid ist stark pH abhängig. Unter einem pH-Wert von 5 tritt ausschließlich der gasförmige Schwefelwasserstoff (H_2S) auf, bei neutralem pH-Wert sind H_2S und das flüssige Hydrogensulfid (HS^-) im Gleichgewicht. Nur in stark basischem Milieu (pH 14) kommt das zweifach negativ geladene Sulfidion (S^{2-}) vor [Steudel, 2000; 2003]. Sulfid ist stark korrosiv und leicht an seinem Geruch nach faulen Eiern zu erkennen.

In der Natur wird Sulfid durch Sulfat- und S^0 -reduzierende Mikroorganismen gebildet. Als anthropogene Sulfidquellen sind die Erdöl und Erdgas fördernde Industrie sowie die Verarbeitung der fossilen Brennstoffe und die Biogasproduktion zu nennen [Janssen et al., 2000]. Der Anteil an H_2S variiert in verschiedenen Erdgasvorkommen. „Süßgas“ ist fast frei von H_2S während „Sauergas“ in Norddeutschland bis zu 25 % und in Kanada sogar bis zu 50 % H_2S enthalten kann [Steudel, 1996]. Der Prozess der Proteolyse, in dem H_2S bei der Erdöl- und Erdgasbildung und Biogasproduktion entstand, ist zwar biologischer Natur, da es sich jedoch bei der Förderung und Verarbeitung von fossilen Brennstoffen bzw. bei der Vergärung von organischem Material zur Biogasproduktion um eine durch Menschen betriebene Verfahrenstechnik handelt, spricht man auch hier von anthropogener Sulfidquelle.

Tab. 3.4: Gesundheitsschädliche Auswirkungen von H_2S auf den Menschen in Abhängigkeit von der Konzentration [Matsché et al., 2005].

H_2S [ppm]	Wirkung
0,002-0,15	Geruchsschwelle
3-5	Deutliche Geruchsbelästigung
10	maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert)
20	Sehstörungen
50-100	Ernsthafte Augenschäden
50-250	Verlust des Geruchssinnes
300-500	Ernsthafte Schädigung der Atemwege
500-1.000	Lebensgefahr

Sulfid ist bereits in geringen Konzentrationen für die meisten Lebewesen äußerst giftig, da es die Enzyme der aeroben Atmungskette inhibiert [Griesbeck et al., 2000]. Aufgrund seiner Korrosivität und Toxizität darf anthropogenes Sulfid nicht in die Umwelt gelangen. Biogas, Erdöl und Erdgas müssen vor ihrer Verbrennung in Heizanlagen, Verbrennungsmotoren und Kraftwerken „entschwefelt“ werden, da sonst das H_2S zu SO_2 oxidiert, welches in der Atmosphäre sauren Regen verursacht [Alloway und Ayres, 1996].

Tab. 3.4 zeigt die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von H_2S in Abhängigkeit von der Konzentration. Der Geruchsschwellenwert von H_2S beträgt je nach Empfindlichkeit zwischen 0,002 und 0,15 ppm. Für den Arbeitsschutz gilt eine maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von 10 ppm, erste ernsthafte Gesundheitsschäden können schon ab einer Konzentration von 20 ppm auftreten [Matsché et al., 2005].

3.2.2 Konventionelle Verfahren zur Sulfidentfernung

Bei der „Entschwefelung“ von Erd- und Biogas können physikalische, chemische und biotechnologische Verfahren eingesetzt werden. [Eow, 2002]. In der Industrie werden hauptsächlich physikalisch-chemische Verfahren angewandt, welche meistens auf einer Weiterentwicklung der bei der Erdgasentschwefelung erfolgreich eingesetzten Claus-Technologie beruhen [Pandey und Malhotra, 1999]. In mehrstufigen Verfahren mit Katalysatoren (z. B. Bauxit) wird so das Sulfid zu S^0 oxidiert und eine Ausbeute von bis zu 97 % erreicht. Das den Claus-Prozess verlassende und noch unterschiedlich hohe Anteile H_2S enthaltende Gas wird als „Claus-Abgas“ bezeichnet. Die Technologien zu dessen Reinigung werden in zwei Gruppen unterteilt: Prozesse die 99 % und solche die 99,9 % S^0 -Rückgewinnung erreichen. Zur ersten Gruppe zählen der Amoco Cold Bed Adsorption Prozess (CBA), der SNPA/ Lurgi Sulfreen Prozess und der IFP Prozess. Zur zweiten Gruppe zählen der Shell Claus-Off-Gas Treating (SCOT) Prozess, der Beavon- und der Wellman-Lord-Prozess. Der dreifache Nutzen einer solchen Konvertierung von H_2S zu S^0 ist die Abfallminimierung, die Rohstoffrückgewinnung und der Schutz der Umwelt [Eow, 2002]. Der Claus-Prozess ist gut für Gase mit hohem H_2S -Anteil und für kontinuierliche Verfahren geeignet. Zu den Nachteilen dagegen gehören hohe Anlagen- und Energiekosten [Buisman et al., 1990].

3.2.3 Alternative mikrobiologische Verfahren zur Sulfidentfernung

Für alternative biotechnologische Anlagen zur Entfernung von Sulfid muss das H₂S-Gas zuerst über einen Gaswäscher als Sulfid in Lösung gebracht werden. Dabei tritt H₂S-Gas in Kontakt mit einer leicht alkalischen Waschlösung, in der das Sulfid gebunden wird [Fischer, 1988, Janssen et al., 1997]. Biotechnologische Verfahren haben den Vorteil, dass die Reaktionen spezifisch, bei Umgebungsdruck und -temperatur, ohne die Bildung von Nebenprodukten ablaufen und keine chemischen Additive benötigen. Daher können derartige Prozesse kostengünstiger als konventionelle Verfahren betrieben werden [Jensen und Webb, 1995; Janssen et al., 2001; Eow, 2002].

Grundsätzlich kommen als Biokatalysatoren chemotrophe und phototrophe Organismen in Frage. Aerobe chemolithoautotrophe *Thiobacilli* wurden erfolgreich zur Sulfidentfernung eingesetzt [Jensen und Webb, 1995; Janssen et al., 1997; 1998, Buisman et al., 1990; 1991]. Sulfid wird dabei zu biogenem S⁰ oxidiert, welches aus dem System zurückgewonnen werden kann. Durch eine komplexe Prozesssteuerung konnte die Oxidation des biogenen S⁰ zu Sulfat verringert werden. Es wird zwischen Prozessen mit und ohne Biomasserückführung unterschieden [Janssen et al., 2001].

In der Literatur wurden auch alternative Verfahren zur Sulfidentfernung unter Anwendung von heterotrophen Mikroorganismen beschrieben, obwohl deren Einsatz wegen einer Limitierung von organischen Stoffen im Abwasser oft nicht vorteilhaft ist [Jensen und Webb, 1995]. Als Beispiel dazu wird der von Cho und Mitarbeitern [1992] beschriebene Prozess unter Anwendung von *Xanthomonas* sp. Stamm DY44 angeführt.

Eine weitere mögliche Alternative zum Claus-Prozess ist der Einsatz von Grünen Schwefelbakterien. Der besondere Vorteil von Grünen Schwefelbakterien liegt darin, dass die Organismen hohe Sulfidkonzentrationen (bis 10 mM) tolerieren und mit geringen Lichtintensitäten auskommen [Fischer, 1988; Overmann, 2000; 2005].

Cork und Mitarbeiter [1983; 1986] entwickelten ein schematisch in Abb. 3.3 dargestelltes Verfahren in dem *Chlorobium limicola* zur Sulfidoxidation eingesetzt wurde und erreichten zeitweise eine 99,9 % Entfernung des Sulfids. Davon konnten 67,1 % als biogener S^0 zurückgewonnen werden.

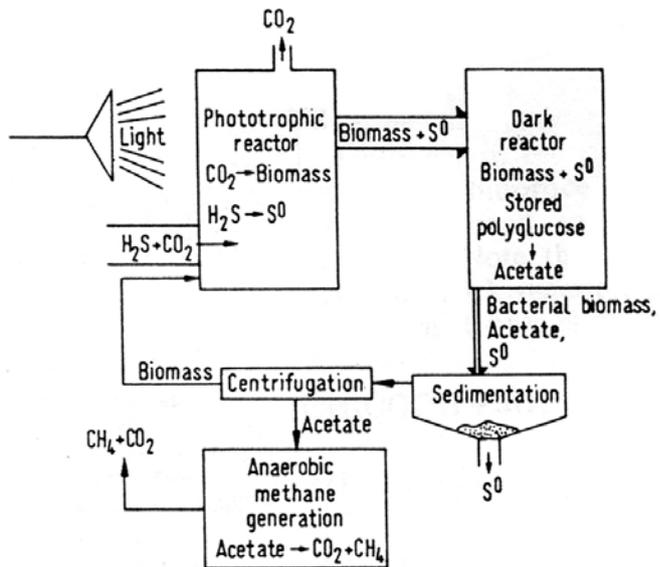


Abb. 3.3: Modell eines biotechnologischen Verfahrens zur Produktion von biogenem S^0 aus H_2S -Gas nach Cork [1986]. Der Photoreaktor enthält *Chlorobium limicola* (Abb. aus Fischer [1988]).

In einem weiteren komplexen zweistufigen Prozess (schematisch dargestellt in Abb. 3.4) zur Produktion von biogenem S^0 aus sulfathaltigem Abwasser wurden in der ersten Stufe sulfatreduzierende Bakterien eingesetzt, welche Sulfat zu Sulfid reduzierten [Cork et al., 1986]. In der zweiten Stufe wurde in einem Photobioreaktor das Sulfid durch *Chlorobium limicola* zu biogenem S^0 oxidiert.

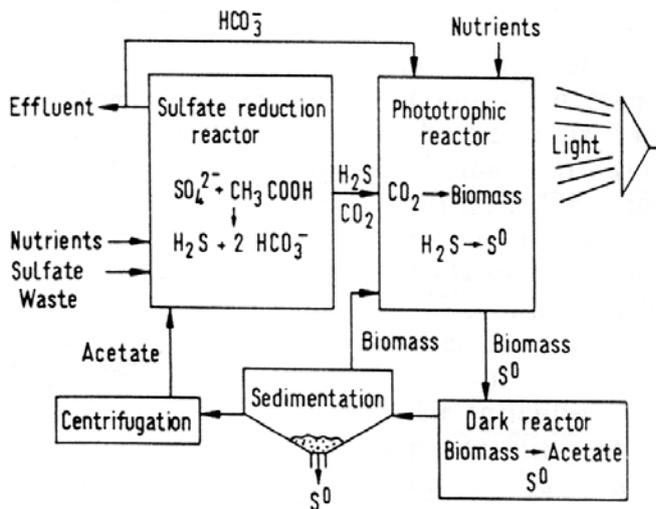


Abb. 3.4: Modell eines zweistufigen biotechnologischen Verfahrens zur Produktion von biogenem S^0 aus Sulfat nach Cork [1986]. Der Sulfatreduktionsreaktor enthält *Desulfobacter postgateii*, der Photobioreaktor enthält *Chlorobium limicola* (Abb. aus Fischer [1988]).

Hurse und Keller [2004a; 2004b, 2004c] entwickelten einen wirkungsvollen Lamellenphotoreaktor in welchem sie allgemein anoxygene phototrophe Bakterien anreicherten, da sie an der Zweckmäßigkeit eines Einsatzes von Reinkulturen zur Sulfidentfernung aus unsterilem Abwasser zweifelten.

Trotz der beschriebenen Vorteile der vorgestellten biotechnologischen Verfahren im Vergleich zu den physikalisch-chemischen, hat jedoch noch keine der Entwicklungen die industrielle Marktreife erlangt. Um die „klassischen“ Verfahren durch die „alternativen“ zu ersetzen, besteht Bedarf an weiterer Forschung und Entwicklung.

3.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit waren es, Untersuchungen

1. zur Bioverfügbarkeit von S^0 und biogenem S^0 durch anoxygene phototrophe Grüne- und Purpurschwefelbakterien und
2. zur Elimination von Sulfid aus entsprechend belasteten Medien durch den Einsatz von Anoxyphotobakterien

durchzuführen.

Ad 1. Es sollte untersucht werden, ob diese anoxygenen phototrophen Bakterien den angebotenen S^0 bzw. den biogenen S^0 unterschiedlich bioverfügbar machen und wie sich dies auf das Wachstumsverhalten auswirkt. Dazu sollte auch eine Beteiligung von oberflächenaktiven Biodetergentien untersucht werden. Mittels gelelektrophoretischen Techniken sollte außerdem nachgewiesen werden, dass für die Verwertung von S^0 bzw. biogenem S^0 zusätzliche Proteine/ Enzyme exprimiert werden müssen, die beim Wachstum mit Sulfid nicht von Nöten sind. Für die Untersuchungen wurden *P. vibrioformis*, *A. vinosum* und *A. vinosum* 21D als Vertreter der Grünen- bzw. Purpurschwefelbakterien eingesetzt.

Ad 2. Hierzu sollten in einem semikontinuierlich bzw. semikontinuierlich mit fed-batch Perioden betriebenen Photobioreaktor Kulturen von *Prosthecochloris vibrioformis* bzw. *Allochromatium vinosum* 21D eingesetzt werden, um durch entsprechende Prozesssteuerung die Effizienz der Sulfidentfernung bei gleichzeitiger Rückgewinnung des Rohstoffes biogener S^0 zu optimieren. Die Anwendung des Purpurschwefelbakteriums *A. vinosum* 21D dürfte besonders vorteilhaft sein, da diese Mutante den gespeicherten biogenen S^0 nicht mehr zu Sulfat weiter oxidieren kann [Pott und Dahl, 1998], so dass letzteres Oxidationsprodukt nicht noch zusätzlich durch ein weiteres (bio) technologisches Verfahren entsorgt werden muss.

4 Material, Methoden und Methodenentwicklung

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Untersuchte Mikroorganismen

In Tab. 4.1. sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Anoxyphotobakterien zusammengestellt.

Tab. 4.1: Liste der verwendeten anoxygenen phototrophen Bakterien.

Organismen	Familie	Herkunft	DSMZ[*]-Katalog- nummer bzw. Literatur
<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	<i>Chlorobiaceae</i>	} AG Marine Mikrobiologie } Universität Bremen	DSM 263
<i>Allochromatium minutissimum</i>	<i>Chromatiaceae</i>		DSM 1376
<i>Allochromatium vinosum</i>		DSMZ [*]	DSM 180
<i>Allochromatium vinosum</i> 21D		PD Dr. Christiane Dahl, Universität Bonn	[Pott und Dahl, 1998]

*Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

Tab. 4.2: Marines Basismineralmedium modifiziert nach Overmann [2000].

Substanz	Konzentration [g/L] in Aqua dest.
NaCl	18,7
MgCl ₂	7,62
KCl	0,4
NH ₄ Cl	0,4
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,4
CaCl ₂ x 4H ₂ O	0,1

Tab. 4.3: Zusätze zum marinen Basismineralmedium modifiziert nach Overmann [2000].

Substanz	[mM] oder [mL/L]
NaHS	1 mM
KH ₂ PO ₄	7,5 mM
NaHCO ₃ (CO ₂ -gesättigt)	17,89 mM
Spurenelemente-Lösung SL 10	1 mL/L
7 Vitamine-Lösung	1 mL/L

Tab. 4.4: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung SL 10 [Overmann, 2000].

Komponenten	Menge
	ad 1.000 mL Aqua dest.
HCl (25 %)	10 mL
FeSO ₄ x 7 H ₂ O*	2 g
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg

*Das FeSO₄ x 7 H₂O wurde zuerst in HCl gelöst, dann wurde das Aqua dest. zugegeben und dann die weiteren Komponenten.

Tab. 4.5: Zusammensetzung der 7-Vitamine-Lösung [Vogt, 1997].

Komponenten	Konzentration [mg/L]
	in Aqua dest.
4-Aminobenzoesäure	80
D (+)-Biotin	20
Nicotinsäure	200
Ca-D (+)-Panthothenat	100
Pyridoxaminhydrochlorid	300
Thiamindichlorid	200
Cyanocobalamin	100

4.1.2.2 Kulturbedingungen und Anzucht von *Prosthecochloris vibrioformis*

Prosthecochloris vibrioformis DSM 263 (vormals: *Chlorobium vibrioforme* forma *thiosulfatophilum* [Imhoff, 2003b]) wurde der Bakteriensammlung der AG Marine Mikrobiologie, Universität Bremen, entnommen und photolithoautotroph in bis zum Rand mit marinem Mineralsalzmedium, modifiziert nach Overmann [2000], gefüllten 60 und 120 mL Serumflaschen bzw. 500 mL Kulturflaschen in einem Inkubationsschrank (Kühlinkubator MIR-253, Sanyo) bei 30°C und Lichtintensitäten von 5-10 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR (Quantitherm, Hansatech) angezogen. Vorkulturen wurden mixotroph mit zusätzlich Acetat (10 mM) und Thiosulfat (10 mM) angezüchtet.

Tab. 4.6: Süßwasser Basismineralsalzmedium modifiziert nach Imhoff [2003a].

Substanz	Konzentration [g/L] in Aqua dest.
NaCl	0,4
KCl	0,4
NH ₄ Cl	0,4
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,4
CaCl ₂ x 4H ₂ O	0,1

Tab. 4.7: Zusätze zum Süßwasser Basismineralsalzmedium modifiziert nach Imhoff [2003a].

Substanz	[mM] oder [mL/L]
NaHS	1 mM
KH ₂ PO ₄	7,5 mM
NaHCO ₃ (CO ₂ -gesättigt)	17,89 mM
Spurenelemente-Lösung SL 12	1 mL/L
7-Vitamine-Lösung	1 mL/L

4.1.2.3 Kulturbedingungen und Anzucht von Purpurschwefelbakterien

Allochromatium minutissimum DSM 1376 (vormals *Chromatium minutissimum* [Imhoff et al., 1998]) wurde der Bakteriensammlung der AG Marine Mikrobiologie, Universität Bremen, entnommen. *Allochromatium vinosum* DSM 180 (vormals *Chromatium vinosum* [Imhoff et al., 1998]) entstammt der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. Die Mutante *Allochromatium vinosum* 21D wurde freundlicherweise von PD Dr. Christiane Dahl, Universität Bonn, für Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

Kulturen von Purpurschwefelbakterien wurden photolithoautotroph in bis zum Rand mit Süßwasser Mineralsalzmedium, modifiziert nach Imhoff [2003a], gefüllten 60 und 120 mL Serumflaschen bzw. 500 mL Kulturflaschen in dem bereits beschriebenen Inkubationsschrank bei 30°C und Lichtintensitäten von 10-30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR angezogen. Vorkulturen wurden mixotroph mit zusätzlich Acetat (10 mM) bzw. für *A. vinosum* 21D mit Acetat (10 mM) und Malat (10 mM) kultiviert. Zur Anzucht von *A. vinosum* 21D wurden dem Medium zusätzlich Kanamycin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugesetzt.

Tab. 4.8: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung SL 12 [Imhoff, 2003a].

Komponenten	Konzentration (mg/L)
	in Aqua dest.
Na ₂ -EDTA (Titriplex III)	3.000
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1.100
ZnCl ₂	42
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	18

4.1.3 Langzeitkonservierung von Anoxyphotobakterien

Zur Langzeitkonservierung von Anoxyphotobakterien wurden von gut gewachsenen mixotroph angezogenen Kulturen 1,2 mL in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert, mit 300 µL sterilem Glycerin versetzt, gevortext und bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise konnten Anoxyphotobakterien mehrere Monate lang gelagert werden. Die Reinokulation erfolgte durch direktes Transferieren der 1,5 mL Bakterien-Glycerin-Suspension in bis zum Rand mit marinem bzw. Süßwasser Mineralsalzmedium, modifiziert nach Overmann [2000] bzw. Imhoff [2003a], gefüllte 15 mL Kulturflaschen und deren anschließender Inkubation unter den oben angegebenen Bedingungen.

4.1.4 Anlegen von Reinkulturen von Anoxyphotobakterien mittels Agarverdünnungsreihen

Die von der DSMZ erhaltenen Kulturen wurden mikroskopisch (Zeiss Axiolab) auf deren Reinheit überprüft. Da diese Kulturen kontaminiert waren, für die weiteren Untersuchungen aber Reinkulturen erforderlich waren, mussten diese erst angelegt werden. Dazu wurde eine Agarverdünnungsreihe, modifiziert nach Larsen [1952], angewandt. Für 10 Verdünnungsstufen wurden jeweils 2,5 mL Agarlösung (1,8 %) in 10 Reagenzgläser pipettiert. Die Reagenzgläser wurden mit Aluminiumkappen verschlossen, autoklaviert und anschließend im Wasserbad bei 50°C temperiert. Dann wurden 6 mL steriles auf 50°C vorgewärmtes Süßwasser Mineralsalzmedium, modifiziert nach Imhoff [2003a], aseptisch in die temperierten Reagenzgläser pipettiert. In das erste Reagenzglas wurden 100 µL Inokulum gefüllt, mit einem sterilen Butylstopfen verschlossen und gemischt. Aus diesem Reagenzglas wurde anschließend aseptisch 1 mL entnommen und in das zweite Reagenzglas pipettiert, welches ebenfalls mit einem sterilen Butylstopfen verschlossen und gemischt wurde. Dieser Vorgang wurde bis zum 10. Reagenzglas wiederholt. Nachdem der Agar erstarrt war, wurden die Reagenzgläser unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach etwa 2 Wochen wurde der Agar aus dem Reagenzglas unter der Sterilbank in eine sterile Petrischale transferiert und mit Hilfe eines sterilen Skalpell eine vereinzelt Kolonie herauspräpariert. Diese wurde in eine bis zum Rand mit Süßwasser Mineralsalzmedium, modifiziert nach Imhoff [2003a], gefüllte 15 mL Kulturflasche transferiert und unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert.

4.1.5 Versuchsansätze zu Wachstumsuntersuchungen von Anoxyphotobakterien mit unterschiedlichen Schwefelspezies als photosynthetische Elektronendonatoren

Für diese Wachstumsuntersuchungen wurden 12 mL einer unter photolithoautotrophen Bedingungen gut gewachsenen Vorkultur von Grünen- und Purpurschwefelbakterien unter sterilen Bedingungen bei 7.500 x g für 10 min (Avanti 325, Beckman, Rotor JA20) zentrifugiert, um noch eventuell vorhandene lösliche Schwefelkomponenten zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in 120 mL sterilem marinem bzw. Süßwasser Mineralsalzmedium, modifiziert nach Overmann [2000] bzw. Imhoff [2003a], resuspendiert. Als photosynthetische Elektronendonatoren wurden die in Tab. 4.9 aufgelisteten Schwefelspezies verwendet.

Tab. 4.9: Schwefelspezies (und für die Untersuchungen eingesetzte Konzentrationen) als photosynthetische Elektronendonatoren für das Wachstum von Grünen- und Purpurschwefelbakterien.

Elektronendonator	Konzentration (mM)
1. S ⁰	40-400
2. Biogener S ⁰ von <i>A. vinosum</i>	20
3. Biogener S ⁰ von <i>P. vibrioformis</i>	28-80
4. Sulfid (als Kontrolle)	1-7

Da das S⁰-Pulver aus unterschiedlich großen Partikeln bestand, wurde es erst mittels Kaffeemühle zerkleinert, um das so hergestellte homogene S⁰-Pulver dann als photosynthetischen Elektronendonator einsetzen zu können. Das homogenisierte S⁰-Pulver wurde außerdem 1 h lang bei 80°C im Trockenschrank erhitzt, um eventuell darin vorhandene lebende Mikroorganismen abzutöten. Erst nach dieser Behandlung wurde das S⁰-Pulver in den in Tab 4.9 angegebenen Konzentrationen den Kulturgefäßen zugesetzt und mittels Magnetührstäbchen den Kulturlösungen beigemischt. Die Inkubation der Versuchsansätze erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen.

4.2 Präparative Methoden

4.2.1 Herstellung von sterilem anoxischem Aqua dest.

Für einige Präparationsschritte war es notwendig, steriles anoxisches Aqua dest. einzusetzen. Zu dessen Herstellung wurden 500 mL Aqua dest. (Milli-Q plus, Millipore) in einer Schottflasche 20 min lang bei 121°C autoklaviert und sofort danach für 20 min mit N₂ begast.

4.2.2 Isolation von intrazellulärem biogenem S⁰ aus *A. vinosum*

Zur Produktion von intrazellulärem biogenem S⁰ durch *A. vinosum* wurde eine gut gewachsene Kultur von *A. vinosum* mit 4 mM Sulfid versetzt. Nach etwa 3 h war das Sulfid zu biogenem S⁰ oxidiert und intrazellulär gespeichert. 1.000 mL dieser Kultur wurden durch Zentrifugation (10.000 x g, 15 min, Avanti 325, Beckman, Rotor JA10) abgeerntet, und das Pellet wurde in 10 mL kommerziellem RS Puffer zusammen mit 0,05 % EDTA (0,5 M) plus 0,05 % Lysozymlösung (100 mg/ml H₂O: Glycerin 4:1 v/v) resuspendiert. Das Kulturmedium wurde während des gesamten Erntevorgangs mit N₂ begast. Nach Inkubation (1 h, 37°C im Wasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik) wurden die Zellen in dieser Suspension unter Kühlung in einem Eiswasserbad 2 x 5 min durch Ultraschall (Cell Disrupter 250, Branson, duty cycle: 80 %, intensity: 7) aufgebrochen.

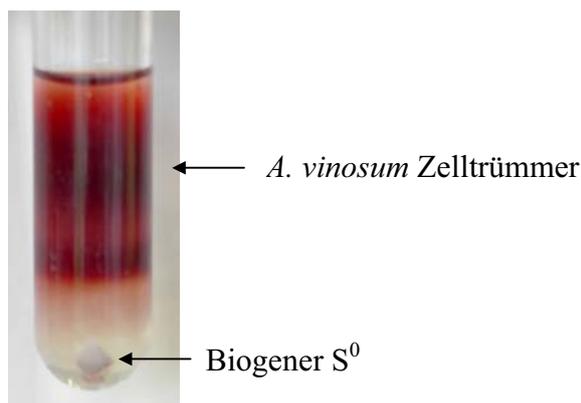


Abb. 4.2: Sedimentierter biogener S⁰ von *A. vinosum* nach Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll (48.000 x g, 80 min). Weitere Einzelheiten im Text.

Zur Trennung des biogenen S⁰ von Zellbestandteilen mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden 6,5 ml Percoll, 1 mL NaCl (1,5 M), 2,5 mL H₂O und 400 µL Zellsuspension vorsichtig übereinander in ein Corex Zentrifugenröhrchen aufgetragen. Anschließend wurde

zentrifugiert (Avanti 325, Beckman, Rotor JA20, 80 min bei 48.000 x g). Durch dieses Zentrifugationsverfahren sedimentierte der biogene S^0 zu Boden, während sich die Zelltrümmer im Überstand befanden, welcher vorsichtig abgehoben wurde (Abb. 4.2). Der biogene S^0 wurde in 100 μ L anoxischem Aqua dest. (Herstellung: Kap. 4.2.1) aufgenommen und 20 min lang bei 80°C erhitzt, um eventuell noch vorhandene lebende Zellen von *A. vinosum* abzutöten. Bis zur weiteren Verwendung wurde der so präparierte biogene S^0 bei 4°C aufbewahrt.

4.2.3 Präparation von extrazellulärem biogenem S^0 von *P. vibrioformis*

Zur Produktion von extrazellulärem biogenem S^0 wurde eine in einer 5.000 mL Kulturflasche gut gewachsene Kultur von *P. vibrioformis* mit 7 mM Sulfid versetzt. Nachdem das Sulfid durch die Zellen zu biogenem S^0 oxidiert und extrazellulär abgelagert worden war, wurde die gesamte Kultur abzentrifugiert (9.000 x g, 10 min, Avanti 325, Beckman, Rotor JA10) und alle Pellets zum Schluss in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Das Kulturmedium wurde während des gesamten Erntevorgangs mit N_2 begast. Der biogene S^0 sedimentierte zum Boden des Zentrifugenröhrchens (Abb. 4.3), während sich die Zellen darüber ablagerten und mit einem Spatel entfernt werden konnten. Danach wurde das biogene S^0 -Pellet dreimal mit anoxischem Aqua dest. (Herstellung: Kap. 4.2.1) gewaschen (Zentrifugation: 9.000 x g, 10 min, Avanti 325, Beckman, Rotor JA20). Der auf diese Weise erhaltene biogene S^0 wurde anschließend 20 min lang auf 80°C erhitzt, um eventuell vorhandene lebende Zellen abzutöten. Bis zur weiteren Verwendung wurde der so erhaltene biogene S^0 bei 4°C aufbewahrt.

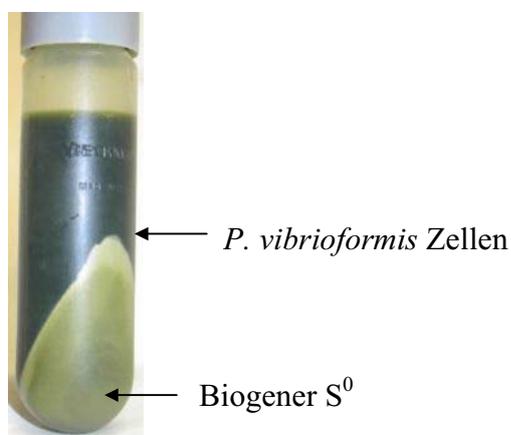


Abb. 4.3: Sedimentierter biogener S^0 von *P. vibrioformis* nach Zentrifugation (7.500 x g, 10 min). Weitere Einzelheiten im Text.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Bestimmung von biogenem S^0 mittels HPLC

Die Bestimmung des Gehalts an biogenem S^0 wurde nach der von Rethmeier und Mitarbeitern [1997] beschriebenen Methode durchgeführt. Den Versuchsansätzen wurden 50 μ L Probe mit sterilen Spitzen entnommen. Die 50 μ L Proben wurden mit 50 μ L Chloroform ausgeschüttelt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Das Chloroform bewirkte, dass sich unpolarer S^0 vollständig in Cyclooctaschwefel (S_8) umwandelte [Rethmeier et al. 1997]. Der S^0 in der Chloroformfraktion wurde durch Reversed Phase HPLC (RP HPLC) bei einer Flussrate von 1 ml/min (Laufmittel: 95 % Methanol, 5 % Aqua dest.) aufgetrennt und durch UV Absorption bei einer Wellenlänge von 263 nm bestimmt. Das chromatographische System von Merck-Hitachi bestand dabei aus einem AS 2000A Autosampler, einer L-6210 Intelligent HPLC Pumpe, einer Li-Chrospher 100 RP Säule (125-4; 5 μ m), einem L-7350 Säulenofen (35°C) und einem UV/VIS Detektor L-4250. Die Kalibration erfolgte mit Standardlösungen (0 - 1 mM). Zur Auswertung der Daten wurde die Merck D-6000 HPLC-Manager Software angewandt.

4.3.2 Bestimmung von Sulfat mittels HPLC

Im Gegensatz zu hydrophilem biogenem S^0 von *P. vibrioformis* und *A. vinosum*, von dem eine homogene Probe entnommen werden kann [Pott und Dahl, 1998], ist dies für den hydrophoben S^0 in wässrigen Systemen nicht möglich [Then und Trüper, 1983; 1984; Suzuki et al., 1999]. Für Untersuchungen mit S^0 als photosynthetischem Elektronendonator wurde daher anstelle der S^0 -Konzentrationsabnahme die Sulfatbildung als Maß für die S^0 -Verwertung herangezogen [Emmel et al., 1986; Franz et al., 2006].

Die Sulfatmessung wurde nach der von Alain und Mitarbeitern [2006] beschriebenen Methode in der Abteilung Mikrobiologie des Max Planck Instituts für Marine Mikrobiologie, Bremen, durchgeführt. Den Versuchsansätzen wurden 100 μ L Probe mit sterilen Spitzen entnommen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Säule 1:50 mit anoxischem Aqua dest. (Kap. 4.2.1) verdünnt. Das Sulfat wurde ionenchromatographisch aufgetrennt und durch Konduktivitätsmessung bestimmt. Das chromatographische System von Waters bestand dabei aus einem WISP 712 Autosampler, einer 510 HPLC Pumpe, einer IC-Pak Anionenaustauschersäule (50x 4,6 mm) und einem 430 Konduktivitätsdetektor. Das

Laufmittel (pH 4.5) setzte sich aus Isophthalsäure (1 mM) und Methanol (10 %) zusammen und war auf eine Flussrate von 1 ml/min eingestellt. Die Kalibration erfolgte mit Standardlösungen (0 - 1 mM). Zur Auswertung der Daten wurde die Software ChromStar 6.2 (SCPA GmbH) angewandt.

4.3.3 Bestimmung von Sulfid mittels HPLC

Die Bestimmung der Sulfidkonzentration wurde in Anlehnung an eine Methode nach Rethmeier und Mitarbeiter [1997] durchgeführt, die auf der Derivatisierung der Thiole mit Monobrombiman nach Fahey und Newton [1987] beruht. Einige Parameter mussten jedoch modifiziert werden, um das Detektionslimit von Sulfid zu verringern. Den Versuchsansätzen wurden 50 µL Probe mit sterilen Spitzen entnommen. Zu den 50 µL Proben wurden sofort 50 µL N₂-begaster HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 8), 50 µL N₂-begastes Acetonitril und 10 µL einer N₂-begasten Monobrombimanlösung (48 mM Monobrombiman in Acetonitril) gegeben. Die Proben wurden gevortext und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL Methansulfonsäure (65 mM) gestoppt. Von diesem Derivatisierungsansatz wurden 20 µL auf die Säule aufgetragen (Probenschleifenbeschickungsmodus: „All Volume“).

Tab. 4.10 Elutionsgradient zur Auftrennung derivatisierter Schwefelverbindungen mittels HPLC [Rethmeier et al., 1997].

Zeit (min)	Eluent A	Eluent B
0	88	12
7	88	12
15	70	30
19	70	30
23	50	50
30	0	100
33	0	100
33,1	88	12
36	88	12

Das Merck-Hitachi Chromatographische System bestand aus einem AS 2000A Autosampler, einer L-6210 Intelligent HPLC Pumpe, einem 885-5192 Mixer, einer Li-Chrospher 60 RP select B Säule (125-4, 5µm) mit einer Vorsäule (4-4, 5µm), einem L-7350 Säulenofen (35°C), und einem F-1050 Fluoreszenz Spektrophotometer. Für das Reinigen der Probenschleife wurden 5 mL Waschlösung (88 % Essigsäure (0,25 % pH 4) und 12 % Methanol) pro Zyklus eingesetzt. Der Elutionsgradient unter Verwendung von 2 Laufmitteln (A: Essigsäure 0,25 %, pH 4; B: Methanol 100 %) ist in Tab. 4.10 dargestellt. Die derivatisierten Schwefelverbindungen wurden bei 380 nm angeregt und die Emission bei 480 nm gemessen. Zur Identifikation der in den Proben der Versuchsansätze erscheinenden Peaks wurden Sulfid, Thiosulfat und Sulfit mit Standardlösungen (0-1 mM) kalibriert und so die Retentionszeiten dieser Substanzen ermittelt. Eine 0,5 M Polysulfidlösung, bestehend aus verschiedenen langen Polysulfiden, wurde nach Ikeda und Mitarbeitern [1972] hergestellt. Dazu wurden in einer 120 mL Serumflasche unter ständigem Begasen von Argon 12 g Na₂S zusammen mit 1,6 g S⁰ unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührstab in 100 mL anoxischem Aqua dest. (Kap. 4.2.1) gelöst und die Flasche sofort mit einem Butylstopfen verschlossen. Die Polysulfide konnten nicht kalibriert werden, da keine Standards zur Verfügung standen. Polysulfide sind in wässrigen Lösungen auf Grund von Disproportionierungsreaktionen extrem instabil [Gun et al., 2004]. Zur Identifikation der Reagenzsubstanzpeaks wurden zum Derivatisationsansatz anstelle einer Probe aus den Versuchsansätzen 50 µL Aqua dest. zugesetzt. Zur Auswertung der Daten wurde die Merck-Hitachi D-6000 HPLC Manager Software angewandt. Zur graphischen Aufbereitung der Chromatogramme wurden die Chromatographiedaten zunächst in ASCII Code (Accelerated Strategic Computing Initiative) konvertiert und im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel weiterbearbeitet.

4.3.4 Trockengewichtsbestimmung

Für die Trockengewichtsbestimmung wurden 100 mL eines Versuchsansatzes mit Purpurschwefelbakterien über einen Papierfilter (595 ½ RN 311647, Schleicher & Schüll) filtriert und das Filtrat verworfen. Nach 24 h Trocknen bei 60°C wurde das Filterpapier gewogen.

4.3.5 Bestimmung des Gehalts an Bacteriochlorophyll *a* bzw. *d*

Bakterielles Wachstum wurde anhand des Gehalts an Bacteriochlorophyll *a* für *A. vinosum* bzw. *d* für *P. vibrioformis*, nach einer Extraktion mit Methanol bestimmt. Dazu wurde den jeweiligen Kulturen zu verschiedenen Zeiten je 1 mL Probe entnommen und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 mL Methanol resuspendiert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde erneut zentrifugiert (10 min, 10.000 x g) und die Absorption des Überstandes bei 770 nm für Bacteriochlorophyll *a* bzw. 657 nm für Bacteriochlorophyll *d* gemessen (DU[®]-640 Spectrophotometer, Beckman).

Gleichung 1:

$$\text{BChl } a \text{ (mg/L)} = E_{770} / \varepsilon_{\text{BChl } a} \times 1000$$

Gleichung 2:

$$\text{BChl } d \text{ (mg/L)} = E_{657} / \varepsilon_{\text{BChl } d} \times 1000$$

Die Bacteriochlorophyll *a*- bzw. *d*-Konzentrationen wurden nach Gleichung 1 bzw. 2 berechnet, wobei E_{770} die Extinktion bei 770nm, $\varepsilon_{\text{BChl } a}$ der Extinktionskoeffizient (84,1) für Bacteriochlorophyll *a*, E_{657} die Extinktion bei 657 nm und $\varepsilon_{\text{BChl } d}$ der Extinktionskoeffizient (82,3) für Bacteriochlorophyll *d* ist [Stal et al., 1984].

4.3.6 Messung der Oberflächenspannung

Zum Nachweis, ob Anoxyphotobakterien bei der Verwertung von S^0 bzw. biogenem S^0 oberflächenaktive Substanzen bilden, wurde die Oberflächenspannung der Kulturmedien gemessen. Die Durchführung der Experimente erfolgte am Institut für Angewandte und Physikalische Chemie (Leitung: Prof. Dr. Markus Bäumer) im Fachbereich Biologie/ Chemie der Universität Bremen mittels einer speziellen Anlage nach Schaefer [2004], die auf dem Prinzip der Blasentensiometrie beruht. Das Reservoir und das Manometer U-Rohr wurden mit 500 mL bzw. 10 mL Leitungswasser (Raumtemperatur) gefüllt. Dann wurde eine Kulturflasche eines Versuchsansatzes (Raumtemperatur) geöffnet und die Messkapillare so tief eingetaucht, dass die Spitze des Oberflächen-Abstandshalters gerade die Oberfläche des Mediums berührte. Mittels vorsichtiger Regulation am Messhahn wurde Wasser vom Reservoir ins Auffanggefäß geleitet. An der Spitze der Messkapillare entstand eine Luftblase, deren Druck beim Loslösen von der Messkapillare einen Maximalwert erreichte. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die Höhendifferenz der Wasserstände in den beiden Schenkeln des

Manometer U-Rohres ihren Maximalwert. Die Wasserstände auf beiden Seiten des Manometer U-Rohrs wurden auf einem dahinter angehefteten Millimeterpapier markiert (Abb. 4.4).

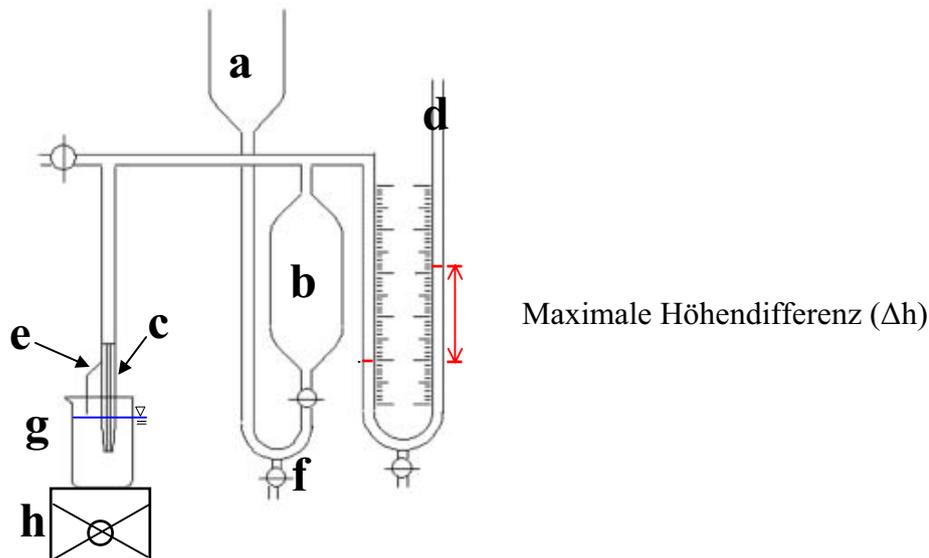


Abb. 4.4: Schema der Anlage zur Messung der Oberflächenspannung von Lösungen mittels Blasentensiometrie. Reservoir (a), Auffanggefäß (b), Messkapillare (c), Manometer U-Rohr (d), Oberflächen-Abstandshalter (e), Messhahn (f), Gefäß (g), Laborboy-Minischraub Bühne (h). Modifiziert nach Schaefer [2004].

Gleichung 3:

$$\sigma = (\delta_{H_2O} \times \Delta h - \delta_p \times h_k) \times r_k g / 2$$

Dieser Wert (Δh in cm) wurde für die Berechnung der Oberflächenspannung gemäß Gleichung 3 eingesetzt, wobei σ die Oberflächenspannung der Probe in mN/m, δ_{H_2O} die Dichte von Wasser (0,9981 g/cm), δ_p die Dichte der Messprobe (0,9981 g/cm), h_k die Eintauchtiefe der Messkapillare (0,9 cm), r_k der Messkapillarendurchmesser (0,0223 cm) und g die Erdbeschleunigung (981 cm/s²) ist [Schaefer, 2004].

4.4 Mikroskopische Untersuchungen

4.4.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Kulturen von anoxygenen phototrophen Bakterien wurden mittels Mikroskop (Axiolab LabStar, Zeiss) in regelmäßigen Abständen auf ihre Reinheit kontrolliert. Lichtmikroskopisch wurde auch das Anhaften der Zellen an S^0 -bzw. biogene S^0 -Kristalle bei 1.000 facher Vergrößerung dokumentiert.

4.4.2 Präparation von Proben für die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Zur Präparation von *P. vibrioformis* Zellen für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden je 1 mL einer mit S^0 und biogenem S^0 gewachsenen Kultur zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Die im Pellet befindlichen Zellen wurden in 200 μ L Fixationslösung A (2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylat) resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixationsmittel wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit Na-Cacodylat (0,05 M) und für je 10 min mit Leitungswasser unter leichtem Schwenken ausgewaschen (Zentrifugation: 4.000 rpm, 5 min). Dann wurden die Zellen mit Fixationslösung B (OsO_4 2 % in 0,05 M Na-Cacodylat) für 1 h unter leichtem Schwenken nachfixiert. Die Fixationslösung B wurde durch dreimaliges Waschen mit Na-Cacodylat (0,05 M) für je 20 min und durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser für je 20 min unter leichtem Schwenken ausgewaschen (Zentrifugation: jeweils 5 min, 4.000 rpm).

Entwässerung mit Ethanol: Das fixierte Material wurde in einer Verdünnungsreihe mit aufsteigenden Konzentrationen an Ethanol (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) entwässert. Dabei wurden die fixierten Zellen in jeder Verdünnungsstufe zweimal für 20 min unter leichtem Schwenken inkubiert (Zentrifugation: 4.000 rpm, 5 min).

Entwässerung mit Diethylether: Alternativ wurde die Entwässerung mit Diethylether, modifiziert nach Bücking [1995], durchgeführt. Dazu wurden die nachfixierten Zellen in Diethylether (p.a.) überführt und für 2 Wochen bei Raumtemperatur im Abzug gelagert.

Einbettung: Die Einbettung in Epoxydharz [Bücking, 1995] erfolgte in 4 Stufen wie in Tab. 4.11 angegeben.

Tab. 4.11: Protokoll zur Einbettung von Osmium-fixierten, entwässerten Bakterienzellen in Epoxydharz zur Herstellung von Präparaten für die Transmissionselektronenmikroskopie [Bücking, 1995].

	Ethanol (%)	Epoxydharz (%)	Dauer (h)
Stufe 1	75	25	1 x \geq 8
Stufe 2	50	50	2 x 2
Stufe 3	25	75	2 x 2
Stufe 4		100	1 x \geq 8 und 1 x 2

Das Epoxydharz wurde im Wärmeschrank für 12 h bei 70°C polymerisiert. Ultradünnschnitte in der Dicke von 25 -100 μm wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung) angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranyl kontrastiert und im Transmissionselektronenmikroskop der Abteilung Pflanzenphysiologie des UFT (Leitung: Prof. Dr. Wolfgang Heyser) der Universität Bremen analysiert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zum Vergleich der Proteinmuster extrazellulärer Enzyme und ganzer Zellen bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit verschiedenen Elektronendonatoren (Sulfid, biogener S^0 , S^0) wurden dem Versuchsansatz im halbmaximalen Wachstumszustand 200 μL Probe entnommen und in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 4°C, 10 min) wurde der Überstand abgenommen, um später als Probe für die Gelelektrophorese der extrazellulären Proteine eingesetzt zu werden. Das Pellet wurde in 200 μL sterilem anoxischem Aqua dest. (Herstellung: Kap. 4.2.1) resuspendiert und später für die Gelelektrophorese der Proteine ganzer Zellen (Whole cell proteins, WCP) eingesetzt. Falls die Proben nicht sofort weiterbearbeitet werden konnten, wurden beide Fraktionen sofort in flüssigem N_2 tiefgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Tab. 4.12: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers zur Durchführung einer SDS PAGE nach Laemmli [1970].

Substanz	Konzentration
Tris-HCl, 1 M (pH 6,8)	100 mM
SDS, 10 % (w/v)	4 %
Bromphenolblau, 1 % (w/v)	0,2 %
Glycerin	20 %
Dithiothreitol*	200 mM

*Dithiothreitol wurde erst direkt vor Gebrauch zugegeben.

Um in allen Gelspuren die gleichen Proteinmengen vergleichen zu können, wurde der Bacteriochlorophyll *d*-Gehalt als Maß für die Biomasse Konzentration gewählt. Die Proben wurden mit der gleichen Menge an Probenpuffer (Tab. 4.12) versetzt und für 15 min im Wasserbad bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Xcell SureLock™ Novex Mini-Cell, Invitrogen), die mit 1:20 verdünntem NuPAGE® MOPS-SDS-Laufpuffer und einem Fertiggel (NuPAGE® Novex® 12% Bis-Tris, Invitrogen) versehen wurde. Die Geltaschen wurden mit 5 µl Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Range 10-200 kDa, Fermentas, 1:10) bzw. 7 µl Probe beladen und die Auftrennung bei 4°C mit 150 V, 70 mA und 10 W für ca. 2 h durchgeführt [Laemmli, 1970]. Die Färbung der aufgetrennten Proteine wurde mit Silbernitrat, modifiziert nach Wiechmann [1993], durchgeführt. Die Silberfärbung ist eine der sensitivsten, nichtradioaktiven Färbemethoden für Proteine. Zunächst erfolgte eine Fixierung der Proteine im Gel unter Schwenken auf einem Schüttler (80 rpm; Unimax 2010, Heidolph). Dabei wurde das Gel mit Fixierer A für 30 min, mit Fixierer B für 20 min (Tab. 4.13) sowie mit Glutaraldehyd (10 %) für 20 min inkubiert.

Tab. 4.13: Zusammensetzung der Fixierlösungen A und B zur Färbung eines Gels nach einer SDS PAGE, modifiziert nach Wiechmann [1993].

Lösungsmittel	Fixierer A	Fixierer B
	ad 1.000 mL	ad 1.000 mL
	Aqua dest.	Aqua dest.
Methanol	500 mL	50 mL
Essigsäure	100 mL	70 mL

Anschließend wurde das Gel für mindestens 30 min mit 100 ml Aqua dest. durch Schwenken auf dem Schüttler (80 rpm) gewaschen. Dann wurden 100 mL einer Dithiothreitol-Lösung (500 mg/L) zugegeben und unter Schwenken (80 rpm) auf dem Schüttler für 20 min inkubiert.

Tab. 4.14: Zusammensetzung der Entwicklerlösung zur Färbung eines Gels nach einer SDS PAGE, modifiziert nach Wiechmann [1993].

Substanz	Konzentration
	ad Aqua dest.
Na ₂ CO ₃	3 %
Formaldehyd	0,0185 %

Die Lösung wurde dekantiert und das Gel mit 100 mL einer Silbernitratlösung (0,1 %) erneut für 20 min auf dem Schüttler (80 rpm) inkubiert. Das Gel wurde mit wenig Aqua dest. gespült und zweimal mit Entwickler (Tab. 4.14) überschichtet. Sobald eine gute Anfärbung der Banden zu erkennen war, wurde die Reaktion mit etwa 5 mL Zitronensäure (2,3 M) gestoppt. Zur Konservierung wurde das Gel nach kurzem Waschen mit Aqua dest. mit einer Na₂CO₃-Lösung (0,03 %) für 10 min auf dem Schüttler (80 rpm) inkubiert und dann in eine Plastikfolie eingeschweißt. Anschließend wurde das Gel photographisch dokumentiert.

4.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)

Zum Vergleich der Proteinmuster bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit verschiedenen photosynthetischen Elektronendonatoren (Sulfid und S⁰) wurden im halbmaximalen Wachstumszustand jeweils 1 L einer Kultur durch Zentrifugation (9.000 rpm, 4°C, 10 min, Avanti 325, Beckman) geerntet. Die Pellets wurden in 200 µL 2DE Probenpuffer (Tab. 4.15) einmal gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im gleichen Puffer (100 µL) resuspendiert.

Tab. 4.15: Zusammensetzung des 2DE Probenpuffers zur Vorbereitung von Proben für eine zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) nach Affeldt [2005].

Substanz	Konzentration
	ad Aqua dest.
Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	5 mM

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets in 300 μL Solubilisierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 3 % (w/v) CHAPS, 1 % (v/v) DTT, 1 % (v/v) IPG-Puffer pH 4 - 7) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde diese Suspension in ein Grinding-Kit Reaktionsgefäß (Amersham Bioscience) überführt und nach den Angaben des Herstellers mechanisch aufgeschlossen. Diese Suspension wurde in Polycarbonat Ultrazentrifugationsgefäße (Beckman) überführt und für 1,5 h bei 75.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Optima MAX-E, Beckman Coulter), um intakte Zellen, Zelltrümmer und Membranen von den solubilisierten Proteinen zu trennen. Dem Überstand wurde ein Aliquot (30 μL) zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen, der Rest des Überstandes auf drei 500- μL -Reaktionsgefäße (Eppendorf) aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Für den Vergleich von Proteinmustern nach elektrophoretischer Trennung ist es von großer Bedeutung, gleiche Proteinkonzentrationen auf die Gele aufzutragen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der von Bradford [1976] beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Standardkurve mit verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Es wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen dieses Proteins mit Farbreagenz (BioRad) vermischt (5:1, v/v), 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm photometrisch gemessen (UV mini 1240, Shimadzu). Mit dem Zellextrakt wurden ebenfalls Verdünnungen hergestellt (1:1.000, 1:2.000, 1:5.000, 1:10.000) und damit gleichermaßen verfahren.

Die zweidimensionale Protein Gelelektrophorese nach Jacob [2005] sowie die anschließende Färbung mit Silbernitrat, modifiziert nach Heukeshoven und Dernick [1988], wurden in der Abteilung Mikrobiologie des Max Planck Instituts für Marine Mikrobiologie, Bremen, durchgeführt. Von den unterschiedlichen physiologischen Zuständen wurden je 4 Gele durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Elektrophorese zu überprüfen.

Stammlösungen:

Rehydratisierungspuffer (ad Aqua dest.)

Harnstoff: 6 M

Thioharnstoff: 2 M

CHAPS: 2 % (v/v)

IPG-Puffer pH 4-7: 0,5 % (v/v)

DTT: 30 mM

Agaroselösung

Agarose: 0,5 % (w/v)

Bromphenolblau: eine kleine Spatelspitze

Laufpuffer: 100 mL

Resolving Gel Puffer (pH 8,8 mit 4 M HCl)

Tris: 1,5 M

SDS: 0,4 % (w/v)

ad 100 mL Aqua dest.

Bromphenolblau Lösung

Bromphenolblau: 0,25 % (w/v)

Na-Azid: 10 mg

ad 50 mL Resolving Gel Puffer

Basis Äquilibrierungspuffer

Harnstoff: 6 M

Glycerol: 30 % (w/v)

SDS: 2 % (w/v)

Resolving Gel Puffer: 16,7 mL

ad 500 mL Aqua dest.

Für den **Äquilibrierungspuffer I** wurden unmittelbar vor Gebrauch 2 g DTT und für den **Äquilibrierungspuffer II** 8 g Iodacetamid zu 200 ml Basis Äquilibrierungspuffer gegeben.

Laufpuffer (10 x)

Tris: 250 mM

Glycin: 1,92 M

SDS: 10 % (w/v)

Slab Gel Puffer

Tris: 1,08 M

Tris HCl: 0,42 M

SDS Stammlösung

SDS: 10 % (w/v)

APS-Lösung

APS: 10 % (w/v)

Erste Dimension

Die erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese war die Isoelektrische Fokussierung (IEF). Dabei wurden die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes in einem pH-Gradienten aufgetrennt. Die IPG Streifenhalter wurden am Tag vor der Analyse gründlich mit Aqua dest. gespült und über Nacht an der Luft getrocknet.

Der Rehydratisierungspuffer zur Probenverdünnung wurde unmittelbar vor dem Start hergestellt. Die Proben wurden darin so verdünnt, dass 50 µg Protein in einem Endvolumen von 450 µL enthalten waren.

Die Proben wurden in einem pH-Gradienten (pH 4-7) isoelektrisch fokussiert. Die isoelektrische Fokussierung wurde parallel mit 12 Streifen durchgeführt. Zunächst wurden die IPG Streifenhalter so mit den 450 µL Probe beladen, dass sich die Flüssigkeit homogen und luftblasenfrei zwischen den Elektroden verteilte. Dann konnten die Gelstreifen mit der Gelseite nach unten darübergerlegt werden. Anschließend wurden die Streifen homogen mit 1,5 mL Silikonöl überschichtet, um Verdunstungen zu vermeiden. Die IPG Streifenhalter wurden mit Deckeln verschlossen und in der richtigen elektrischen Orientierung auf das IPGphor (Amersham Bioscience) gelegt. Schließlich konnte der Lauf der ersten Dimension mit den in Tab. 14.16 angegebenen Spannungsgradienten erfolgen.

Tab. 14.16: Spannungsgradient zur Durchführung einer isoelektrischen Fokussierung als erste Dimension in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) nach Jacob [2005]. Weitere Einzelheiten im Text.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]
1	30	7,0
2	60	6,0
3	200	1,0
4	1000	1,0
5	1.000-8.000	0,5
6	8.000	10,0

Das Gerät wurde so programmiert, dass die Rehydratisierung der Gelstreifen und das Einlaufen der Proben bei niedriger Spannung erfolgen konnte (Schritt 1 und 2). Danach erfolgte eine kurze Unterbrechung, um Filterblättchen (Amersham Bioscience), welche mit 10 μ L H₂O befeuchtet waren, vorsichtig zwischen die Elektroden und die Gelstreifen zu legen. Dies verhinderte ein zeitlich verzögertes Einwandern der Proteine jenseits der Elektrodendrähte in das Gel. Nach erneuter Überschichtung der Streifen mit 0,5 mL Silikonöl wurde die Elektrophorese fortgesetzt.

Zweite Dimension

Nach der isoelektrischen Fokussierung folgte in der zweiten Dimension die Auftrennung der Proteine nach ihrer apparenten molekularen Masse. Da von dem nichtionischen System der IEF in ein ionisches System der SDS-PAGE gewechselt wurde, mussten die Gelstreifen nach der ersten Dimension zunächst umgepuffert werden. Dazu wurden die Streifen in Reagenzgläser überführt und mit 15 mL DTT-haltiger Äquibrierungslösung I für 15 min bei 20 rpm auf einem Wippschüttler (GFL 3014, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Das DTT spaltete reduktiv vorhandene Cysteinbrücken, musste aber in einem zweiten Äquibrierungsschritt wieder entfernt werden, da überschüssiges DTT die Silberfärbung behindert. Hierzu wurde im Äquibrierungspuffer II Iodacetamid verwendet, welches außerdem mit den entstandenen SH-Gruppen reagierte und somit eine Reoxidation verhinderte. In je 15 mL dieser Lösung wurden die Streifen für je 15 min auf dem Wippschüttler inkubiert.

Für die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde ein 12,5 % Duracrylgel hergestellt. Duracryl verleiht dem Gel eine hohe Festigkeit, wodurch die Handhabung erleichtert wird.

Tab. 14.17: Zusammensetzung des Duracrylgels, welches für die Durchführung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Jacob [2005] benötigt wird.

Reagenz	Menge [mL] für 14 Gele
Duracryl	415
Slab Gel Puffer	247
Aqua dest.	325
SDS Stammlösung (10 %)	10,3
TEMED	0,15
APS	2,49

Das Gelpolymer wurde in einer 1 L-Saugflasche angesetzt, da der Slab Gel Puffer und das Aqua dest. mit Hilfe einer Vakuumpumpe zu dem vorgelegten Duracryl gefiltert wurden. Das Gemisch wurde unter leichtem Rühren 10 min entgast. Anschließend wurde mittels einer Glaspipette das SDS hinzugefügt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Dieses Gemisch wurde dann in die vorbereitete Gießkassette gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurden die Gele in den zuvor mit Lauffpuffer befüllten Ettan-Dalt-Elektrophorese-Tank (Amersham Bioscience, Einstellungen: Temperatur: 25 °C, continuous run, auto pump) eingesetzt. Die Gelstreifen wurden mit der Oberseite nach vorne und der anodischen Seite nach links auf die Oberkante des Geles gelegt. Anschließend wurden sie mit je 1 mL Agaroselösung überschichtet. Nach Verfestigung der Agarose wurde die Elektrophorese gestartet. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde zunächst eine Leistung von 30 W angelegt, die nach Erkennen einer scharfen Bromphenoblau-Front auf 180 W erhöht wurde. Kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet, um eine optimale Trennung zu erreichen.

Silberfärbung von Duracrylgelen

Tab. 14.18 stellt die einzelnen Schritte der Silberfärbung, modifiziert nach Heukeshoven und Dernick [1988], dar. Die Proteine wurden zunächst durch Inkubation in einem Essigsäuregemisch fixiert und dann durch Inkubation in einer Silbernitratlösung gefärbt. Dabei banden die Silberionen an die Proteine und wurden während der Entwicklung zu metallischem Silber reduziert.

Die Gele wurden solange entwickelt, bis deutlich bräunliche Spots zu sehen waren. Dann wurde die Entwicklerlösung sofort abgegossen und die Abstopplösung auf das Gel gegeben, um eine Anfärbung des Hintergrunds zu vermeiden. Die erhaltenen Gele wurden in eine Plastikfolie eingeschweißt und anschließend fotografisch dokumentiert. Die Skalen, sowohl für den pH-Wert-Bereich als auch für das Molekulargewicht, wurden elektronisch hinzugefügt. Die Auswertung der Proteinspots erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Adobe Photoshop 7.0.

Tab. 14.18: Protokoll zur Färbung von Duracrylgelen mittels Silbernitrat, modifiziert nach Heukeshoven und Dernick [1988].

Schritt	Lösung	Zeit
Fixierung	50 % (v/v) Ethanol	mind. 2 h
	10% (v/v) Essigsäure	
	0,5 M Na-Acetat	
Inkubation	0,02 M Na-Thiosulfat	1 h
	50 % (v/v) Ethanol	
Waschen	Aqua dest.	2 x 5 min
Färbung	0,1 % (w/v) Silbernitrat	1 h
Waschen	Aqua dest.	~ sec
Spülen	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃	1 min
Entwickeln	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃	5-20 min
	0,01 % (v/v) Formalin	
	0,05 % (w/v) NaHCO ₃	
	0,02 % (w/v) Thimerosal	
Abstoppen	0,05 M Na-EDTA	mind. 10 min
Waschen	Aqua dest.	mind. 5 min

4.5.3 Trennung von *P. vibrioformis* Zellen und S⁰ durch eine Dialysemembran

Zur Trennung von *P. vibrioformis* Zellen und S⁰ wurde ein etwa 10 cm langer Abschnitt eines Dialyseschlauches (Spectra/Por[®] 4, Durchmesser 20,4 mm, Ausschlussgröße 12- 14 kDa) nach einer 15 min Aktivierung in sterilem, anoxischem Aqua dest. (Herstellung: Kap. 4.2.1) unter der Sterilbank auf einer Seite zugeknotet. Auf der offenen Seite wurden etwa 1,5 g steriler S⁰ mit 1 mL anoxischem Aqua dest. in den Schlauch gefüllt. Dann wurde die zweite Seite des Schlauchs möglichst luftblasenfrei zugeknotet. Das auf diese Weise hergestellte „Schwefelbonbon“ (Abb. 4.5) wurde dann in eine bis zum Rand mit marinem Mineralsalzmedium, modifiziert nach Overmann [2000], gefüllte 60 mL Serumflasche gehängt. Die Serumflasche wurde mit *P. vibrioformis* inokuliert, mit einem Butylstopfen verschlossen und unter den in Kap. 4.1.2.2 angegebenen Bedingungen inkubiert.



Abb. 4.5: Dokumentation eines „Schwefelbonbons“ zur Trennung von S⁰ und Bakterienzellen durch eine Dialysemembran.

4.6 Photobioreaktor und Prozessbedingungen für die biotechnologischen Verfahren zur Anwendung von Anoxyphotobakterien als Biokatalysatoren zur Sulfideliminierung

Die Untersuchungen zur biotechnologischen Sulfideliminierung durch *P. vibrioformis* bzw. *A. vinosum* 21D wurden in einem 5 L Photobioreaktor (Biostat[®] B, B. Braun Biotech International) durchgeführt (Abb. 4.6).

Zur Vorbereitung der Versuchsanlage wurden zunächst der Photobioreaktor sowie die Mediumvorratsflasche mit 5 L bzw. 10 L marinem bzw. Süßwasser Basismineralmedium, modifiziert nach Overmann [2000] bzw. Imhoff [2003], gefüllt (Herstellung: Kap. 4.1.2.1). Zusätzlich wurden eine 100 mL Vorratsflasche für NaHS (2 M) sowie 1.000 mL Vorratsflaschen für HCl (1 M) und NaOH (1 M) vorbereitet. Die Kupplungsenden der Verbindungsschläuche aller Gefäße wurden mit Aluminiumfolie umwickelt. Der Reaktor wurde mit einem Edelstahldeckel verschlossen, an dem sich folgende Anschlüsse befanden: Temperatur-, O₂- und pH-Sonde, Rührwerk, Einlass und Auslass für Begasung, Kupplungsenden für Lauge, Säure und NaHS, Einlass für Medium, Auslass für Produkt und für die Probenahme. Die pH-, O₂- und Temperatursonden wurden am Edelstahldeckel befestigt und die elektronischen Anschlüsse abgesteckt. Die restlichen Kupplungsenden am Deckel wurden mit Aluminiumfolie umwickelt.

Dann wurden der Reaktor sowie alle Gefäße 20 min lang bei 121°C autoklaviert (Standautoklav Tecnomara, Integra Biosciences). Nach dem Autoklavieren wurde das noch heiße Basismedium im Photobioreaktor und im Mediumvorratsgefäß mit N₂ begast. Die Zusätze (Kap. 4.1.2.1) wurden aus sterilen Stammlösungen unter der Sterilbank aseptisch zugegeben und so lange weiterbegast, bis das Medium gerade trüb wurde. Dann wurde so lange mit CO₂ begast, bis die Trübung gerade wieder verschwand. Unter der Sterilbank wurden die Aluminiumfolien von den Kupplungsenden der Schlauchanschlüsse entfernt und alle Gefäße, wie in Abb. 4.6 gezeigt, über die Kupplungen miteinander verbunden.

Danach wurden der Reaktor sowie die angeschlossenen Gefäße mittels Laborwagen zum vorgesehenen Versuchsstandort neben den stationären Fermentationscomputer transferiert. Hier wurde der Rührwerkskopf auf den Rührwerksrumpf gesetzt und die N₂- und CO₂-Gasleitungen der Laboranschlüsse an die Sterilfilter angesteckt. Die Schläuche der Säure-, Laugen- und NaHS-Vorratsflaschen wurden über die integrierten Schlauchquetschpumpen der Steuereinheit des Fermentationscomputers geleitet.

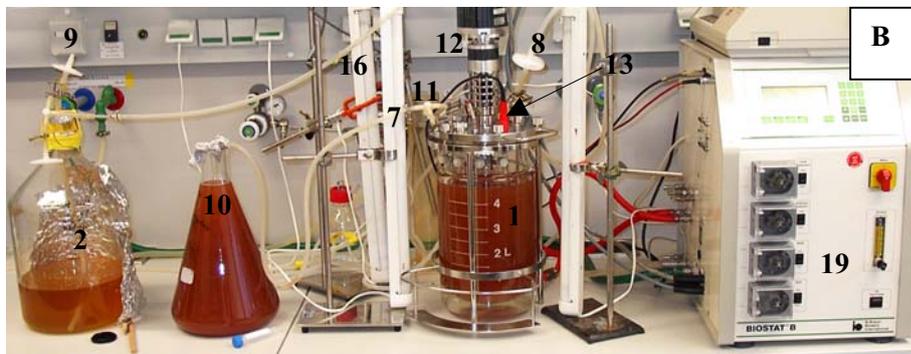
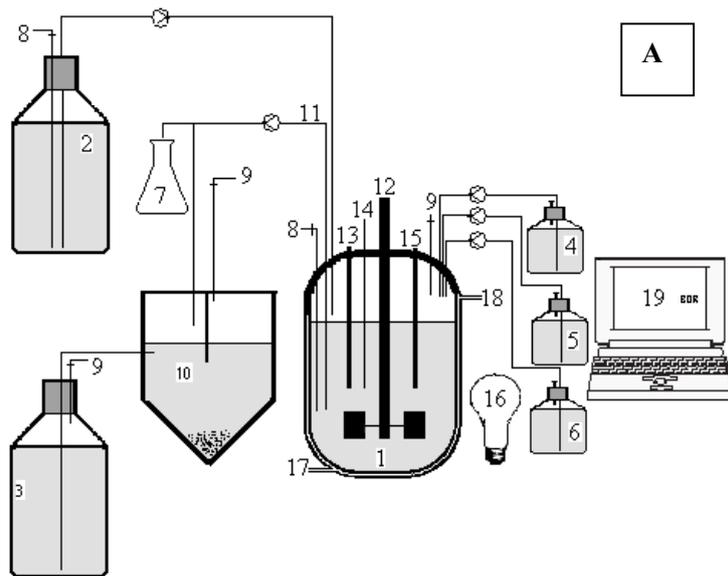


Abb. 4.6: Schema (A) und Foto (B) der Versuchsanlage zur biotechnologischen Anwendung von anoxygenen phototrophen Bakterien zur Sulfidentfernung. Photobioreaktor (1), Mediumvorratsflasche (2), Abfallbehälter (3), NaHS-Lösung (4), HCl-Lösung, 1 M (5), NaOH-Lösung, 1 M (6), Probenahmestelle (7), N₂/CO₂-Begasung über Sterilfilter (8), Gasauslass über Sterilfilter (9), Absetzbecken (10), Reaktorausgang für Produkt (11), Rührwerk (12), pH-Sonde (13), Temperatursonde (14), O₂-Sonde (15), Lichtquelle (16), Heiz- und Kühlkreislauf-Einlass (17) und -Auslass (18), Fermentationscomputer (19).

Die elektronischen Verbindungskabel der pH-, O₂- und Temperatursonden wurden ebenfalls am Computer angeschlossen. Der Photobioreaktor wurde durch 3 kreisförmig angeordnete Neonröhren (Osram L36W/30 Warm Light) kontinuierlich beleuchtet. Die gewünschten Lichtintensitäten wurden durch ein Verringern oder Vergrößern des Abstands der Neonröhren vom Reaktor erreicht. Die Lichtintensität wurde an der Oberfläche der äußeren Reaktorglaswand mit Hilfe eines Lichtstärkemessgeräts (Quantitherm, Hansatech) gemessen. Für *P. vibrioformis* bzw. *A. vinosum* 21D wurden Lichtintensitäten von 10 bzw. 30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR gewählt. Der pH-Wert (6,8 für *P. vibrioformis* bzw. 7,0 für *A. vinosum*), die Temperatur (30°C), der Sauerstoffpartialdruck (0) und die Geschwindigkeit des Rührwerks (50 rpm)

wurden computergesteuert reguliert. Die Temperatur wurde durch zirkulierendes erhitztes Wasser auf 30°C und der pH-Wert wurde mit steriler NaOH (1 M) bzw. steriler HCl (1 M) konstant gehalten. Ein doppellagiger Blattrührer diente zur Homogenisierung des Mediums (Abb 4.6).

Die Kalibration der pH-Sonde erfolgte vor dem Autoklavieren (Kalibrationspunkte pH 4 und 9), weshalb nach dem Autoklavieren nur mehr eine Einpunkt-Rekalibration im Medium erforderlich war. Dazu wurde von dem fertigen Medium, welches bereits mit Zusätzen ergänzt war, eine Probe entnommen und der pH-Wert mittels externem pH-Meter bestimmt.

Die O₂-Sonde wurde ebenfalls vor dem Autoklavieren kalibriert. Dazu wurde das Medium zuerst für 15 min mit Druckluft und dann für 30 min mit N₂ begast. Nach dem Autoklavieren musste ebenfalls nur mehr eine Einpunkt-Rekalibration im Medium vorgenommen werden, wobei festgelegt wurde, dass das fertige mit N₂/CO₂ begaste, mit Zusätzen versetzte Medium, sauerstofffrei war.

Zur Probenahme wurde mittels N₂-Begasung ein Überdruck im Reaktor angelegt, wodurch das gewünschte Probevolumen über die Probeentnahmestelle entnommen werden konnte. Für die Verdünnungsschritte wurden mittels Schlauchquetschpumpe (Multifix constant MC100-PEC, Jürgens) 2 L Medium aus dem Reaktor abgezogen und in das Absetzbecken transferiert. Anschließend wurden 2 L frisches Medium aus der Mediumvorratsflasche in den Reaktor gepumpt.

4.7 Herkunft der Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden überwiegend in p.a.-Qualität bzw. als HPLC-grade von folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (New Jersey), British Drughouse (Poole, England), Fluka (Neu Ulm), Molzym (Bremen), Riedel de Haën (Seelze), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR International (Darmstadt). Gase wurden von den Firmen Linde und Messer-Griesheim bezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Elementar- und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

5.1.1 Vorbereitende Experimente

5.1.1.1 Detektion von Sulfid mittels HPLC

Durch die in Kap. 4.3.3 beschriebenen Modifikationen der Methode von Rethmeier und Mitarbeitern [1997] zur chromatographischen Auftrennung von reduzierten Schwefelverbindungen, welche durch Monobrombiman derivatisiert waren, und deren fluoreszenzphotometrischer Detektion, wurde eine Steigerung des bis dahin erreichten Detektionslimits für Sulfid um 40 % erreicht. Sulfid konnte dadurch in Konzentrationen ab 3 μM nachgewiesen werden.

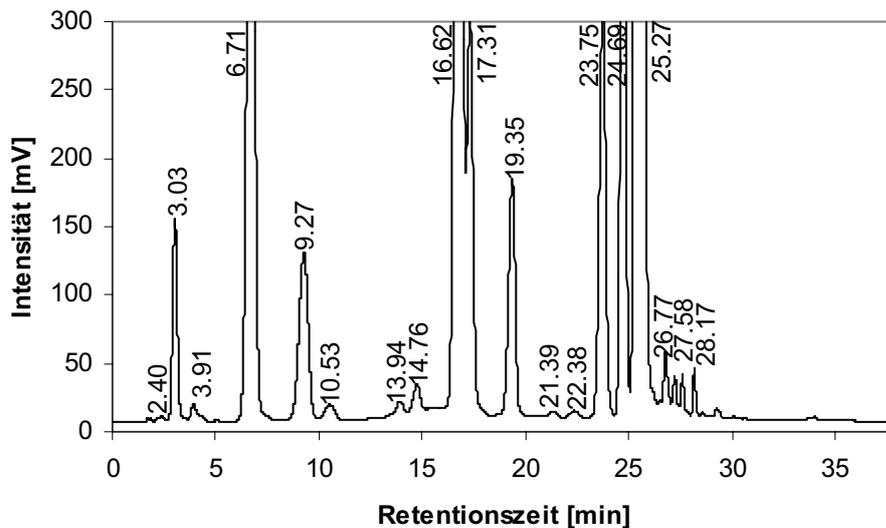


Abb. 5.1: Beispielhaftes Chromatogramm von Monobrombiman-derivatisierten reduzierten Schwefelverbindungen und Reagenzsubstanzen einer 1 mM Polysulfidlösung nach Ikeda und Mitarbeitern [1972]. Die Auftrennung erfolgte durch RP HPLC und die Detektion durch Fluoreszenzmessung. Die Zuordnung der Peaks befindet sich in Tab. 5.1. Beschreibung der Methodenparameter in Kap. 4.3.3.

Tab. 5.1: Monobrombiman-derivatisierte reduzierte Schwefelverbindungen und Reagenzsubstanzen aus dem Chromatogramm in Abb. 5.1. Die Auftrennung erfolgte durch RP HPLC und die Detektion durch Fluoreszenzmessung. Beschreibung der Methodenparameter in Kap. 4.3.3.

Retentionszeit [min]	Substanz	Retentionszeit [min]	Substanz
2,40	Reagenz	19,35	Reagenz
3,03	Sulfit	21,39	Reagenz
3,91	Reagenz	22,38	Reagenz
6,71	Thiosulfat	23,75	Reagenz
9,27	Reagenz	24,69	} Sulfid
10,53	Reagenz	25,27	
13,94	Reagenz	26,77	} vermutlich Polysulfide } verschiedener } Kettenlänge
14,76	Reagenz	27,58	
16,62	Reagenz	28,17	
17,31	Reagenz		

Abb. 5.1 zeigt ein typisches Chromatogramm von Monobrombiman-derivatisierten reduzierten Schwefelverbindungen und von Reagenzsubstanzen einer 1 mM Polysulfidlösung nach Ikeda [1972], deren Herstellung in Kap. 4.3.3 beschrieben wurde. Die Auftrennung und Detektion erfolgte mittels der in Kap. 4.3.3 beschriebenen Methode. Die Reagenzsubstanzpeaks des Chromatogramms, welche durch die Chemikalien aus dem Reagenz-Mix verursacht wurden, konnten durch Vergleich mit Nullproben identifiziert werden. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen (Sulfit, Thiosulfat, Sulfid, Polysulfide) konnten die Peaks der Schwefelverbindungen zugeordnet werden. Sulfid eluierte bei 24,69 min, gefolgt von einem zweiten Peak bei 25,27 min, bei dem es sich vermutlich um ein Dissoziationsprodukt des Monobrombiman-derivatisierten Sulfids handelte. Da diese beiden Peaks nicht getrennt werden konnten, wurden sie beide zusammen zur Berechnung der Sulfidkonzentrationen herangezogen.

5.1.1.2 Anlegen von Reinkulturen von *A. vinosum*

Für die in der vorliegenden Arbeit geplanten mikrobiologischen Untersuchungen war das Arbeiten mit Reinkulturen von Anoxyphotobakterien erforderlich. Die aus der Stammsammlung der Abteilung Marine Mikrobiologie der Universität Bremen entnommenen

Kulturen von *A. minutissimum* DSM 1376 und *P. vibrioformis* DSM 263 sowie die von PD Dr. Christiane Dahl, Universität Bonn, erhaltene Kultur von *A. vinosum* 21D wurden mikroskopisch auf Homogenität überprüft, um mögliche Kontaminationen auszuschließen. Die von der DSMZ erhaltene Kultur von *A. vinosum* DSM 180 schien auf Grund von Heterogenität verunreinigt zu sein. Daher musste von dieser Kultur mittels der in Kap. 4.1.4 beschriebenen Agarverdünnungsreihe eine Reinkultur angelegt werden. Eine vereinzelt Kolonie aus der in Abb. 5.2 dargestellten Reagenzglaskultur (Verdünnungsstufe 10^{-8}) wurde dazu, wie in Kap. 4.1.4 beschrieben, präpariert und nach dem Transfer in flüssiges Süßwasser Mineralsalzmedium (Kap. 4.1.2.1) unter den in Kap. 4.1.2.3 angegebenen Bedingungen inkubiert. Mit der auf diese Weise erhaltenen Reinkultur konnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

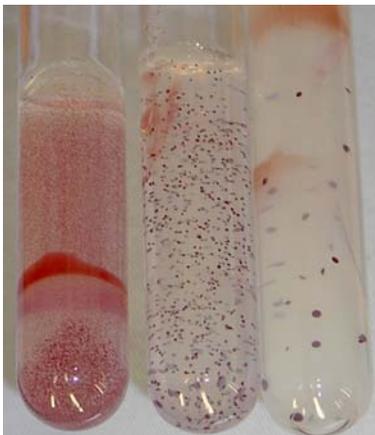


Abb. 5.2: Reagenzglaskulturen zum Anlegen einer Reinkultur von *A. vinosum* mittels Agarverdünnungsreihe. Verdünnungsstufen 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} (v.l.). Inkubationszeit: 2 Wochen unter den in Kap. 4.1.2.3 angegebenen Bedingungen.

5.1.2 Untersuchungen zum Wachstum von Anoxyphotobakterien

5.1.2.1 Photomixotrophes Wachstum von *A. minutissimum* mit biogenem S^0 und Acetat

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, Untersuchungen zur Bioverfügarmachung von S^0 bzw. biogenem S^0 durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien durchzuführen. Als Vertreter der Purpurschwefelbakterien wurde zunächst *A. minutissimum* ausgewählt. Der Organismus wurde unter den in Kap. 4.1.2.3 beschriebenen Bedingungen mit vorher präpariertem biogenem S^0 von *P. vibrioformis* kultiviert. Photolithoautotrophes Wachstum konnte jedoch weder mit biogenem S^0 noch mit Sulfid beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

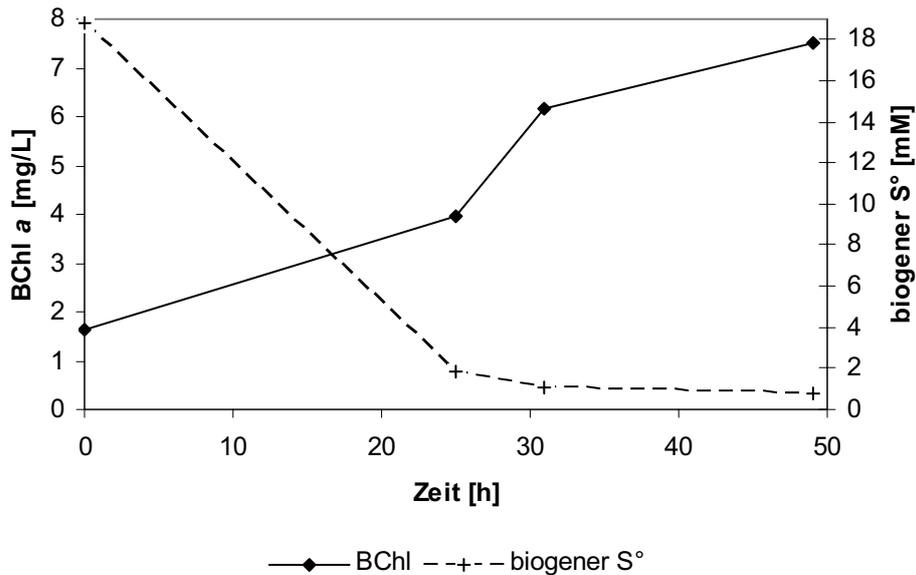


Abb. 5.3: Wachstum von *A. minutissimum* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *a*) mit vorher präpariertem biogenem S⁰ von *P. vibrioformis* und Acetat unter den in Kap. 4.1.2.3 beschriebenen Bedingungen.

Der Stamm *A. minutissimum* schien die Fähigkeit zu autotrophem Wachstum verloren zu haben. Dies könnte auf eine Spontanmutation zurückgeführt werden, welche durch jahrelanges kontinuierliches Überimpfen zu Zwecken der Stammhaltung verursacht wurde. Wurde der Kultur jedoch Acetat zugesetzt, so wurde sowohl Wachstum (Zunahme der Bacteriochlorophyll *a*-Konzentration) als auch eine Abnahme der biogenen S⁰-Konzentration gemessen. Die Abnahme der Konzentration an biogenem S⁰ korrelierte mit der Zunahme der Bacteriochlorophyll *a*-Konzentration (Abb. 5.3). Die Arbeiten mit *A. minutissimum* wurden auf Grund dieser Ergebnisse eingestellt, da für die geplanten Untersuchungen photolithoautotrophes Wachstum erforderlich war.

Daher wurde *A. vinosum* DSM 180 als Vertreter der Purpurschwefelbakterien für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, da dieser Stamm zu photolithoautotrophem Wachstum mit Sulfid als Elektronendonator fähig war (Daten nicht gezeigt).

5.1.2.2 Photolithoautotrophes Wachstum von *P. vibrioformis* mit Sulfid

Als Vertreter der Grünen Schwefelbakterien wurde *P. vibrioformis* ausgewählt. Zuerst musste die Fähigkeit dieses Organismus zu photolithoautotrophem Wachstum überprüft werden, da dies für die weiteren Untersuchungen erforderlich war. Daher wurde *P. vibrioformis* mit Sulfid (1,8 mM) unter den in Kap. 4.1.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

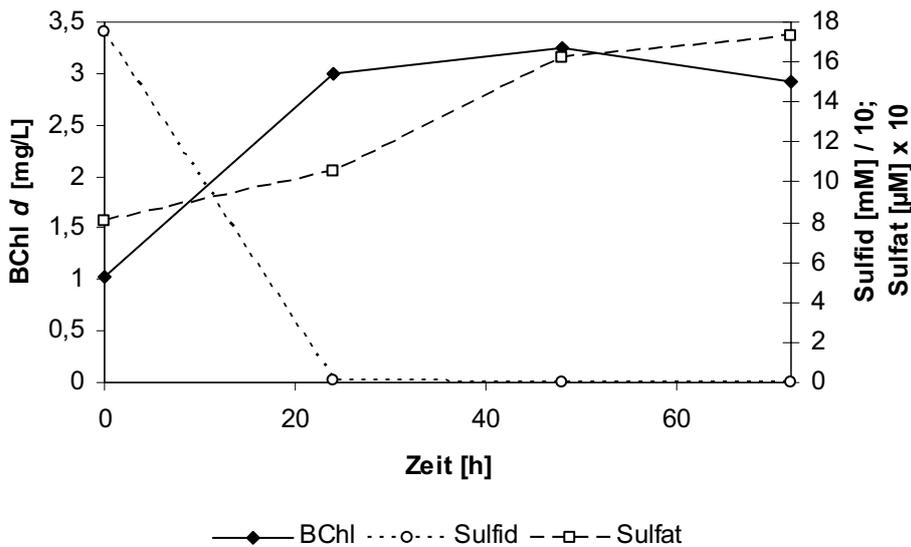


Abb. 5.4: Photolithoautotrophes Wachstums von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) mit Sulfid als Elektronendonator. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Die in der Abb. 5.4 dargestellten Werte stellen - wie in der gesamten vorliegenden Arbeit - Mittelwerte von Mehrfachmessungen dar. *P. vibrioformis* war zu photolithoautotrophen Wachstum mit Sulfid fähig (Abb. 5.4). Daher konnten in weiterer Folge Wachstumsuntersuchungen mit unterschiedlichen Elektronendonatoren durchgeführt werden.

5.1.2.3 Vergleich des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 bzw. Sulfid

Zunächst sollte überprüft werden, ob photolithoautotrophes Wachstum von *P. vibrioformis* auch mit S^0 als Elektronendonator möglich war. Des Weiteren sollte das Wachstumsverhalten von *P. vibrioformis* mit S^0 (80 mM) und Sulfid (2 mM) verglichen werden. *P. vibrioformis* wurde mit S^0 unter den in Kap. 4.1.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert, und es konnte dabei Wachstum (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) festgestellt werden. In Kontrollansätzen, in denen den Zellen keine Schwefelverbindung zugesetzt worden war, fand kein Wachstum statt (Daten nicht gezeigt).

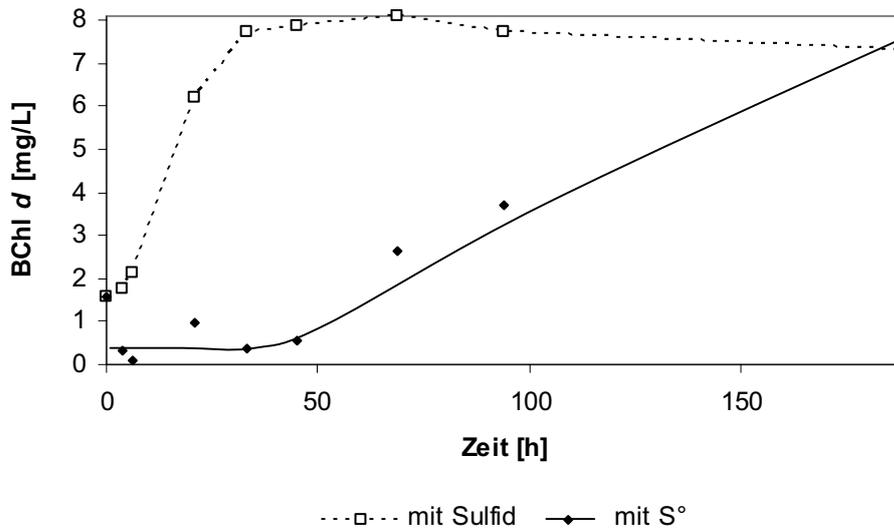


Abb. 5.5: Wachstum von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *a*) mit Sulfid (2 mM) bzw. S^0 (80 mM) als photosynthetische Elektronendonatoren. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Auffallend dabei war, dass das Wachstum mit S^0 mit einer Verzögerung von etwa 48 Stunden einsetzte (Abb. 5.5). Als Kontrolle wurde *P. vibrioformis* mit Sulfid als Elektronendonator angesetzt. Bei Wachstum mit Sulfid trat diese Verzögerung nicht auf (Abb. 5.5). Aus dem sofort einsetzenden Wachstum der Zellen mit Sulfid geht hervor, dass die Enzyme zur Metabolisierung des Sulfids konstitutiv vorliegen müssen. Im Gegensatz dazu scheinen die Zellen bei Wachstum mit S^0 eine gewisse Zeit zu benötigen, in der z. B. die zur Bioverfügbarmachung und Verwertung des S^0 notwendigen Enzyme induziert werden könnten.

5.1.2.4 Wachstum von *P. vibrioformis* und *A. vinosum* mit biogenem S^0

Der von verschiedenen Mikroorganismen produzierte biogene S^0 besitzt eine andere Struktur als S^0 (Kap. 3.1.6). Der von *A. vinosum* gebildete biogene S^0 ist im Gegensatz zu dem von *P. vibrioformis* gebildeten von einer Proteinhülle umgeben [Brune, 1995a; Prange, 2001]. Daher sollte untersucht werden, inwieweit Grüne- und Purpurschwefelbakterien in der Lage sind, den von dem jeweils anderen Organismus produzierten biogenen S^0 zum Wachstum zu nutzen.

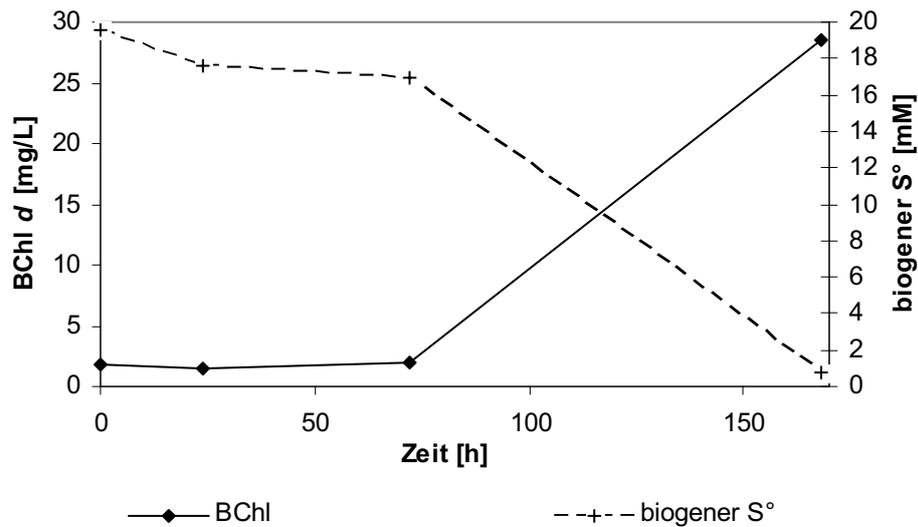


Abb. 5.6: Wachstum (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) von *P. vibrioformis* kultiviert mit biogenem S⁰ von *A. vinosum* als Elektronendonator. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Zellen von *P. vibrioformis* waren in der Lage, mit dem aus *A. vinosum* isoliertem biogenem S⁰ zu wachsen (Abb. 5.6). Gleiches gilt auch für *A. vinosum* Zellen, die den von *P. vibrioformis* produzierten biogenen S⁰ nutzten (Abb. 5.7). Die Abnahme in der biogenen S⁰-Konzentration korrelierte dabei mit der Zunahme im Bacteriochlorophyll *d*- bzw. *a*-Gehalt als Maß für das Wachstum (Abb. 5.6 und 5.7).

Auffällig dabei ist, dass das Wachstum mit dem jeweils angebotenen biogenen S⁰ sowohl von *P. vibrioformis* (Abb. 5.6) als auch bei *A. vinosum* (Abb. 5.7) erst nach einer längeren lag-Phase von 72 bzw. 48 h einsetzte. Wurden Kulturen von *P. vibrioformis* bzw. *A. vinosum* dagegen mit Sulfid als photosynthetischem Elektronendonator angezogen, so traten die lag-Phasen nicht auf, bzw. waren wesentlich kürzer (Daten nicht gezeigt). Diese lag-Phasen wurden auch bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit S⁰ beobachtet (Abb. 5.5).

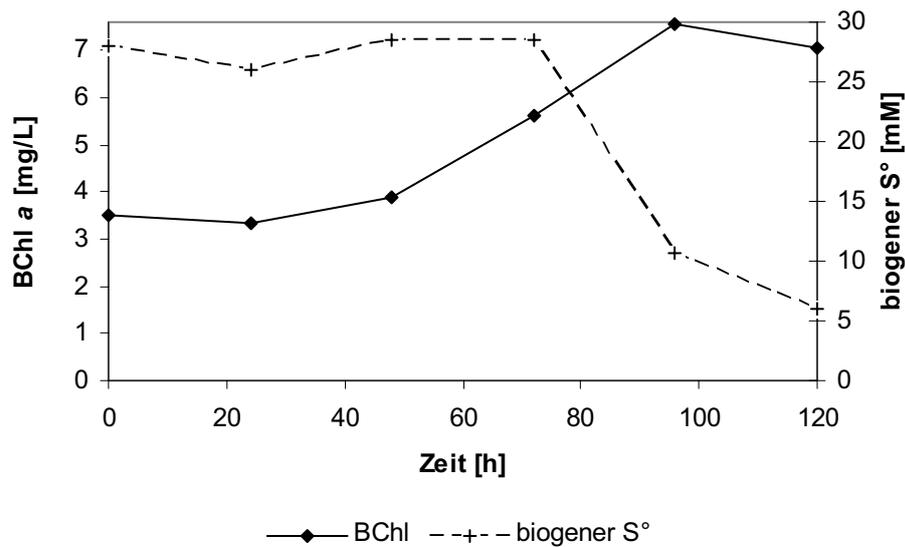


Abb. 5.7: Wachstum (Zunahme an Bacteriochlorophyll *a*) von *A. vinosum* mit biogenem S⁰ von *P. vibrioformis*. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.3.

In Kontrollansätzen, die biogenen S⁰ aber keine Zellen enthielten, blieb die biogene S⁰-Konzentration konstant. Somit konnte eine chemische Umsetzung des biogenen S⁰ experimentell ausgeschlossen werden.

5.1.2.5 Vergleich des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S⁰ und vom Organismus selbst produziertem biogenem S⁰

Dieser Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob *P. vibrioformis* ein verändertes Wachstumsverhalten zeigt, wenn die Zellen mit S⁰ bzw. mit selbst produziertem biogenem S⁰, der aus einer mit Sulfid gewachsenen Kultur präpariert worden war (Präparation von extrazellulärem biogenem S⁰ von *P. vibrioformis*: Kap. 4.2.3), wuchsen. Für einen Vergleich wurden daher in verschiedenen Ansätzen S⁰ (80 mM) bzw. vom Organismus selbst produzierter biogener S⁰ (80 mM) als photosynthetische Elektronendonatoren eingesetzt. Als Kontrolle diente das Wachstum von *P. vibrioformis* mit Sulfid (1 mM).

Während das Wachstum von *P. vibrioformis* mit Sulfid sofort einsetzte, wurden sowohl bei Wachstum mit S^0 als auch mit selbst produziertem biogenem S^0 Verzögerungen gemessen (Abb. 5.8). Die lag-Phase bei Wachstum mit S^0 (48 h) war allerdings um 24 h länger als die lag-Phase bei Wachstum mit dem selbst produzierten biogenen S^0 (24 h).

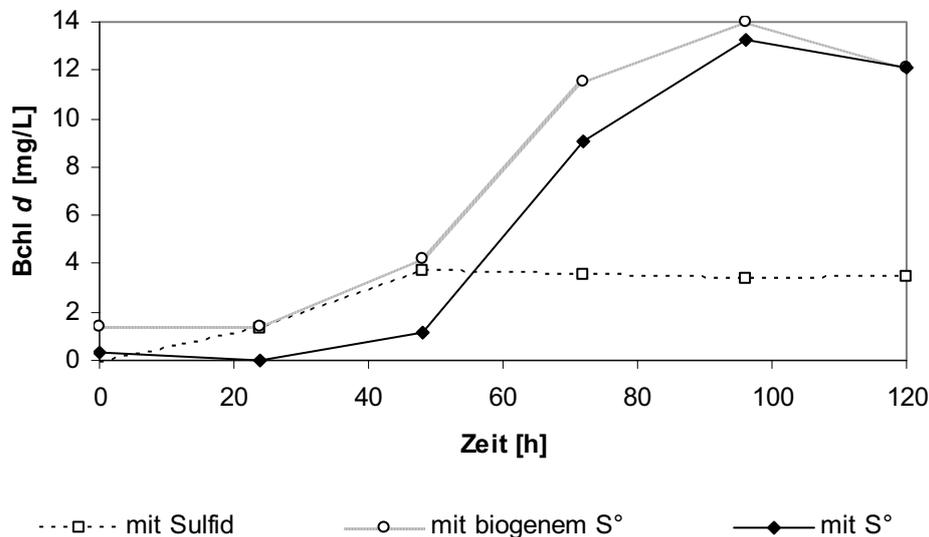


Abb. 5.8: Wachstum von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) mit Sulfid (1 mM), vom Organismus selbst produziertem biogenem S^0 (80 mM) und S^0 (80 mM). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Nach 96 h erreichten die Ansätze mit S^0 und biogenem S^0 eine gleiche Bacteriochlorophyll *d*-Konzentration. Der Unterschied in der maximal erreichten Bacteriochlorophyll *d*-Konzentration bei Wachstum mit S^0 bzw. biogenem S^0 und mit Sulfid ist darauf zurückzuführen, dass die eingesetzte S^0 bzw. biogene S^0 -Menge ein Vielfaches des Sulfids betrug. In Kontrollansätzen, in denen *P. vibrioformis* Zellen keine Schwefelverbindung zugesetzt worden war, fand kein Wachstum statt (Daten nicht gezeigt). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass *P. vibrioformis* Zellen den selbst produzierten biogenen S^0 schneller bioverfügbar machen können als S^0 .

5.1.2.6 Wachstum von *P. vibrioformis* Zellen mit S^0 , die mit S^0 vorkultiviert worden waren

Für vorhergehende Experimente wurde eine Vorkultur eingesetzt, welche mit Sulfid angezogen worden war. Es sollte geklärt werden, ob bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0 die lag-Phase dann kürzer ist, wenn die Vorkultur bereits mit S^0 kultiviert worden war. Da die

Zellen der Vorkultur die an der Bioverfügbarmachung von S^0 beteiligten Enzyme bereits gebildet haben sollten, müsste es gegenüber den vorhergehenden Experimenten zu einer Verkürzung der lag-Phase kommen.

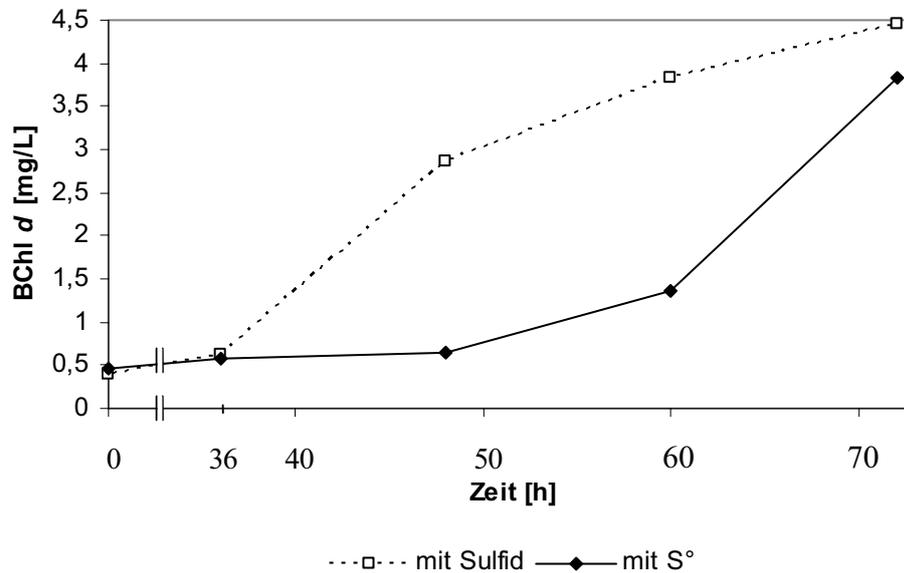


Abb. 5.9: Verlauf des Wachstums (Zunahme an Bacteriochlorophyll d) von *P. vibrioformis* mit Sulfid (1 mM, Kontrolle) und S^0 (80 mM). Die Vorkultur war mit S^0 angezogen worden (siehe Text). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Wie in Abb. 5.9 dargestellt, wuchs *P. vibrioformis* mit Sulfid mit einer Verzögerung von 36 h, während die Kultur mit S^0 nach 48 h Wachstum zeigte. In vorhergehenden Experimenten, in denen *P. vibrioformis* mit S^0 kultiviert wurde, die Vorkultur aber mit Sulfid gewachsen war, wurde ebenfalls eine lag-Phase von 48 h registriert (Abb. 5.5 und Abb. 5.8). Die lag-Phasen waren somit ähnlich lang, unabhängig davon ob die Vorkultur mit S^0 oder mit Sulfid kultiviert worden war. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die Zellen, welche auf S^0 vorkultiviert worden waren, keinen Vorteil gegenüber den Zellen besaßen, die mit in Medium gelöstem Sulfid wuchsen. Bei Wachstum mit S^0 müssen die Zellen zunächst die Hydrophobizität der S^0 -Partikel überwinden. Möglicherweise geschieht dies durch eine Anlagerung der Zellen an den S^0 , welches einige Zeit in Anspruch nehmen könnte und damit die lag-Phase erklären würde.

5.1.2.7 Trennung von *P. vibrioformis* Zellen und S⁰ durch eine Dialysemembran

Um zu klären, ob ein Kontakt zwischen *P. vibrioformis* Zellen und dem S⁰ notwendig ist, um eine Bioverfügarmachung einzuleiten, wurde der S⁰, wie in Kap. 4.5.3 beschrieben, in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße 12-14 kDa) von den Zellen im Medium getrennt (Abb. 5.10 „1“). In diesem Fall war unter den in Kap. 4.1.2.2 beschriebenen Inkubationsbedingungen kein Wachstum möglich (Abb. 5.10 „3“). Wurde jedoch der S⁰ direkt zum Medium gegeben (Abb. 5.10 „2“), wuchsen die Zellen (Abb. 5.10 „4“). In diesen Fällen stieg die maximal erreichte Bacteriochlorophyll *d*-Konzentration nach 120 h mit der Menge an zugegebenem S⁰, wobei das maximale Wachstum bei 240 mM S⁰ beobachtet wurde (Abb. 5.11).



Versuchsbeginn

Nach 120 h

Abb. 5.10: Wachstum von *P. vibrioformis* mit S⁰. Der S⁰ befand sich dabei entweder direkt im Medium oder war von den Zellen durch einen Dialyseschlauch getrennt. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2. Der Pfeil markiert den mit S⁰ gefüllten Dialyseschlauch.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein direkter Kontakt zwischen *P. vibrioformis* Zellen und dem S⁰ für eine photosynthetische Nutzung notwendig ist. Kleinere lösliche Faktoren scheinen keine Rolle bei der Bioverfügarmachung von S⁰ zu spielen. Die Ausschlussgröße von 12-14 kDa lässt darüber hinaus den Schluss zu, dass, falls extrazelluläre Proteine an der Bioverfügarmachung von S⁰ beteiligt gewesen wären, diese größer als 14 kDa hätten sein müssen.

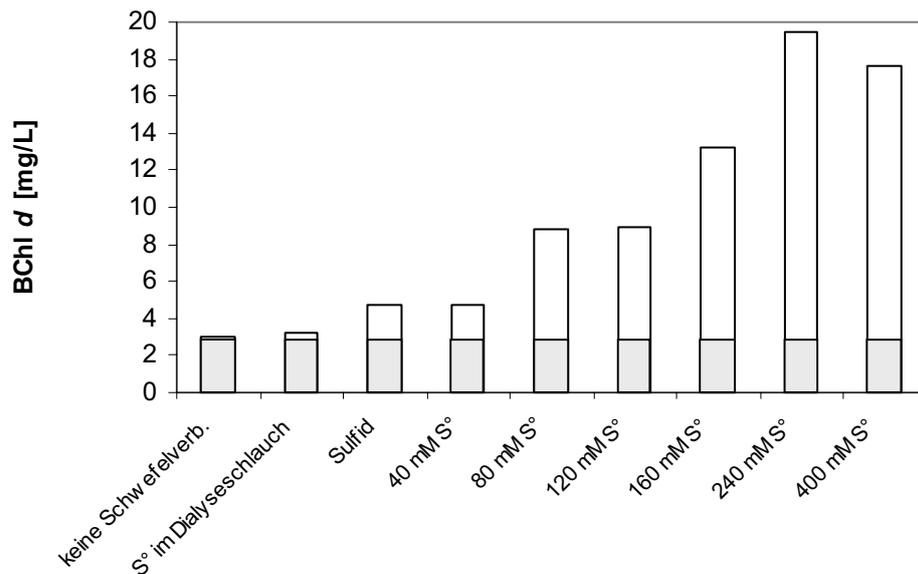


Abb. 5.11: Wachstum von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) in Abhängigkeit von der angebotenen S⁰ Menge nach 120 h Inkubation unter den in Kap. 4.1.2.2 angegebenen Bedingungen mit und ohne Trennung von Zellen und S⁰ durch eine Dialysemembran (□). Für Kontrollansätze wurde Sulfid (1 mM) zugegeben bzw. keine Schwefelquelle (Kontrolle) benutzt. □ = Gehalt an BChl *d* zu Beginn des Experiments (2,8 mg/L). Weitere Details im Text.

5.1.2.8 Wachstum von *A. vinosum* 21D mit S⁰

In der Mutante *A. vinosum* 21D wurde durch eine Inaktivierung des *dsrB* Gens die enzymatisch katalysierte Oxidation von intrazellulär gespeichertem biogenem S⁰ ausgeschaltet [Pott und Dahl, 1998]. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Mutation auch einen Einfluss auf die Bioverfügbarmachung von extern zum Medium zugegebenem S⁰ hat. Zu diesem Zweck wurde *A. vinosum* 21D photoautotroph bzw. photomixotroph (mit zusätzlich 10 mM Acetat und 10 mM Malat) kultiviert. Als photosynthetischer Elektronendonator wurde S⁰ (80 mM) angeboten. In Kontrollansätzen wurde Sulfid (1 mM) bzw. keine Schwefelverbindung zugesetzt. In den beiden Ansätzen mit S⁰ bzw. Sulfid konnte sowohl unter photoautotrophen als auch unter photomixotrophen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen ohne zugesetzter Schwefelverbindung geringes Wachstum (Zunahme an Bacteriochlorophyll *a*, Abb. 5.12) und die Bildung von internen biogenen S⁰-Globuli beobachtet werden (letzteres nicht gezeigt).

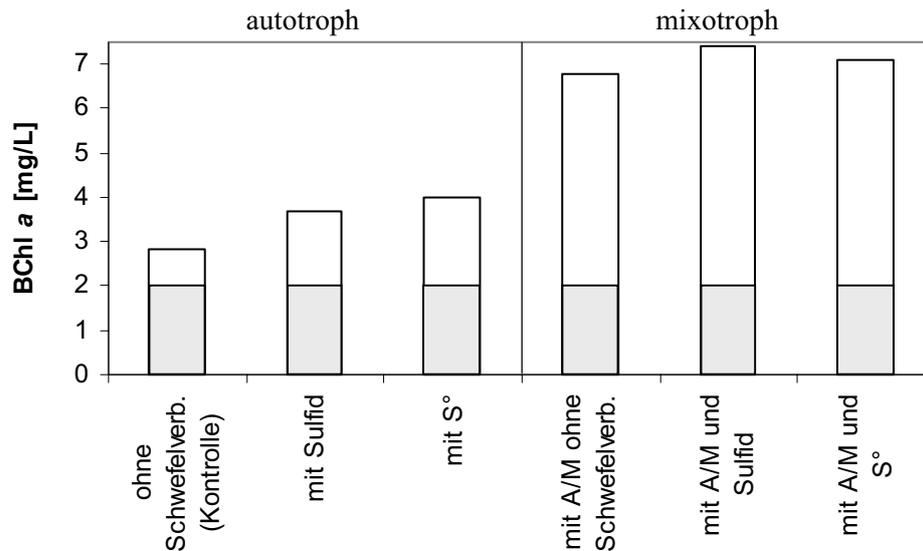


Abb. 5.12: Photoautotrophes und photomixotrophes Wachstum (Zunahme an BChl *a*) von *A. vinosum* 21D mit verschiedenen Schwefelverbindungen (□). Der BChl *a*-Gehalt wurde nach 96 h bestimmt. Inkubationsbedingungen: Kap 4.1.2.3. A/M = Acetat (10 mM) und Malat (10 mM), Sulfid: 1 mM, S⁰: 80 mM. □ = Gehalt an BChl *a* zu Beginn des Experiments (2,0 mg/L).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der Bioverfügarmachung von *intrazellulärem* biogenem S⁰ bzw. von *extern zugesetztem* S⁰ um zwei verschiedene Enzymsysteme handeln könnte.

5.1.3 Makroskopische Beobachtungen

5.1.3.1 Biologische Hydrophilisierung des hydrophoben S⁰

Während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S⁰ (80 mM) konnte in den Kulturflaschen beobachtet werden, dass die anfangs hydrophoben S⁰-Partikel bereits nach 24 h Inkubation unter den in Kap. 4.1.2.2 beschriebenen Bedingungen hydrophile Eigenschaften angenommen hatten (Abb. 5.13 „A“). Das Wachstum der *P. vibrioformis* Zellen setzte allerdings erst mit einer Verzögerung von 48 h ein (Abb. 5.5 und Abb. 5.8).

Diese Hydrophilisierung konnte in Kontrollansätzen nicht beobachtet werden welche i) die gleiche Menge an S⁰ enthielten, aber keine *P. vibrioformis* Zellen und unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurden (Abb. 5.13 „B“), bzw. ii) die gleiche Menge S⁰ sowie Zellen

enthielten, aber im Dunkeln inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte eine abiotische Ursache für die beobachtete Hydrophilisierung des S^0 ausgeschlossen werden.

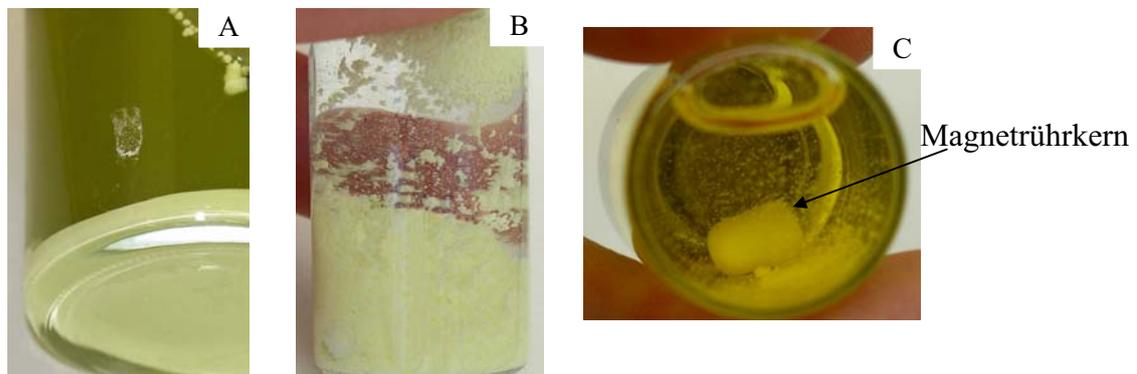


Abb. 5.13 A, B und C: Hydrophilisierte S^0 -Partikel nach 120 h Inkubation mit *P. vibrioformis* Zellen (A), hydrophobe S^0 -Partikel nach 120 h Inkubation ohne Zellen (B) und hydrophobe S^0 -Partikel nach 120 h Inkubation im gleichen Medium ohne Zellen mit zusätzlich 5 mM Sulfid (C). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Es ist bekannt, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und S^0 durch chemische Reaktionen lösliche Polysulfide entstehen können [Visscher und van Gemerden, 1988; Brune, 1995b; Steudel, 2000]. Um zu überprüfen, ob durch die eventuelle Anwesenheit von Sulfid bzw. Polysulfiden eine ähnliche Hydrophilisierung des hydrophoben S^0 möglich ist, wurde der S^0 zusammen mit Sulfid (5 mM) in Abwesenheit von Zellen unter den gleichen Bedingungen inkubiert (Kap. 4.1.2.2). Dabei blieben die S^0 -Partikel auch nach 120 h Inkubation hydrophob (Abb. 5.13 „C“). Somit konnten Sulfid bzw. Polysulfid als Ursache für die in dem oben beschriebenen Versuchsansatz beobachtete Hydrophilisierung des S^0 ausgeschlossen werden.

Sowohl präparierter biogener S^0 von *P. vibrioformis* als auch isolierter biogener S^0 aus *A. vinosum* (Herstellung: Kap. 4.2.2 und 4.2.3) zeigten jedoch bereits direkt nach der Präparation bzw. Isolation hydrophile Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hydrophilität des biogenen S^0 bzw. die Hydrophilisierung des zum Medium zugegebenen S^0 eine wichtige Grundvoraussetzung für die Bioverfügbarkeit sind.

5.1.4 Mikroskopische Untersuchungen

5.1.4.1 Anlagerung von *P. vibrioformis* Zellen an S⁰-Partikel

Auf Grund der makroskopisch beobachteten Hydrophilisierung des S⁰ wurde im Anschluss untersucht, welche Form der Assoziation zwischen Zellen und S⁰-Partikeln vorlag. Dazu wurde *P. vibrioformis* mit S⁰ unter den in Kap. 4.1.2.2 angegebenen Bedingungen kultiviert und nach 24 h Wachstum wurden Proben mikroskopisch analysiert. Wie in Abb. 5.14 dokumentiert, hatten sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits an die S⁰-Partikel angelagert.

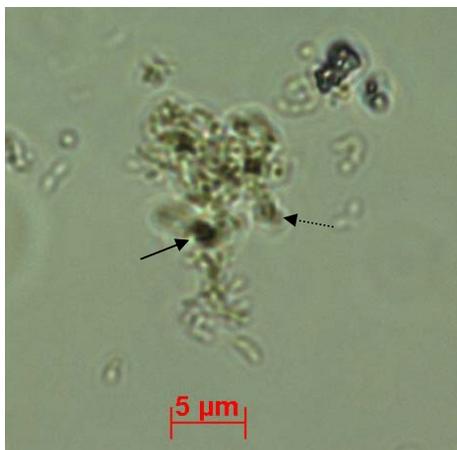


Abb. 5.14: Mikroskopische Aufnahme von *P. vibrioformis* Zellen (gestrichelter Pfeil), die sich an S⁰-Kristalle (Pfeile) anlagern. Inkubationszeit: 24 h. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Da diese mikroskopische Beobachtung mit der makroskopisch beobachteten Hydrophilisierung des S⁰ zeitlich korrelierte, scheint der Hydrophilisierungsvorgang durch die Anlagerung der *P. vibrioformis* Zellen verursacht worden zu sein. Dieser im Lichtmikroskop beobachtete Kontakt (Abb. 5.14) zwischen *P. vibrioformis* Zellen und den S⁰-Partikeln sollte näher untersucht werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten hierzu weitere Aufschlüsse geben. Eine Möglichkeit für Zellen von Grünen Schwefelbakterien den S⁰ bioverfügbar zu machen, wäre die Ausbildung von sogenannten „Haftfüßchen“, mit deren Hilfe die Zellen sich an die S⁰-Partikel anhaften könnten [Pibernat und Arbella, 1996]. Mittels beider in Kap. 4.4.2 dargestellten Methoden der Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie wurden Bilder mit guter Auflösung erzielt (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten keine S⁰-Partikel präpariert werden und somit durch die

elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Kontakt zwischen Zellen und S^0 nicht dargestellt werden.

5.1.5 Chemisch analytische Untersuchungen

5.1.5.1 Oberflächenspannung der Kulturmedien bei Wachstum von *P. vibrioformis* und *A. vinosum* mit biogenem S^0

Die Bildung von Biodetergentien ist für Mikroorganismen eine Möglichkeit, gering wasserlösliche Stoffe wie S^0 bioverfügbar zu machen. Mit solchen Substanzen kann die Oberflächenspannung gesenkt werden. Daher sollten im Verlauf des Wachstums von *P. vibrioformis* mit biogenem S^0 von *A. vinosum* bzw. von *A. vinosum* mit biogenem S^0 von *P. vibrioformis* mögliche Änderungen in den Oberflächenspannungen der Kulturmedien nachgewiesen werden.

Zunächst wurde vor den eigentlichen Messungen der Proben die Versuchsanlage auf ihre Funktionsfähigkeit hin überprüft. Dazu wurden die Oberflächenspannungen von i) Aqua dest., ii) Aqua dest. mit Aceton und iii) Aqua dest. mit verschiedenen Detergentien bestimmt.

Tab. 5.2: Oberflächenspannungen von verschiedenen Flüssigkeiten bei Raumtemperatur, die mittels der in Kap. 4.3.6 beschriebenen Versuchsanlage [Schaefer, 2004] bestimmt wurden.

Flüssigkeit	Oberflächenspannung (mN/m)
Aqua dest.	72,6
Aceton (5 %; v/v) in Aqua dest	58,0
Aceton (10 %; v/v) in Aqua dest	52,0
Triton X-100 (140 mg/L) in Aqua dest.	41,5
SDS (4 mg/L) in Aqua dest.	39,6

Die Oberflächenspannung von unterschiedlichen Flüssigkeiten konnte somit bestimmt werden. Tab. 5.2 zeigt die aus diesen Messungen erhaltenen Werte. Daher konnte diese Versuchsanlage zur Bestimmung der Oberflächenspannung von Kulturmedien aus Versuchsansätzen von Anoxyphotobakterien mit biogenem S^0 eingesetzt werden.

Während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit biogenem S^0 von *A. vinosum* bzw. von *A. vinosum* mit biogenem S^0 von *P. vibrioformis* wurde alle 24 h die Oberflächenspannung der Kulturmedien gemessen. Dabei konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Tab. 5.3).

Sowohl *A. vinosum* als auch *P. vibrioformis* zeigten Wachstum, welches anhand des Anstiegs der Bacteriochlorophyll Konzentrationen überprüft wurde (von 2,4 bis 27 mg Bacteriochlorophyll *d/L* für *P. vibrioformis* bzw. 3,5 bis 7,6 mg Bacteriochlorophyll *a/L* für *A. vinosum*). In Kontrollansätzen wurde biogener S^0 ohne Zellen im gleichen Medium unter den gleichen Bedingungen inkubiert (Tab. 5.3). Bei den erhaltenen Oberflächenspannungen handelte es sich um den gleichen Wert, wie die Oberflächenspannung von Aqua dest. [Schaefer, 2004].

Tab. 5.3: Vergleich der Oberflächenspannung von Kulturmedien in Wachstumsversuchen zur Verwertung von biogenem S^0 durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien in der in Kap. 4.3.6 beschriebenen Versuchsanlage [Schaefer, 2004]. Inkubationsbedingungen der Kulturen: Kap. 4.1.2.1.

Versuchsansatz	Oberflächenspannung (mN/m)	
	Versuchsbeginn	Nach 120 h
<i>P. vibrioformis</i> Zellen mit biogenem S^0 von <i>A. vinosum</i>	72,6	72,6
<i>A. vinosum</i> Zellen mit biogenem S^0 von <i>P. vibrioformis</i>	72,6	72,6
Medium + biogener S^0 von <i>P. vibrioformis</i> , ohne Zellen	72,6	72,6
Medium + biogener S^0 von <i>A. vinosum</i> , ohne Zellen	72,6	72,6

Es konnte eine Beteiligung von oberflächenaktiven Substanzen an der Bioverfügbarmachung von biogenem S^0 durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien mit diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden.

5.1.5.2 Sulfid als Intermediat bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0

Als weitere Möglichkeit der Bioverfügbarmachung von S^0 durch Grüne Schwefelbakterien wurde von einigen Autoren [Shivvers und Brock, 1973; Trüper, 1978; Hansen, 1983; Dahl, 1999; Dahl, 2000; Dahl und Prange, 2006] vorgeschlagen, dass S^0 durch eine initiale Reduktion zum löslichen Sulfid aktiviert werden könnte. Daher sollte versucht werden, Sulfid als Intermediat der S^0 -Verwertung nachzuweisen.

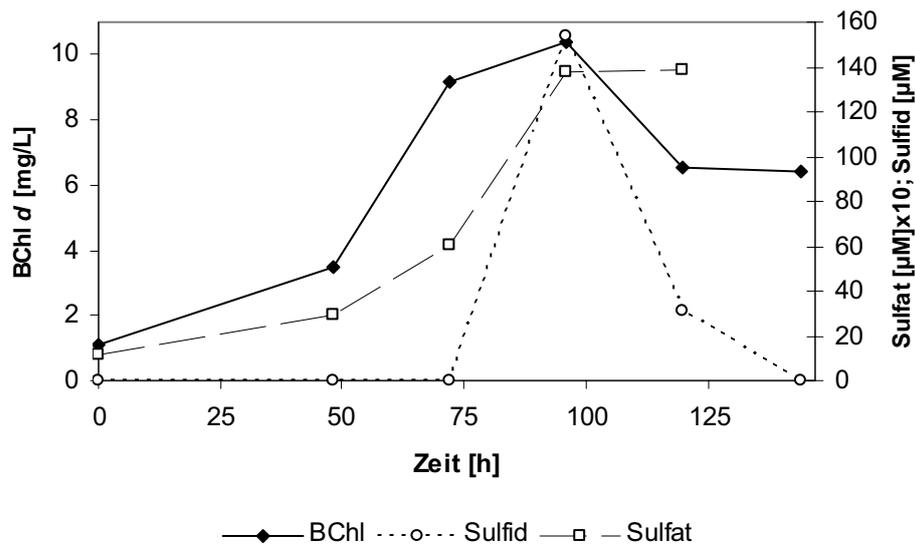


Abb. 5.15: Bildung von Sulfid während des photolithoautotrophen Wachstums von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) mit S^0 (80 mM). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.1.

Während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 wurde Sulfid im Medium detektiert (Abb. 5.15). Die maximale Sulfidkonzentration wurde nach 96 h gemessen und betrug 150 μM . Danach nahm der Sulfidgehalt wieder ab. Die maximale Bacteriochlorophyll *d*-Konzentration und die des Sulfats wurden ebenso nach 96 h erreicht. Der Anstieg der Sulfatkonzentration musste als Maß für die S^0 Oxidation herangezogen werden (siehe: Kap. 4.3.2). Die 96 h Verzögerung des im Medium nachgewiesenen Sulfids korrelierte nicht mit der Zunahme im BChl *d*-, und Sulfatgehalt. In Kontrollansätzen, in denen entweder i) *P. vibrioformis* Zellen alleine oder ii) nur S^0 ohne Zellen (Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2) bzw. iii) Zellen mit der gleichen Menge S^0 aber im Dunkeln inkubiert worden waren, wurde während des gesamten Versuchslaufs (144 h) kein Sulfid im Medium detektiert. Somit konnte eine chemische Ursache für die Bildung des Sulfids ausgeschlossen werden.

Der angebotene S^0 scheint durch *P. vibrioformis* tatsächlich über eine vorangestellte Reduktion zu Sulfid metabolisiert zu werden. Die Reduktion des S^0 zu Sulfid durch *P. vibrioformis* passiert eventuell durch membrangebundene Enzyme innerhalb des S^0 -Zell-Kontakts. Vermutlich wird Sulfid, sobald der Kontakt hergestellt ist, gebildet und danach sofort von den Zellen als Elektronendonator genutzt. Das könnte eine Erklärung dafür sein, warum Sulfid erst nach 96 h im Medium detektiert wurde, obwohl der Organismus bereits nach 72 h Wachstum zeigte.

5.1.5.3 Sulfid als Intermediat bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit biogenem S⁰

Da gezeigt werden konnte, dass die photosynthetische Nutzung von S⁰ durch *P. vibrioformis* über eine vorangeschaltete Reduktion zu Sulfid initiiert wird, sollte untersucht werden, ob auch für den vom Organismus selbst gebildeten biogenen S⁰ der gleiche Mechanismus der Bioverfügbarmachung gilt. Dazu wurde *P. vibrioformis* biogener S⁰ (25 mM, Präparation von extrazellulärem biogenem S⁰ von *P. vibrioformis*: Kap. 4.2.3) zum Wachstum angeboten und eine mögliche Bildung von Sulfid verfolgt. Auch in diesem Fall konnte Sulfid im Medium detektiert werden (Abb. 5.16). Auffallend ist allerdings, dass Sulfid erst nach 72 h auftrat, ähnlich wie beim Wachstum von *P. vibrioformis* mit S⁰ (96 h). Die detektierte Sulfidkonzentration war bei Wachstum mit biogenem S⁰ im Vergleich zu S⁰ etwa um den Faktor 10 höher (Abb. 5.16 und Abb. 5.15). Das bakterielle Wachstum (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) korrelierte dabei mit der Abnahme der Konzentration an biogenem S⁰.

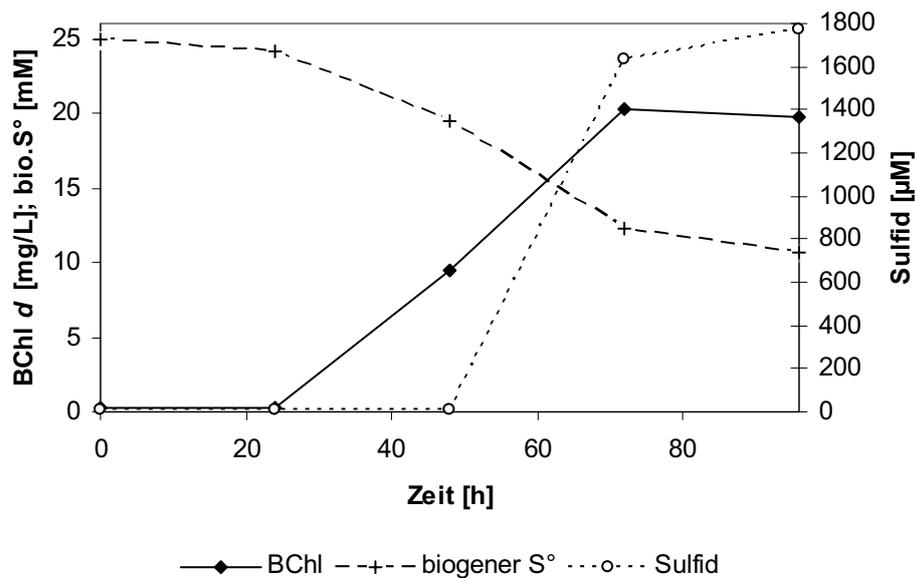


Abb. 5.16: Bildung von Sulfid während des photolithoautotrophen Wachstums von *P. vibrioformis* (Zunahme an Bacteriochlorophyll *d*) mit selbst produziertem biogenem S⁰. Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

In Kontrollansätzen wurden i) *P. vibrioformis* Zellen ohne Schwefelquelle ii) biogener S⁰ ohne Zellen (Inkubationsbedingungen: Kap.4.1.2.2) bzw. iii) Zellen mit biogenem S⁰ im Dunkeln inkubiert. In keinem Kontrollansatz konnte während des gesamten Versuchslaufs (96 h) Sulfid im Medium detektiert werden. Somit konnte eine chemische Ursache für die Bildung des Sulfids ausgeschlossen werden.

5.1.5.4 Wachstum von *A. vinosum* 21D mit S⁰

Da während des Wachstums von *A. vinosum* 21D mit extern zum Medium zugesetztem S⁰ die Bildung von intrazellulären biogenen S⁰-Globuli beobachtet worden war (Kap. 5.1.2.8), sollte ein Versuch Aufschluss darüber geben, ob die Bioverfügbarmachung von S⁰ hier genauso wie bei *P. vibrioformis* über eine vorangestellte Reduktion zu Sulfid verläuft. Zu diesem Zweck sollte während des autotrophen bzw. mixotrophen Wachstums von *A. vinosum* 21D (Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2) mit S⁰ (80 mM) eine mögliche Sulfidbildung nachgewiesen werden, wie bereits für *P. vibrioformis* dokumentiert. Während des Wachstums von *A. vinosum* 21D mit S⁰ konnte jedoch kein Sulfid im Medium detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass in Grünen- und Purpurschwefelbakterien unterschiedliche Wege in der initiellen Verwertung von S⁰ existieren.

5.1.6 Molekularbiologische Untersuchungen

5.1.6.1 Vergleich des Proteinmusters von *P. vibrioformis* bei Wachstum mit S^0 , biogenem S^0 und Sulfid

Die Versuche zur Trennung von *P. vibrioformis* Zellen und S^0 unter Verwendung einer Dialysemembran sowie die mikroskopischen Beobachtungen hatten den Hinweis erbracht, dass ein Kontakt zwischen den Zellen und S^0 für eine Bioverfügbarmachung notwendig ist. Um weitere Informationen über die Bioverfügbarmachung von S^0 bzw. biogenem S^0 durch *P. vibrioformis* zu erhalten, sollte eine mögliche Beteiligung von extrazellulären Enzymen überprüft werden. Dabei wurde untersucht, ob bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0 bzw. Sulfid unterschiedliche extrazelluläre Enzyme exprimiert werden.

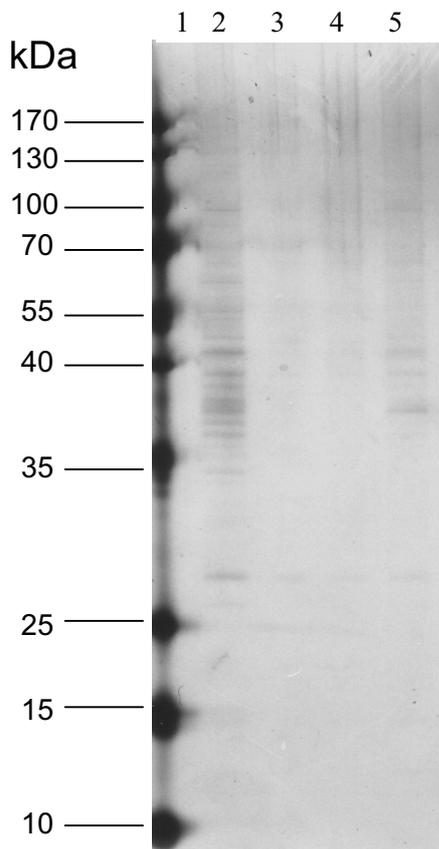


Abb. 5.17: Proteinbanden mittels SDS PAGE aufgetrennter extrazellulärer Enzyme aus Wachstumsversuchen von *P. vibrioformis* mit verschiedenen photosynthetischen Elektronendonatoren. Gelspuren: **1**: Proteinleiter (Fermentas, 10-170 kDa); **2**: mit Sulfid (2 mM); **3** und **4**: mit selbst produziertem biogenem S^0 (80 mM); **5**: mit S^0 (80 mM). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2.

Um eventuelle Unterschiede im extrazellulären Enzymmuster bei der Verwertung unterschiedlicher Elektronendonatoren zu erfassen, wurde eine elektrophoretische Trennung der extrazellulären Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) durchgeführt. In den Gelspuren 3, 4 und 5 (Wachstum mit biogenem S^0 bzw. S^0) erschienen keine zusätzlichen Proteinbanden im Vergleich zur Gelspur 2 (Wachstum mit Sulfid) (Abb. 5.17). Dies bedeutet, dass während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 bzw. biogenem S^0 keine zusätzlichen extrazellulären Enzyme gebildet wurden. Eine Beteiligung von extrazellulären Enzymen an der Bioverfügbarmachung von S^0 bzw. biogenem S^0 durch *P. vibrioformis* konnte mit dieser Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden.

Eine Erklärung für die beobachtete Bioverfügbarmachung von S^0 könnte darauf zurückzuführen sein, dass die beteiligten Proteine zellgebunden vorliegen könnten. Zellgebundene S^0 -Bindepoteine wurden bereits z. B. bei *Wolinella succinogenes* beschrieben [Lin et al., 2004; Klimmek, 2006]. Daher wurde eine SDS PAGE zur Auftrennung der Proteine ganzer Zellen von *P. vibrioformis* durchgeführt, um das Proteinmuster bei Wachstum mit S^0 bzw. biogenem S^0 mit Sulfid vergleichen zu können.

Einige Proteine wurden stärker exprimiert als andere bzw. traten nur in bestimmten Proben auf (Abb. 5.18).

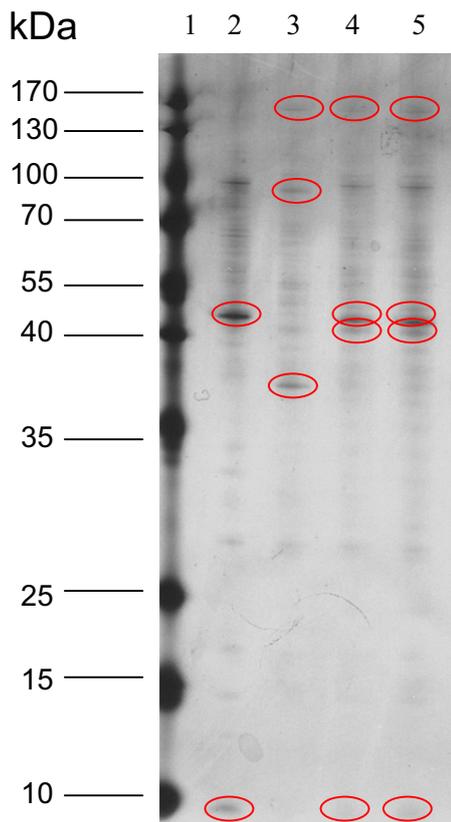


Abb. 5.18: Proteinbanden mittels SDS PAGE aufgetrennter Proteine von ganzen Zellen aus Wachstumsversuchen von *P. vibrioformis* mit verschiedenen photosynthetischen Elektronendonatoren. Gelspuren: 1: Proteinleiter (Fermentas, 10-170 kDa); 2: mit Sulfid (2 mM); 3: mit S^0 (80 mM); 4 und 5: mit selbst produziertem biogenem S^0 (80 mM). Inkubationsbedingungen: Kap. 4.1.2.2. Die umrandeten Banden sind im Text beschrieben.

Ein etwa 145 kDa großes Protein trat nur bei Wachstum mit S^0 bzw. biogenem S^0 auf (Gelspuren 3, 4 und 5), nicht aber bei Wachstum mit Sulfid (Gelspur 2). Ein etwa 90 kDa großes Protein wurde nur bei Wachstum mit S^0 exprimiert (Gelspur 3). Die auffälligste Bande, ein etwa 50 kDa großes Protein, kam bei Wachstum mit Sulfid bzw. mit selbst produziertem biogenem S^0 vor (Gelspuren 2, 4 und 5), nicht aber bei Wachstum mit S^0 (Gelspur 3). Ausschließlich bei Wachstum mit S^0 wurden ein ca. 38 kDa (Gelspur 3) und ausschließlich bei Wachstum mit biogenem S^0 ein ca. 40 kDa großes Protein exprimiert (Gelspuren 4 und 5). Bei Wachstum mit Sulfid bzw. biogenem S^0 (Gelspuren 2, 4 und 5) trat ein etwa 10 kDa großes Protein auf, nicht aber bei Wachstum mit S^0 (Gelspur 3).

Anhand der Elektrophoresegele lässt sich daher ableiten, dass bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit verschiedenen Elektronendonatoren (S^0 , biogener S^0 , Sulfid) unterschiedliche Proteine exprimiert werden.

In Folge wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) durchgeführt, um die Auftrennung der vielen vorhandenen Proteine im Vergleich zur SDS PAGE zu verbessern. Mit Hilfe der 2DE werden nicht nur cytoplasmatische und periplasmatische lösliche Proteine sondern auch membranassoziierte Proteine untersucht. Für diese Untersuchung wurde wiederum das Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0 (Abb. 5.19) bzw. mit Sulfid (Abb. 5.20) verglichen. Bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0 wurden im Vergleich zum Wachstum mit Sulfid 45 zusätzliche Proteinspots detektiert (Abb. 5.19). Bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit Sulfid konnten im Vergleich zum Wachstum mit S^0 23 zusätzliche Proteinspots aufgetrennt werden (Abb. 5.20).

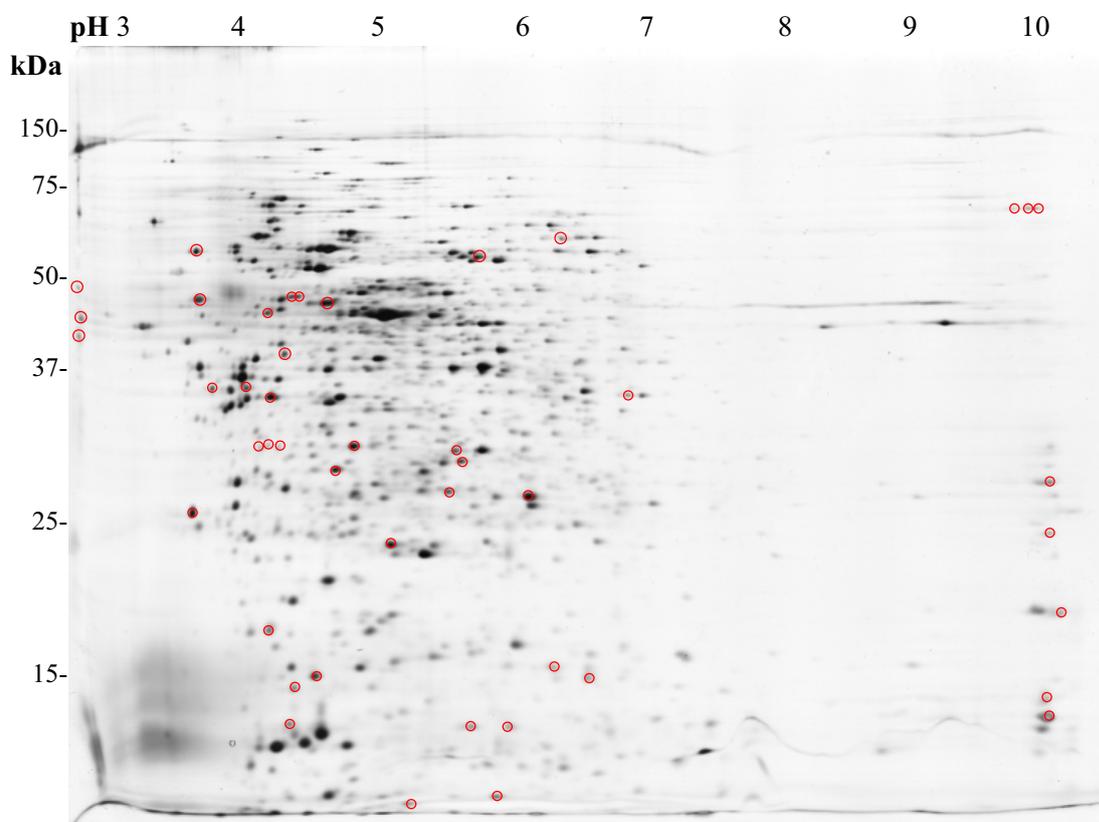


Abb. 5.19: Gel zur zweidimensionalen Auftrennung von löslichen und membranassoziierten Proteinen aus dem Wachstumsversuch von *P. vibrioformis* mit S^0 . Proteinspots, welche bei Wachstum mit Sulfid nicht detektiert wurden sind umrandet.

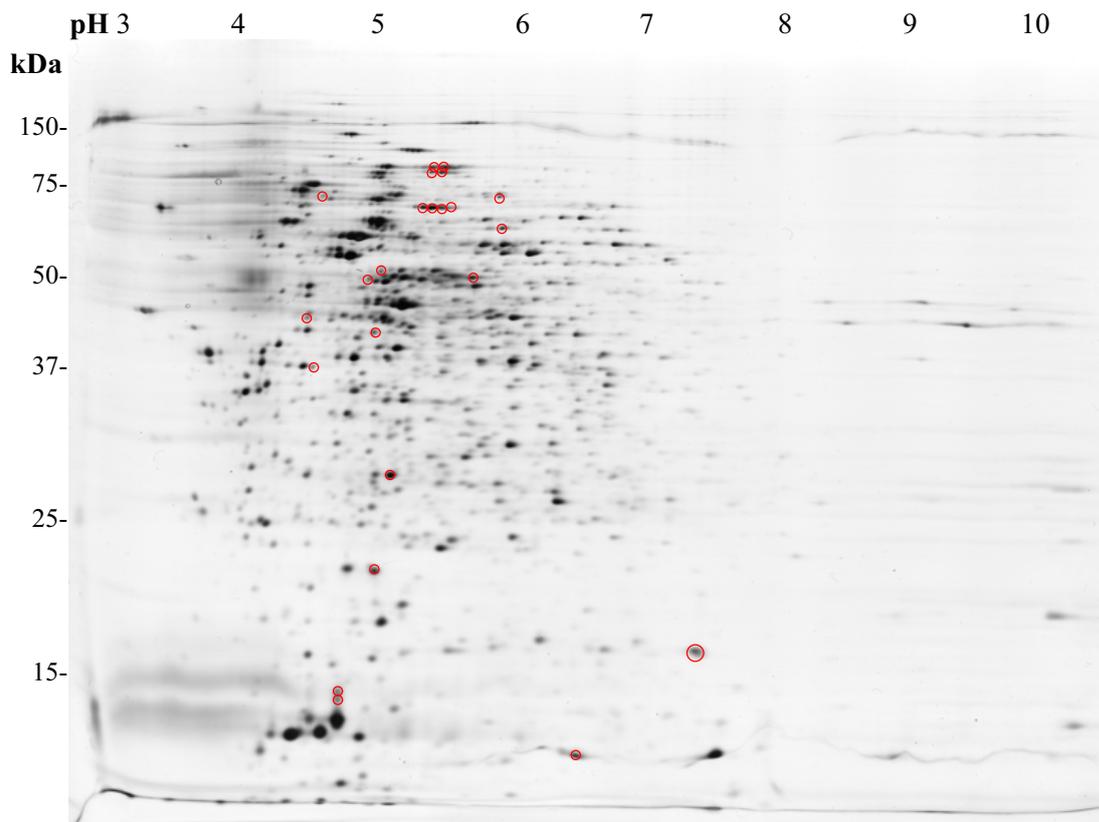


Abb. 5.20: Gel zur zweidimensionalen Auftrennung von löslichen und membranassoziierten Proteinen aus dem Wachstumsversuch von *P. vibrioformis* mit Sulfid. Proteinspots, welche bei Wachstum mit S^0 nicht detektiert wurden sind umrandet.

Auf beiden Gelen fällt auf, dass die meisten Proteinspots in einem pH-Wert-Bereich von ca. 4 bis 7 zu finden sind. In diesem Bereich werden die meisten bekannten löslichen Proteine aufgetrennt [Görg et al., 2000; 2004]. Die meisten Spots wiesen zudem eine Größe von etwa 25-75 kDa auf. Beim Wachstum mit S^0 konnten außerdem - im Gegensatz zum Wachstum mit Sulfid - einige Proteinspots dargestellt werden, deren isoelektrischer Punkt kleiner als 3 bzw. größer als 10 ist.

Wie nach der eindimensionalen elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen ganzer Zellen aus dem Wachstum von *P. vibrioformis* mit Sulfid bzw. mit S^0 mittels SDS PAGE (siehe oben) lässt sich auch nach der zweidimensionalen Auftrennung zusammenfassen, dass die Zellen beim Wachstum mit verschiedenen Elektronendonatoren unterschiedliche Proteinmuster aufwiesen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass einige dieser zusätzlichen Proteine auch an der Bioverfügbarmachung von S^0 beteiligt sein könnten.

5.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

5.2.1 Biotechnologisches Verfahren zur kombinierten Sulfidentfernung und Produktion von biogenem S⁰ mittels Grünen Schwefelbakterien

P. vibrioformis sollte als Biokatalysator zur Sulfidentfernung eingesetzt werden. Dabei sollte das Sulfid in Form von biogenem S⁰ zurück gewonnen werden. Der Bioprozess sollte semikontinuierlich in einem 5 L Photobioreaktor betrieben werden. Abb. 5.21 zeigt einen idealisierten Prozessverlauf. Dazu sollte zunächst einer bereits gut gewachsenen Kultur von *P. vibrioformis* Sulfid zugegeben werden (Abb. 5.21 „S“) welches die Zellen lichtabhängig oxidieren sollten. Im Anschluss sollte ein Verdünnungsschritt folgen (Abb. 5.21 „D“), in dem 2 L Medium (*P. vibrioformis* Zellen und durch die Zellen gebildeter und extrazellulär abgelagerter biogener S⁰) entfernt und durch 2 L frisches Medium ersetzt werden sollte. Der gesamte Vorgang (Sulfidzugabe und Verdünnungsschritt) sollte dreimal wiederholt werden.

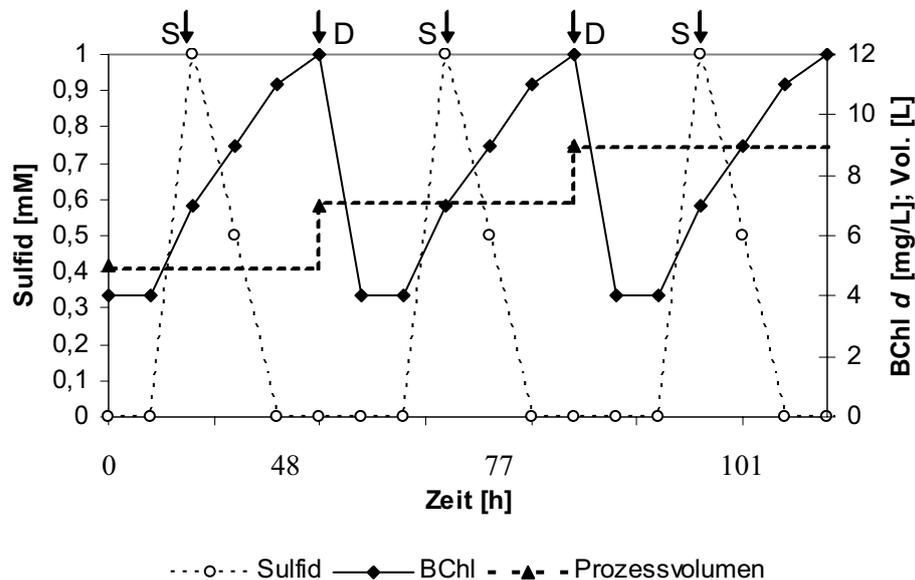


Abb. 5.21: Schema des idealisierten Bioprozessverlaufs zur Oxidation von Sulfid zu biogenem S⁰ durch *P. vibrioformis*. S = Sulfidzugabe, D = Verdünnungsschritt.

Es sollte gezeigt werden, ob sich dieser idealisierte Bioprozess unter Laborbedingungen erwartungsgemäß darstellen lässt. Der als Versuchslauf durchgeführte Bioprozess ist in Abb. 5.22 dargestellt. Zu einer gewachsenen Kultur von *P. vibrioformis* in einem 5 L Photobioreaktor wurde Sulfid (1,8 mM) zugegeben. Die Zellen oxidierten das Sulfid zu

biogenem S^0 , welcher extrazellulär abgelagert wurde. Nach 48 h war das Sulfid fast vollständig (99,4 %) oxidiert. In dem darauf folgenden Verdünnungsschritt wurden 2 L Medium abgezogen und durch 2 L frisches Medium ersetzt. Die Konzentration des biogenen S^0 im abgenommenen Medium betrug 1 mM. Somit wurden 53,3 % des zugesetzten Sulfids in biogenem S^0 umgewandelt. Der verbleibende Anteil des zugesetzten Sulfids wurde von den Zellen zu Sulfat oxidiert (Daten nicht gezeigt). Das abgezogene Medium wurde in ein Absetzbecken transferiert. Nach 1 Woche waren die Zellen und der extrazelluläre biogene S^0 am Boden des Absetzbeckens sedimentiert. Nach dem Entfernen des zellfreien Überstand wurde der biogene S^0 für 48 h bei 80°C getrocknet, um den verbleibenden Wassergehalt zu entfernen.

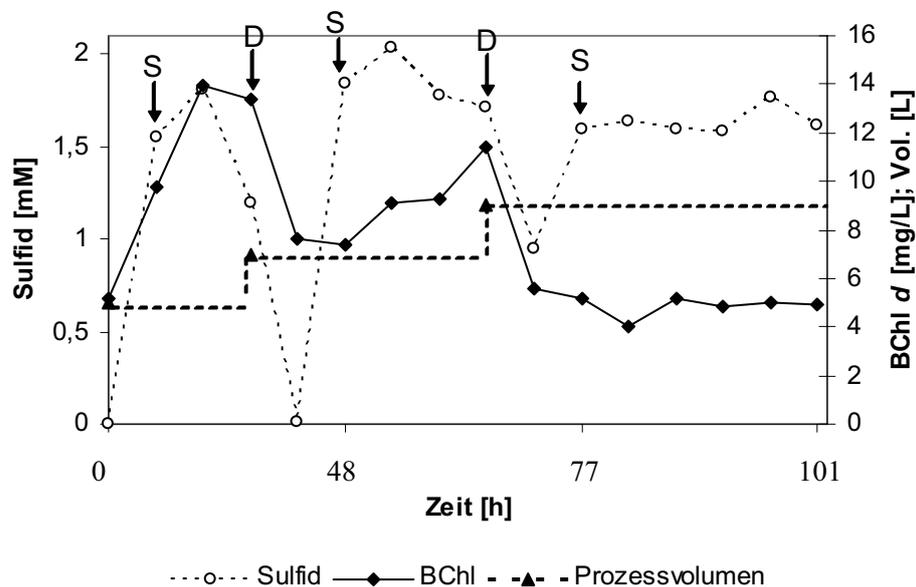


Abb. 5.22: Verlauf der Bacteriochlorophyll *d*- und Sulfidkonzentrationen während eines 101 h biotechnologischen Prozesses zur Sulfidentfernung mittels *P. vibrioformis*. S = Sulfidzugabe, D = Verdünnungsschritt.

Im Anschluss wurde dem Photobioreaktor erneut Sulfid (2 mM) zugegeben. Nach 29 h erfolgte ein weiterer Verdünnungsschritt, in dem 2 L Medium abgezogen und durch das gleiche Volumen an frischem Medium ersetzt wurde. Die Sulfidkonzentration im abgezogenen Medium betrug 0,9 mM, die Konzentration an biogenem S^0 0,1 mM. Somit wurden 53,4 % des eingesetzten Sulfids oxidiert und 5 % des eingesetzten Sulfids in Form von biogenem S^0 zurück gewonnen. Dem Versuchsansatz wurde ein weiteres Mal Sulfid (1,6 mM) zugegeben. Dieses wurde jedoch nicht weiter von den Zellen zum Wachstum genutzt.



Abb. 5.23: Photobioreaktor (5 L) bei Anwendung von *P. vibrioformis* als Biokatalysator zur Produktion von biogenem S^0 aus Sulfid. An der Glaswand ist der abgelagerte biogene S^0 zu erkennen.

Die Konzentrationen an Sulfid und Bacteriochlorophyll *d* blieben für 24 h konstant (Abb. 5.22), worauf der Versuch nach einer Laufzeit von 101 h beendet wurde. Es kam zu Ablagerungen des von den Zellen produzierten biogenen S^0 an der Reaktorglaswand (Abb. 5.23). Der so abgelagerte biogene S^0 konnte nur noch nach einem Prozessabbruch zurück gewonnen werden. Dabei wurde das Medium aus dem Reaktor vollständig entleert und der biogene S^0 mechanisch von der Glaswand entfernt.

Tab. 5.4: Sulfidoxidationsraten, prozentuale Sulfidoxidation und biogene S^0 -Rückgewinnung in einem mit *P. vibrioformis* betriebenen 5 L Photobioreaktor. Versuchsdauer: 101 h.

Sulfidzugabe	Sulfidoxidations- rate ($\mu\text{M/h}$)	Sulfidoxidation (%)	Rückgewinnung an biogenem S^0 (%)
1.	72,7	99,4	53,3
2.	100,3	53,4	5
3.	-	-	-

Wie gezeigt werden konnte, wurde in dem dargestellten biotechnologischen Prozess zur kombinierten Sulfidentfernung und Produktion von biogenem S^0 bei Anwendung von *P. vibrioformis* initial eine effiziente Sulfidoxidation bzw. biogene S^0 -Rückgewinnung erreicht (Tab. 5.4). Die Anwendung von *P. vibrioformis* zur Sulfidentfernung wies in der weiteren Versuchsdurchführung jedoch Nachteile auf: i) der aus der Sulfidoxidation gebildete biogene S^0 wurde an der Reaktorglaswand abgelagert und konnte nur nach einem Prozessabbruch aus dem System zurück gewonnen werden, ii) diese Ablagerungen bewirkten eine Verringerung des Lichteintrags in den Reaktorraum (Beschattung), iii) die Oxidation des biogenen S^0 führte

zur Bildung von in diesem Prozess unerwünschtem Sulfat. Die Ablagerungen des Produkts an der Reaktorglaswand, sowie seine vollständige Oxidation zu Sulfat, machten sich in einer Verringerung der Ausbeute an recyceltem biogenem S^0 bemerkbar. Die Verringerung des Lichteintrags durch die „Beschattung“ des Reaktors führte zu verschlechterten Wachstumsbedingungen für die Zellen.

5.2.2 Biotechnologisches Verfahren zur kombinierten Sulfidentfernung und Produktion von biogenem S^0 mittels *A. vinosum* 21D

Auf Grund der beschriebenen Nachteile der biotechnologischen Sulfideliminierung mit *P. vibrioformis* wurde ein Einsatz von *A. vinosum* 21D getestet. In dieser Mutante wurde durch eine Inaktivierung des *dsrB* Gens die enzymatisch katalysierte Oxidation von intrazellulär gespeichertem biogenem S^0 ausgeschaltet [Pott und Dahl, 1998]. Darüber hinaus wird bei diesem Organismus der aus der Sulfidoxidation gebildete biogene S^0 intrazellulär gespeichert. Dies könnte eine Ablagerung des letzteren an der Reaktorglaswand verhindern. Von Vorteil ist weiterhin, dass bei *A. vinosum* 21D der biogene S^0 das Endprodukt der Sulfidoxidation ist. Somit kann es zu keiner Bildung des in diesem Prozess unerwünschten Sulfats kommen.

Der Bioprozess unter Anwendung von *A. vinosum* 21D ist zwar ebenfalls semikontinuierlich, unterscheidet sich allerdings von dem mit *P. vibrioformis* dadurch, dass dieser durch 3 einzelne fed-batch Abschnitte unterteilt ist. Abb. 5.24 zeigt ein Schema des idealisierten Bioprozessverlaufs. Jeder der fed-batch Abschnitte sollte unter mixotrophen Wachstumsbedingungen mit Acetat (10 mM) und Malat (10 mM) eingeleitet werden, um höhere Zellausbeuten und eventuell mehr an biogenem S^0 zu erhalten.

Um mögliche toxische Sulfidkonzentrationen im Kulturansatz zu vermeiden, sollte dreimal aufeinanderfolgend Sulfid (1 mM) zugegeben werden. Das zugegebene Sulfid sollte daraufhin von den Zellen zu biogenem S^0 oxidiert und intrazellulär gespeichert werden. Jeweils am Ende jedes der drei fed-batch Abschnitte (Abb. 5.24), nach der vollständigen Oxidation des Sulfids, sollte in einem Verdünnungsschritt 2 L Medium aus dem Fermenter abgezogen und durch 2 L frisches Medium ersetzt werden. Anschließend sollte ein weiterer fed-batch Abschnitt gestartet werden.

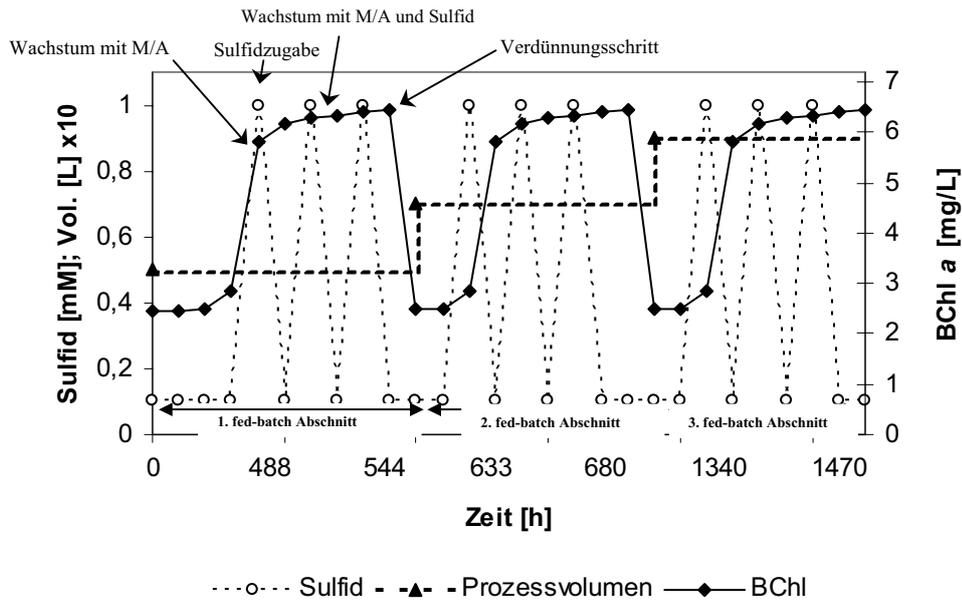


Abb. 5.24: Idealisiertes Schema des Bioprocessverlaufs zur Anwendung von *A. vinosum* 21D zur Sulfidentfernung und Gewinnung von biogenem S^0 . M = Malat, A = Acetat.

Es sollte gezeigt werden, ob sich dieser idealisierte Bioprocess unter Laborbedingungen erwartungsgemäß darstellen lässt. Abb. 5.25 zeigt die Bacteriochlorophyll *a*- und Sulfidkonzentrationen sowie das Prozessvolumen eines 1464 h Versuchslaufs.

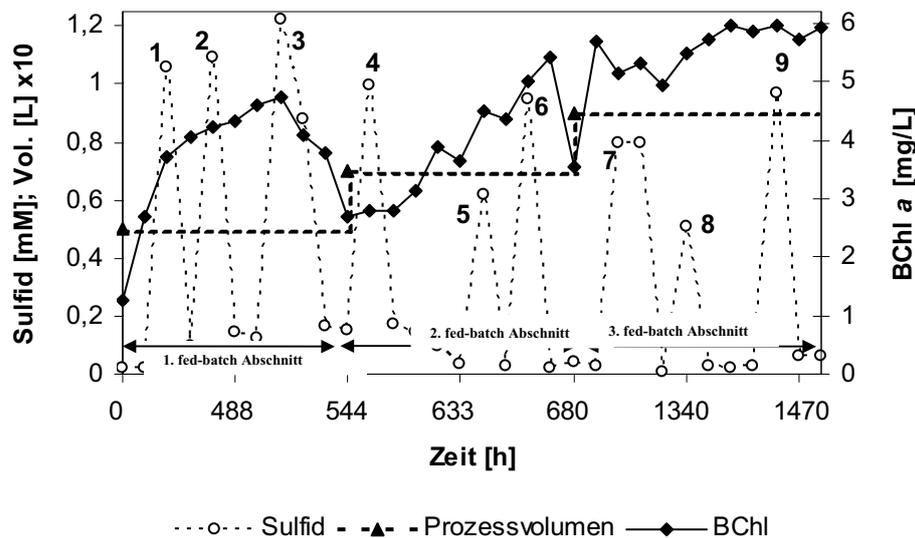


Abb. 5.25: Verlauf der Bacteriochlorophyll *a*- und Sulfidkonzentrationen und des Prozessvolumens während des biotechnologischen Prozesses zur Sulfidentfernung mittels *A. vinosum* 21D. Die einzelnen Sulfidzugaben sind durch Nummern gekennzeichnet (1-9).

Der Photobioreaktor wurde mit 1 L einer dicht gewachsenen Kultur von *A. vinosum* 21D angeimpft. Das Trockengewicht des Inokulums betrug 421 mg (Tab. 5.5). Die Zellen waren bei Versuchsbeginn frei von biogenem S⁰ (Abb. 5.26 „A“).

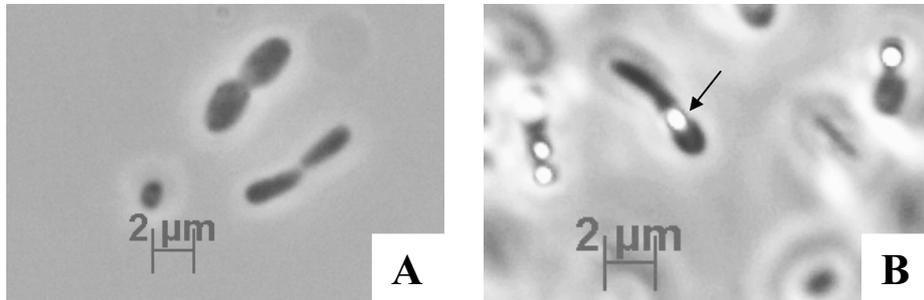


Abb. 5.26 A und B: Mikroskopische Aufnahmen schwefelfreier Zellen von *A. vinosum* 21D zu Beginn (A) und Zellen mit biogenen S⁰-Globuli am Ende des biotechnologischen Prozesses zur Sulfidentfernung unter Anwendung von *A. vinosum* 21D (B). Der Pfeil kennzeichnet den biogenen S⁰ in *A. vinosum* 21D.

In jeder fed-batch Phase wuchsen die Zellen zuerst photomixotroph. Im Anschluss oxidierten die Zellen das zugesetzte Sulfid zu biogenem S⁰, welcher in Form von intrazellulären biogenen S⁰-Globuli gespeichert wurde (Abb. 5.26 „B“). Im anschließenden Verdünnungsschritt wurden 2 L Medium abgezogen und durch 2 L frisches Medium ersetzt. Das abgezogene Medium (*A. vinosum* 21D Zellen mit intrazellulär gespeichertem biogenem S⁰) wurde in ein Absetzbecken transferiert. Nach 1 Woche hatten sich die Zellen am Boden abgesetzt und der zellfreie Überstand konnte in einen Abfallbehälter der Anlage überführt werden. Die sedimentierten Zellen wurden für 48 h bei 80°C getrocknet, um den verbleibenden Wassergehalt zu entfernen.

Tab. 5.5: Prozessvolumen und Biomasse im Photobioreaktor zu Beginn und am Ende des biotechnologischen Prozesses zur Sulfidentfernung unter Anwendung von *A. vinosum* 21D.

	Volumen (mL)	Trockengewicht (mg)
Versuchsbeginn	5.000	421
Nach 1464 h	9.000	3789

Das gesamte Prozessvolumen stieg von 5.000 auf 9.000 mL an (Abb. 5.25 und Tab. 5.5) Insgesamt wurden 3789 mg Biomasse (mit intrazellulär gespeichertem biogenem S⁰) produziert (Tab. 5.5). Während des 1464 h dauernden Versuchslaufs wurden eine maximale

Sulfidentfernungsrate von 49,3 $\mu\text{M/h}$ und eine maximale Sulfidentfernung von 98,7 % erreicht (Tab. 5.6). Die durchschnittliche Sulfidentfernung für das Gesamtexperiment betrug 91,7 %. Während des gesamten Versuchslaufs wurden aus den zugesetzten 1443 mg Sulfid 871,6 mg biogener S^0 gebildet, was einer Rückgewinnung des biogenen S^0 von 60,4 % entspricht (Tab. 5.7).

Tab. 5.6: Sulfidoxidationsraten und prozentuale Sulfidoxidationen in einem mit *A. vinosum* 21D betriebenen 5 L Photobioreaktor. Versuchsdauer: 1464 h. Die jeweiligen maximalen Werte sind fett markiert. Die Sulfidzugaben (1-9) korrelieren mit denen aus Abb. 5.25.

Sulfidzugabe	Sulfid-entfernungs-rate ($\mu\text{M/h}$)	Sulfidentfernung (%) nach jeder Sulfidzugabe	Durchschnittliche Sulfidentfernung (%) für einzelne fed-batch Abschnitte	Durchschnittliche Sulfidentfernung (%) für den gesamten Versuch
1.	2,1	90,6		
2.	43,1	86,7		
3.	49,3	86,5	88,0	
4.	49,2	82,7		
5.	25,3	95,3		
6.	40,0	97,6	92,0	
7.	1,2	98,7		
8.	17,3	94,2		
9.	12,0	93,3	95,4	91,7

Tab. 5.7: Anteil an recyceltem biogenem S^0 aus dem 1464 h dauernden Bioprozess zur Sulfidentfernung unter Anwendung von *A. vinosum* 21D als Biokatalysator.

Sulfidzugabe (mg)	1443,0
Ausbeute biogener S^0 (mg)	871,6
Rückgewinnung biogener S^0 (%)	60,4

Durch den Einsatz von *A. vinosum* 21D als Biokatalysator zur Sulfidentfernung konnten die dargestellten Nachteile der Anwendung von *P. vibrioformis* (Anhaften des gebildeten biogenen S^0 an der Reaktorglaswand, Oxidation des biogenen S^0 zu Sulfat) erfolgreich

unterbunden werden. Da der aus der Sulfidoxidation gebildete biogene S^0 intrazellulär gespeichert wurde, konnten Ablagerungen von biogenen S^0 -Partikeln an der Reaktorglaswand vermieden werden. Durch die Mutation in *A. vinosum* 21D konnte außerdem eine Oxidation des biogenen S^0 zu Sulfat verhindert werden. Die in dem Prozess erreichte effiziente Sulfidentfernung und die hohe Rückgewinnung an biogenem S^0 zeigen, dass der Einsatz von *A. vinosum* 21D eine vielversprechende umweltbiotechnologische Einsatzmöglichkeit eines Purpurschwefelbakteriums darstellt.

6 Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Elementar- und biogenem Schwefel durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Näheres über den Mechanismus der Bioverfügbarmachung von gering wasserlöslichem Elementarschwefel (S^0) durch Anoxyphotobakterien zu erfahren. Dabei wurden mikrobiologische, physiologische, chemisch-analytische, licht- und elektronenmikroskopische, sowie molekularbiologische Untersuchungsmethoden angewandt. Als Modellorganismen wurden das Grüne Schwefelbakterium *Prosthecochloris vibrioformis* DSM 263 und die beiden Purpurschwefelbakterien *Allochromatium vinosum* DSM 180 bzw. *A. vinosum* 21D eingesetzt. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen wurden in Kap. 5 dargestellt und werden hier gemeinsam diskutiert und die Zusammenhänge erklärt.

In der Literatur gibt es nur begrenzt Informationen über die Bioverfügbarmachung von S^0 . Darüber hinaus gibt es, trotz einiger gemeinsamer Abbauwege, keinen universellen prokaryotischen Schwefelmetabolismus [Robertson und Kuenen, 1999; Friedrich et al., 2001; Dahl und Prange, 2006]. Bei einem Vergleich der Untersuchungen zu Aufklärungen des S^0 -Metabolismus fällt auf, dass meist eine mit Detergentien in Lösung gebrachte S^0 -Suspension (z. B. mit 500 ppm Tween 80 [Suzuki et al., 1999]) oder ein hydrophiles Schwefelsol [Then und Trüper, 1984] eingesetzt wurde. Im Falle des hydrophilen Schwefelsols spricht man auch von „Pseudolöslichkeit“ des S^0 [Rabus et al., 2000]. Hydrophiles Schwefelsol besteht aus S^0 (17 %) und langkettigen Polythionaten (83 %). Diese verhalten sich in Wasser vermutlich wie amphiphile Moleküle und bilden Mizellen aus [Studel et al., 1988; Studel, 1989]. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde daher ausschließlich S^0 -Pulver eingesetzt.

6.1.1 Kontakt zwischen Zellen und gering wasserlöslichem S^0

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Kontakt zwischen den Zellen und S^0 für photolithoautotrophes Wachstum von *P. vibrioformis* mit S^0 notwendig ist. Die dabei makroskopisch beobachtete Hydrophilisierung des hydrophoben S^0 wird vermutlich durch die mikroskopisch beobachtete Anlagerung der Zellen an die S^0 Partikel ausgelöst.

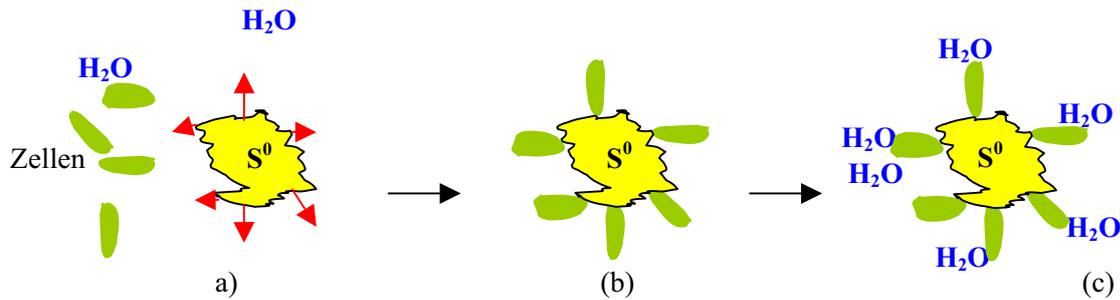


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der Anlagerung von *P. vibrioformis* Zellen an S^0 -Partikel. Die hydrophobe Oberfläche des S^0 (a) wird durch Zellen überlagert (b) und nimmt dadurch hydrophile Eigenschaften an (c).

Wie schematisch in Abb. 6.1 dargestellt, ist die Oberfläche des S^0 anfänglich stark hydrophob. Dies ist daran zu erkennen, dass sich in Wasser verteiltes S^0 -Pulver agglomeriert und an der Wasseroberfläche schwimmt. Die Anlagerung der Zellen rund um die S^0 -Partikel bedingen eine Verdeckung der hydrophoben Oberfläche. Makroskopisch kann dies durch ein Absinken des S^0 -Pulvers beobachtet werden. Da biogener S^0 von *P. vibrioformis* hydrophile Eigenschaften zeigt, scheint es, dass die Hydrophilität von biogenem S^0 essentiell für die Bioverfügbarmachung ist bzw. die Hydrophilisierung des S^0 der initiale Schritt seiner Bioverfügbarmachung ist.

Ein weiterer Hinweis für die Notwendigkeit eines Kontakts zwischen Zellen und S^0 zum Wachstum wurde durch Experimente mit einer Dialysemembran gegeben (Kap. 5.1.2.5). Durch den Einsatz der Dialysemembran zur Trennung von Zellen und S^0 konnte dargestellt werden, dass eine Bioverfügbarmachung des S^0 so nicht möglich war. Dabei wurde gezeigt, dass kleinere lösliche Faktoren keine Rolle bei der Bioverfügbarmachung von S^0 spielen. Ebenso konnte ein direktes Mitwirken von Polysulfiden ausgeschlossen werden, da die gewählte Porengröße der Dialysemembran (Ausschlussgröße 12-14 kDa) für Polysulfide kein Hindernis dargestellt hätte wie Blumentals und Mitarbeiter [1990] am Wachstum des hyperthermophilen Archeons *Pyrococcus furiosus* mit S^0 festgestellt hatten. Der S^0 wurde dabei von den *P. furiosus* Zellen durch eine Dialysemembran (Ausschlussgröße: 8 kDa) separiert. Polysulfide sind ein Gemisch unterschiedlich langer Ketten bestehend aus Schwefelatomen der Oxidationsstufe Null, die von negativ geladenen Sulfidionen flankiert werden. Polysulfide sind dadurch im Gegensatz zu S^0 wasserlöslich. Bei einem pH-Wert von 7 sind Polysulfide mit einer Kettenlängen von 4 und 5 Schwefelatomen (S_4^{2-} , S_5^{2-}) am stabilsten [Visscher und van Gernerden, 1988; Steudel, 1996]. Die Ausschlussgröße von 12-

14 kDa gibt zudem Hinweise, dass eventuell an der Bioverfügbarmachung von S^0 beteiligte extrazelluläre Proteine größer als 14 kDa hätten sein müssen. Durch die gewählte Ausschlussgröße wären diese zurück gehalten worden.

Ein ähnliches Experiment beschrieben Franz und Mitarbeiter [2006] für das Wachstum von *A. vinosum*. Sie trennten die Zellen von dem S^0 durch eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa und verhinderten damit das Wachstum der Zellen. Da kein Wachstum beobachtet wurde, müssen entweder die für die Bioverfügbarmachung von S^0 verantwortlichen Enzyme größer als 100 kDa sein oder zellgebunden vorliegen. Somit könnte auch für das Wachstum von *A. vinosum* mit S^0 ein Kontakt zwischen Zellen und dem S^0 notwendig sein.

Einen weiteren Hinweis für die Notwendigkeit eines Kontakts zwischen Zellen und S^0 zu einem erfolgreichen Wachstum lieferten die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung von extrazellulären Enzymen bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit verschiedenen Schwefelverbindungen. Bei einem Vergleich des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 bzw. mit Sulfid (Kap. 5.1.6.1) konnte gezeigt werden, dass an der Bioverfügbarmachung von S^0 keine extrazellulären Enzyme involviert sind. Diese wären durch die Anwesenheit zusätzlicher Proteinbanden im Gel erkannt worden. Es sind jedoch einige Organismen bekannt, die mittels extrazellulärer Enzyme Redoxreaktionen einleiten können. So werden z. B. durch *Geobacter sulfurreducens* Fe(III)-Nitrileessigsäure, $Fe(OH)_3$, Fe(III)-Citrat und S^0 mittels eines extrazellulären Cytochroms reduziert [Seeliger et al., 1998]. Die Wurzeln von einigen Gräsern wiederum sekretieren Phytosiderophore, welche mit Fe(III) Chelate bilden. Die Aufnahme der Fe(III)-Phytosiderophoren-Komplexe wird durch Transportermoleküle bewerkstelligt [Marschner und Römheld, 1994].

Die Notwendigkeit zur Ausbildung eines Kontakts zwischen Zellen und S^0 wurde auch für eine Reihe anderer Organismen dokumentiert, welche S^0 als Energiequelle nutzen.

Eine Anlagerung von Zellen an S^0 wurde beispielsweise bei chemotrophen Wachstum des Archaeons *Sulfolobus acidocaldarius* beschrieben [Shivvers und Brock, 1973]. Die Autoren postulierten die Anwesenheit von membrangebundenen Enzymen, welche den hydrophoben S^0 für die Zellen verfügbar machten. Espejo und Romero [1987] zeigten, dass Wachstum von *Thiobacilli* mit S^0 nur dann möglich war, wenn die Zellen in direktem Kontakt mit S^0 standen. Zellen welche sich im Medium befanden, aber nicht direkten Kontakt zum S^0 besaßen, waren zum Wachstum nicht befähigt. Bei *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus*

denitrificans beschrieben Blais und Mitarbeiter [1994] ein der bakteriellen Glycokalix ähnliches Material, welches für den Zell-S⁰-Kontakt verantwortlich war. Ohmura und Mitarbeiter [1996] untersuchten *Thiobacilli* und verschiedene S⁰-oxidierende-Bakterien, welche sie zuvor aus Klärschlamm isoliert hatten. Sie machten Sulfhydryl Gruppen der Zellhülle für die Anlagerung der Zellen an S⁰ verantwortlich. Die Zellen bildeten zwischen dem S⁰ und einem 40 kDa großen Protein an den Flagella eine chemische Bindung aus. Auch von Suzuki und Mitarbeitern [1999] wurde bei der Oxidation von S⁰ durch *Thiobacilli* ein Zell-S⁰-Kontakt beschrieben.

Der direkte Kontakt zwischen Organismen und dem Substrat ist auch beim so genannten „*biomining*“, ein im Bergbau zur Metallgewinnung von erzhaltigem Gestein angewandtes biotechnologisches Verfahren, ein wesentlicher Bestandteil der biologischen Reaktion. Mikroorganismen werden in industriellen Prozessen für die kommerzielle Extraktion von Metallen wie Kupfer, Gold und Uran aus ihren Erzen eingesetzt [Rawlings, 2005]. In diesen Prozessen werden Mikroorganismen entweder benötigt, um unlösliche Metallsulfide in wasserlösliche Sulfate zu konvertieren oder um Mineralstrukturen zu öffnen, damit in weiteren Prozessschritten Chemikalien das gewünschte Mineral lösen können [Rawlings, 2005]. Ein Beispiel für die erste Variante ist das so genannte „*bioleaching*“, ein Prozess der die Umwandlung von schwer löslichem Kupfersulfid (CuS) in lösliches Kupfersulfat (CuSO₄) bewirkt [Rawlings, 2005]. Ein Beispiel für die zweite Möglichkeit ist die Gewinnung von Gold aus goldhaltigen Arsenopyrit (FeAsS) Erzen, wobei nach dem biologischen Prozess nur das Gold im Mineral verbleibt und durch eine anschließende Cyanidbehandlung extrahiert werden kann. Da hierbei das gewünschte Metall im Mineral verbleibt, wird dieser Prozess „*biooxidation*“ genannt [Rawlings, 2005]. Die Ausbildung eines Kontakts zwischen den Zellen und den Mineralien wird durch eine von den Zellen gebildete Exopolysaccharid (EPS) Schicht ermöglicht [Sand et al., 1995]. Der Kontakt ist essentiell für die Reaktion, wobei die EPS-Schicht als Reaktionsraum dient [Sand et al., 1995; Gehrke et al., 1998; Tributsch, 2001; Rohwerder et al., 2003; Harneit et al., 2006]

Obwohl bisher keine hüllenartigen Strukturen bei biogenem S⁰ von Grünen Schwefelbakterien gefunden worden sind [Prange, 2001], konnte in Studien an *Chlorobium limicola* gezeigt werden, dass der gebildete biogene S⁰ nur den produzierenden Zellen zur Verfügung stand [Cohen-Bazire, 1963]. Es wäre daher denkbar, dass die Zellen zu ihrem selbst produzierten biogenen S⁰ eine Verbindung aufrechterhalten, um ihn später, wenn kein Sulfid mehr verfügbar ist, oxidieren zu können. Puchkova und Mitarbeiter [1975] nahmen auf

Grund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Grünen Schwefelbakterien an, dass der biogene S^0 in nicht näher definierten „Säcken“ bzw. Ausstülpungen der Cytoplasmamembran abgelagert wurde. Da der Durchmesser der biogenen S^0 -Globuli oft die Größe einer Bakterienzelle übersteigt, erscheint die biogene S^0 -Bildung außerhalb der Zelle mit einer mitwachsenden Cytoplasmamembran aber unwahrscheinlich [Trüper, 1978]. Van Gernerden [1986] beobachtete, dass der extrazellulär abgelagerte biogene S^0 an den Zellen haften blieb. Er erklärte dieses Phänomen mit der möglichen Anwesenheit von Polysaccharidkapseln oder an der Zelloberfläche ausgebildeten Tubuli, welche mit dem biogenen S^0 weiter in Verbindung blieben. Mas und van Gernerden [1995] postulierten, dass der biogene S^0 von Grünen Schwefelbakterien entweder eine Hülle oder Strukturen in der Art von „pili“ besitzen muss. Tatsächlich beobachteten Pibernat und Arbella [1996] während der Bildung von extrazellulärem biogenem S^0 durch *Chlorobium limicola* charakteristische Strukturen der Zellwand, ähnlich wie Haftfüßchen. Sie schrieben diesen Zellwandstrukturen - „spinae“ genannt - eine entscheidende Bedeutung bei der Verfügbarmachung des biogenen S^0 zu.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten daher Aufschluss darüber geben, ob *P. vibrioformis* ähnliche Zellwandstrukturen aufweist bzw. ob sich Hüllstrukturen um den selbst gebildeten biogenen S^0 darstellen lassen (Kap. 5.1.4.1). Allerdings konnten trotz verschiedener Präparationsprotokolle die S^0 -Partikel nicht fixiert und somit keine ähnlichen Strukturen dokumentiert werden. Es könnte sein, dass die native Struktur der biogenen S^0 -Globuli während der Präparation zerstört wurde [Strohl et al., 1981]. Zur Präparation der Proben war es notwendig, eine Entwässerung vorzunehmen. Eine gelungene Einbettung des Objekts wurde nur dadurch erreicht, dass das flüssige Epoxydharz die gesamte entwässerte Struktur ausfüllte. Allerdings sind auch S^0 bzw. biogener S^0 in den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Lösungsmitteln (Ethanol und Diethylether) teilweise löslich (0,65 g S^0 sind in 100 g Ethanol löslich [Tim Ferdelman, persönliche Mitteilung]). Darüber hinaus ist S^0 unter dem Elektronenstrahl im Vakuum extrem instabil. Der biogene S^0 , welcher die Lösungsmittelbehandlung überstanden hatte, war somit thermischer Degradation ausgesetzt [Pasteris et al., 2001]. Eventuell könnten vorhanden gewesene Hüllstrukturen oder „spinae“ während des mikrotomischen Schneidens heraus gebrochen sein. Da allerdings Pibernat und Arbella [1996] ein ähnliches Protokoll für die Einbettung von *Chlorobium limicola* Zellen für die Elektronenmikroskopie verwendeten, ist es auch vorstellbar, dass *P. vibrioformis* tatsächlich keine „spinae“ ausbildet und hier eine andere Möglichkeit des Kontakts vorliegt.

6.1.2 Biogener S⁰ von Anoxyphotobakterien

Bereits 1966 gelang es Thiele zu zeigen, dass auch solche Schwefelbakterien *extern* angebotenen S⁰ nutzen konnten, die biogenen S⁰ *intrazellulär* speichern. Das bedeutet, dass Schwefelbakterien, welche durch Sulfidoxidation gebildeten biogenen S⁰ intrazellulär speichern, die gleichen Enzymsysteme zur Nutzung von S⁰ haben müssen wie solche, die den biogenen S⁰ extrazellulär ablagern [Trüper, 1978].

Sowohl der aus *A. vinosum* isolierte biogene S⁰ als auch der extrazelluläre biogene S⁰ von *P. vibrioformis* zeigten hydrophile Eigenschaften (Kap. 5.1.3.1). Extrazellulärer biogener S⁰ wurde auch von anderen Autoren als hydrophil beschrieben [Dahl, 1999; Dahl und Prange, 2006; Seidel et al., 2006]. Kleinjan und Mitarbeiter [2003] führten die hydrophile Eigenschaft des extrazellulär abgelagerten biogenen S⁰ von *Thiobacilli* auf die Oberflächenstruktur der biogenen S⁰-Partikel zurück. Die Autoren postulierten, dass letztere durch langkettige Polymere - höchstwahrscheinlich Proteine - stabilisiert wurden.

Den biogenen S⁰ der Purpurschwefelbakterien unterscheidet von dem der Grünen Schwefelbakterien, dass die Globuli von einer Proteinhülle umgeben sind [Brune, 1995a; Dahl und Prange, 2006]. In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob Grüne und Purpurschwefelbakterien auch den biogenen S⁰ des jeweils anderen Bakteriums nutzen können. Besonders interessant war, ob nicht nur *A. vinosum* den hüllfreien präparierten biogenen S⁰ von *P. vibrioformis* nutzen kann, sondern auch ob *P. vibrioformis* den aus *A. vinosum* isolierten biogenen S⁰ mit Proteinhülle nutzen kann. Beide Organismen waren in der Lage, den biogenen S⁰ des jeweils anderen Organismus zu verwerten (Kap. 5.1.2.4). Ein Vergleich der lag-Phasen ergab, dass *P. vibrioformis* zur Bioverfügarmachung von isoliertem biogenem S⁰ von *A. vinosum* (72 h) länger benötigte als umgekehrt (48 h). Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass *P. vibrioformis* zuerst die Proteinhülle des angebotenen biogenen S⁰ von *A. vinosum* enzymatisch entfernen musste.

Nach diesen Ergebnissen blieb allerdings unklar, ob die Präparation der Schwefelglobuli aus *A. vinosum* die Hüllproteine zerstört und/ oder die chemische Struktur des biogenen S⁰ verändert hatte. Dahl und Prange [2006] wiesen darauf hin, dass die Extraktion und Präparation von biogenem S⁰ eine chemische Modifikation verursachen kann. Der native chemische Zustand des biogenen S⁰ von *A. vinosum* wurde mittels XANES Spektroskopie als kettenförmiger S⁰ nachgewiesen. Der aus *A. vinosum* Zellen isolierte biogene S⁰ wurde jedoch als Cyclooctaschwefel (S₈) identifiziert [Prange et al., 2002]. Diese Modifikation wurde auf

die Anwesenheit von Sauerstoff während der Extraktion zurückgeführt [Prange et al., 2002]. Um eine durch Sauerstoff verursachte chemische Modifikation des biogenen S^0 zu vermeiden, wurde daher die Isolation des biogenen S^0 aus *A. vinosum* unter anoxischen Bedingungen durchgeführt (Kap. 4.2.2).

6.1.3 Lag-Phasen bei Wachstum von Anoxyphotobakterien mit S^0

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Kulturen von *P. vibrioformis* bei Wachstum mit S^0 bzw. biogenem S^0 später mit dem Wachstum begannen als Kulturen, denen Sulfid zum Medium zugesetzt worden war (Kap. 5.1.2.3). Sulfid ist in gelöster Form im Medium vorhanden und gelangt von dort durch Diffusion in die Zelle und wird im Cytoplasma zu Sulfit oxidiert [Dahl, 1999; 2000; Brüser et al., 2000]. Der S^0 ist jedoch gering wasserlöslich und der in der flüssigen Phase gelöste Anteil würde für ein Wachstum nicht ausreichen.

Ähnliche lag-Phasen wurden auch von Kusche [1984] während des Wachstums von *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* mit S^0 beobachtet. Während Sulfid nur mit kurzer Verzögerung oxidiert wurde, wurde S^0 erst mit einer 4-mal so langen Verzögerung oxidiert. Eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten lag-Phasen von *P. vibrioformis* könnte sein, dass die Organismen eine gewisse Zeit für die Ausbildung des Kontakts zwischen den Zellen und S^0 -Partikeln benötigten. Diese Vermutung konnte durch das in Kap. 5.1.2.6 beschriebene Experiment erhärtet werden, in dem auf S^0 vorkultivierte Zellen wieder in Medium mit S^0 inkubiert wurden. Die Zellen wiesen in diesem Fall wiederum die gleiche lag-Phase (48 h) auf wie in den Ansätzen, deren Vorkulturen mit Sulfid angezogen worden waren. Auch Kusche [1984] beobachtete wieder eine lag-Phase bei Wachstum von *E. shaposhnikovii*, auch wenn die Zellen in der Vorkultur bereits mit S^0 gewachsen waren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Metabolisierung von selbst gebildetem biogenem S^0 schneller eingeleitet wird als die von S^0 (Kap. 5.1.2.5). Das war insofern zu erwarten, da biogener S^0 von *P. vibrioformis* als Elektronenspeicher angelegt wird. Wenn kein leicht verfügbares Sulfid mehr im Medium vorhanden ist, wird der biogene S^0 als Elektronendonator genutzt. Dieser wird daher in einer Form abgelagert, in der er von den Zellen auch wieder genutzt werden kann. Biogener S^0 weist zudem auch hydrophile Eigenschaften auf, welche ihn für die Zellen leichter zugänglich machen als hydrophoben S^0 .

S^0 besteht aus unterschiedlichen Anteilen polymerer Ketten (S_μ) und Ringe verschiedener Größe, hauptsächlich Cyclooctaschwefel (S_8). Franz und Mitarbeiter [2006] untersuchten

während des Wachstums von *A. vinosum* mit S^0 das Verhältnis zwischen S_8 und S_{μ} mittels XANES Spektroskopie. Der zugesetzte S^0 bestand aus 30 % S_8 sowie 68 % S_{μ} . Für das Wachstum nutzte *A. vinosum* nur S_{μ} , während der S_8 -Anteil des S^0 unberührt blieb. In einem 144 h dauernden Wachstumsversuch wurde bereits nach 3 h die Bildung von intrazellulärem biogenem S^0 beobachtet. Die Oxidation des biogenen S^0 zu Sulfat begann aber erst nach 12 h. Selbst nach 144 h wurde nur 74 % des zugesetzten S^0 von den Zellen genutzt und zu Sulfat oxidiert. Der übrig gebliebene Anteil von S^0 bestand zu 95 % aus S_8 .

Der biogene S^0 von *P. vibrioformis* liegt ebenfalls in Kettenform vor [Prange et al., 2002]. Somit besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen S^0 und biogenem S^0 vor allem in der Hydrophilität. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Hydrophilität für die Bioverfügbarmachung von S^0 bzw. biogenem S^0 essentiell ist (Kap. 6.1.1).

6.1.4. Chemische Möglichkeiten der Bioverfügbarmachung von gering wasserlöslichen Substanzen

Die Bildung von Biotensiden ist eine Möglichkeit für Mikroorganismen, gering wasserlösliche Stoffe wie S^0 für ihren Metabolismus bioverfügbar zu machen. Steudel und Holdt [1988] zeigten, dass sich die Löslichkeit von S^0 in Wasser bei Zugabe von neutralen Tensiden wie SDS etwa um den Faktor 5.000 steigern ließ. Jones und Starkey [1961] beobachteten während des Wachstums von *Acidithiobacillus thiooxidans* (vormals: *Thiobacillus thiooxidans*) das Auftreten von oberflächenaktiven Substanzen wie Aminosäuren und Polypeptiden und schlossen daraus, dass diese Substanzen für eine Erhöhung der Löslichkeit von S^0 im Kulturmedium verantwortlich sein könnten. Schaeffer und Umbreit [1963] identifizierten Phosphatidylinositol als oberflächenaktive Substanz während des Wachstums von *A. thiooxidans* mit S^0 . Shively und Benson [1967] schrieben diese oberflächenaktiven Eigenschaften Phosphatidylglycerin zu. Auch langkettige Alkane werden mit der Hilfe von Biotensiden für Mikroorganismen bioverfügbar gemacht [Bühler und Schindler, 1984].

Sander [1990] untersuchte die Oberflächenspannung der Kulturmedien während der Sulfidoxidation durch *P. vibrioformis* (vormals *Chlorobium vibrioformis* f. *thiosulfatophilum*) mittels Kapillaraszension. Dabei veränderte sich die Oberflächenspannung der Kulturmedien nur geringfügig gegenüber der von destilliertem Wasser als Referenzsubstanz. Eine Untersuchung der Oberflächenspannung des Mediums während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 bzw. biogenem S^0 wurde allerdings nicht durchgeführt.

Da in der vorliegenden Arbeit eine viel sensitivere Analyse­methode angewandt wurde und keine Unterschiede in der Oberflächenspannung im Verlauf des Wachstums von *P. vibrioformis* und *A. vinosum* mit biogenem S⁰ detektiert wurden, könnte dies darauf hinweisen, dass Grüne- und Purpurschwefelbakterien biogenen S⁰ bzw. extern zugesetzten S⁰ mit anderen Mechanismen nutzen als *A. thiooxidans*.

Eine weitere Möglichkeit der Bioverfüg­barmachung von extern zugesetztem S⁰ durch Anoxyphotobakterien ist die von verschiedenen Autoren vorgeschlagene reduktive Aktivierung der Schwefelatome auf das Niveau von Sulfid [Shivvers und Brock, 1973; Trüper, 1978; Hansen, 1983; Dahl, 1999; 2000; Dahl und Prange, 2006].

Die Detektion von Sulfid im Medium während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S⁰ bestätigte diese Hypothese der Bioverfüg­barmachung von S⁰ erstmalig experimentell für Grüne Schwefelbakterien. Das gebildete Sulfid kann dann entweder durch Diffusion in die Zelle gelangen und im Cytoplasma zu Sulfit oxidiert werden [Dahl 1999; 2000; Brüser et al., 2000]. Der Mechanismus der reduktiven Aktivierung von S⁰ wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl bei der Bioverfüg­barmachung von S⁰ als auch von biogenem S⁰ nachgewiesen. Neutzling [1985] untersuchte das Wachstum des phototrophen *Blastochloris sulfoviridis* (vormals *Rhodopseudomonas sulfoviridis*) mit S⁰ und detektierte geringe Mengen Sulfid im Medium. Eine direkte Interpretation der Ergebnisse wurde nicht abgeleitet, aber es wurde vermutet, dass die Zellen den S⁰ nicht direkt oxidieren konnten. Somit könnte also auch bei *B. sulfoviridis* eine vorangestellte reduktive Aktivierung die Bioverfüg­barmachung von S⁰ einleiten.

Auch bei einigen chemotrophen Organismen wurde eine initiale reduktive Aktivierung des S⁰ beschrieben. Bacon und Ingledew [1989] konnten ebenfalls Sulfid während des Wachstums von *A. ferrooxidans* mit S⁰ im Medium nachweisen. Sie postulierten, dass der Cyclooktaschwefel (S₈) durch eine „2-Elektronen-Reduktion“ unter Bildung eines enzymgebundenen Polysulfids aktiviert wurde (Enzym + S₈ + 2e → Enzym-S-S₆-S). Das Polysulfid konnte anschließend zu 8 Sulfat Molekülen oxidiert werden. Nach Ansicht der Autoren könnte das detektierte Sulfid durch eine Seitenreaktion des enzymgebundenen Polysulfids entstanden sein.

Brune [1995b] schlug, basierend auf die Ergebnisse von Bacon und Ingledew [1989], eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von S₈ vor. Demnach sollte S₈ zunächst durch zweifache Oxidation zu S₈O₂ oxidiert werden. Durch eine anschließende Ringöffnung und Hydrolyse

des entstandenen Sulfanmonosulfonats sollte ein lösliches Polysulfid (S_7^{2-}) gebildet werden (Abb. 6.2).

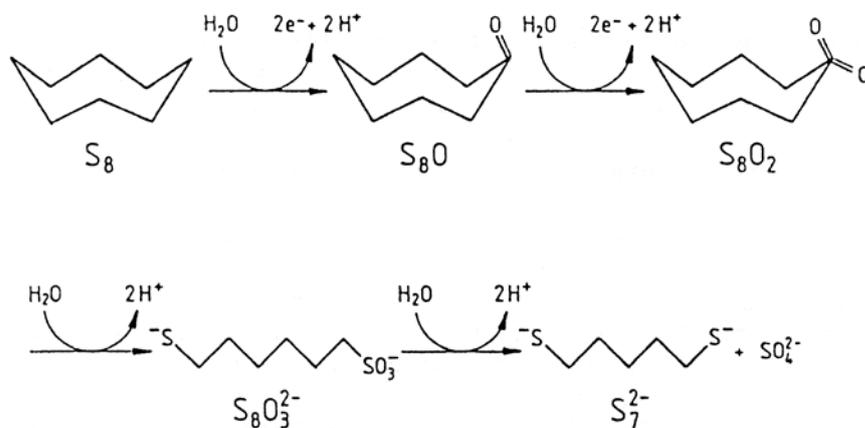


Abb. 6.2: Hypothetische Reaktionsschritte zur Aktivierung von Cyclooctaschwefel (S_8) zu löslichem Polysulfid [Brune, 1995b].

Sulfid als Reaktionsprodukt einer S^0 -Disproportionierung wurde am Beispiel von *Chlorobium limicola* (vormals *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*) nachgewiesen [Paschinger et al. 1974]. Diese photochemische Disproportionierung von S^0 zu Sulfid und Sulfat fand nur dann statt, wenn das Kulturmedium frei von CO_2 war und kontinuierlich mit H_2 begast wurde. Die Bildung von Sulfid bzw. Sulfat war proportional dem in Form von hydrophilem Schwefelsol zugesetztem S^0 und der Beleuchtungsstärke. Trüper und Mitarbeiter [1988] konnten diese Daten nur teilweise bestätigen. Die detektierbaren Reaktionsprodukte waren Sulfid und Thiosulfat sowie Spuren von Sulfit, aber nicht Sulfat. Die Autoren vermuteten, dass Thiosulfat in einer extrem schnellen Reaktion aus S^0 und Sulfit entstanden war. Die Reaktion fand nur bei Licht, bei Abwesenheit von CO_2 und nur so lange statt, wie das gebildete H_2S durch Begasen des Mediums mit Stickstoff oder Argon ausgetrieben wurde. Die S^0 -Disproportionierung kam nur bei solchen Grünen Schwefelbakterien vor, die Thiosulfat als photosynthetischen Elektronendonator verwenden konnten, nicht aber bei anderen Grünen Schwefelbakterien, Purpurschwefelbakterien und *Ectothiorhodospiraceae* [Trüper et al., 1988].

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eine S^0 -Disproportionierung als Erklärung für das während des Wachstums von *P. vibrioformis* mit S^0 gebildete Sulfid ausgeschlossen werden, da das eingesetzte Kulturmedium eine $NaHCO_3$ -Konzentration von 17,89 mM aufwies (Kap. 4.1.2.1). Eine S^0 -Disproportionierung findet aber nur bei Abwesenheit von CO_2 statt [Trüper et al., 1988].

Ein weiterer chemischer Mechanismus der Bioverfügbarmachung von S^0 durch schwefelreduzierende Bakterien wurde am Beispiel des anaeroben Pansenbakteriums *Wolinella succinogenes* dargestellt [Klimmek et al., 1998; Dietrich und Klimmek, 2002; Lin et al., 2004]. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Sulfid und S^0 , was in der Umgebung von Schwefelreduzieren meistens der Fall ist, kommt es zu einer nukleophilen Attacke der Sulfidionen am S_8 . Dies führt zur Bildung von Polysulfiden. Die periplasmatische Polysulfid-Schwefel-Transferase (Sud) dient als Polysulfid Binde- und Transferprotein. *W. succinogenes* betreibt also keine richtige S^0 -Atmung sondern eine Polysulfidatmung [Lin et al., 2004]. Durch das in Kap. 5.1.2.7 dargestellte Dialysemembran-Experiment konnte jedoch eine Rolle von Polysulfiden an der Bioverfügbarmachung von S^0 durch *P. vibrioformis* ausgeschlossen werden.

6.1.5 An der Bioverfügbarmachung von S^0 beteiligte Enzyme

Schon Hansen [1983] hatte die Beteiligung eines „speziellen S^0 -oxidierenden Enzyms“ an der photosynthetischen Nutzung von S^0 durch Anoxyphotobakterien postuliert. Die tatsächliche Anwesenheit bzw. die genaue Funktion eines solchen Enzyms blieb aber bislang unbekannt. Die periplasmatische Polysulfid-Schwefel-Transferase (Sud) ist ein S^0 -bindendes Enzym und wird von *Wolinella succinogenes* bei Anwesenheit von S^0 bzw. daraus chemisch entstehendem Polysulfid im Medium exprimiert [Lin et al., 2004; Klimmek, 2006]. Wegen der extrem geringen Wasserlöslichkeit von S^0 könnte es sein, dass auch bei *P. vibrioformis* solche S^0 -Bindeproteine vorkommen. Solche membrangebundenen Proteine könnten rasch und effizient den Kontakt zwischen Zellen und S^0 herstellen. Um dies zu klären, wurden sowohl eine eindimensionale elektrophoretische Trennung der Proteine der ganzen Zellen von *P. vibrioformis* als auch eine zweidimensionale Trennung der gesamten löslichen und membranassoziierten Proteine durchgeführt, um die Proteinmuster der Zellen bei Wachstum mit S^0 / biogenem S^0 bzw. mit Sulfid miteinander zu vergleichen (Kap. 5.1.6.1). Eine SDS PAGE von Proteinen ganzer Zellen wird oft zur Klassifizierung und Identifizierung von Mikroorganismen benutzt [Vandamme et al., 1996] und wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, um das Proteinmuster bei verschiedenen physiologischen Zuständen zu vergleichen. Diese Methode bietet den Vorteil, unter standardisierten Bedingungen hoch reproduzierbar zu sein [Piraino et al., 2006]. Die zweidimensionale Elektrophorese (2DE), in Kombination mit Identifikation der Proteine durch Massenspektrometrie, wird heute als Standardmethode in der Analyse von Proteinen (Proteomik) eingesetzt. Mit Hilfe dieser

Technik können verschiedene Proteine gemäß ihrem isoelektrischen Punkt, ihrer molekularen Masse und ihrer relativen Häufigkeit aufgetrennt werden [Görg et al., 2001; 2004]. So wurden z. B. mittels 2DE die löslichen Proteine von Zellen des denitrifizierenden Bakteriums EbN1 aus verschiedenen physiologischen Zuständen aufgetrennt [Kühner et al., 2005]. Dabei wurde das Proteinmuster der Zellen bei Wachstum mit Toluol bzw. mit Ethylbenzol verglichen. Etwa 150 verschiedene Proteinspots, die im jeweiligen anderen Zustand nicht vorkamen, wurden analysiert. Davon wurden 8 bzw. 7 Proteinspots mittels Massenspektrometrie identifiziert, welche nur bei Toluol bzw. bei Ethylbenzol gewachsenen Zellen exprimiert wurden.

Mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen elektrophoretischen Verfahren konnten in der vorliegenden Arbeit einige unterschiedliche Banden bzw. Proteinspots festgestellt werden. So konnte durch elektrophoretische Auftrennung der Proteine ganzer Zellen bei Wachstum von *P. vibrioformis* mit verschiedenen Elektronendonatoren mittels SDS-PAGE gezeigt werden, dass nur bei Wachstum mit S^0 eine 38 kDa große Proteinbande und nur bei Wachstum mit biogenem S^0 eine etwa 40 kDa große Proteinbande detektiert wurde, welche bei Wachstum mit Sulfid nicht gefunden wurde. Ein Vergleich der zweidimensional aufgetrennten löslichen und membranassoziierten Proteine der Zellen von *P. vibrioformis* bei Wachstum mit S^0 zeigte, dass 45 zusätzliche Proteinspots im Vergleich zum Wachstum mit Sulfid detektiert exprimiert wurden. Sehr wahrscheinlich stammen eine oder mehrere dieser zusätzlichen Banden bzw. Spots von einem membrangebundenen Protein, welches an der Bioverfügbarkeit von S^0 beteiligt ist.

Die bisher einzigen S^0 -oxidierenden Enzyme konnten bei den thermoacidophilen Archaea *Sulfolobus brierleyi* und *Acidianus ambivalens* (vormals *Desulfurolobus amivalens*) charakterisiert werden [Emmel et al., 1986; Kletzin, 1989]. Der S^0 bindet an einen Cystein Rest der cytoplasmatischen Schwefel-Oxygenase-Reduktase (SOR) und in Folge kommt es zu einer Disproportionierungsreaktion am Eisenkern des Enzyms mit den Produkten Sulfit, Thiosulfat und Sulfid [Urich et al., 2004; 2005; 2006]. Der Mechanismus ist vermutlich ähnlich dem periplasmatischen „Thiosulfat-oxidierenden-Multienzym-System-Komplex (TOMES)“, welcher bei *Paracoccus pantotrophus* beschrieben wurde [Friedrich et al., 2001]. Die Frage nach der genauen Struktur des Substrats für diese Enzyme ist allerdings noch nicht restlos geklärt. Für die SOR wurde ein spezieller Aktivierungsschritt des S^0 vorgeschlagen. Dabei würde der S_8 -Ring durch ein nukleophiles Reagenz aufgebrochen werden und dieses zur Bildung von anorganischen oder organischen Polysulfanen führen [Rohwerder und Sand,

2003; Urich et al., 2005b]. Möglicherweise handelt es sich aber auch um lösliche Polysulfide, was auch die cytoplasmatische Lokalisation der SOR erklären würde [Urich et al., 2006]. Eine endgültige Antwort auf die Frage der Bioverfügbarmachung von S^0 durch thermoacidophile Archaea kann somit noch nicht gegeben werden.

Da in der vorliegenden Arbeit die reduktive Aktivierung von S^0 als Mechanismus der Bioverfügbarmachung von S^0 / biogenem S^0 durch *P. vibrioformis* identifiziert wurde, können in weiterer Folge die beteiligten Enzyme aufgeklärt und charakterisiert werden.

6.1.6 Modellvorschlag zur initiellen photosynthetischen Nutzung von S^0 durch *P. vibrioformis*

Anhand der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse lässt sich ein Schema der initiellen Schritte der photosynthetischen Nutzung des gering wasserlöslichen S^0 durch *P. vibrioformis* darstellen (Abb. 6.3). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen zunächst einen Kontakt zu den S^0 -Partikeln ausbilden, was eine bestimmte Zeit in Anspruch nimmt und makroskopisch an der Hydrophilisierung der vorher hydrophoben S^0 -Partikeln erkennbar ist. Durch vermutlich membrangebundene Proteine wird S^0 zu Sulfid reduziert. Wasserlösliches Sulfid gelangt entweder durch Diffusion ins Cytoplasma [Dahl, 1999; 2000; Brüser et al., 2000] und dient als Elektronendonator für die photosynthetische CO_2 -Reduktion und Bildung von Biomasse.

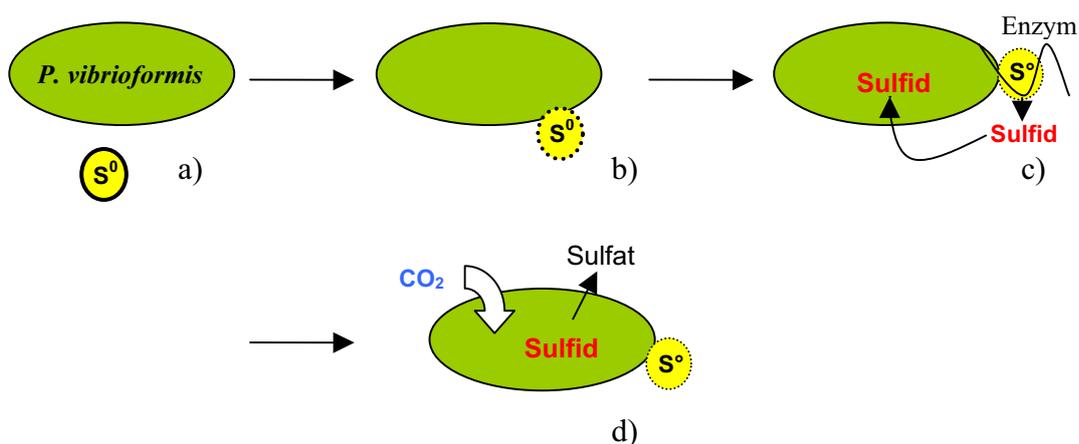


Abb. 6.3: Modellvorschlag zu den initiellen Schritten der photosynthetischen Nutzung von S^0 durch *P. vibrioformis*. Zellen von *P. vibrioformis* und S^0 im Medium a) Kontakt zwischen Zellen und dem S^0 -Partikel, Hydrophilisierung des S^0 b) enzymatische Reduktion des S^0 zu Sulfid c) Durchführung einer anoxygenen Photosynthese mit Sulfid als Elektronendonator d).

6.1.7 Bioverfügbarmachung von S⁰ durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

Bei der Bioverfügbarmachung des selbst gebildeten biogenen S⁰ durch Purpurschwefelbakterien entfällt auf Grund der intrazellulären periplasmatischen Lokalisation die Notwendigkeit der Ausbildung eines Kontakts zwischen den Zellen und dem Substrat. Allerdings ist der gesamte Mechanismus der photosynthetischen Nutzung des biogenen S⁰ durch Purpurschwefelbakterien noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Enzyme des *dsr* Operons für die Oxidation des biogenen S⁰ essentiell sind [Pott und Dahl, 1998; Dahl et al., 2005]. Innerhalb der *dsr* Genregion wurden 15 open reading frames (ORF) identifiziert (*dsr*ABEFHCMKLJOPNRS) [Dahl und Prange, 2006]. Die von der *dsr* Genregion kodierten Proteine sind entweder cytoplasmatischer oder membrangebundener Natur und können daher nicht direkt den extracytoplasmatisch gespeicherten biogenen S⁰ metabolisieren. Daher wurde vorgeschlagen, dass der biogene S⁰ reaktiv aktiviert wird und dass das gebildete Sulfid ins Cytoplasma diffundiert wird, um dort zu Sulfid oxidiert zu werden [Dahl, 1999]. Dieses Modell der reaktiven Aktivierung von *intrazellulärem* biogenem S⁰ von Purpurschwefelbakterien entspricht somit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Bioverfügbarmachung von zum Medium *extern zugesetztem* S⁰ durch Grüne Schwefelbakterien. In einem zweiten hypothetischen Modell dient ein Gluthathionamid als Transportmolekül um den extracytoplasmatischen biogenen S⁰ ins Cytoplasma zu transportieren [Dahl, 1999; Prange, 2001; Dahl et al., 2005].

A. vinosum 21D konnte, trotz des Unvermögens zur Oxidation von intrazellulärem biogenem S⁰, extern zum Medium zugesetztes S⁰ nutzen, was an der Bildung von intrazellulären biogenen S⁰-Globuli zu sehen war (Kap. 5.1.2.8). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, dass es sich bei der Bioverfügbarmachung von intrazellulärem biogenem S⁰ und von extern zugesetztem S⁰ um zwei verschiedene Enzymsysteme handeln könnte.

Auf Grund eines DNA Sequenzvergleichs wurde bisher vermutet, dass sich die Mechanismen der Oxidation von S⁰/ biogenem S⁰ durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien gleichen [Dahl et al., 2005]. Da allerdings während des Wachstums von *A. vinosum* 21D mit S⁰ kein Sulfid als Intermediat im Medium detektiert wurde (Kap. 5.1.5.4), kann daher vermutet werden, dass in Grünen- und Purpurschwefelbakterien offensichtlich unterschiedliche Wege in der initiellen Verwertung von extern zugesetztem S⁰ existieren.

6.2 Untersuchungen zur biotechnologischen Sulfidentfernung durch Grüne- und Purpurschwefelbakterien

Sulfid ist für viele pro- und eukaryotische Organismen eine toxische Substanz und darf aus Umweltschutzgründen nicht aus Industrieprozessen in die Luft oder ins Abwasser abgegeben werden. Das Angebot an biotechnologischen Alternativen zu den kostenintensiven physikalisch-chemischen Verfahren zur Sulfidoxidation ist noch sehr gering. Entwicklungen von konkurrenzfähigen biotechnologischen Verfahren sind daher ökologisch und ökonomisch von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei biotechnologische Verfahren unter Anwendung von Anoxyphotobakterien vorgestellt, die eine mikrobielle Entfernung des Sulfids mit der Produktion von biogenem S^0 kombinieren. Beide Prozesse verbinden somit einen umweltrelevanten und wirtschaftlichen Nutzen: i) Entfernung von Sulfid und ii) Rohstoffrecycling.

Besonders in Bereichen der industriellen Produktion („Weiße Biotechnologie“) haben sich biotechnologische Verfahren etabliert. So werden beispielsweise Enzyme, Aminosäuren, Ethanol und Zitronensäure im Maßstab von mehreren hunderttausend Jahrestonnen hergestellt. Biotechnologische Produktionsverfahren bieten gegenüber konventionellen chemischen Verfahren den Vorteil, dass sie unter milden Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu bei Raumtemperatur unter weitgehender Vermeidung von Neben- und Abfallprodukten arbeiten [Antranikian, 2006]. Auch die umweltbiotechnologischen Verfahren („Graue Biotechnologie“) werden im Allgemeinen als wirtschaftlich vorteilhafter im Vergleich zu konventionellen umwelttechnologischen Verfahren bezeichnet [Stottmeister, 2003]. Als hohe Kostenfaktoren von konventionellen Verfahren werden vor allem der Energieaufwand und die Entsorgung von toxischen Nebenprodukten angeführt [Buisman et al., 1990; Syed und Henshaw, 2003]. Allerdings muss bei biotechnologischen Verfahren die mit photosynthetischen Organismen betrieben werden der Energieaufwand für die Bereitstellung von künstlichem Licht berücksichtigt werden, sofern nicht Sonnenlicht genutzt werden kann [Jensen und Webb, 1995].

Tab. 6.1 gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile von alternativen biotechnologischen Verfahren gegenüber konventionellen physikalisch-chemischen Verfahren zur Sulfidentfernung. Biotechnologische Verfahren arbeiten meist bei moderaten Temperaturen und bei Atmosphärendruck, während physikalisch-chemische Verfahren bei hohen

Temperaturen und hohem Druck betrieben werden. Moderate Prozesstemperaturen und bei Atmosphärendruck betriebene Prozesse tragen darüber hinaus zu einer hohen Arbeitssicherheit für das Personal bei. Anstelle von chemischen Oxidationsmitteln oder chemischen Katalysatoren werden Zellen als Biokatalysatoren eingesetzt. Meistens arbeiten biotechnologische Verfahren mit sehr spezifischen Reaktionsabläufen, um die Produktion von unerwünschten Nebenprodukten zu vermeiden.

Tab. 6.1: Vor- und Nachteile von biotechnologischen Verfahren der Sulfidentfernung im Vergleich zu physikalisch-chemischen Verfahren [zusammengestellt aus Jensen und Webb, 1995; Pandey und Malhotra, 1999; Janssen et al., 2001; Kleinjan et al., 2003].

Vorteile	Nachteile
- geringe Energiekosten und hohe Arbeitssicherheit für Personal wegen Umgebungstemperatur und -druck	- Nicht geeignet für hohe und stark schwankende Sulfidkonzentration
- Keine toxischen Nebenprodukte	- Reinprodukt erst nach Abrennung von Zellen
- Kein zusätzlicher Katalysator oder Oxidationsmittel notwendig	- Junge Technologie (wenige verfahrens-technische Erfahrungswerte)

Auf Grund der Toxizität von Sulfid sind jedoch biotechnologische Verfahren nicht geeignet zur Reinigung von Abwasser mit höheren Sulfidkonzentrationen als 7 mM. Außerdem ist Abwasser mit stark schwankenden Sulfidkonzentrationen ungünstig, da die Zellen nicht so schnell auf sich verändernde Bedingungen reagieren können. Die alternativen biotechnologischen Verfahren zur Sulfidentfernung können nicht auf eine so lange Entwicklungsgeschichte zurückblicken wie die konventionellen Verfahren. So wurde der heute in der industriellen Sulfidentfernung dominierende Claus-Prozess beispielsweise bereits 1880 entwickelt [Fischer, 1988]. Daher ist das Entwicklungspotential im Bereich der biotechnologischen Verfahren noch sehr hoch und im Gegensatz zu den physikalisch-chemischen Verfahren konnten noch keine hochtechnologischen Anlagen entwickelt werden.

Trotz der verhältnismäßig kurzen Entwicklungsperiode konnte jedoch der Einsatz verschiedener Mikroorganismen im Bereich der Sulfidentfernung getestet werden. Prinzipiell können chemotrophe als auch phototrophe Organismen als Biokatalysatoren in der biotechnologischen Sulfidentfernung zum Einsatz kommen.

Vorteile der Anwendung von chemotrophen *Thiobacilli* in der Sulfidentfernung sind der geringe Nährstoffanspruch dieser Organismen und die Tatsache, dass die Bioreaktoren nicht, wie bei phototrophen Organismen, lichtdurchlässig sein müssen [Kleinjan et al., 2003]. Der biogene S^0 wird wie bei den Grünen Schwefelbakterien extrazellulär abgelagert und kann sowohl bei kontinuierlichem als auch bei diskontinuierlichem (batch) Betrieb aus dem Ablauf von den Zellen getrennt werden [Kleinjan et al., 2003]. Dabei sedimentieren die biogenen S^0 -Partikel, wegen der größeren Dichte, schneller zu Boden als die Zellen. Der Katalysator (die Zellen) kann dem System wieder zurückgeführt werden [Cork et al., 1986]. Einen großen Kostenfaktor kann allerdings die Bereitstellung der Energie für die Belüftung dieser aeroben Systeme darstellen [Pandey und Malhotra, 1999; Kleinjan et al., 2003]. Sulfid wird durch *Thiobacilli* bei Anwesenheit von Sauerstoff zu biogenem S^0 und weiter zu Sulfat oxidiert. Durch eine aufwendige Prozesssteuerung und ein optimales möglichst stöchiometrisches „Sulfid: Sauerstoff-Verhältnis“ kann die in diesem Prozess unerwünschte Sulfatbildung verringert werden [Janssen et al., 1998].

Zur Überprüfung des Einsatzes eines neuen Bakteriums für eine abwassertechnologische Anwendung ist es zunächst notwendig, den Bakterienstamm in Reinkultur zu studieren. Erst dann wird untersucht, wie sich das Bakterium im realen Abwasser verhält. Eine Sterilisierung von Abwasser ist zwar prinzipiell möglich, aber auf Grund der großen Volumenströme unwirtschaftlich [Hurse 2002; Hurse und Keller, 2004a]. Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Verfahren wurden Reinkulturen von *P. vibrioformis* bzw. *A. vinosum* 21D eingesetzt, um zunächst Informationen über die Wirksamkeit dieser Organismen als Biokatalysatoren zur Entfernung von Sulfid aus synthetischem Abwasser zu erhalten. Der Wildstamm *A. vinosum* kommt auch natürlich in Kläranlagen vor [Madigan, 1988]. Im Abwasser ist eine große Zahl von verschiedenen Mikroorganismen anzutreffen. So zeigten unter anderem Kobayashi und Mitarbeiter [1983], dass in einer Kläranlage Sulfid tatsächlich aus dem Abwasser entfernt wurde, wenn die Bedingungen für Sulfid oxidierende Organismen förderlich waren.

Wegen der Notwendigkeit zur Entschwefelung von Erdöl und Erdgas wird aktuell auf dem Weltmarkt mittels Claus-Prozess mehr S^0 produziert, als in der Industrie als Chemierohstoff benötigt wird [Ober, 2004]. Für manche Anwendungen wird jedoch dem biogenen S^0 gegenüber dem S^0 aus physikalisch-chemischer Produktion der Vorzug gegeben. Biogener S^0 aus biotechnologischen Sulfidentfernungsverfahren kann verschieden eingesetzt werden. Für

den Einsatz von (biogenem) S^0 als Rohstoff für die Schwefelsäureproduktion ist eine Reinheit von 99 % erforderlich. Verunreinigter (biogener) S^0 muss vorher einer Behandlung in einer Schmelzhütte unterzogen werden, deren Produkt S^0 mit einer Reinheit von 99,9 % ist [Kleinjan et al., 2003]. Im „*biomining*“ sowie als Dünger in der Landwirtschaft konnten Vorteile des biogenen S^0 gegenüber S^0 aufgezeigt werden [Kleinjan et al., 2003]. Tichý und Mitarbeiter [1994] verglichen den Einsatz von S^0 und durch *Thiobacilli* gebildeten biogenen S^0 auf „*biomining*“. Die Autoren begründeten die positive Wirkung des biogenen S^0 mit dessen hydrophilen Eigenschaften. Kijlstra und Mitarbeiter [2001] untersuchten den Ertrag von Raps bei Düngung mit verschiedenen „ S^0 -Typen“. Schwefel ist ein wichtiger Pflanzennährstoff und kann über die Blätter aus der Atmosphäre in Form von reduzierten (COS , CS_2 , H_2S) oder oxidierten Verbindungen (SO_2) aufgenommen werden [Kleinjan et al., 2003]. Der Großteil des Bedarfs an Schwefel wird jedoch von Pflanzen über die Wurzeln in Form von Sulfat aufgenommen. In vielen Ackerböden Europas herrscht ein Schwefeldefizit, welcher sich besonders negativ auf das Wachstum von Raps und Getreide auswirkt [Kleinjan et al., 2003]. Bei Düngung mit biogenem S^0 von *Thiobacilli* konnte 34,5 %, bei Zusatz von S^0 jedoch nur 14,6 % Ertragssteigerung gegenüber dem Ertrag bei gar keiner Düngung erzielt werden [Kijlstra et al., 2001]. Die Autoren führten den Vorteil des biogenen S^0 gegenüber S^0 auf die geringere Partikelgröße zurück. Biogener S^0 bzw. S^0 wird durch chemotrophe Organismen (z. B. *Thiobacilli*) zu Sulfat oxidiert und kann dann von den Pflanzen aufgenommen werden. Der Vorteil des schwer löslichen biogenen S^0 bzw. S^0 gegenüber Sulfat als Dünger ist darauf zurückzuführen, dass keine umweltbedenklich Auswaschung ins Grundwasser, wie beim löslichen Sulfat, stattfindet [Alloway und Ayres, 1996; Meyer, 1977].

6.2.1 Grüne Schwefelbakterien als Biokatalysatoren zur Sulfidentfernung

Der Vorteil bei der Anwendung von Grünen Schwefelbakterien für die Sulfidentfernung ist zum einen die hohe Sulfidresistenz dieser Organismen und zum anderen die Tatsache, dass der durch die Sulfidoxidation gebildete biogene S^0 , wie bei den chemotrophen *Thiobacilli*, außerhalb der Zellen abgelagert wird. Darüber hinaus benötigen Grüne Schwefelbakterien sehr geringe Lichtintensitäten und ertragen hohe Sulfidkonzentrationen [Overmann, 2000; 2005].

Basu und Mitarbeiter [1996] arbeiteten mit einem, dem in der vorliegenden Arbeit ähnlichen Photobioreaktor, welcher *Chlorobium limicola* Zellen enthielt und zur Entschwefelung von Erdgas geringer Qualität (low quality natural gas, LQNG) im kontinuierlichen Betrieb

eingesetzt wurde. Das einströmende Gas enthielt 2,5 % H₂S, 11,2 % CO₂, 14,8 % CH₄ und 71,5 % He, wobei der H₂S-Anteil durch die mikrobiologische Aktivität auf 0,04 % im „gereinigten“ Gas reduziert werden konnte. Die Autoren sammelten den gebildeten biogenen S⁰ in einem Absetzbecken und erreichten zeitweise eine Rückgewinnung von 99,9 %. Allerdings wurden keine Angaben über den Zeitraum des Versuchs gemacht.

Henshaw und Mitarbeiter [1998], Henshaw und Zhu [2001] sowie Syed und Henshaw [2003] arbeiteten mit einem kontinuierlich betriebenen beleuchteten Röhrenreaktor, welcher aus transparenten Tygon Röhren mit Durchmessern bis 6,4 mm bestand. An der Innenseite der Röhren war ein aus Grünen Schwefelbakterien bestehender Biofilm angewachsen. Durch die Rückhaltung der Zellen im System wurden eine Erhöhung der Biomasse und eine Verbesserung der Sulfidentfernung erzielt. Nur der biogene S⁰ als gewünschtes Produkt verließ den Reaktor. Die Oxidation des biogenen S⁰ zu Sulfat wurde durch eine komplexe Prozesssteuerung verringert. Dazu wurde dem Bioreaktor genau diese Sulfidkonzentration zugesetzt, bei der kein überschüssiges Sulfid den Reaktor verließ, aber auch noch kein Sulfat gebildet wurde.

Kim und Mitarbeiter [1990; 1991] entwickelten ein Verfahren zur Sulfidentfernung bei dem *Chlorobium limicola* Zellen in einer Strontium-Alginat Matrix immobilisiert waren. Durch eine optimale Versorgung der Zellen im Bioreaktor mit Licht konnte die Sulfatbildung verringert werden. Die maximal mögliche Sulfidkonzentration im Bioreaktor, bei welcher der Prozessbetrieb nicht beeinträchtigt wurde, betrug 6,7 mM.

Bei diesen beschriebenen Verfahren der Anwendung von Grünen Schwefelbakterien als Biokatalysatoren zur Sulfidentfernung handelte es sich jedoch ausschließlich um Laborexperimente, die aus ökonomischen oder praktischen Gründen zu keinem Einsatz in größerem Maßstab gelangt waren. Daher gab es Handlungsbedarf ein weiteres Verfahren zur biotechnologischen Sulfidentfernung zu entwickeln, welches ökonomische und praktische Kriterien erfüllt, um später im Pilotmaßstab eingesetzt werden zu können.

In dem in der vorliegenden Arbeit dargestellten 101 h betriebenen Prozess mit *P. vibrioformis* konnten initial eine hohe Sulfidoxidation und eine hohe Rückgewinnung von biogenem S⁰ erreicht werden (Kap. 5.2.1). Allerdings lagerte sich während des Prozessverlaufs der biogene S⁰ an der Glaswand des Reaktors ab und konnte nur mehr nach Prozessabbruch aus dem System zurückgewonnen werden. Diese Störung wurde auch von anderen Autoren bei Systemen zur Sulfidentfernung mit Grünen Schwefelbakterien beschrieben [Cork et al., 1983; Jennemann et al., 1997]. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit die Oxidation des biogenen S⁰ zu Sulfat nicht verhindert werden. Die Ablagerung des biogenen S⁰ an der

Glaswand und seine Oxidation zu Sulfat führten zu einer Verringerung der Rückgewinnung an biogenem S^0 und zu einer wachstumsbeeinflussenden Verringerung des Lichteintrags in den Reaktorraum.

6.2.2 *A. vinosum* 21D als Biokatalysator zur Sulfidentfernung

Während des Einsatzes von *P. vibrioformis* als Biokatalysator zur Sulfidentfernung waren die Ablagerung des biogenen S^0 an der Reaktorglaswand sowie die schwer zu kontrollierende Oxidation des biogenen S^0 zu Sulfat problematisch, da es dadurch zu einer Verringerung des rückgewinnbaren biogenen S^0 kam. Daher wurde ein neuartiges Konzept zur biotechnologischen Sulfideliminierung erstellt.

Der eingesetzte Organismus *A. vinosum* 21D bot zwei Vorteile: i) der durch die Sulfidoxidation gebildete biogene S^0 wurde intrazellulär gespeichert, und es kam somit zu keiner Ablagerung von biogenem S^0 an der Reaktorglaswand und ii) da der Enzymkomplex zur Oxidation von biogenem S^0 zu Sulfat gentechnisch ausgeschaltet war [Pott und Dahl, 1998], entfiel die Notwendigkeit einer verfahrenstechnischen Steuerung, um diese Oxidation zu verhindern. Die Prozessführung war somit stark vereinfacht. Soweit bekannt, wurde bislang kein gentechnisch verändertes Purpurbakterium auf dem Gebiet der biotechnologischen Sulfidentfernung eingesetzt [Imhoff, 2003a].

Tab. 6.2 zeigt eine Zusammenstellung der speziellen Vor- und Nachteile der Anwendung von *A. vinosum* 21D gegenüber anderen biotechnologischen Verfahren zur Sulfidentfernung wie z.B. mit Grünen Schwefelbakterien oder *Thiobacilli*. Die intrazelluläre Lokalisierung des von *A. vinosum* 21D gebildeten und gespeicherten biogenen S^0 kann allerdings auch als Nachteil angeführt werden, da der biogene S^0 nicht als Reinprodukt zur Verfügung steht wie extrazellulär abgelagerter biogener S^0 durch Grüne Schwefelbakterien oder *Thiobacilli*. Um reinen biogenen S^0 zu erhalten, müssen Zellen von *A. vinosum* 21D zuerst mittels Ultraschall aufgebrochen werden, um dann z. B. in einer anschließenden Gradientenzentrifugation Zelltrümmer von biogenem S^0 zu trennen. Ein solches Trennverfahren wäre im industriellen großtechnischen Einsatz, bedingt durch den enormen Arbeitsaufwand, irrelevant. Da allerdings der Anteil an biogenem S^0 in Purpurschwefelbakterien bis zu 50 % Trockenmasse erreichen kann [Sánchez et al., 1997], könnte man für bestimmte industrielle Anwendungen das getrocknete und gemahlene Biomassepulver (Zellen und biogener S^0) auch unsepariert einsetzen. Denkbar wäre ein Einsatz als Fungizid oder als Zusatz zu Asphalt bzw. Beton [Meyer, 1977]. Sowohl in Asphalt als auch in Beton hat S^0 die Rolle eines Bindemittels.

Asphaltmischungen mit hohem S^0 Gehalt haben eine höhere Viskosität bei hohen Temperaturen. Dadurch wird eine höhere Widerstandsfähigkeit des Asphalts gegen die von Fahrzeugen verursachte Verformung erreicht. Außerdem sind solche Asphaltmischungen chemisch resistenter gegen Kraftstoffe und andere Lösungsmittel [Fischer, 1988]. Der Zusatz von S^0 zu Betonmischungen bewirkt eine Verbesserung der Materialeigenschaften, höhere Lebensdauer sowie Beständigkeit gegenüber durch Säure und Salze verursachte Korrosion [Fischer, 1988].

Tab. 6.2: Spezielle Vor- und Nachteile bei der Anwendung von *A. vinosum* 21D zur Sulfideliminierung gegenüber anderen biotechnologischen Verfahren (z. B. mit Grünen Schwefelbakterien oder *Thiobacilli*).

Vorteile	Nachteile
- Energieersparnis durch anaeroben Betrieb (keine Belüftung)	- Geringere Sulfidkonzentrationen möglich
- Keine Ablagerung von biogenem S^0 an Wand	- Energieaufwand durch Beleuchtung
- Spezifische Reaktion: Oxidation nur bis S^0	- Biogener S^0 liegt nicht in Reinform vor
- Keine Bildung unerwünschten Sulfats	

Ein weiterer Nachteil des in der vorliegenden Arbeit dargestellten Einsatzes von *A. vinosum* 21D im Vergleich zu anderen biotechnologischen Systemen zur Sulfidentfernung, welche biogenen S^0 extrazellulär ablagern, ist der notwendige Verdünnungsschritt. Das gewünschte Produkt wird im Verfahren mit *A. vinosum* 21D zusammen mit den als Biokatalysatoren dienenden Zellen entfernt. In Verfahren mit z. B. Grünen Schwefelbakterien können die Zellen dem System wieder zurückgeführt werden [Cork et al. 1986].

Während durch den anaeroben Betrieb und den Wegfall der Notwendigkeit einer Belüftung Energie gespart wird, muss Energie für die Bereitstellung des Lichts aufgebracht werden. Darüber hinaus weisen Zellen von Purpurschwefelbakterien im Vergleich zu Grünen Schwefelbakterien eine geringere Sulfidkonzentrationstoleranz auf.

Um keine Antibiotikaresistenz in die Umwelt einzubringen, müsste das Genom der Mutante *A. vinosum* 21D vor einem großtechnischen Einsatz neu konstruiert werden, um eine sogenannte „unmarkierte Mutante“ zu erzeugen. Dabei würde das *dsrB* Gen anstelle durch Insertion einer Antibiotikaresistenz-Kassette durch Deletion der kompletten Gensequenz inaktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass *A. vinosum* 21D als Biokatalysator zur Entfernung von Sulfid aus *synthetischem* Abwasser im Labormaßstab unter aseptischen Bedingungen gut geeignet ist. Die Erarbeitung dieser Parameter waren notwendig um i) *A. vinosum* 21D auch in *realem* Abwasser einsetzen zu können und ii) ein „upscaling“ dieses Verfahrens auf größere Reaktorvolumina durchführen zu können. Dabei müsste auch der Reaktortyp geändert werden, um die Zellen effizient mit Lichtenergie zu versorgen. Dies könnte z. B. durch den Einsatz eines Schlaufenreaktors erreicht werden [Papagianni et al., 2003; Krishnakumar et al., 2005; Georgiou und Aivasidis, 2006]. Mit den Sulfidentfernungsraten und den Ausbeuten an recyceltem biogenem S⁰ konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von *A. vinosum* 21D eine konkurrenzfähige Alternative zu den bestehenden biotechnologischen Verfahren zur Sulfidentfernung darstellt.

7. Literaturverzeichnis

- Affeldt** K (2005) Regulation von Enzymen des anaeroben Alkylbenzol-Abbaus unter oxischen Bedingungen in einem denitrifizierenden Bakterium, Stamm EbN1. Diplomarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
- Alain** K, Holler T, Musat F, Elvert M, Treude T, Krüger M (2006) Microbiological Investigation of Methane- and Hydrocarbon-Discharging Mud Volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environ Microbiol* 8: 574-90
- Alloway** BJ, Ayres DC (1996) Schadstoffe in der Umwelt. Chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Antranikian** G (2006) Angewandte Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin
- Bacon** M, Ingledew WJ (1989) The Reductive Reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on Sulphur and Selenium. *FEMS Microbiol Lett* 58: 189-194
- Basu** R, Clausen EC, Gaddy JL (1996) Biological Conversion of Hydrogen Sulfide into Elemental Sulfide. *Environ Prog* 15: 234-238
- Blais** JF, Tyagi RD, Meunier N, Auclair JC (1994) The Production of Extracellular Appendages During Bacterial Colonization of Elemental Sulphur. *Process Biochem* 29: 475-482
- Blumentals** II, Itoh M, Olson GJ, Kelly RM (1990) Role of Polysulfides in Reduction of Elemental Sulfur by the Hyperthermophilic Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 56: 1255-1262
- Boulégué** J (1978) Solubility of Elemental Sulfur in Water at 298 K. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 5: 127-128
- Bradford** MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254
- Brune** DC (1995a) Isolation and Characterisation of Sulfur Globule Proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch Microbiol* 163: 391-399
- Brune** DC (1995b) Sulfur Compounds as Photosynthetic Electron Donors. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 847-870

- Brüser** T, Lens PNL, Trüper HG (2000) The Biological Sulfur Cycle. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L (eds) Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution, IWA Publishing, London. pp: 47-85
- Bryant DA**, Frigaard NU (2006) Prokaryotic Photosynthesis and Phototrophy Illuminated. Trends Microbiol 14: 488-496
- Bücking** H (1995) Untersuchungen zur Aufnahme, Speicherung und Verteilung von Phosphor in unmykorrhizierten und mykorrhizierten Sämlingen von *Pinus sylvestris* L. Dissertation, Universität Bremen
- Bühler** M, Schindler J (1984) Aliphatic Hydrocarbons. In: Kieslich K (ed) Biotransformations 6a. Verlag-Chemie Weinheim. pp: 329–385
- Buisman** CJN, Geraats BG, Ijspeert P, Lettinga G (1990) Optimization of Sulfur Production in a Biotechnological Sulfide-Removing Reactor. Biotechnol Bioeng 35: 50-56
- Buisman** CJN, Ijspeert P, Hof A, Janssen AJH, ten Hagen R, Lettinga G (1991) Kinetic Parameters of a Mixed Culture Oxidizing Sulfide and Sulfur with Oxygen. Biotech Bioeng 38: 831-820
- Cho** KS, Hirai M, Shoda M (1992) Degradation of Hydrogen Sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY44 isolated from peat. Appl Environ Microbiol 58: 1183-1189
- Cohen-Bazire** G (1963) Some Observations on the Organization of the Photosynthetic Apparatus in Purple and Green Bacteria. In: Gest H, San Pietro A, Vernon LP (eds) Bacterial Photosynthesis. The Antioch Press, Yellow Springs. pp: 89-110
- Cork** DJ, Garunas R, Sajjad A (1983) *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the Production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H₂S and CO₂. Appl Environ Microbiol 45: 913-918
- Cork** DJ, Jerger DE, Maka A (1986) Biocatalytic Production of Sulfur from Process Waste Streams. Biotechnol Bioeng Symp 16: 149-162
- Dahl** C (1999) Deposition and Oxidation of Polymeric Sulfur in Prokaryotes. In: Steinbüchel A (ed) Biochemical Principles and Mechanisms of Biosynthesis and Biodegradation of Polymers, Wiley-VCH, Weinheim. pp 27-34
- Dahl** C (2000) Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren für die Photosynthese anoxygener phototropher Bakterien. Biospektrum 4: 263-266
- Dahl** C, Engels S, Pott-Sperling AS, Schulte A, Sander J, Lübke Y, Deuster O, Brune DC (2005) Novel Genes of the *dsr* Gene Cluster and Evidence for Close Interaction of DSR Proteins during Sulfur Oxidation in the Phototrophic Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum*. J Bacteriol 187: 1392-1404

- Dahl C, Prange A** (2006) Bacterial Sulfur Globules: Occurrence, Structure and Metabolism. In: Shively JM (ed) Inclusions in Prokaryotes. Springer Verlag, Heidelberg. pp: 21-51
- Dahl C, Prange A, Steudel R.** (2002) Natural Polymeric Sulfur Compounds. In: Steinbüchel A (ed) Miscellaneous Biopolymers and Biodegradation of Synthetic Polymers Vol. 9. Wiley-VCH, Weinheim. pp 35-62
- Dietrich W, Klimmek O** (2002) The Function of Methyl-Menaquinone-6 and Polysulfide Reductase Membrane Anchor (PsrC) in Polysulfide Respiration of *Wolinella succinogenes*. Eur J Biochem 269: 1086-1095
- Drzyzga O** (1992) Isolierung und Charakterisierung von marinen sulfatreduzierenden Bakterien unter Berücksichtigung des anaeroben Aromatenabbaus. Diplomarbeit, Universität Oldenburg
- Emmel T, Sand W, König WG, Bock, E** (1986) Evidence for the Existence of a Sulfur Oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. J Gen Microbiol 132; 3415-3420
- Eow JS** (2002) Recovery of Sulfur from Sour Acid Gas: A Review of the Technology. Environ Prog 21: 143-162
- Espejo RT, Romero P** (1987) Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on Elemental Sulfur. Appl Environ Microbiol 53: 1907-1912
- Exxon Mobil** (2006) Natural Gas Conditioning. Exxon Mobil Productions Deutschland GmbH, Unternehmenskommunikation Exxon Mobil, Hannover
- Fahey RC, Newton GL** (1987) Determination of Low-Molecular-Weight Thiols Using Monobromobimane Fluorescent Labeling and High-Performance Liquid Chromatography. Methods Enzymol 143: 85-96
- Fischer U** (1986) Schwefelstoffwechsel und Elektronentransportproteine in Anoxyphotobakterien. Habilitationsschrift, Universität Oldenburg
- Fischer U** (1988) Sulfur in Biotechnology. In: Rehm HJ, Reed G (eds) Biotechnology Vol. 6b, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp: 463-496
- Fischer U** (1989) Enzymatic Steps and Dissimilatory Sulfur Metabolism by Whole Cells of Anoxyphotobacteria. In: Saltzman ES, Cooper WJ (eds) Biogenic Sulfur in the Environment. ACS Symposium Series 393, American Chemical Society, Washington, DC. pp: 262-279
- Franz B, Prange A, Modrow H, Hormes J, Dahl C** (2006) Uptake of Elemental Sulfur in *Allochromatium vinosum*. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Münster, Program and Abstracts. pp: 100-101

- Friedrich** CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J (2001) Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Appl Environ Microbiol* 67: 287-2882
- Frigaard** NU, Bryant DA (2004) Seeing Green Bacteria in a New Light: Genomics-Enabled Studies of the Photosynthetic Apparatus in Green Sulfur Bacteria and Filamentous Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Arch Microbiol* 182: 265-276
- Fritsche** W (1998) *Umweltmikrobiologie. Grundlage und Anwendung.* Gustav Fischer Verlag, Jena
- 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
- Georgiou** D, Aivasidis A (2006) Decoloration of Textile Wastewater by Means of a Fluidized-Bed Loop Reactor and Immobilized Anaerobic Bacteria. *J Hazard Mater B135*: 372–377
- Görg** A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000) The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053
- Görg** A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current Two-Dimensional Electrophoresis Technology for Proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685
- Griesbeck** C, Hauska G, Schütz M (2000) Biological Sulfide Oxidation: Sulfide-Quinone Reductase (SQR), the Primary Reaction. In: Pandalai SG (ed) *Recent Research Developments in Microbiology Vol 4, Research Signpost, Trivadrum.* pp: 179-203
- Guerrero** R, Mas J, Pedrós-Alió C, Esteve I (1984) Buoyant Density Changes Due to Intercellular Content of Sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* 137: 350-356
- Gun** J, Modestov AD, Kamyshny A Jr, Ryzkov D, Gitis V, Goifman A, Lev O, Hultsch V, Grischek T, Worch E (2004) Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aqueous Polysulfide Solutions. *Microchim Acta* 146: 227-237
- Hageage** GJ Jr, Eanes ED, Gherna RL (1970) X-ray Diffraction Study of the Sulfur Globules Accumulated by *Chromatium* species. *J Bacteriol* 101: 464-469
- Hansen** TA (1983) Electron Donor Metabolism in Phototrophic Bacteria. In: Ormerod JG (ed) *The Phototrophic Bacteria: Anaerobic Life in the Light,* Blackwell Scientific, Oxford. pp: 76-95

- Harneit** K, Göksel A, Kock D, Klock J, Gehrke T, Sand W (2006) Adhesion to Sulfur and Metal Sulfide Surfaces by Leaching Bacteria. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Münster, Program and Abstracts. pp: 148-149
- Henshaw** PF, Bewtra JK, Biswas N (1998) Hydrogen Sulfide Conversion to Elemental Sulfur in a Suspended-Growth Continuous Stirred Tank Reactor Using *Chlorobium limicola*. Water Res 32: 1769-1778
- Henshaw** PF, Zhu W (2001) Biological Conversion of Hydrogen Sulfide to Elemental Sulfur in a Fixed-Film Continuous Flow Photo-Reactor. Water Res 35: 3605-3610
- Heukeshoven** J, Dernick R (1988) Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in PhastSystem Development Unit I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels. Electrophoresis 9: 28-32
- Hurse** TJ (2002) Sulfide Removal from Wastewater by Phototrophic Microorganisms. PhD thesis, University of Queensland, Australia
- Hurse** TJ, Keller J (2004a) Performance of a Substratum-Irradiated Photosynthetic Biofilm Reactor for the Removal of Sulfide from Wastewater. Biotechnol Bioeng 87: 14-23
- Hurse** TJ, Keller J (2004b) Effects of Acetate and Propionate on the Performance of a Photosynthetic Biofilm Reactor for Sulfide Removal. Biotechnol Bioeng 89:178-187
- Hurse** TJ, Keller J (2004c) Reconsidering the Use of Photosynthetic Bacteria for Removal of Sulfide from Wastewater. Biotechnol Bioeng 85: 47-55
- Ikeda** S, Satake H, Hisano T, Terazawa T (1972) Potentiometric Argentometric Method for the Successive Titration of Sulphide and Dissolved Sulphur in Polysulphide Solutions. Talanta 19: 1650-1654
- Imhoff** J (2003a) The *Chromatiaceae*. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. Release 3.13 (5/12/2003) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Imhoff** JF (2003b) Phylogenetic Taxonomy of the Family *Chlorobiaceae* on the Basis of 16S rRNA and fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) Gene Sequences. Int J Sys Evol Microbiol 53: 941-951
- Imhoff** JF (2005a) The Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Vol 1. Springer, New York. pp: 631-637
- Imhoff** JF (2005b) The Family *Chromatiaceae*. In: Brenner DJ, Krieg R, Staley JT (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Vol 2 Part B. Springer, New York. pp: 3-9

- Imhoff** JF, Hiraishi A, Süling J (2005) Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Vol 2 Part A. Springer, New York. pp: 119-132
- Imhoff** JF, Süling J, Petri R (1998) Phylogenetic Relationships among the *Chromatiaceae*, Their Taxonomic Reclassification and Description of the New Genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *Int J Sys Bacteriol* 48: 1129-1143
- Jacob** JH (2005) Regulation of Anaerobic Toluene and Benzoate Metabolism in Sulfate-Reducing *Desulfobacula toluolica*, strain Tol2. M.Sc. Thesis, Universität Bremen
- Janssen** AJH, Dijkman H, Janssen G (2000) Novel Biological Processes for the Removal of H₂S and SO₂ from Gas Streams. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L (eds) *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution; Principles and Engineering*. IWA Publishing, London. pp 265-280
- Janssen** AJH, Ma SC, Lens P, Lettinga G (1997) Performance of a Sulfide-Oxidizing Expanded-Bed Reactor Supplied with Dissolved Oxygen. *Biotech Bioeng* 53: 32-40
- Janssen** AJH, Meijer S, Bontsema J, Lettinga G (1998) Application of the Redox Potential for Controlling a Sulfide Oxidizing Bioreactor. *Biotech Bioeng* 60: 147-155
- Janssen** AJH, Ruitenber R, Buisman CJN (2001) Industrial Applications of New Sulfur Biotechnology. *Water Sci Technol* 44: 85-95
- Jennemann** GE, Bartlesville O, Geferetz D (1997) Sulfid-oxidierende Bakterien und damit durchgeführte Verfahren. Offenlegungsschrift DE 19627180 A1 Deutsches Patentamt
- Jensen** AB, Webb C (1995) Treatment of H₂S-Containing Gases: A Review of Microbiological Alternatives. *Enzyme Microb Technol* 17: 2-10
- Jones** GE, Starkey RL (1961) Surface-Active Substances Produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* 82: 788-789
- Kelly** DP (1995) Sulfur and Its Doppelgänger. *Arch Microbiol* 163: 157-158
- Kijlstra** SWS, Janssen ACJ, Arena B (2001) Biological Process for H₂S Removal from (High Pressure) Gas: The Shell-Thiopaq Gas Desulfurization Process. Proceedings of the Laurance Reid Gas Conditioning Conference 2001, University of Oklahoma, Norman. pp: 169-182
- Kim** BW, Kim IW, Chang HN (1990) Bioconversion of Hydrogen Sulfide by Free and Immobilized Cells of *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biotechnol Lett* 12: 381-386
- Kim** BW und Chang HN (1991) Removal of Hydrogen Sulfide by *Chlorobium thiosulfatophilum* in Immobilized-Cell and Sulfur-Settling Free-Cell Recycle Reactors. *Biotechnol Prog* 7: 495-500

- Kleinjan** WE, de Keizer A, Janssen AJH (2003) Biologically Produced Sulfur. *Top Curr Chem* 230: 167-188
- 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
- Klimmek** O (2006) How Make Prokaryotes the Sulfur Bioavailable- an Insight in “The Polysulfide Sulfur- Harvesting Complex of *Wolinella succinogenes*”. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Münster, Program & Abstracts. pp: 76-77
- Klimmek** O, Kreis V, Klein C, Simon J, Wittershagen A, Kröger A (1998) The Function of the Periplasmic Sud Protein in Polysulfide Respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur J Biochem* 253: 263-269
- Kobayashi** HA, Stenstrom M, Mah RA (1983) Use of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Sulfide Removal from Anaerobic Waste Treatment Effluent. *Water Res* 17: 579-587
- Kondratieva** EN, Pfennig N, Trüper HG (1999) The Phototrophic Prokaryotes. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. Release 3.0 (5/21/1999) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Krishnakumar** B, Majumdar S, Manilal VB, Haridas A (2005) Treatment of Sulphide Containing Wastewater With Sulphur Recovery in a Novel Reverse Fluidized Loop Reaktor (RFLR). *Water Res* 39: 649-647
- Kühner** S, Wöhlbrand L, Fritz I, Wruck W, Hultschig C, Hufnagel P, Kube M, Reinhardt R, Rabus R (2005) Substrate-Dependent Regulation of Anaerobic Degradation Pathways for Toluene and Ethylbenzene in a Denitrifying Bacterium Strain EbN1. *J Bacteriol* 187: 1493-1503
- Kusche** WH (1985) Untersuchungen an Elektronentransportproteinen und zum Schwefelstoffwechsel in *Ectothiorhodospiraceae*. Dissertation, Universität Bonn
- Laemmli** UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Larkin** JM, Strohl WR (1983) *Beggiatoa*, *Thiothrix* and *Thioploca*. *Ann Rev Microbiol* 37: 141-167
- Larsen** H (1952) On the Culture and General Physiology of the Green Sulphur Bacteria. *J Bacteriol* 64: 187-196

- Lin YJ**, Dancea F, Löhr F, Klimmek O, Pfeiffer-Marek S, Nilges M, Wienk H, Kröger A, Rüterjans H (2004) Solution Structure of the 30 kDa Polysulfide-Sulfur Transferase Homodimer from *Wolinella succinogenes*. *Biochemistry* 43: 1418-1424
- Madigan** MT (1988) Microbiology, Physiology, and Ecology of Phototrophic Bacteria. In: Zehnder AJB (ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York. pp: 39–111
- Madigan** MT, Martinko JM, (2006) *Brock Mikrobiologie*, 11. Auflage, Pearson Studium, München
- Marschner** H, Römheld V (1994) Strategies of Plants for Acquisition of Iron. *Plant Soil* 165: 261-274
- Mas** J, van Gemerden H (1995) Storage Products in Purple and Green Sulfur Bacteria. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE (eds) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 973-990
- Matsché** N, Saracevic E, de Lis B, Brooks L (2005) Korrosions- und Geruchsprobleme in Abwasserdruckleitungen, Institut für Wassergüte, Ressourcenmanagement und Abfallwirtschaft der Technischen Universität Wien. Medieninhaber und Herausgeber: Lebensministerium, Wien
- Meyer** B (1977) *Sulfur, Energy and Environment*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam
- Michel** K, Ludwig B (2005) Bioavailability and Biogeochemistry of Metals in the Terrestrial Environment. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (eds) *Metal Ions in Biological Systems Vol 44: Biogeochemistry, Availability, and Transport of Metals in the Environment*. Taylor & Francis, Boca Raton. pp: 75-96
- Middelburg** J (2000) The Geochemical Sulfur Cycle. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L (eds) *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution*. IWA Publishing, London. pp: 33-46
- Neutzling** O (1985) Untersuchungen zum dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Rhodospirillaceae*. Dissertation, Universität Bonn
- Nicolson** GL, Schmidt GL (1971) Structure of the *Chromatium* Sulfur Particle and Its Protein Membrane. *J Bacteriol* 105: 1142-1148
- Ober** JA (2001) Sulfur - US Geological Survey Minerals Yearbook, US Geological Survey, Reston
- Ober** JA (2004) Sulfur - US Geological Survey Minerals Yearbook, US Geological Survey, Reston

- Ohmura** N, Tsugita K, Koizumi J, Saiki H (1996) Sulfur-Binding Protein of Flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 178: 5776-5780
- Overmann** J (2000) The *Chlorobiaceae*. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. Release 3.1 (1/20/2000) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Overmann** J (2005) Green Sulfur Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Vol 1. Springer, New York. pp: 601-605
- Overmann** J, Garcia-Pichel F (2000) The Phototrophic Way of Life. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. Release 3.2 (25/07/2000) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Pandey** RA, Malhotra S (1999) Desulfurization of Gaseous Fuels with Recovery of Elemental Sulfur: An Overview. *Crit Rev Env Sci Technol* 29: 229-268
- Papagianni** M, Matthey M, Kristiansen B (2003) Design of a Tubular Loop Bioreactor for Scale-up and Scale-down of Fermentation Processes. *Biotechnol Prog* 19: 1498-1504
- Paschinger** H, Paschinger J, Gaffron H (1974) Photochemical Disproportionation of Sulfur into Sulfide and Sulfate by *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*. *Arch Microbiol* 96: 341-251
- Pasteris** JD, Freeman JJ, Goffredi SK, Buck KR (2001) Raman Spectroscopic and Laser Confocal Microscopic Analysis of Sulfur in Living Sulfur-Precipitating Marine Bacteria. *Chem Geol* 180: 3-18
- Pattaragulwanit** K, Brune DC, Trüper HG, Dahl C (1998) Molecular Genetic Evidence for Extracytoplasmic Localization of Sulfur Globules in *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* 169: 434-444
- Pibernat** IV, Abella CA (1996) Sulfide Pulsing as the Controlling Factor of Spinae Production in *Chlorobium limicola* Strain UdG 6038. *Arch Microbiol* 165: 272-278
- Piraino** P, Ricciardi A, Salzano G, Zotta T, Parente E (2006) Use of Unsupervised and Supervised Artificial Neural Networks for the Identification of Lactic Acid Bacteria on the Basis of SDS-PAGE Patterns of Whole Cell Proteins. *J Microbiol Met* 66: 336-346
- Pott** AS, Dahl C (1998) Sirohaem 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 (2001) Molekulargenetische und physikalisch-chemische Untersuchungen an den Schwefelkugeln photo-und chemotropher Schwefelbakterien. Dissertation, Universität Bonn

- Prange A**, Chauvistré R, Modrow H, Hormes J, Trüper HG, Dahl C (2002) Quantitative Speciation of Sulfur in Bacterial Sulfur Globules: X-ray Absorption Spectroscopy Reveals at Least Three Different Speciations of Sulfur. *Microbiology* 148: 267-276
- Prange A**, Engelhardt H, Trüper HG, Dahl C (2004) The Role of the Sulfur Globule Proteins of *Allochromatium vinosum*: Mutagenesis of the Sulfur Globule Protein Genes and Expression Studies by Real-Time RT PCR. *Arch Microbiol* 182:165-174
- Puchkova NN**, Gorlenko VM, Pivovarova TA (1975) Comparative Study of the Ultrastructure of Vibrioid Green Sulfur Bacteria. *Mikrobiologiya* 44: 108-114
- Rabus R**, Hansen T, Widdel F (2000) Dissimilatory Sulfate and Sulfur Reducing Prokaryotes. *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York. Release 3.3 (9/08/2000) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Rawlings DE** (2005) Characteristics and Adaptability of Iron- and Sulfur-Oxidizing Microorganisms Used for the Recovery of Metals from Minerals and their Concentrates. *Microb Cell Fact* 4:13 doi:10.1186/1475-2859-4-13
- Rethmeier J**, Rabenstein A, Langer M, Fischer U (1997) Detection of Traces of Oxidized and Reduced Sulfur Compounds in Small Samples by Combination of Different High-Performance Liquid Chromatography Methods. *J Chromatogr A* 760: 295-302
- Robertson LA**, Kuenen JG (1999) *The Colorless Sulfur Bacteria*. *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York. Release 3.0 (5/21/1999) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
- Rohwerder T**, Gehrke T, Kinzler K, Sand W (2003) Bioleaching Review Part A: Progress in Bioleaching: Fundamentals and Mechanism of Bacterial Metal Sulfide Oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 239-248
- Rohwerder T**, Sand W (2003) The Sulfane Sulfur of Persulfides is the Actual Substrate of the Sulfur-Oxidizing Enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilum* spp. *Microbiology* 149: 1699-1710
- Sánchez O**, van Gernerden H, Mas J (1997) Description of a Redox-Controlled Sulfidostat for the Growth of Sulfide-Oxidizing Phototrophs. *Appl Environ Microbiol* 62: 3640-3645
- Sand W**, Gehrke T, Hallmann R, Schippers A (1995) Sulfur Chemistry, Biofilm, and the (In-) Direct Attack Mechanism - Critical Evaluation of Bacterial Leaching. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 961-966
- Sander S** (1990) Untersuchung zur chemischen Struktur, sowie zur Bildung und Verwertung von „Elementarschwefel“ bei *Chlorobium vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*. Diplomarbeit, Universität Oldenburg

- Schaefer** A (2004) Entwicklung einer Apparatur zur Messung von Oberflächenspannungen mittels der Blasentensiometrie. Forschungspraktikum im IAPC an der Universität Bremen
- Schaeffer** WI, Umbreit WW (1963) Phosphatidylinositol as a Wetting Agent in Sulfur Oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bacteriol 85: 492-493
- Schmidt** TM, DiSpirito AA (1990) Spectral Characterisation of c-type Cytochromes Purified from *Beggiatoa alba*. Arch Microbiol 154: 453-458
- Schulz** H, Brinkhoff T, Ferdelman TG, Marine MH, Teske A, Jørgensen BB (1999) Dense Populations of a Giant Sulfur Bacterium in Namibian Shelf Sediments. Science 284: 493-495
- Schulz** HN, Jørgensen BB (2001) Big Bacteria. Annu Rev Microbiol 55: 105-137
- Seeliger** S, Cord-Ruwisch R, Schink B (1998) A Periplasmic and Extracellular c-type Cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* Acts as a Ferric Iron Reductase and as an Electron Carrier to Other Acceptors Or to Partner Bacteria. J Bacteriol 180: 3686–3691
- Seidel** H, Wennrich R, Hoffmann P, Löser C (2006) Effect of Different Types of Elemental Sulfur on Bioremediation of Heavy Metals from Contaminated Sediments. Chemosphere 62: 1444-1453
- Shively** JM, Benson AA (1967) Phospholipids of *Thiobacillus thiooxidans*. J Bacteriol 94: 1679-1683
- Shivvers** DW, Brock TD (1973) Oxidation of Elemental Sulfur by *Sulfolobus acidocaldarius* J Bacteriol 114: 706-710
- Stal** LJ, van Gemerden H, Krumbein WE (1984) The Simultaneous Assay of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll in Natural Microbial Communities. J Microbiol Met 2: 295-306
- Stuedel** R (1982) Homocyclic Sulfur Molecules. Top Curr Chem 102: 149-176
- Stuedel** R (1989) On the Nature of the „Elemental Sulfur“ (S^0) Produced by Sulfur Oxidizing Bacteria - a Model for S^0 Globules. In: Schlegel HG, Bowien B (eds) Biology of Autotrophic Bacteria. Science Tech Publishers, Madison. pp 289-303
- Stuedel** R (1996) Das gelbe Element und seine erstaunliche Vielseitigkeit. Chem unserer Zeit 30: 226-234
- Stuedel** R (2000) The Chemical Sulfur Cycle. In: Lens PNL, Hulshoff Pol L (eds) Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. IWA Publishing, London. pp: 1-31
- Stuedel** R (2003) Inorganic Polysulfides S_n^{2-} and Radical Anions $S_n^{\cdot-}$. Top Curr Chem 231: 127-152
- Stuedel** R, Göbel T, Holdt G (1988) The Molecular Composition of Hydrophilic Sulfur Sols Prepared by Acid Decomposition of Thiosulfate. Z Naturforsch 43b: 203-218

- Stuedel R, Hold G, Göbel 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 Secretions. *Angew Chem Int Ed Engl* 26: 151-153
- Stuedel R, Holdt G (1988)** Auflösung von elementarem Schwefel in Wasser durch kationische und anionische Tenside. *Angew Chem* 100: 1409-1410
- Stottmeister U (2003)** Biotechnologie zur Umweltentlastung. Teubner Verlag, Stuttgart
- Strohl WR, Geffers I, Larkin JM (1981)** Structure of the Sulfur Inclusion Envelopes from Four Beggiatoas. *Curr Microbiol* 6: 75-79
- Suzuki I, Lee D, Mackay B, Harahuc L, Oh JK (1999)** Effect of Various Ions, pH, and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 65: 5163-5166
- Syed MA, Henshaw FH (2003)** Effect of Tube Size on Performance of a Fixed Film Tubular Bioreactor for Conversion of Hydrogen Sulfide to Elemental Sulfur. *Water Res* 37: 1932-1938
- Then J, Trüper HG (1983)** Sulfide Oxidation in *Ectothiorhodospira abdelmalekii*. Evidence for the Catalytic Role of Cytochrome c-551. *Arch Microbiol* 135: 254-258
- Then J, Trüper HG (1984)** Utilization of Sulfide and Elemental Sulfur by *Ectothiorhodospira halochloris*. *Arch Microbiol* 139: 295-298
- Thiele HH (1966)** Wachstumsphysiologische Untersuchungen an *Thiorhodaceae*, Wasserstoff-Donatoren und Sulfatreduktion. Dissertation, Universität Göttingen
- Tichý R, Janssen A, Grotenhuis JTC, Lettinga G, Rulkens WH (1994)** Possibilities for Using Biologically-Produced Sulfur for Cultivation of *Thiobacilli* with Respect to Bioleaching Processes. *Bioresour Technol* 48: 221-227
- Tributsch H (2001)** Direct Vs Indirect Bioleaching. *Hydrometallurgy* 59: 177-185
- Trüper HG (1978)** Sulfur Metabolism. In: Clayton RK, Sistrom WR (eds) *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York. pp: 677-690
- Trüper HG (1984)** Microorganisms and the Sulfur Cycle. In: Müller A, Krebs B (eds) *Sulfur, Its Significance for Chemistry, for the Geo-, Bio- and Cosmosphere and Technology*. Studies in Inorganic Chemistry Vol 5. Elsevier, Amsterdam. pp: 351-365
- Trüper HG, Fischer U (1982)** Anaerobic Oxidation of Sulphur Compounds as Electron Donors for Bacterial Photosynthesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 298: 529-542
- Trüper HG, Lorenz C, Schedel M, Steinmetz M (1988)** Metabolism of Thiosulfate in *Chlorobium*. In: Olson JM, Ormerod JG, Amesz J, Stackebrandt E, Trüper HG (eds) *Green Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York. pp: 189-200

- Urich T**, Bandejas TM, Leal SS, Rachel R, Albrecht T, Zimmermann P, Scholz C, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A (2004) The Sulphur Oxygenase Reductase from *Acidianus ambivalens* is a Multimeric Protein Containing a Low-Potential Mononuclear Non-Haem Iron Centre. *Biochem J* 381: 137-146
- Urich T**, Coelho R, Kletzin A, Frazão C (2005) The Sulfur Oxygenase Reductase from *Acidianus ambivalens* is an Icosatetramer as Shown by Crystallization and Patterson Analysis. *Biochim Biophys Acta* 1747: 267-270
- Urich T**, Gomes CM, Kletzin A, Frazão C (2006) X-ray Structure of a Self-Compartmentalizing Sulfur Cycle Metalloenzyme. *Science* 311: 996-1000
- Urich T**, Kroke A, Bauer C, Seyfarth K, Reuff M, Kletzin A (2005b) Identification of Core Active Site Residues of the Sulfur Oxygenase Reductase from *Acidianus ambivalens* by Site-Directed Mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* 248: 171-176
- Van Gernerden H** (1986) Production of Elemental Sulfur by Green and Purple Sulfur Bacteria. *Arch Microbiol* 146: 52-56
- Vandamme P**, Pot B, Gillis M, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiol Rev* 60: 407-436
- Visscher PT**, van Gernerden (1988) Growth of *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* on Polysulfides. In: Olson JM, Ormerod JG, Amesz J, Stackebrandt E, Trüper HG (eds) *Green Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York. pp: 287-294
- Vogt C** (1997) Untersuchungen zum Metabolismus von DMS und verwandter Verbindungen durch phototrophe Bakterien. Dissertation, Universität Bremen
- Widdel F** (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen
- Wiechmann F** (1993) Die Cysteinsynthese aus *Anabaena* PCC 7120. Diplomarbeit, Tierärztliche Hochschule Hannover

8. Veröffentlichungen

8.1 Liste der Veröffentlichungen

8.1.1 Artikel

1. Borkenstein CG, Fischer U (2006) Biotechnological Sulfide Removal and Elemental Sulfur Recycling from a Sulfide Polluted Medium by the Phototrophic Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum* strain 21D. International Microbiology (2006), 9 (4), in press
2. Borkenstein CG, Fischer U (2006) Bioavailability of Elemental Sulfur by the Green Sulfur Bacterium *Prosthecochloris vibrioformis*. Submitted to International Microbiology
3. Kamyshny A Jr., Borkenstein CG, Fischer U, Ferdelman T (2006) A Protocol for the Detection of Elemental Sulfur and Polysulfide Zero-Valent Sulfur Distribution in Natural Aquatic Systems. In preparation for Limnology and Oceanography-Methods

8.1.2 Konferenzbeiträge

1. Borkenstein CG, Fischer U (2005) Biological Sulfide Removal from Wastewater by the Photosynthetic Bacterium *Allochromatium vinosum* strain 21D. 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (IBBS-13), 4.-9. Sept. 2005 Madrid, Spanien, Abstracts Book, Seite 216
2. Borkenstein CG, Fischer U (2005) Bioavailability of Elemental Sulfur by the Green Sulfur Bacterium *Prosthecochloris vibrioformis*. Tagungsband zum 2. gemeinsamen Kongress der DGHM und VAAM, 25.-28. Sept. 2005, Göttingen, Biospectrum Sonderausgabe, Seite 129
3. Borkenstein CG (2006) Biotechnologische Sulfidentfernung und Schwefelrückgewinnung aus Industrieabwasser durch *Allochromatium vinosum* 21D. Vortrag beim Chromforum Hamburg 2006 (Fa. VWR International), 1. März 2006
4. Borkenstein CG, Fischer U (2006) Photosynthetic Utilisation of Elemental Sulfur by *Prosthecochloris vibrioformis* Proceeds via an Advanced Reduction to Sulfide. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (ISMSM), 29. Juni-2. Juli 2006, Münster, Program and Abstracts, Seite 94
5. Kamyshny A Jr., Borkenstein CG, Fischer U, Ferdelman T (2006) Critical Evaluation of Methods for Speciation of Zero-Valent Sulfur in Natural Aquatic Systems. 1st European Chemistry Congress, 27.-31. Aug. 2006, Budapest, Ungarn

6. Borckenstein CG, Fischer U (2006) Biotechnological Application of *Allochromatium vinosum* Strain 21D for Sulfide Removal and New Insights into Phototrophic Use of “Sulfur-Flower“. 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, 27. Aug.-1. Sept. 2006, Pau, Frankreich, Seite 217

8.2 Biotechnological Sulphide Removal and Elemental Sulphur Recycling from a Sulphide Polluted Medium by the Phototrophic Sulphur Bacterium *Allochromatium vinosum* strain 21D

Clemens G. Borkenstein* and Ulrich Fischer

Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie (UFT) und Fachbereich Biologie/Chemie; Abteilung Marine Mikrobiologie, Universität Bremen, D-28359 Bremen, Germany; fax: +49-421-2187222

*Corresponding author e-mail: borkenstein@uni-bremen.de

International Microbiology (2006), 9 (4), in press

Abstract

Phototrophic purple sulphur bacteria oxidise sulphide to elemental sulphur, which is stored as intracellular sulphur globules. Due to an inactivation of the *dsrB* gene, the mutant *Allochromatium vinosum* strain 21D is unable to further oxidise the intracellularly stored sulphur to sulphate. This mutant was used as a biocatalyst in a biotechnological process to eliminate sulphide from synthetic wastewater and to recycle elemental sulphur as a raw material. For this purpose, the above-mentioned mutant was grown in an illuminated 5 L bioreactor (30 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR) for 61 days at 30°C in anoxic phototrophic medium. The process of sulphide removal was semi-continuous and consisted of 3 consecutive fed-batch sections. Sulphide was repeatedly added into the bioreactor and was oxidised by the cells to sulphur. Due to the applied mutant, no unwanted sulphate was produced during sulphide removal. A maximum sulphide removal rate of 49.3 $\mu\text{M}/\text{h}$, a maximum sulphide removal efficiency of 98.7 %, and a sulphur recycling of 60.4 % was achieved.

Key Words: Biological Sulphide Removal, Biological Sulphur Production, *Allochromatium vinosum*, GMO

Introduction

Anthropogenic sulphide contamination occurs during the exploitation of resources containing hydrogen sulphide (H₂S) (e.g. natural gas and crude oil), the use of H₂S in the production process (e. g. tanneries), or when H₂S is an unwanted reaction product (e. g. biogas) [15]. Sulphide is a corrosive compound with an unpleasant rotten egg-like odour and is toxic in very low concentrations [30]. The maximum acceptable concentration is 10 mg/m³ [31]. Due to environmental protection regulations, industries are not allowed to emit sulphide in exhaust gas and wastewater. The attempts to eliminate sulphide from industrial waste streams are therefore self-explanatory and necessary.

Various possibilities exist to remove anthropogenic sulphide from wastewaters [7]. Currently, physico-chemical sulphide removal technologies dominate in industry. These processes involve either air stripping or the use of various oxidising agents such as air, oxygen, chlorine, hypochlorite, or chlorine dioxide. Most commonly used methods are further developments of the Claus-process, which was invented in 1880 [9]. Based on the Claus-procedure, many technologies exist and can be divided into two groups: processes with sulphide removals of 99 % (e. g. Amoco Cold Bed Adsorption process [CBA] and SNPA/ Lurgi Sulfreen process) and 99.9 % (e. g. Shell Claus-Off-Gas Treating [SCOT], Beavon- and Wellman-Lord-process) [7]. These processes are well suited for converting natural gas with high sulphide concentrations to sulphur in continuous or discontinuous operations. As an example, Exxon Mobile produces 800,000 tons elemental sulphur/year from natural sour gas in its facilities in northern Germany [8]. However, these physico-chemical processes have several disadvantages such as high-energy requirements, high chemical costs, the production of toxic products or by-products, and the involved high disposal costs [2, 30]. Advantages of using biotechnological sulphide removal as an alternative to physico-chemical methods are its lower intrinsic capital and operating costs. These processes are generally operating at moderate temperature and at atmospheric conditions. Furthermore, sulphide is oxidised in a single step reaction, catalyst regeneration is automatic, and no generation of waste is occurring [1, 3].

Biological methods apply either aerobic chemotrophic bacteria such as *Thiobacilli* [2, 16, 18, 24], heterotrophic *Xanthomonas* [5], or anaerobic phototrophic bacteria (green and purple sulphur bacteria) to oxidise sulphide to sulphur [12]. Green and purple sulphur bacteria use reduced sulphur compounds such as sulphide as electron donor to perform an anoxygenic

photosynthesis. They produce elemental sulphur as an intermediate sulphur compound and sulphate as a final oxidation product [14, 25]. It is desirable to yield sulphur as a raw material without any sulphate, which requires a further elimination treatment [2]. The benefit of applying anaerobic phototrophic bacteria compared to aerobic chemotrophic ones (e.g. *Thiobacilli*) is the reduction of process costs because there is no need for aeration [19]. Research on biological sulphide removal by phototrophic bacteria has been done by using either a consortium of phototrophic bacteria [12, 20, 21] or using green sulphur bacteria [6, 9, 10, 11].

In the present work, strain 21D as a mutant of the purple sulphur bacterium *Allochromatium vinosum* was used as a biocatalyst to convert sulphide into elemental sulphur, which was stored as intracellular sulphur globules. Due to the inactivation of the *dsrB* gene, this mutant lacks the capability to further oxidise intracellularly stored sulphur and no undesired sulphate is produced [26]. The application of purple sulphur bacteria for the removal of sulphide has an advantage compared to using green sulphur bacteria, because the latter produce extracellular sulphur, which covers the inner glass walls of the photobioreactor. Such a sulphur-layer limits light input and subsequently lowers sulphur yield [17, Borkenstein and Fischer, unpublished].

Although the wildtype *A. vinosum* is naturally occurring in wastewater treatment plants [22], to our knowledge neither a pure culture of a purple sulphur bacterium nor a genetically modified sulphur bacterium has been applied in wastewater treatment technology [14]. Recently, the use of genetically modified organisms for bioremediation has been critically discussed [4]. However, the unique advantage of using strain 21D as a genetically modified organism (GMO) for sulphide removal is that in this organism intracellularly stored sulphur cannot be further oxidised to unwanted sulphate. Therefore, no further process control is required to prevent sulphate production during sulphide removal.

Real wastewater is a non-sterile medium. Flow rates of the untreated wastewater are too high to make its sterilisation affordable [13]. However, we used sterile synthetic wastewater and maintained a pure culture of *A. vinosum* strain 21D throughout the whole process. This was done in order to obtain information about the efficiency of the system on a laboratory scale with the possibility to apply this process on a larger scale with real wastewater.

Material and Methods

Medium and culture conditions

Allochromatium vinosum strain 21D [26] was kindly provided by Dr. C. Dahl, University of Bonn, Germany. The organism was cultivated in anoxic phototrophic medium described by Imhoff [14]. The medium was additionally supplemented with malate (10 mM) and acetate (10 mM) to get higher cell yields and contained kanamycin (10 µg/mL) and streptomycin (50 µg/mL).

Reactor setup

A 5 L photobioreactor (Biostat[®] B, B. Braun International, Melsungen, Germany) and a fresh medium reservoir were filled with medium, which was described above. The reactor lid was equipped with a stirrer and contained ports to insert probes for measuring temperature, oxygen and pH. The reactor lid also contained inlets and outlets for gases, fresh medium, Na₂S, sampling, as well as NaOH and HCl for pH adjustment. Further details can be taken from Fig. 1A and the legend. Temperature (30°C), pH (6.9), oxygen (0), and agitation (50 rpm) were computer-controlled. Three neon tubes (Osram L36W/30 Warm Light) were placed in an upright position equidistantly around the bioreactor at an angle of 120° for constant illumination (Fig. 1B). By this arrangement, a photon irradiance of 30 µE/m²/s PAR, measured by a light meter (Quantitherm QRT1, Hansatech Instruments Ltd, Kings Lynn, England), was achieved on the surface of the outer glass wall.

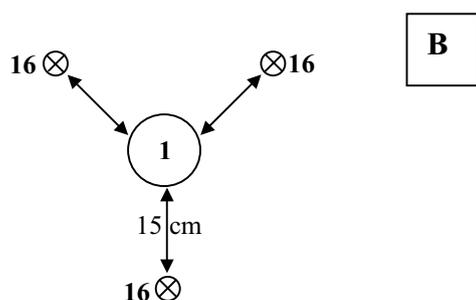
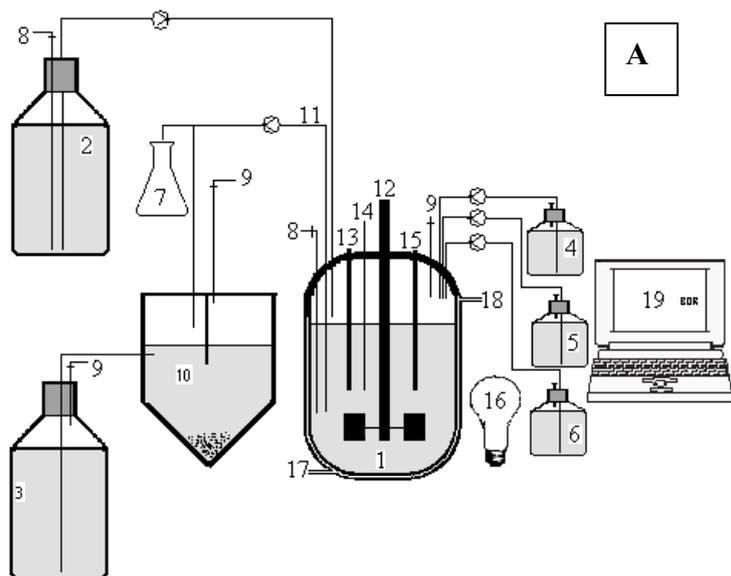


Fig. 1 A and B: Schemes of the biotechnological device to convert sulphide into sulphur by *Allochromatium vinosum* strain 21D (**A**) and of the light source arrangement (**B**, view from the top). Photobioreactor (1), fresh medium reservoir (2), waste tank (3), flask with 1 M Na₂S (4), flask with 1 M HCl (5), flask with 1 M NaOH (6), sampling flask (7), N₂/CO₂ gas inlet (8), gas outlet (9), settler (10), outlet for sampling and product (11), stirrer (12), pH probe head (13), temperature probe head (14), O₂ probe head (15), light source (16), cooling/heating liquid inlet (17), cooling/heating outlet (18), computer (19).

Process conditions

The sulphide removal bioprocess was semi-continuous and consisted of three successive fed-batch sections. Each of the three fed-batch sections was initiated by photoorganoheterotrophic growth with malate and acetate (**a** in Fig. 2) to achieve higher cell yields. Sulphide was consecutively added three times (**b** in Fig. 2). After each sulphide addition, the culture grew photolithoheterotrophically with malate/acetate and sulphide. Each fed-batch section was terminated by a dilution (**c** in Fig. 2), which was done by using a laboratory pump to remove 2 L of culture medium from the reactor into the settler and then to replace it with 2 L medium from the fresh medium reservoir (Fig. 1A). After a residence time of seven days within the settler, the cell-free supernatant was pumped into the waste container. The sedimented cells, which contained stored elemental sulphur, were dried for two days at 80°C to evaporate the water content and to destroy the remaining living cells. The dried material was used to determine the amount of elemental sulphur produced.

Analytical methods

Elemental sulphur was extracted from the cells with chloroform, separated by reversed phase HPLC and analysed by UV absorption at 263 nm according to the method described by Rethmeier et al. [27]. **Sulphide** was determined by using a bromobimane fluorescent labelling assay and separated by reversed phase HPLC as described by Rethmeier et al. [27]. **Bacterial growth** was determined by the increase of the bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) content, which was extracted with methanol and calculated according to Stal et al. [29].

Results and Discussion

Allochrodatum vinosum strain 21D was used as a successful biocatalyst to oxidise sulphide to elemental sulphur in a semi-continuous process, which consisted of three consecutive fed-batch sections (I-III in Fig. 2). The reactor was initially inoculated with 1 L of a well-grown preculture of *A. vinosum* strain 21D (BChl *a* concentration: 1.3 mg/L). Each of the three fed-batch sections contained three consecutive sulphide additions, which are marked with numbers (1-9). At the beginning of the experiment, cells were free of sulphur globules (Fig. 3A). The organism converted sulphide into elemental sulphur, which was deposited as numerous sulphur globules inside the cells (Fig. 3B). At the end of each fed-batch section, 2 L medium (containing cells with sulphur globules) were withdrawn from the reactor and transferred into the settler (Fig. 1A) to determine the amount of sulphur produced (see Material and Methods).

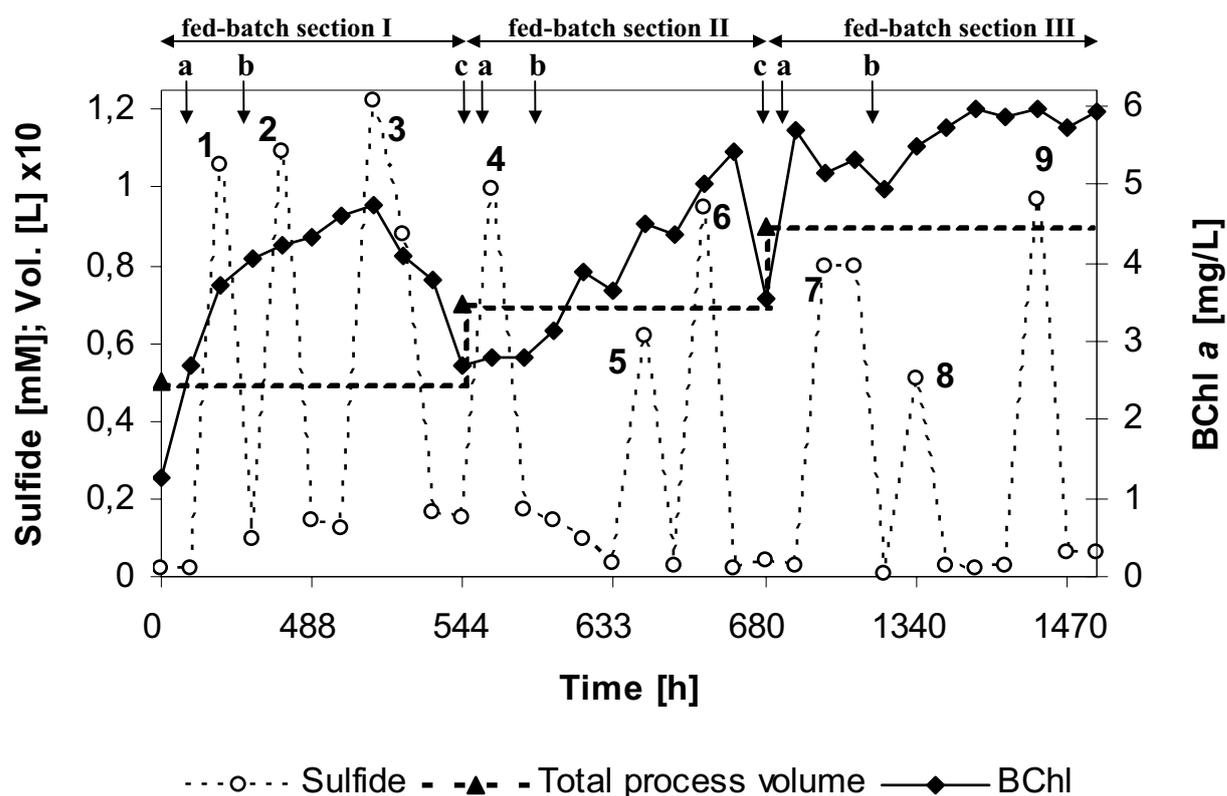


Fig. 2: Bacteriochlorophyll (BChl) *a*- and sulphide-concentrations and total process volume during the biotechnological removal process of sulphide by *Allochrodatum vinosum* strain 21D. Sulphide inputs are marked with numbers (1-9). **a** = growth with malate and acetate (10 mM each); **b** = growth with malate, acetate and sulphide; **c** = dilution.

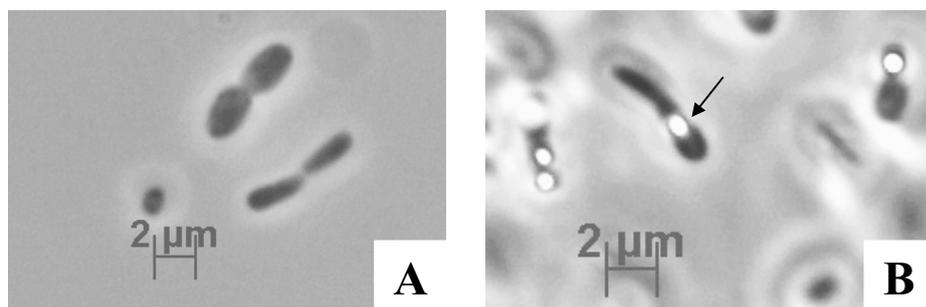


Fig. 3 A and B: Photomicrographs of sulphur-free cells of *Allochromatium vinosum* strain 21D at the beginning of the experiment (**A**) and with elemental sulphur globules at the end of a fed-batch section (**B**). Arrow points to an elemental sulphur globule.

Tab. 1: Sulphide removal rates and efficiencies, calculated from a 61 days (= 1470 h) run of a photobioreactor for the biotechnological removal of sulphide by *Allochromatium vinosum* strain 21D. Maximum rate and efficiency are marked bold. The numbers of sulphide inputs correspond to the numbers marked in Fig. 2.

Number of sulphide inputs	Sulphide removal rate ($\mu\text{M}/\text{h}$)	Sulphide removal efficiency (%) for each sulphide addition	Average sulphide removal efficiencies (%) for each fed-batch section	Average sulphide removal efficiency (%) for the total experiment
1.	2.1	90.6	} 88	} 91.7
2.	43.1	86.7		
3.	49.3	86.5		
4.	49.2	82.7	} 91.9	
5.	25.3	95.3		
6.	40.5	97.6		
7.	1.2	98.7	} 95.4	
8.	17.3	94.2		
9.	12	93.3		

A. vinosum strain 21D was able to remove sulphide with a maximum removal rate of 49.3 $\mu\text{M/h}$ and a maximum sulphide removal efficiency of 98.7 %. The average sulphide removal efficiency for the total experiment was 91.7 % (Tab. 1).

Tab. 2: Sulphur recycling calculated from the amount of total added sulphide and the amount of produced elemental sulphur during a 61 days run of a bioreactor for the biotechnological sulphide removal by *Allochromatium vinosum* strain 21D.

Total sulphide _{IN} (mg)	1443
Total sulphur _{OUT} (mg)	871.6
Sulphur recycling (%)	60.4

Since *A. vinosum* strain 21D stored elemental sulphur inside the cells and not outside, no covering of the bioreactor's inner glass wall occurred. No sulphate was produced, due to the inability of the organism to further oxidise intracellularly stored elemental sulphur. During the entire run of the bioreactor-process, 871.6 mg elemental sulphur were produced from 1443 mg sulphide totally added, which corresponds to 60.4 % recycling (Tab. 2). Pott and Dahl [26] demonstrated that only about one quarter of the added sulphide (5 mM) was converted into elemental sulphur by *A. vinosum* 21D. This observation is in agreement with that of *Chloroflexus aurantiacus*, which oxidised only 70 % of the added sulphide to elemental sulphur during photolithoautotrophic growth [23]. In both reports, no explanations were given, whether and which other inorganic sulphur compounds might have been produced from the added sulphide in addition to the detected elemental sulphur. Average biological sulphide efficiency removal in biotechnological sulphide removing technology using phototrophic organisms ranges from 81-100 %, conversion efficiency ranges from 8-90 % [10].

Kleinjan et al. [19] suggested the application of only those microorganisms for sulphide removal biotechnology that store sulphur extracellularly, due to easier separation of biomass and sulphur. However, we propose the industrial or agricultural use of our "biomass-sulphur" product without prior separation. Sulphur content of purple sulphur bacteria can comprise up to 50 % of cell dry mass [28]. Dried, and therefore dead *A. vinosum* strain 21D cells including a high percentage of sulphur could be grinded to powder and then be used for instance as biofungicides. We assume that the remaining cellmass will not interfere with the industrial or agricultural application.

To operate the photobioreactor over a period of 61 days, the entire process needed 197.6 kWh electric energy. Although some energy could be saved, because there is no need for aeration in this anaerobic system, the use of electric light as a source of photon irradiance still remains cost intensive. Whether electric energy can be substituted by sunlight to drive the phototrophic sulphide removal process by *A. vinosum* strain 21D should therefore be elucidated.

As can be seen from the sulphide removal rates, sulphide removal efficiencies and conversion rate, the purple sulphur bacterium *A. vinosum* strain 21D is a potent phototrophic alternative to the existing biotechnological sulphide removing techniques to efficiently and effectively convert sulphide from synthetic sulphide-polluted wastewater with a high yield into elemental sulphur. It was concluded that the process was well functioning, because the following two goals were met: first, the elimination of the toxic compound sulphide, and second, the production of the useful raw material elemental sulphur. Compared to prior tested biological methods (e. g. applying green sulphur bacteria), the above described procedure had the following advantages: i) easier process monitoring (no necessity to avoid further oxidation of sulphur to sulphate), and ii) no elemental sulphur is stored outside the cells, therefore, no sulphur attaches to the inner glass wall of the bioreactor.

We showed that the use of a genetically modified organism (GMO) in wastewater technology might be of great environmental value. *A. vinosum* strain 21D oxidised sulphide from sterile synthetic sulphide-polluted wastewater under sterile conditions. Further research can now be carried out applying *A. vinosum* strain 21D on a larger scale with real wastewater or even in gas desulphurisation. Biotechnological gas desulphurisation has already been successfully performed using the green sulphur bacterium *Chlorobium limicola* [1] or chemolithotrophic bacteria of the *Thiobacillus* genus [18].

Acknowledgements

This work was funded by the "Zentrale Kommission für Forschungsplanung und wissenschaftlichen Nachwuchs" of Bremen University, Project Number BFK02/102/1. We kindly thank Ann Puschell, Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany, for helping improve the English.

References

1. **Basu R**, Clausen EC, Gaddy JL (1996) Biological Conversion of Hydrogen Sulfide into Elemental Sulfur. *Environ Prog* 15: 234-238
2. **Buisman CJN**, Geraats BG, Ijspeert P, Lettinga G (1990) Optimization of Sulfur Production in a Biotechnological Sulfide-Removing Reactor. *Biotechnol Bioeng* 35: 50-56
3. **Buisman CJN**, Ijspeert P, Hof A, Janssen AJH, ten Hagen R, Lettinga G (1991) Kinetic Parameters of a Mixed Culture Oxidizing Sulfide and Sulfur with Oxygen. *Biotechnol Bioeng* 38: 813-820
4. **Cases I**, de Lorenzo V (2005) Genetically Modified Organisms for the Environment: Stories of Success and Failure and What We Have Learnt from Them. *Int Microbiol* 8: 213-222
5. **Cho KS**, Hirai M, and Shoda M (1992) Degradation of Hydrogen Sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY44 Isolated from Peat. *Appl Environ Microbiol* 58: 1183-1189
6. **Cork DJ**, Garunas R, Sajjad A (1983) *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the Production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H₂S and CO₂. *Appl Environ Microbiol* 45: 913-918
7. **Eow JS** (2002) Recovery of Sulfur from Sour Acid Gas: A Review of the Technology. *Environ Prog* 21: 143-162
8. **Exxon Mobil** (2006) Natural Gas Conditioning. Exxon Mobil Productions Deutschland GmbH, Unternehmenskommunikation. Exxon Mobil, Hannover
9. **Fischer U** (1988) Sulfur in Biotechnology. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology. A Comprehensive Treatise Vol 6b*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. pp: 463-496
10. **Henshaw PF**, Bewtra JK, Biswas N (1998) Hydrogen Sulfide Conversion to Elemental Sulfur in a Suspended-Growth Continuous Stirred Tank Reactor Using *Chlorobium limicola*. *Water Res* 32: 1769-1778
11. **Henshaw PF**, Zhu W (2001) Biological Conversion of Hydrogen Sulfide to Elemental Sulfur in a Fixed-Film Continuous Flow Photo-Reactor. *Water Res* 35: 3605-3610
12. **Hurse TJ**, Keller J (2004) Performance of a Substratum-Irradiated Photosynthetic Biofilm Reactor for the Removal of Sulfide from Wastewater. *Biotechnol Bioeng* 87: 14-23
13. **Hurse TJ**, Keller J (2004) Reconsidering the Use of Photosynthetic Bacteria for Removal of Sulfide from Wastewater. *Biotechnol Bioeng* 85: 47-55
14. **Imhoff J** (2003) *The Chromatiaceae*. *The Prokaryotes*. Springer, New York. Release 3.13 re(5/12/2003) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

15. **Janssen** AJH, Dijkman H, Janssen G (2000) Novel Biological Processes for the Removal of H₂S and SO₂ from Gas Streams. In: Lens PNL, Hulshoff-Pol L (eds) Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution; Principles and Engineering. IWA Publishing, London. pp: 265-280
16. **Janssen** AJH, Ruitenbergh R, Buisman CJN (2001) Industrial Applications of New Sulfur Biotechnology. *Water Sci Technol* 44: 85-95
17. **Jennemann** GE, Bartlesville O, Geferetz D (1997) Sulfid-oxidierende Bakterien und damit durchgeführte Verfahren. Offenlegungsschrift DE 19627180 A1 Deutsches Patentamt
18. **Jensen** AB, Webb C (1995) Treatment of H₂S-containing Gases: A Review of Microbiological Alternatives. *Enzyme Microb Technol* 17: 2-10
19. **Kleinjan** WE, de Keizer A, Janssen AJH (2003) Biologically Produced Sulfur. *Top Curr Chem* 230: 167-188
20. **Kobayashi** HA, Stenstrom M, Mah RA (1983) Use of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Sulfide Removal from Anaerobic Waste Treatment Effluent. *Water Res* 17: 579-587
21. **Kobayashi** M, Tchan YT (1973) Treatment of Industrial Waste Solutions and Production of Useful By-Products Using a Photosynthetic Bacterial Method. *Water Res* 7: 1219-1224
22. **Madigan** MT (1988) Microbiology, Physiology, and Ecology of Phototrophic Bacteria. In: Zehnder AJB (ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley & Sons, New York. pp: 39–111
23. **Madigan** MT, Brock TD (1975) Photosynthetic Sulfide Oxidation by *Chloroflexus aurantiacus*, a Filamentous, Photosynthetic, Gliding Bacterium. *J Bacteriol* 122: 782-784
24. **Nishimura** S, Yoda M (1997) Removal of Hydrogen Sulfide from an Anaerobic Biogas Using a Bio-Scrubber. *Water Sci Technol* 36: 349-356
25. **Overmann** J (2000) The *Chlorobiaceae*. *The Prokaryotes*. Springer, New York. Release 3.1 (1/20/2000) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
26. **Pott** AS, Dahl C (1998) Sirohaem 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
27. **Rethmeier** J, Rabenstein A, Langer M, Fischer U (1997) Detection of Traces of Oxidized and Reduced Sulfur Compounds in Small Samples by Combination of Different High-Performance Liquid Chromatography Methods. *J Chromatogr A* 760: 295-302

- 28. Sánchez O, van Gemerden H, Mas J (1997) Description of a Redox-Controlled Sulfidostat for the Growth of Sulfide-Oxidizing Phototrophs. Appl Environ Microbiol 62: 3640-3645**
- 29. Stal LJ, van Gemerden H, Krumbein WE (1984) The Simultaneous Assay of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll in Natural Microbial Communities. J Microbiol Met 2: 295-306**
- 30. Syed MA, Henshaw FH (2003) Effect of Tube Size on Performance of a Fixed Film Tubular Bioreactor for Conversion of Hydrogen Sulfide to Elemental Sulfur. Water Res 37: 1932-1938**
- 31. Visser JM, Stefess GC, Robertson LA, Kuenen JG (1997) *Thiobacillus* sp. W5, the Dominant Autotroph Oxidizing Sulfide to Sulfur in a Reactor for Aerobic Treatment of Sulfidic Wastes. Antonie van Leeuwenhoek 72: 127-134**

8.3 Bioavailability of Elemental Sulfur by the Green Sulfur Bacterium *Prosthecochloris vibrioformis*

Clemens G. Borkenstein* and Ulrich Fischer

Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie (UFT) and Fachbereich Biologie/Chemie, Abteilung Marine Mikrobiologie, Universität Bremen, D-28359 Bremen, Germany; fax: +49-421-2187222

*corresponding author e-mail: borkenstein@uni-bremen.de

Submitted to “International Microbiology”

Abstract

Anoxygenic phototrophic bacteria use inorganic sulfur compounds such as sulfide, elemental sulfur (S^0), thiosulfate, and polysulfide as electron donors for an anoxygenic photosynthesis and generation of reducing power.

In the present study, the green sulfur bacterium *Prosthecochloris vibrioformis* was grown photolithoautotrophically using S^0 as the only electron donor. Microscopical observations showed that cells attached to the S^0 crystals. Such an attachment is essential for the hydrophilisation of the hydrophobic S^0 and the initial step of its bioavailability. Analysis of the medium's surface tension during growth of *P. vibrioformis* with biogenic S^0 produced by the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* proved that surface active substances (biodetergents) are not responsible for bioavailability of S^0 by *P. vibrioformis*. Separation of S^0 and *P. vibrioformis* cells by a dialysis tube (12-14 kDa cut off) resulted in no growth, therefore excluding the role of soluble substances in bioavailability of S^0 and strengthening the proof for the necessity of a close contact between *P. vibrioformis* cells and S^0 . The utilisation of S^0 by *P. vibrioformis* is initiated via a reduction to sulfide which could be detected in the medium for the first time. Due to this finding, the assumed hypothesis that the uptake of S^0 by green phototrophic sulfur bacteria proceeds via an advanced reduction to sulfide could be confirmed herewith.

Key Words: *Prosthecochloris vibrioformis*, elemental sulfur, S^0 , sulfur oxidation, bioavailability

Introduction

Although sulfur is known for thousands of years and has been studied scientifically for hundreds of years, we are still far away from fully understanding its chemistry. The autoxidation, the reversibility of sulfur reactions, the characteristic of sulfur to catenate and form various chains and rings and the interconnection of the chemical, geochemical and biological sulfur cycles make sulfur chemistry a very complex matter [5]. In nature, sulfur occurs in various oxidation states from -2 (sulfide) to $+6$ (sulfate). Sulfur with the oxidation state zero, or “elemental sulfur” (S^0) plays a very important role in biochemical sulfur cycle. About 30 solid allotropes of S^0 exist, from which the homocyclic orthorhombic crystalline α -sulfur (αS_8 or cyclo-octasulfur) is the most stable form at standard conditions. Commercially available S^0 consists mostly of S_8 rings as well as of some polymeric S^0 [7]. The solubility of S^0 in water is only $5 \mu\text{g}$ or $0.16 \mu\text{mol}$ per 1 L at 25°C . Therefore, S^0 is virtually insoluble [27].

Despite its low solubility in water, S^0 is metabolised by a variety of microorganisms. Chemotrophic prokaryotes use S^0 as a terminal electron acceptor, the best studied representative being *Wolinella succinogenes* [12]. Furthermore, S^0 serves as a source of energy for various chemolithotrophic organisms such as *Thiobacillus* spp. [11] and *Paracoccus pantotrophus* [8]. The archaeon *Acidianus ambivalens* oxidises S^0 under aerobic conditions and reduces S^0 anaerobically [27]. Moreover, purple and green phototrophic sulfur bacteria use S^0 as electron donor for an anoxygenic photosynthesis and generation of reducing power and reduce it to sulfate [26].

A model organism for studying sulfur metabolism in anoxygenic phototrophic bacteria is the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*, because a method for reverse genetics has been developed for this organism [3]. Many studies have been conducted to elucidate the mechanisms of inorganic sulfur compound oxidation by *A. vinosum* [3, 4, 7, 16]. While much is known about the utilisation of water-soluble inorganic sulfur compounds such as sulfide or thiosulfate, the consumption mechanism of insoluble S^0 by anoxyphotobacteria is one of the most poorly understood areas of sulfur metabolism. The S^0 metabolism seems to be complex and implies its binding, activation and transport into the cell [4, 5].

Since nearly nothing is known about the S⁰ utilisation by green sulfur bacteria, it was the aim of this study to find out how *Prosthecochloris vibrioformis* initiates the bioavailability of S⁰ and uses S⁰ as photosynthetic electron donor under lithoautotrophic conditions.

Materials and Methods

Medium, culture conditions and experimental setup

Medium according to [14] with CO₂ as the only carbon source was inoculated with 10 % (v/v) of a well-grown sulfur-starved preculture of *Prosthecochloris vibrioformis* DSMZ 263 (formerly *Chlorobium vibrioforme* [10]) and cultivated by stirring at 120 rpm in 60 mL rubber capped bottles under constant illumination with an irradiance of 5-10 μE/m²/s photon flux at 30°C. The preculture was washed twice with anoxic medium by centrifugation (5,000 rpm; 10 min) and the pellet was resuspended in anoxic medium to remove any remaining dissolved sulfur compounds. Commercially available double-sublimed S⁰ (sulfur flower, Riedel-de Haën), throughout the following text designated as “S⁰”, served as electron donor. Before application, S⁰ was ground in a coffee mill and heated to 80°C for 1 h to destroy possibly living cells.

Isolation of intracellularly stored S⁰ from *Allochromatium vinosum*

Intracellularly stored S⁰- globules from *Allochromatium vinosum*, designated as “biogenic S⁰” in the text, were prepared as follows: Cultures of *A. vinosum* DSMZ 180 were cultivated photomixotrophically with acetate as carbon source and sulfide as the photosynthetic electron donor in medium according to [9] in 120 mL rubber capped bottles at 30°C under constant illumination with an irradiance of 20 μE/m²/s photon flux. The culture was fed once with 3 mM sulfide, and when all this sulfide was oxidised and stored as intracellular biogenic S⁰ (recognised 3 h after feeding by a milky appearance of the culture), the culture was harvested by centrifugation at 10,000 x g; 15 min. The pellet was resuspended in 1 mL RS buffer (Molzym) plus 0.05 % EDTA (0.5 M) and 0.05 % lysozyme solution (100 mg lysozyme/1 ml H₂O: glycerol 4:1 v/v). After incubation for 1 h at 37°C, 15 mL cell suspension was ruptured by ultrasonification 3 x 5 min in an ice-cooled water bath in a Branson Cell Disrupter 250 (duty cycle: 80 %, intensity: 7). Then, 6.5 mL Percoll plus 1 mL NaCl (1.5 M), 2.5 mL H₂O and 400 μL of the lysozyme-disrupted cells were transferred into a Corex centrifugation tube.

After centrifugation (48,000 x g; 80 min), the biogenic S⁰ had sedimented on the bottom of the tube, whereas cell debris stayed in the supernatant which was removed. Biogenic S⁰ was heated to 80°C for 20 min to destroy possible living cells and was stored at 4°C until further use.

Analytical methods

Samples for the determination of sulfur compounds and bacteriochlorophyll *d* were withdrawn from the medium through the septum of the bottles by a sterile 1 mL syringe. All samples were stored at -20°C until further analysis. Sulfide in the samples was derivatised by bromobimane prior to storage at -20°C and separated by reversed-phase chromatography and analysed using the fluorescence method as described by [17], while sulfate was separated by ion chromatography and analysed by conductivity according to [1]. Bacterial growth was determined by the increase of the bacteriochlorophyll *d* content, extracted with methanol [21]. The surface tension for detection of surface active substances was measured with a special device using the bubble-tensiometry according to Schaefer [18]. For the documentation of cell-S⁰-contact during growth of *P. vibrioformis* with S⁰, samples were withdrawn by a syringe from a growing culture at different intervals of time and microscopically observed by a Zeiss Axiolab microscope.

Results and Discussion

Attachment of *Prosthecochloris vibrioformis* cells to hydrophobic S⁰ and its hydrophilisation

Microbial bioavailability of very low soluble substrates such as S⁰ requires that the concentration and surface area of S⁰ must be high to be attacked by living cells. Little information has been found about the adhesion to and an attack of S⁰ by prokaryotes because throughout the bacterial world no universal mechanism exists for the degradation of sulfur [4]. When the green phototrophic sulfur bacterium *P. vibrioformis* was grown photolithoautotrophically with S⁰, it could be demonstrated by microscopic observations that an attachment of the cells to the S⁰-crystals is a necessary precondition to make them bioavailable (Fig. 1).

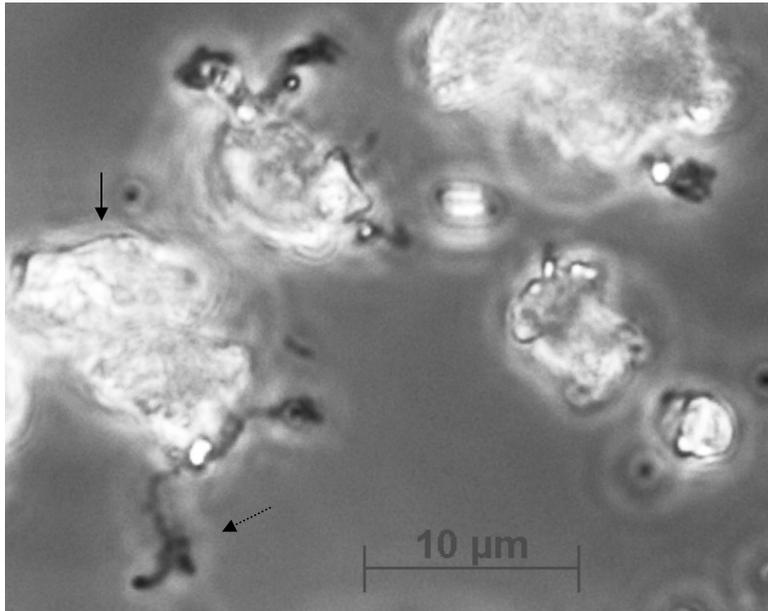


Fig. 1: Microscopic image of *P. vibrioformis* cells (dotted arrow) attached to S⁰-crystals (arrow) during growth with S⁰, 24 h after inoculation.

Several possibilities were described in the literature to render the bioavailability of water-insoluble S⁰. According to Suzuki and co-workers [23], the oxidation of S⁰ by thiobacilli is a complex process involving the contact of cells with hydrophobic S⁰-particles across water and the oxidation of S⁰ to sulfite. A cellular material, similar to bacterial glycocalyx which is involved in the cell-S⁰-contact, was suggested for *Thiobacillus thiooxidans* and *T. denitrificans* by Blais and co-workers [2]. Ohmura and co-workers [13] proposed cell envelope sulfhydryl groups for the adhesion of S⁰ to the cells of pure thiobacilli cultures and sewage sludge indigenous sulfur-oxidising microorganisms. The cells could closely approach S⁰ through a chemical bond with a 40 kDa protein on the flagella.

Close attachment of cells to externally provided S⁰ particles has also been observed for the sulfur oxidizing archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* which derives energy from the oxidation of S⁰ to sulfate [20]. The authors stated that the cells, which are attached to the S⁰-crystals, could efficiently obtain the atoms of sulfur needed through the action of membrane or periplasmic proteins that solubilise the S⁰, probably by a reduction of S⁰ to sulfide. The reaction product sulfide is then transported into the cell and enters the chemolithotrophic metabolism. Cell wall adherent structures, called “spinae”, seemed to be responsible for the adhesion to extracellular S⁰ by the green phototrophic bacterium *Chlorobium limicola* [15].

If hydrophobic S^0 was added to sulfur-starved cells of *P. vibrioformis*, the S^0 became visually recognisably hydrophilic already after 24 h of incubation (data not shown). Such a visible change did not occur in the controls with S^0 but without cells or those containing S^0 and increasing concentrations of sulfide (up to 5 mM). From the above mentioned data and observations, it is assumed that the hydrophilisation is of biologic nature and that an attachment of *P. vibrioformis* cells to the S^0 -crystals is essential for the hydrophilisation and the initial step of the bioavailability of hydrophobic S^0 .

The necessity of direct cell- S^0 -contact was additionally supported by the results obtained with cultures of *P. vibrioformis* where the offered S^0 was separated from the cells by a dialysis tube (Spectra/Por[®] 4, 12-14 kDa cut off, diameter 20.4 mm). As can be seen from Tab. 1, growth of the organism occurred only in that medium where the cells had direct contact to the S^0 .

Tab. 1: Growth behaviour of *P. vibrioformis* with S^0 as single electron donor with and without separation by a dialysis tube (12-14 kDa cut off).

	BChl <i>d</i> [mg/L]	
	S^0 in dialysis tube	S^0 in the medium
Start	2.5	2.5
After 5 days	2.9	8.8

The results obtained with *P. vibrioformis* are confirmed by the observations of Franz and co-workers [7] with *Allochromatium vinosum* who reported that a direct cell- S^0 -contact appears to be necessary for the uptake of S^0 , because S^0 oxidation was completely abolished when S^0 was separated from cells by a dialysis tube with 100 kDa cut off. Therefore, the substance/enzyme, responsible for the bioavailability of S^0 , must be larger than 100 kDa.

Proof of surface active substance occurrence for S^0 -bioavailability

One possibility for making S^0 bioavailable is the production of biodetergents, which lower the surface tension of water. Schaeffer and Umbreit [19] identified phosphatidylinositol as a “wetting agent” of S^0 in *Acidithiobacillus thiooxidans* (formerly *Thiobacillus thiooxidans*). Therefore, this possibility was also taken under consideration for *P. vibrioformis*.

During 5 days growth of sulfur-starved *P. vibrioformis* cells with isolated intracellular biogenic S^0 from *A. vinosum* as the only electron donor, the surface tension was measured in a bubble-tensiometry-device.

Growth of the culture was followed by the bacteriochlorophyll *d* content which increased from 2,4 (start) to 27 mg BChl *d*/L (after 5 days), but the surface tension remained constantly 72.6 mN/m. Controls were performed without any electron donor and without cells but with biogenic S^0 . Therefore, it is concluded that surface active substances seem to play no essential role in the bioavailability of S^0 by *P. vibrioformis*.

Photolithoautotrophic reduction of S^0 to sulfide by *Prosthecochloris vibrioformis*

During growth of *P. vibrioformis* with S^0 as the only electron donor, small amounts of sulfide were detected in the medium with a maximum concentration of 150 μ M sulfide after 96 h of incubation (Fig. 2). The sulfide formed was then consumed by the cells for photosynthetic growth and for the oxidation to sulfate. A maximum biomass of about 10 mg BChl *d*/L was obtained after 96 h of growth.

The measurement of hydrophobic S^0 in an aqueous system is technically problematic, due to the difficulties caused by inhomogenic sampling [24]. To avoid these difficulties, sulfate formation can be taken into consideration as a basis of external S^0 oxidation [6]. Analysis of intracellular biogenic S^0 from purple sulfur bacteria causes less troubles because of its hydrophilic properties [16].

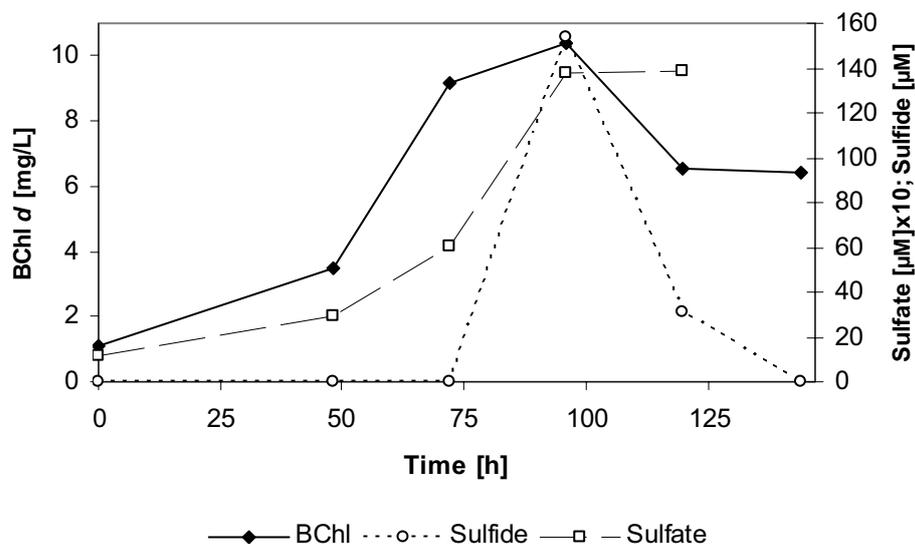


Fig. 2: Formation of sulfide during photolithoautotrophic growth of *P. vibrioformis* with S^0 .

Controls were performed under the same incubation conditions as the real experiment (see Materials & Methods): i) with neither S^0 nor sulfide as photosynthetic electron donors: no growth occurred (data not shown) and ii) without *P. vibrioformis* cells but with S^0 to exclude that sulfide might be formed by a pure chemical reaction: neither sulfide nor sulfate could be detected (data not shown).

The appearance of sulfide in the medium during growth of the green photosynthetic sulfur bacterium *P. vibrioformis* on S^0 as the only photosynthetic electron donor could be demonstrated for the first time. This experimental finding now confirms the suggestion of various authors [4, 25] who supposed that exogenous offered S^0 , because of its very low solubility in water, is reductively activated to the level of sulfide, which can then diffuse or actively be transported into the cells and can be used as photosynthetic electron donor by the organisms

Dahl and co-workers [3] found that in *A. vinosum* the proteins derived from the *dsr* operon are obligatory for the consumption of deposited periplasmic biogenic S^0 globules. To our knowledge, no enzyme has been described so far that enables the oxidation of extracellular S^0 by anoxygenic phototrophic bacteria.

Sulfur-oxygenase-reductases (SOR) from the thermophilic archeons *Acidianus ambivalens* [27] and *Sulfolobus brierleyi* [6] are the only well-characterised enzymes, able to oxidise S^0 . A soluble sulfur oxygenase reductase (SOR) catalysis the initial step of the oxidation pathway by performing an oxygen-dependent sulfur disproportionation reaction with sulfite, thiosulfate and hydrogen sulfide as reaction products.

Narrow channels leading into the reaction centre at the iron core of the enzyme suggest that the actual substrate is a soluble, linear S^0 species [27]. This mechanism seems to be similar to that of the thiosulfate binding protein subunit of the periplasmic thiosulfate oxidising multienzyme complex (TOMES) of *Paracoccus pantotrophus* [8]. However, the mechanism of making the S^0 bioavailable is still unresolved for those organisms.

The sulfur reducing *Wolinella succinogenes* does not use S^0 as terminal electron acceptor, but it utilises polysulfide [12]. If sulfide is present, which is usually the case in the environment of sulfur reducers, the S_8 -ring of S^0 is cleaved by a nucleophilic attack of the sulfide anion which results in the formation of polysulfide [22]. *Wolinella succinogenes* produces a

periplasmic polysulfide-sulfur-transferase (Sud) protein when growing on polysulfides, which serves as a polysulfide binding and transferase protein [12].

However, for *P. vibrioformis* this possibility of making S^0 bioavailable through polysulfide does not exist, because no initial sulfide was present in the medium, as can be seen in Fig. 2. Therefore, and due to the results obtained by the dialysis tube experiment (see above), a chemical formation of polysulfide can be excluded. The dialysis tube would not have been a barrier for polysulfide.

Acknowledgements

This work was funded by "Zentrale Kommission für Forschung und wissenschaftlichen Nachwuchs" of Bremen University, Project Number BFK02/102/1. Technical help of Harald Schunck and Andreas Schaefer is highly appreciated.

References

1. **Alain** K, Holler T, Musat F, Elvert M, Treude T, Krüger M (2006) Microbiological Investigation of Methane- and Hydrocarbon-Discharging Mud Volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environ Microbiol* 8: 574-90
2. **Blais** JF, Tyagi RD, Meunier N, Auclair JC (1994) The Production of Extracellular Appendages during Bacterial Colonization of Elemental Sulphur. *Process Biochem* 29: 475-482
3. **Dahl** C, Engels S, Pott-Sperling AS, Schulte A, Sander J, Lübke Y, Deuster O, Brune DC (2005) Novel Genes of the *Dsr* Gene Cluster and Evidence for Close Interaction of Dsr Proteins during Sulfur Oxidation in the Phototrophic Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum*. *J Bacteriol* 187: 1392-1404
4. **Dahl** C, Prange A (2006) Bacterial Sulfur Globules: Occurrence, Structure and Metabolism. In: JM Shevely (ed) *Inclusions in Prokaryotes*. Springer Verlag, Heidelberg. pp: 20-51
5. **Dahl** C, Prange A, Steudel R (2002) Natural Polymeric Sulfur Compounds. In: Steinbüchel A (ed) *Miscellaneous Biopolymers and Biodegradation of Synthetic Polymers Vol. 9*. Wiley-VCH, Weinheim. pp: 35-62
6. **Emmel** T, Sand W, König WG, Bock, E (1986) Evidence for the Existence of a Sulfur Oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. *J Gen Microbiol* 132: 3415-3420
7. **Franz** B, Prange A, Modrow H, Hormes J, Dahl C (2006) Uptake of Elemental Sulfur in *Allochromatium vinosum*. *International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism, Münster, Germany, Program and Abstracts*. pp: 100-101
8. **Friedrich** CG, Rother D, Bardischewsky 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
9. **Imhoff** J (2003) *The Chromatiaceae. The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York. Release 3.13 (5/12/2003) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
10. **Imhoff** JF (2003) Phylogenetic Taxonomy of the Family Chlorobiaceae on the Basis of 16S rRNA and Fmo (Fenna-Matthews-Olson protein) Gene Sequences. *Int J Sys Evol Microbiol* 53: 941-951
11. **Kelly** DP, Shergill JK, Lu WP, Wood AP (1997) Oxidative Metabolism of Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 95-107

12. **Lin** YL, Dancea F, Löhr F, Klimmek O, Peiffer-Marek S, Nilges M, Wienk H, Kröger A, Rüterjans H (2004) Solution Structure of the 30 kDa Polysulfide-Sulfur Transferase Homodimer from *Wolinella succinogenes*. *Biochemistry* 43: 1418-1424
13. **Ohmura** N, Tsugita K, Koizumi J, Saiki H (1996) Sulfur-Binding Protein of Flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 178: 5776-5780
14. **Overmann** J (2000) The Chlorobiaceae. The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. Release 3.1 (1/20/2000) URL: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>
15. **Pibernat** IV, Abella CA (1996) Sulfide Pulsing as the Controlling Factor of Spinae Production in *Chlorobium limicola* Strain UdG 6038. *Arch Microbiol* 165: 272-278
16. **Pott** AS, Dahl C (1998) Sirohaem 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
17. **Rethmeier** J, Rabenstein A, Langer M, Fischer U (1997) Detection of Traces of Oxidized and Reduced Sulfur Compounds in Small Samples by Combination of Different High-Performance Liquid Chromatography Methods. *J Chromatogr A* 760: 295-302
18. **Schaefer** A (2004) Entwicklung einer Apparatur zur Messung von Oberflächenspannungen mittels der Blasentensiometrie. Forschungspraktikum am Institut für Angewandte und Physikalische Chemie (IAPC), University of Bremen, Germany
19. **Schaeffer** WI, Umbreit WW (1963) Phosphotidylinositol as a Wetting Agent in Sulfur Oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol* 85: 492-493
20. **Shivvers** DW, Brock TD (1973) Oxidation of Elemental Sulfur by *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Bacteriol* 114: 706-710
21. **Stal** LJ, van Gernerden H, Krumbein WE (1984) The Simultaneous Assay of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll in Natural Microbial Communities. *J Microbiol Met* 2: 295-306
22. **Studel** R, Holdt G, Nagorka R. (1986) On the Autoxidation of Aqueous Sodium Polysulfide. *Z Naturforsch* 41b: 1519-1522
23. **Suzuki** I, Lee D, Mackay B, Harahuc L, Oh JK (1999) Effect of Various Ions, pH, and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 65: 5163-5168
24. **Then** J, Trüper HG (1984) Utilization of Sulfide and Elemental Sulfur by *Ectothiorhodospira halochloris*. *Arch Microbiol* 139: 295-298
25. **Trüper** HG (1978) Sulfur Metabolism. In: Clayton RK, Sistrom WR (eds) *The Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press, New York. pp: 677-690

- 26. Trüper** HG and Fischer U (1982) Anaerobic Oxidation of Sulphur Compounds as Electron Donors for Bacterial Photosynthesis. *Phil Trans R Soc Lond B* 298: 529-542
- 27. Urich** T, Gomes CM, Kletzin A, Frazão C (2006) X-Ray Structure of a Self-Compartmentalizing Sulfur Cycle Metalloenzyme. *Science* 311: 966-1000

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Ulrich Fischer** für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie seine ständige Ansprech- und Hilfsbereitschaft danken. Darüber hinaus möchte ich mich für die großzügige Gewährung von wissenschaftlichen Freiräumen in meiner experimentellen Arbeit bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Gunter Otto Kirst** danke ich für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten ebenso. Allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission sei für ihre freundliche Bereitschaft zur Teilnahme gedankt.

Thomas Holler, Eva Borkenstein, und Dr. Birgit Heyduck- Söller danke ich für das Lesen von Teilen der vorliegenden Arbeit und das Vornehmen von Korrekturen.

Den Mitgliedern der **Arbeitsgruppe „Marine Mikrobiologie“** und der **Firma Molzym, Bremen** danke ich für die mehr als 3 Jahre lange gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Spezieller Dank gilt **Dr. Birgit Heyduck Söller** und **Helge Mühl**. Bei **Harald Schunck** bedanke ich mich ganz besonders für die engagierte und exzellente Hilfe bei Laborarbeiten.

Bei **PD Dr. Christiane Dahl** bedanke ich mich für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn. Den **Mitgliedern der „Schwefel- Arbeitsgruppe“** ein Dankeschön für das Näherbringen von zahlreichen Methoden. **Prof. Dr. Dr. Dr. h. c Hans Georg Trüper** und **Prof. Dr. Dr. Alexander Prange** danke ich sehr für die Diskussionsbereitschaft während meines Aufenthalts an der Universität Bonn.

Reinhard Richter, Fa. VWR International, Darmstadt, danke ich für die - weit über die gewöhnlichen Dienste eines technischen Service hinausreichende - technische Unterstützung bei den Arbeiten an der HPLC Anlage, und **Anke Tölz**, Abteilung Pflanzenphysiologie des UFT, Universität Bremen, für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. **Lars Wöhlbrand, Jacob Jacob, und Prof. Dr. Ralf Rabus**, Abteilung Mikrobiologie, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, sei gedankt für die Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der 2DE Analysen, **Thomas Holler** Abteilung Mikrobiologie und **Martina Meyer** Abteilung Biogeochemie, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, für Unterstützung bei der Sulfatbestimmung. **Andreas Schaefer** und **Prof. Dr. Markus Bäumer**, Institut für Angewandte und Physikalische Chemie, Universität Bremen, sei gedankt für ihre Hilfestellung bei der Durchführung von physikalisch-chemischen Untersuchungen zur Oberflächenspannung. **Prof. Dr. Jörg Thöming**, Abteilung

Umweltverfahrenstechnik des UFT, Universität Bremen, möchte ich für die Diskussionsbereitschaft betreffend Kläranlagentechnologie danken. **Dr. Timothy Ferdelman**, Abteilung Biogeochemie, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, danke ich für die Beantwortung komplexer Fragen zur Schwefelchemie. **Prof. Dr. Friederike Koenig**, Abteilung Molekulare Pflanzenphysiologie der Universität Bremen gilt mein Dank für die Überlassung von Kulturräumen zur Anzucht von phototrophen Bakterien und die Bereitstellung von Geräten zur Aufbereitung von Bakteriensuspensionen. Bei **Falko Berger**, Abteilung Pflanzenphysiologie des UFT, Universität Bremen und **Ralf Nieswandt**, Abteilung Umweltverfahrenstechnik des UFT, Universität Bremen, bedanke ich mich für die Soft- und Hardware- technische Unterstützung.

PD Dr. Broder Breckling, Abteilung Allgemeine und Theoretische Ökologie des UFT, Universität Bremen, sei für die Diskussion zu GVOs gedankt. Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich **Dr. Christiane Glöckner**, Abteilung Molekulare Ökologie, MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen, für die Unterstützung in organisatorischen Belangen zum MARMIC Programm aussprechen.

Die Erstellung der vorliegenden Arbeit wurde dankenswerterweise von der Zentralen Kommission für Forschungsplanung und wissenschaftlichen Nachwuchs (**FNK**) an der Universität Bremen ermöglicht (Projektnummer 02/102/1).

Erklärung gemäß § 5 Abs. 1 PromO-Biologie (vom 05.07.1985)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Bremen, Datum
