

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Georg August-Universität Göttingen

## Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas* \*

Von  
ERIKA WILDE

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Februar 1962)

Für die meisten an gewaschenen Suspensionen von wasserstoffoxydierenden Bakterien (Knallgasbakterien) durchgeführten Untersuchungen wurden Zellen herangezogen, welche unter schlecht reproduzierbaren Bedingungen gewachsen waren und deren Stoffwechsellzustand sich schlecht oder nicht definieren ließ. Die Organismen wurden entweder mehrere Tage oder Wochen auf Mineralagar kultiviert (KLUYVER u. MANTEN 1942; SCHATZ u. BOVELL 1952; ATKINSON 1955; PACKER u. VISHNIAC 1955) oder langfristig in stehenden Flüssigkeitskulturen herangezogen (KASERER 1906; NIKLEWSKY 1908; LEBEDEFF 1908; RUHLAND 1922, 1924; SCHLEGEL 1953, 1954). Das auf diese Weise gewachsene Zellmaterial war uneinheitlich; es ließ sich keiner bestimmten Wachstumsphase zuordnen. Den kulturtechnischen Schwierigkeiten, die zum Teil durch die Handhabung des explosiven Wasserstoff-Sauerstoff-Gemisches bedingt sind, ist es zuzuschreiben, daß Untersuchungen über das chemolithotrophe Wachstum von Knallgasbakterien bisher kaum angestellt worden sind. Das im hiesigen Institut eingeführte Submersverfahren zur Heranzucht dieser Organismen (SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK 1961) ermöglichte eine eingehende Untersuchung des Wachstumsverlaufs.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung neu isolierter Knallgasbakterien und die Untersuchung ihres chemolithotrophen Wachstums. Außerdem sollten die Versuche einen Einblick in die Speicherstoffsynthese geben. Nachdem Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure als Speicherprodukt bei *Azotobacter chroococcum* (LEMOIGNE u. GIRARD 1943), *Pseudomonas*-Stämmen (MORIS u. ROBERTS 1959; DOUDOROFF u. STANIER 1959; LEWINE u. WOLOCHOW 1960), *Bacillus*-Arten (LEMOIGNE, DELAPARTE u. CROSON 1944), *Micrococcus halodenitrificans* (SMITHIES, GIBBONS u. BAYLEY 1955) und *Chromobacterium*-Arten (FORSYTH, HAYWARD u. ROBERTS 1958)

\* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1961.

nachgewiesen worden war, wurde dieses Polymere auch bei Knallgasbakterien, die unter chemolithotrophen Bedingungen gehalten worden waren, aufgefunden (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961; BARTHA 1962). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Speicherstoffsynthese unter organotrophen Bedingungen im Vergleich zur chemolithotrophen Speicherung betrachtet werden. Darüber hinaus sollte ein Einblick in den Verlauf der Speicherung bei gleichzeitiger Verwertung von organischen Substraten und Kohlendioxyd gewonnen werden. Der bevorzugte Einbau bestimmter organischer Substrate sollte Beziehungen zwischen der chemischen Struktur von Substrat und Endprodukt erkennen lassen und Hinweise auf die potentiellen Stoffwechselwege geben.

### Methodik

1. *Nährmedien.* Zur Heranzucht der Bakterien unter chemolithotrophen Bedingungen diente eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  10,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g; dest. Wasser 1000 ml. Dieser Grundlösung wurden je 10 ml der Lösungen: a) 0,5%  $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{-Citrat}$  + 0,1%  $\text{CaCl}_2$ ; b) 5,0%  $\text{NaHCO}_3$ , und 2 ml einer Hoaglandschen Spurenelementlösung zugefügt. Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und nach Abkühlen vereinigt; End-pH 7,0–7,2. Zur Anreicherung wurden Erdalkochung und Leitungswasser zugesetzt. Für Plattenkulturen wurde die Nährlösung mit 2% Difco-Agar verfestigt.

Zur Kultur unter organotrophen Bedingungen wurde Glucose-Pepton-Medium, 3XD-Medium (nach FRASER u. MAHLER 1957) und Bouillon-Agar verwandt. Für Wachstumsteste diente ein Mineralagar, in den jeweils 0,4 ml bzw. 0,15 ml einer 25%igen Lösung eines organischen Substrates mit dem Drigalsky-Spatel eingerieben wurden.

Die Nährböden zur Bestimmung der isolierten Stämme wurden nach den Angaben von PELTIER, GEORGI u. LINDGREN (1952) sowie PELCZAR u.a. (1957) angesetzt.

2. *Massenkultur.* Für alle Versuche, die an gewaschenen Suspensionen („ruhenden“ Zellen) angestellt wurden, sind die Zellen bei geringen Nährlösungsmengen in 500 ml Saugflaschen oder bei größeren Mengen in 2-l- oder 6-l-Zweihalskolben (SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK 1961) bei 28°C herangezogen worden. Die Gasatmosphäre setzte sich, sofern nicht anders angegeben ist, aus 10%  $\text{O}_2$  + 10%  $\text{CO}_2$  + 80%  $\text{H}_2$  zusammen.

3. *Manometrische Messungen.* Gaswechselfmessungen wurden bei 30°C in einer Warburgapparatur (Modell „V“) der Fa. Braun, Melsungen, durchgeführt; Schüttelfrequenz 120 Hin- und Hergänge je Minute; 4 cm Elongation; einarmige Gefäße mit 13–16 ml Rauminhalt.

4. *Einbauversuche.* 200 ml Erlenmeyerkolben mit je 25 oder 50 ml Suspension wurden in einem Wasserbad bei 30°C mit 125 Hin- und Hergängen je Minute geschüttelt. Die Kolben wurden durch einen doppelt durchbohrten Gummistopfen begast. Die Proben wurden mit Hilfe einer Injektionsspritze durch eine seitliche, mit einem Gummistopfen verschlossene Öffnung durch eine Injektionsnadel entnommen. Die radioaktive Bicarbonatlösung wurde durch dieselbe Kanüle eingeführt.

5. *Chemische Analysen.* Der Gesamt-Stickstoff der Zellsuspensionen wurde nach nasser Verbrennung in Gegenwart von Selen-Reaktions-Gemisch und Schwefelsäure nach KJELDAHL bestimmt. Das Zell-Protein wurde nach der

Biuretmethode (modifiziert nach LA RIVIÈRE 1958) bestimmt. Reagenslösung: Na-K-Tartrat 5,0 g; NaOH 20,0 g; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1,0 g; KJ 2,5 g. Diese Reagentien wurden einzeln in wenig dest. Wasser gelöst und in der angegebenen Reihenfolge zusammengewaschen. Die Reagenslösung wurde anschließend auf 500 ml aufgefüllt und wegen besserer Haltbarkeit in einer braunen Flasche aufbewahrt. 1 ml dieses Reagens wurde mit je 2 ml Bakteriensuspension im Zentrifugenglas gemischt und 30 min bei 37°C stehengelassen. Ein gelegentlich entstehender Niederschlag wurde durch Zentrifugieren (15 min bei 2500 U/min) entfernt. Die Extinktion der klaren Lösung wurde im Eppendorf-Photometer unter Verwendung des Filters 546 bei 2 cm Schichtdicke gemessen. Der mit dem Faktor 3 multiplizierte Extinktionswert gibt die Menge an Protein in mg/ml Suspension an. Bis zu 1,5 mg Protein/ml Suspension verlief die Eichkurve gradlinig; oberhalb dieses Wertes bestand keine Proportionalität zwischen Proteingehalt und Extinktionswert. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden 50 oder 100 ml einer Suspension bei 6000 U/min zentrifugiert und zweimal in dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Zentrifugat 12 Std bei 80°C getrocknet und im Exsiccator über Silicagel abgekühlt. Aus der Gewichts-differenz der Zentrifugengläser (Wägung bei Beginn und nach Abschluß dieses Arbeitsganges) wurde die Trockensubstanz in mg/50 bzw. 100 ml Suspension ermittelt. Zur Bestimmung der Trübung wurde die Bakteriensuspension soweit verdünnt, daß die Extinktionswerte bei 436 m $\mu$  und  $d = 1$  cm zwischen 0,1 und 0,3 lagen. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach NEUBAUER ermittelt. Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure wurde aus 30–80 mg gefriergetrockneten Zellen durch Chloroform extrahiert (etwa 12 Std bei Zimmertemperatur); die Zellrückstände wurden auf einer Nutsche mit Filterpapier Schl. u. Sch. Nr. 597 abgetrennt und zweimal mit Chloroform gewaschen. Durch Zusatz des gleichen Volumenanteils Äthyläther zum Chloroformextrakt wurde PHBS ausgefällt und nach Abkühlen auf den Gefrierpunkt auf „G4“ Glasfritten abgesaugt. Durch Differenzwägung wurde das Gewicht der extrahierten PHBS ermittelt. Das von den Zellen fixierte Kohlendioxyd wurde durch Radioaktivitätsbestimmung auf Membranfiltern erfaßt; 2 ml Suspension wurden abgesaugt und mit 0,1 n HCl gewaschen; die Membranfilter wurden auf Messingblocks festgelegt; die Impulszahl wurde im Zählgerät FH 49 bestimmt (SCHLEGEL u. LAFFERTY 1961).

6. Folgende Abkürzungen werden verwendet: ES = Essigsäure, BTS = Brenztraubensäure, BSS = Bernsteinsäure, MiS = Milchsäure, AS = Äpfelsäure, HBS =  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, PHBS = Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure, FuS = Fumarsäure.

## Ergebnisse

### A. Isolierung und Charakterisierung neuer Knallgasbakterien

In früheren Jahren waren verschiedene Typen von Knallgasbakterien isoliert worden (KASERER 1906: *Bacillus pantotrophus*; LEBEDEFF 1908; NIKLEWSKI 1914: *Hydrogenomonas vitrea*, *Hydrogenomonas flava*, *Hydrogenomonas agilis*), die als bewegliche Stäbchen charakterisiert worden waren und sich lediglich im Pigmentgehalt, im Wachstumsverhalten und in einigen untergeordneten Merkmalen unterschieden. RUHLAND (1924) hatte sogar einen Sporenbildner, *Bacillus pycnoticus*, beschrieben. In den letzten 20 Jahren sind dagegen lediglich farblose Pseudomonaden isoliert und zu physiologischen Untersuchungen herangezogen worden (DOUDOROFF 1942: *Hydrogenomonas saccharophila*; KLUYVER u. MANTEN 1942: *Hydrogenomonas flava*; SCHATZ u. BOVELL 1952: *Hydrogenomonas facilis*; SCHLEGEL 1953: *Hydrogenomonas spec.*; KISTNER 1954: *Hydrogenomonas carboxydovorans*; PACKER u. VISHNIAC 1954, 1955: *Hydrogenomonas ruhländii*; BELJAJEWA 1960: *Pseudomonas pyocyanea*, *Pseudomonas pantotropha*; ROMANOVA u. DOMAN 1960; WITTENBERGER u. REPASKE 1961: *Hydrogenomonas eutropha*). Ferner ist in jüngster Zeit

dieser Stoffwechselmodus auch bei einigen Actinomyceten-Arten nachgewiesen worden (KANAI, MIYACHI u. TAKAMIYA 1960: *Streptomyces autotrophicus*; HIRSCH 1961: *Nocardia saturnea*, *Nocardia petroleophila*, *Streptomyces spec.*).

Um neuen Fragestellungen an einer Zahl mehrerer möglichst verschiedener typischer Stämme von chemolithotroph wachsenden  $H_2$ -oxydierenden Bakterien nachgehen zu können, wurden Anreicherungskulturen mit Impfmateriale von verschiedenen Standorten und unter verschiedenen Anreicherungsbedingungen angesetzt. Als Ausgangsmateriale für die Anreicherungskulturen wurden 16 verschiedene Proben verwendet: Wald- und Wiesenboden aus verschiedenen Lagen, Grabenschlamm, Teichschlamm und Quellschlamm. Von allen Proben wurden Anreicherungskulturen zur Isolierung von „Häutchenbildnern“, „Suspensionsbildnern“, Sporenbildnern und einer möglichst großen Zahl anderer Formen angesetzt.

In stehenden Flüssigkeitskulturen (Ruhekulturen) kommt es häufig zur Ausbildung einer Kahlhaut; die Häutchenbildner werden bevorzugt. Sie bilden eine Bakteriendecke, die die Nährlösung von der weiteren Zufuhr der gasförmigen Komponenten abschließt und das nachträgliche Aufkommen submerser gedeihender Bakterien verhindert. — Umgekehrt werden durch Schütteln oder Rühren Bedingungen geschaffen, unter denen sich suspensionsbildende Organismen durchsetzen. Es wurde deshalb die Anreicherung unter beiden Bedingungen vorgenommen.

In Flüssigkeitskulturen setzen sich in der Regel die am schnellsten wachsenden Bakterien durch und unterdrücken alle Organismen mit geringerer Wachstumsrate. Um auch solche langsam wachsenden Organismen, die unter Umständen bemerkenswerte Eigenschaften aufweisen können, anzureichern, versah ich auch Mineralagarplatten mit Standortmaterial. Die Organismen bleiben auf dem Agar fixiert und wachsen zu Einzelkolonien aus (direktes Plattenverfahren).

Zur Isolierung von Sporenbildnern wurden die Bodenproben pasteurisiert, d. h. 15 min lang bei 78°C gehalten und erst dann mit Mineralnährlösung aufgefüllt. Nach diesem Verfahren wurde jedoch in keinem Fall Wachstum erzielt.

Durch wiederholtes Überimpfen und Bebrüten jeweils unter den gleichen Bedingungen wurden die angereicherten Stämme gereinigt und schließlich durch Verdünnungsausstrich auf Agar isoliert. Reinheitskontrollen erfolgten durch Passagen auf Glucose-Pepton-Agar und 3XD-Agar.

Nach mehrmaliger Aussortierung aller Kulturen mit ungünstigen Wachstumseigenschaften verblieben zehn Bakterienstämme, die auf Mineralschrägagar in Kultur gehalten wurden. Sie wurden mit der Ziffer ihres Standortes und dem Index „s“ oder „h“ bezeichnet, je nachdem, ob sie „Suspensions-“ oder „Häutchenbildner“ waren. Die Konstanz und

Spezifität dieser Merkmale wurde durch Anzucht sowohl in Schüttelkultur, als auch in Ruhekultur bestätigt. „Häutchenbildner“ wuchsen in Ruhekultur als Häutchen; in Schüttelkultur als Ring oder Flocken, aber niemals als homogene Suspension. Die „suspensionsbildenden“ Stämme ergaben unter beiden Kulturbedingungen eine homogene Suspension.

Die isolierten Bakterienstämme wurden hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften, ihrer Zellmorphologie und einer Reihe von stoffwechselphysiologischen und biochemischen Merkmalen charakterisiert. Bis auf zwei Stämme erwiesen sich alle Herkünfte als beweglich; alle Stämme sind gramnegative Stäbchen; auf Grund ihrer Fähigkeit, mit Knallgas und Kohlendioxyd in einem Mineralmedium zu wachsen, sind sie zur Gattung *Hydrogenomonas* zu stellen.

Unter den neu isolierten Stämmen befindet sich kein obligat chemolithotropher Organismus. Alle Stämme gedeihen auch mit organischen Säuren als C- und Energiequelle. Sie wachsen gut auf BSS, FuS, BTS, ÄS und ES, weniger auf Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valeriansäure, Propionsäure und Malonsäure. Auf Ameisensäure, Glykolsäure und Glykoll wachsen nur wenige Stämme; kein Stamm vermochte auf Oxalsäure zu gedeihen; Zucker sind ausgesprochen schlecht verwertbar; der am besten wachsende Stamm 16 vermag auf keinem der vier geprüften Zucker (Glucose, Mannose, Xylose und Ribose) zu wachsen. Petroleum wird nicht verwertet. Als N-Quelle ist Ammoniumsalz besser verwertbar als Nitrat.

### B. Wachstumsphysiologie

#### I. Beziehungen zwischen Trübung, Trockengewicht und Zellzahl bei chemolithotrophem Wachstum

Von den drei am besten wachsenden und hinsichtlich der  $H_2$ -Oxydation aktivsten Stämmen (*H 1*, *H 16* und dem von C. BOVELL übernommenen Stamm *H 20*) wurden Wachstumskurven aufgenommen. 3 l Mineralmedium wurden von einer viertägigen Mineralagarkultur beimpft und in einem 6-l-Zweihalskolben bei  $28^\circ C$  mit 650 U/min gerührt. Die Kulturgefäße wurden zu Beginn des Versuchs mit dem Gasgemisch durchströmt; entsprechend dem Verbrauch wurde Gas aus einem mit demselben Gasgemisch gefüllten Gasometer nachgesogen. Nach einer kurzen Anlaufphase vermehrten sich die Zellen exponentiell (Abb. 1).

Daß die Zellen bereits nach 24 Std das Wachstum einstellten, ist auf den Verbrauch des Sauerstoffs zurückzuführen.  $H_2$  und  $O_2$  werden von den Zellen annähernd im Verhältnis 2:1 aufgenommen. Das nachströmende Gasgemisch ( $82\% H_2 + 8\% O_2 + 10\% CO_2$ ) enthielt die Komponenten jedoch im Verhältnis 10:1. Wird die Gasatmosphäre also nur ergänzt und nicht ausgetauscht, so verarmt sie im Laufe der Zeit an Sauerstoff.

Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Kolben im Abstand von 3—4 Std mit demselben Gasgemisch durchströmt. Daraufhin setzte das Wachstum wieder ein, jedoch mit einer erheblich herabgesetzten Wachstumsrate.

Den geringen  $O_2$ -Partialdruck in der Gasatmosphäre von 0,1 Atm. hatte ich gewählt, weil *Hydrogenomonas* gegen höhere Sauerstoffpartialdrücke

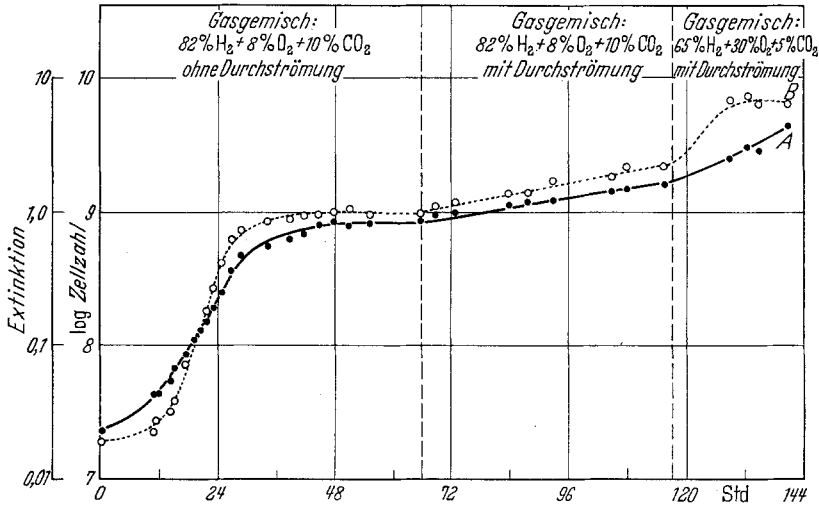


Abb. 1. Wachstum von *Hydrogenomonas* Stamm H 16 unter Knallgas und Kohlendioxyd. 31 Mineralmedium wurden von einer viertägigen Mineralagarkultur beimpft und in einem 6-l-Zweihalskolben bei 28°C mit 650 U/min gerührt. Zeichenerklärung: A Extinktion ●—●; B Zellzahl ○—○

empfindlich ist (SCHATZ u. BOVELL 1952; SCHLEGEL 1953; WILSON, STOUT, POWELSON u. KOFFLER 1953); die  $O_2$ -Empfindlichkeit scheint insbesondere das Enzym Hydrogenase zu betreffen. Entsprechende Versuche über den zuträglichen  $O_2$ -Partialdruck waren jedoch stets bei sehr geringen Suspensionsdichten angestellt worden, also unter Bedingungen, unter denen der Partialdruck im Medium dem in der Gasatmosphäre vorhandenen entsprach. Da die Suspension in meinem Versuch aber bereits eine Trübung von  $E = 1,5$  erreicht hatte, erprobte ich ein Gasgemisch von 30%  $O_2$  + 65%  $H_2$  + 5%  $CO_2$ . Nach Durchströmung mit diesem Gasgemisch stieg die Wachstumsgeschwindigkeit bei allen drei Stämmen wieder an.

Bei hohen Zelldichten tritt also trotz des hohen  $O_2$ -Partialdruckes in der Gasatmosphäre keine Schädigung ein. Wegen der geringen Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs stehen bei hohen Bakteriedichten und entsprechend hohem  $O_2$ -Verbrauch in der Nährlösung die  $O_2$ -Partialdrücke in der Gasphase und im Medium nicht mehr im Gleichgewicht

miteinander. Bei hohen Bakteriendichten wird die Wachstumsrate durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs bestimmt.

Wie die Ergebnisse der ersten Wachstumsversuche (Abb. 1) erkennen lassen, unterscheiden sich die Extinktions- und Zellzahlkurve während der exponentiellen Phase im Anstiegswinkel. Die Extinktionskurve verläuft in der „lag-Phase“ steiler, in der exponentiellen Phase dagegen

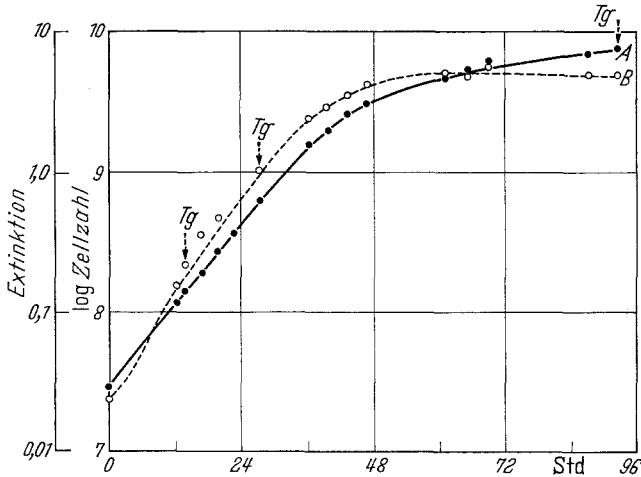


Abb. 2. Zunahme von Extinktion und Zellzahl während des chemolithotrophen Wachstums von Stamm H 16. Ein 2-l-Rundkolben mit 1 l Minerallösung wurde mit einer chemolithotroph gewachsenen Suspension beimpft und bei 28°C unter einer Gasatmosphäre von 30% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 65% H<sub>2</sub> mit 650 U/min gerührt. Das Gasgemisch wurde nach jeder Messung, nach 3–4 Std, erneuert. Zeichenerklärung: A Extinktion ●—●; B Zellzahl ○—○; Tg Trockengewichtbestimmung zu dem aus der Kurve ersichtlichen Zeitpunkt

Tabelle 1. Extinktion, Zellzahl und Trockengewicht in verschiedenen Wachstumsstadien

Kulturdauer (Std)	Extinktion	Zellzahl/ml	Trockengewicht (mg/ml)	Trockengewicht/Extinktion	Zellgewicht (mg)
13 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	0,144	2,25 · 10 <sup>8</sup>	0,112	0,774	4,96 · 10 <sup>-10</sup>
27	0,645	1,05 · 10 <sup>9</sup>	0,308	0,478	2,93 · 10 <sup>-10</sup>
92	8,32	5,26 · 10 <sup>9</sup>	3,452	0,415	6,56 · 10 <sup>-10</sup>

Bedingungen wie bei Abb. 2.

flacher als die Zellzahlkurve. Das bedeutet, daß das Verhältnis „Extinktion/Zellzahl“ im Laufe des exponentiellen Wachstums abnimmt. Die Zellen werden also zunehmend kleiner; dabei ist die Gewichtsabnahme der Zellen sogar noch mehr ausgeprägt als durch das Verhältnis Extinktion/Zellzahl zum Ausdruck kommt, da mit Abnahme der Teilchengröße die spezifische (auf das Trockengewicht bezogene) Extinktion steigt.

Diese Befunde wurden durch einen weiteren Versuch bestätigt, bei dem neben Zellzahl und Extinktion zu verschiedenen Zeiten auch das Trockengewicht der Zellen bestimmt wurde (Abb. 2 und Tab. 1).

Nach den an allen drei Stämmen angestellten Messungen verändern sich die Zellen während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase; man kann daher nicht von „Standardzellen“ sprechen; Zellen aus dem Anfang der log-Phase können sich ganz anders verhalten als am Ende der log-Phase geerntete Zellen. Daß in der stationären Phase bei Konstant-erhaltung der Zellzahl die Extinktion zunimmt, deutete darauf hin, daß

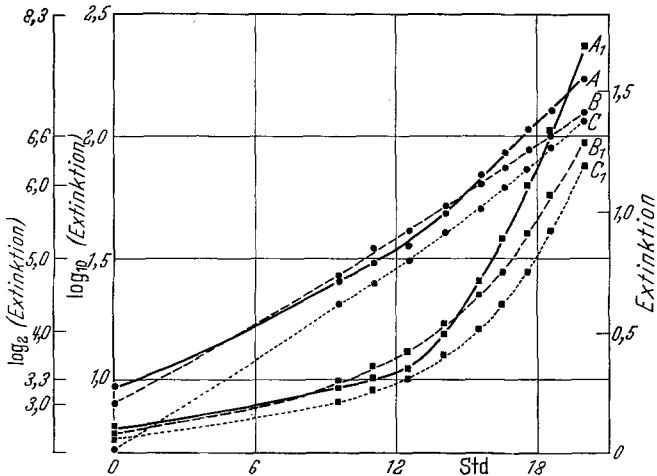


Abb. 3. Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase der Stämme H 16, H 1 und H 20. 6-l-Rundkolben mit je 3 l Minerallösung wurden mit chemolithotroph gewachsener Suspension beimpft und bei 28°C und 650 U/min gerührt. Die Gasmischung, 10% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 85% H<sub>2</sub>, wurde stündlich erneuert. Zeichenerklärung: A H 20 (Extinktion log. aufgetragen) ●—●; A<sub>1</sub> H 20 (Extinktion arithm. aufgetragen) ■—■; B H 16 (Extinktion log. aufgetragen) ●—●; B<sub>1</sub> H 16 (Extinktion arithm. aufgetragen) ■—■; C H 1 (Extinktion log. aufgetragen) ●—●; C<sub>1</sub> H 1 (Extinktion arithm. aufgetragen) ■—■

die Zellen nach Beendigung ihres Wachstums Speicherstoffe bilden. Die Speichersubstanz wurde später als Poly-β-Hydroxybuttersäure identifiziert (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961).

Für alle drei Stämme sollte auch die Verdopplungszeit bestimmt werden. Die exponentielle Phase eines weiteren Wachstumsversuchs wurde semilogarithmisch und arithmetisch aufgetragen (Abb. 3). Auf der Skala der Logarithmen mit der Basis 2 entspricht jede Einheit einer Verdopplung der Zellmasse (vgl. LAMANNA u. MALETTE 1959).

Für H 16 wurde als niedrigste Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase 270 min, für H 1 220 min und für H 20 195 min bestimmt.

## II. Wachstum auf organischen Säuren und Zuckern

Wie sich schon bei Wachstumstesten auf Agarmedien herausgestellt hatte, werden Ribose, Xylose, Saccharose, Glucose und Malonsäure nicht verwertet. Diese Befunde ließen sich in Rührkultur an *Hydrogenomonas*



Stamm *H 16* bestätigen. Glutaminsäure, BSS, BTS, ES, ÄS und Casaminosäuren führen zu einem üppigen Wachstum. Die Zunahme an Zellmasse scheint mit BSS, BTS und ÄS am größten zu sein. Die Dauer der lag-Phase unterscheidet sich bei den einzelnen Substraten. Sie ist auf ES verhältnismäßig lang.

### C. Hydrogenaseaktivität

#### I. Hydrogenaseaktivität nach chemolithotrophem Wachstum

Die Aktivität der Hydrogenase der drei Stämme *H 16*, *H 1* und *H 20* sollte vergleichend bestimmt werden.

Die drei Stämme wurden nebeneinander angezogen; die Versuchssuspensionen wurden aus dem gleichen Stadium der exponentiellen Phase eines Wachstumsversuchs entnommen. Durch Einstellung auf einen bestimmten Extinktionswert wurden die Suspensionen auf annähernd den gleichen Trockensubstanz- bzw. Proteingehalt gebracht. Wie bei früheren Versuchen wurde die  $H_2$ -Aufnahme manometrisch unter 50% Luft + 50%  $H_2$  ohne  $CO_2$ , also als „Leerlaufreaktion“, bestimmt. Außerdem wurde der  $H_2$ -Verbrauch mit Methyleneblau als H-Acceptor gemessen.

Tabelle 2  
*H<sub>2</sub>-Aufnahme (μl/Std/mg Protein) chemolithotroph gezogener Zellen mit O<sub>2</sub> und Methyleneblau als H-Acceptor*

Stamm	$H_2$ -Aufnahme in μl/Std/mg Protein; als H-Acceptor	
	Sauerstoff	Methyleneblau
<i>H 16</i>	306	1011
<i>H 1</i>	315	1088
<i>H 20</i>	521	1417

Bedingungen wie unter Abb.4.

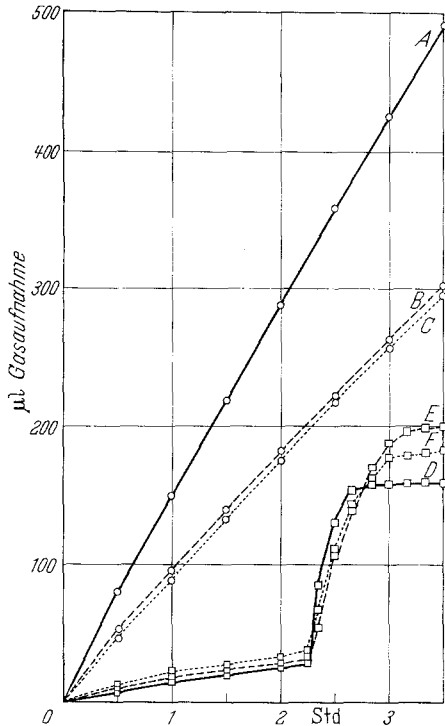


Abb. 4. *Hydrogenaseaktivität chemolithotroph gewachsener Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase.* Die Versuchssuspensionen wurden chemolithotroph angezogen, dreimal in Phosphatpuffer ( $DH 7$ ) gewaschen, darin aufgenommen und auf gleiche Extinktion eingestellt. In jedes Warburggefäß wurden 2,5 ml Suspension (0,186 mg Zellprotein) einpipettiert. Methyleneblau wurde als 0,04 molare Lösung verwendet, 0,2 ml wurden nach etwa 2 Std aus dem Seitenarm des Warburggefäßes herübergeholt. Gasatmosphäre: 50% Luft + 50%  $H_2$ . Bei Verwendung von Methyleneblau als H-Acceptor: 100%  $H_2$ . KOH im Zentralzylinder. Rundwarburgapparat; 120 Hin- und Hergänge je Minute; Amplitude 4 cm; 30° C.

Zeichenerklärung: Stamm H-Acceptor Zeichen

A <i>H 20</i>	$O_2$	○—○	D <i>H 20</i>	Methyleneblau	□—□
B <i>H 1</i>	$O_2$	○- - -○	E <i>H 1</i>	Methyleneblau	□- - -□
C <i>H 16</i>	$O_2$	○·····○	F <i>H 16</i>	Methyleneblau	□·····□

In Abb.4 und Tab.2 ist das Ergebnis dargestellt. Stamm 20 zeigte eine merklich höhere Hydrogenaseaktivität als die Stämme 16 und 1, bei denen die Geschwindigkeiten der Knallgasreaktion nahezu gleich sind.

Die Werte für die  $H_2$ -Aufnahme mit Methylenblau als H-Acceptor liegen etwa dreimal so hoch wie die mit  $O_2$  als H-Acceptor. Die erhöhte  $H_2$ -Aufnahme bei Verwendung von Methylenblau als H-Acceptor wurde bereits bei der Charakterisierung der Stämme beobachtet. Diese mit

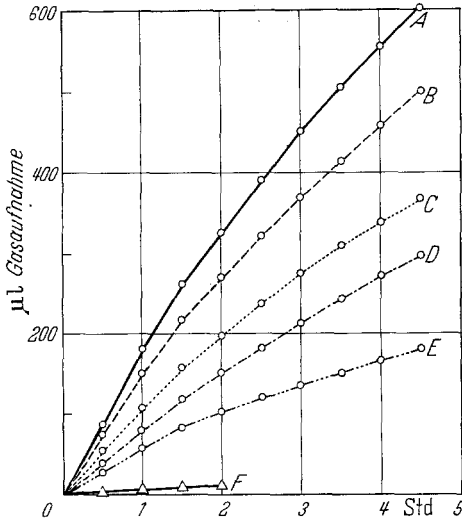


Abb. 5. Hydrogenaseaktivität von Stamm H 16 nach Wachstum auf organischen Säuren. Organotroph gewachsene Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, dreimal in Phosphatpuffer (pH 7) gewaschen, darin aufgenommen und auf Extinctionsgleichheit verdünnt. Jedes Warburggefäß enthielt 2,5 ml Suspension (0,379 mg Protein). Gasatmosphäre: 50% Luft + 50%  $H_2$ . KOH im Zentralzylinder. Zeichenerklärung: A auf Glutaminsäure angezogen  $\circ$ — $\circ$ ; B auf BTS angezogen  $\circ$ - - - $\circ$ ; C auf BSS angezogen  $\circ$ · · · · $\circ$ ; D auf ÄS angezogen  $\circ$ - · - · $\circ$ ; E auf ES angezogen  $\circ$ - - - - $\circ$ ; F endogene Atmung  $\Delta$ — $\Delta$

Phase und waren auf gleiche Extinktion und somit annähernd gleichen Proteingehalt eingestellt worden. Abb.5 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion ist von den Anzuchtbedingungen abhängig. Sie ist am größten bei den auf GluS gewachsenen Zellen. In den ersten Stunden der Messung kommt sie der Aktivität chemolithotroph angezogener Zellen nahe (vgl. Abb.4). Für die anderen Suspensionen lagen die Werte tiefer. Nach Wachstum auf ES war die Hydrogenaseaktivität am niedrigsten. Alle fünf Kurven verlaufen nicht

Methylenblaugegenüber der Knallgasreaktion erhöhte  $H_2$ -Aufnahme ist anscheinend darauf zurückzuführen, daß Methylenblau nicht nur als H-Acceptor wirkt, sondern gleichzeitig die mit der  $H_2$ -Oxydation verknüpften Prozesse entkoppelt. Die in Gegenwart von Methylenblau beobachtete Geschwindigkeit der  $H_2$ -Oxydation entspricht größenordnungsmäßig derjenigen, die bei der mit der  $CO_2$ -Fixierung gekoppelten Knallgasreaktion in Erscheinung tritt (BARTHA 1961).

## II. Hydrogenaseaktivität nach organotrophem Wachstum

Suspensionen aus einem parallel laufenden Wachstumsversuch von Stamm H 16 auf BTS, BSS, GluS, ÄS und ES wurden manometrisch auf ihre Hydrogenaseaktivität untersucht. Die Zellen entstammten dem gleichen Wachstumsstadium der exponentiellen

gerade, sondern fallen während der Dauer des Versuchs ab. Nach 4 Std war die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion auf den halben Anfangswert abgesunken.

### III. Einfluß von organischen Substraten auf die Geschwindigkeit der H<sub>2</sub>-Oxydation

Die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion wird durch Anwesenheit von CO<sub>2</sub> auf das Drei- bis Vierfache der „Leerlaufreaktion“ erhöht. Der

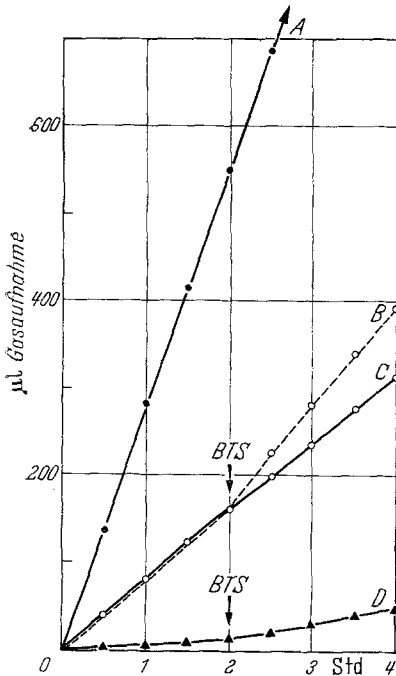


Abb. 6

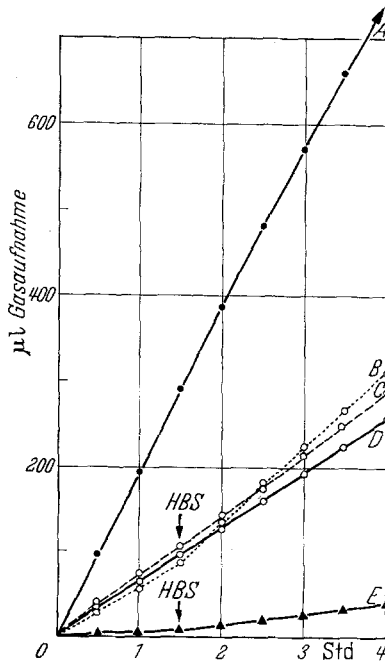


Abb. 7

Abb. 6. Einfluß von Brenztraubensäure auf die Höhe der Knallgasreaktion (*Hydrogenomonas* Stamm H 16). Chemolithotroph gewachsene Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, dreimal in Puffer (pH 7) gewaschen und darin aufgenommen. In jedes Warburggefäß wurden 2,5 ml Suspension (0,21 mg Protein) einpipettiert; bei B, C und D 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder.

Gasatmosphäre
A 80% H <sub>2</sub> + 10% CO <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>
B 80% H <sub>2</sub> + 10% N <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>
C 80% H <sub>2</sub> + 10% N <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>
D Luft

Zusätze
—
53 µMol BTS
—
53 µMol BTS

Zeichen
●—●
○-○
○—○
○—○
▲—▲

Abb. 7. Einfluß von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure auf die Knallgasreaktion (*Hydrogenomonas* Stamm H 16). Chemolithotroph gewachsene Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, dreimal teils in Puffer von pH 7, teils in Puffer von pH 6 gewaschen, darin aufgenommen und auf Extinktionsgleichheit eingestellt. In jedes Warburggefäß wurden 2,5 ml Suspension, entsprechend 0,21 mg Protein, einpipettiert. Außer A enthielten alle Ansätze 0,2 ml 20% KOH im Zentralzylinder.

Gasatmosphäre	pH-Wert
A 80% H <sub>2</sub> + 10% CO <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>	7,0
B 80% H <sub>2</sub> + 10% N <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>	6,0
C 80% H <sub>2</sub> + 10% N <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>	7,0
D 80% H <sub>2</sub> + 10% N <sub>2</sub> + 10% O <sub>2</sub>	7,0
E Luft	7,0

Zusatz
—
58 µMol HBS
—
58 µMol HBS
—
58 µMol HBS

Zeichen
●—●
○-○
○—○
○—○
▲—▲

energieverwertende Prozeß der  $\text{CO}_2$ -Fixierung ist wahrscheinlich über das Adenylsäuresystem mit dem energieliefernden Prozeß der  $\text{H}_2$ -Oxydation verknüpft. Während bei Abwesenheit von  $\text{CO}_2$  nur eine „Leerlaufreaktion“ abläuft, wird durch die  $\text{CO}_2$ -Fixierung laufend ATP verbraucht und die Knallgasreaktion dadurch auf ihre maximale Höhe gebracht (SCHLEGGEL u. BARTHA 1961 a). Die folgenden Versuche an Stamm *H 16* sollten zeigen, ob sich auch durch organische Säuren die Geschwindigkeit der  $\text{H}_2$ -Oxydation in gleichem Maße erhöhen ließe wie durch  $\text{CO}_2$ . Als erstes Substrat wurde BTS geprüft (Abb. 6).

Während die Gasaufnahme mit 10%  $\text{CO}_2$  3,6mal so hoch war wie bei Abwesenheit von  $\text{CO}_2$ , war die Erhöhung durch BTS nur sehr gering. Die  $\text{H}_2$ -Aufnahme unter 80%  $\text{H}_2 + 10\% \text{O}_2 + 10\% \text{N}_2$  stieg nach Zusatz von BTS von 75,6  $\mu\text{l}/\text{Std}$  auf 102,5  $\mu\text{l}/\text{Std}$ , d. h. um 35,5%.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure geprüft. Die Messungen wurden in diesem Fall nicht nur bei  $\text{pH}$  7, sondern auch bei  $\text{pH}$  6 durchgeführt, weil die Säuren im niedrigeren  $\text{pH}$ -Bereich undissoziiert vorliegen und in dieser Form von den Zellen besser aufgenommen werden können (Abb. 7). Bei  $\text{pH}$  7 hatte die Säure keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion. Bei  $\text{pH}$  6 stieg der  $\text{H}_2$ -Verbrauch nach Zusatz von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure von 62,9  $\mu\text{l}/\text{Std}$  auf 81,0  $\mu\text{l}/\text{Std}$ , also nur um 28,8%.

Auch durch Zusatz von BSS und ES war keine nennenswerte Erhöhung der  $\text{H}_2$ -Aufnahme zu erreichen (BARTHA 1961). Aus diesen Ergebnissen ist der Schluß zu ziehen, daß sich der Effekt des Kohlendioxyds, die  $\text{H}_2$ -Oxydation auf ein Mehrfaches zu beschleunigen, nicht durch organische Substrate nachahmen läßt. Auch gut verwertbare Säuren, die rasch zum Speicherprodukt PHBS aufgebaut werden, haben nicht annähernd die Wirkung von  $\text{CO}_2$ . Der Aufbau von PHBS aus Säuren benötigt einerseits weniger Energie als die Synthese von PHBS aus  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ , andererseits scheint der Polymerisierungsprozeß in seiner Geschwindigkeit begrenzt zu sein, so daß der energieliefernde Prozeß der  $\text{H}_2$ -Oxydation nicht stärker in Anspruch genommen werden kann.

#### *D. Verwertung organischer Substrate zur Synthese von PHBS*

Daß nicht nur wachsende, sondern auch gewaschene Suspensionen („ruhende“ Zellen) zur Speicherstoffsynthese aus  $\text{CO}_2 + \text{H}_2 + \text{O}_2$  befähigt sind, wurde für die Stämme *H 16*, *H 1* und *H 20* bereits festgestellt (BARTHA 1962). Weitere Versuche, zu denen lediglich Stamm *H 16* herangezogen wurde, sollten erweisen, welche organischen Substrate zur Synthese von PHBS verwertet werden können. Aus den Einbauleistungen mit verschiedenen organischen Säuren als Substraten hofften wir Hinweise auf die möglichen Intermediärprodukte und den Mechanismus der Synthese von PHBS während der chemolithotrophen  $\text{CO}_2$ -Fixierung zu erhalten.

## I. Oxydative Assimilation und synthetischer Wirkungsgrad

Zunächst sollte der Wirkungsgrad bestimmt werden, mit dem BSS, BTS, ÄS, ES und MiS eingebaut werden. Die Oxydation einer bestimmten Substratmenge wurde manometrisch gemessen, und die verbrauchte O<sub>2</sub>-Menge wurde zur theoretisch für eine vollständige Substratoxydation errechnete O<sub>2</sub>-Aufnahme in Beziehung gesetzt. Wird nur ein geringer Prozentsatz des theoretischen Sauerstoffverbrauchs erreicht, so ist anzunehmen, daß der nicht oxydierte Anteil des Substrats eingebaut wird und der synthetische Wirkungsgrad demnach hoch ist. Diese Schlußfolgerung läßt sich nur dann ziehen, wenn durch Bilanzversuche das Schicksal des nicht oxydierten Anteils sichergestellt wurde. Der synthetische Wirkungsgrad ist als Quotient „assimilierter Anteil/oxydierter Anteil“ definiert (vgl. KANDLER 1953).

Die aus zahlreichen Versuchen errechneten synthetischen Wirkungsgrade sind in Tab. 3 zusammengestellt. Die synthetischen Wirkungsgrade

Tabelle 3. Synthetischer Wirkungsgrad verschiedener Substrate

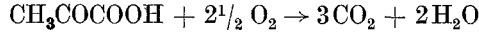
Substrat	In Minerallösung pH 6		In Puffer pH 6	
	Assimilierter Teil Oxydierter Teil	Assimilierter Anteil in %	Assimilierter Teil Oxydierter Teil	Assimilierter Anteil in %
BSS	1,26	56	1,30	57
BTS	2,91	74	2,47	71
ÄS	1,02	50	0,69	41
ES	0,86	46	0,51	34
MiS	0,23	19	0,32	24

Chemolithotroph gewachsene Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, dreimal in Puffer (pH 6) bzw. in Minerallösung (pH 6) gewaschen und darin aufgenommen. Jedes Warburggefäß wurde mit 2,5 ml Suspension und 0,2 ml 20%iger KOH versehen. Es wurden 5 µMol Substrat gegeben. Endvolumen: 3 ml.

in Puffer- und Minerallösung weichen kaum voneinander ab. Mit BSS als Substrat verläuft die Oxydationskurve der wachsenden Zellen steiler als die der ruhenden Zellen. Die Oxydation der anderen Substrate geht in beiden Fällen gleich schnell vor sich. Keines der Substrate wird vollständig oxydiert; in allen Fällen wird ein Teil assimiliert. Nach Tab. 3 wäre anzunehmen, daß BTS mit dem höchsten synthetischen Wirkungsgrad eingebaut wird. Ein Parallelversuch mit diesem Substrat, bei dem die Trockengewichts- und PHBS-Zunahmen bestimmt wurden, zeigte aber einen geringeren Einbau. Auch der *RQ*-Wert von 1,9 wurde diesem hohen synthetischen Wirkungsgrad bei BTS nicht gerecht. Die vollständige Assimilation hätte nach



einen  $RQ$ -Wert von 4,0, vollständige Oxydation nach



einen  $RQ$ -Wert von 1,2 ergeben. Der unerwartet hohe synthetische Wirkungsgrad kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß BTS teilweise zu di- und trimerer para-BTS polymerisiert und in dieser Form der Zelle nicht mehr zugänglich ist. Die Oxydationskurve knickt deshalb vorzeitig ab.

## II. Stöchiometrische Beziehungen zwischen Trockengewicht, Trübung und PHBS-Gehalt während der Speicherung

Um bei nachfolgenden Versuchen die Anhäufung von PHBS am Extinktionsanstieg messen zu können, wurden in einem Eichversuch Extinktion, Zelltrockengewicht und der Gehalt an PHBS nebeneinander bestimmt.

Der Speicherungsversuch wurde mit „ruhenden“ Zellen unter einem Gasgemisch, bestehend aus  $\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{CO}_2$ , und parallel dazu mit HBS als Substrat

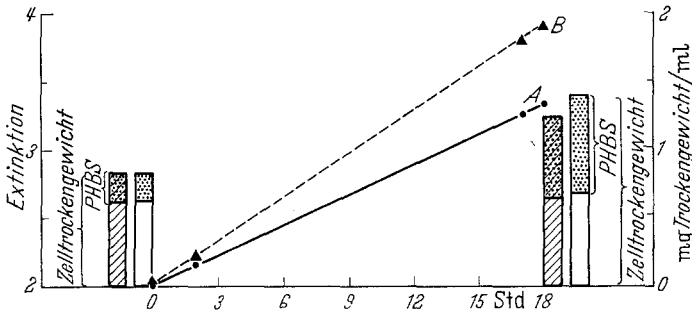


Abb. 8. Verhältnis von Extinktionsanstieg, Trockengewichts- und PHBS-Zunahme während der Speicherung (Stamm H 16). Die Versuchssuspension wurde chemolithotroph in 2-l-Rundkolben bei 28° C und 440 U/min bis zum Verbrauch des Stickstoffs geführt und dann auf zwei Kolben verteilt; der Speicherungsprozeß wurde chemolithotroph und organotroph verfolgt.

Die Extinktionszunahme wurde in Kurven, die Trockengewichts- und PHBS-Zunahme in Säulen dargestellt.

Gasatmosphäre	Zusatz	Zeichen
A 75% $\text{H}_2$ + 10% $\text{CO}_2$ + 15% $\text{O}_2$	—	● — ●
B Luft	0,4% HBS	▲ — ▲

Zu Kurve A gehören die schraffierten, zu Kurve B die leeren Säulen. Die punktierten Flächen zeigen den PHBS-Gehalt des Zelltrockengewichts an

unter Luft durchgeführt. Es wurde der  $p_{\text{H}}$ -Wert 6 gewählt, um durch den Verbrauch der Säure bedingte  $p_{\text{H}}$ -Verschiebungen in den alkalischen Bereich möglichst zu vermeiden. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert 6 erwies sich allerdings als ungünstig für die Anzucht der Bakterien; auch der Speicherungsprozeß verlief etwas langsamer als bei  $p_{\text{H}}$  7. In späteren Einbauversuchen wurde deshalb bei  $p_{\text{H}}$  7 gearbeitet.

Das Ergebnis dieses Versuches zeigen Abb. 8 und Tab. 4. Aus Abb. 8 ist zu ersehen, daß der Extinktionsanstieg mit HBS als Substrat größer ist als unter  $\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{CO}_2$ . Der Extinktionszunahme läuft eine Vermehrung des Trockengewichts und des PHBS-Gehalts parallel.

Tab. 4 gibt die Meßwerte wieder. Bei beiden Suspensionen entspricht die Gewichtszunahme der Zellmasse der PHBS-Zunahme. Unter  $H_2 + O_2 + CO_2$  nahm das Zellgewicht um 0,406 mg/ml und das Gewicht der PHBS um 0,408 mg/ml zu; mit HBS als Substrat erhöhte sich das Trockengewicht um 0,572 mg/ml und der Gehalt an PHBS um 0,538 mg/

Tabelle 4. Verhältnis von Extinktionsanstieg, Trockengewichts- und PHBS-Zunahme während der Speicherung

Bedingungen	Zeit (Std)	Ex-tinktion	Trock.-Gewicht (mg/ml)	PHBS/Trock.-Gewicht (mg/mg)	PHBS/ml (mg/ml)	Zunahme an	
						Trock.-Gewicht (mg/ml)	PHBS (mg/ml)
ohne organisches Substrat	0	2,02	0,823	0,218	0,179	—	—
Atmosphäre: 80% $H_2 + 10\% O_2 + 10\% CO_2$	16	3,34	1,229	0,478	0,587	0,406	0,408
mit 0,4% HBS	0	2,02	0,830	0,222	0,184	—	—
Atmosphäre: Luft	16	3,90	1,402	0,515	0,722	0,572	0,538

Bedingungen wie bei Abb. 8.

ml. Zu Beginn des Versuchs machte der PHBS-Gehalt 22% des Trockengewichts aus, am Versuchsende bereits 48% bzw. 52%.

Die Übereinstimmung in den Werten für den Gewichtszuwachs an Zellsubstanz und an PHBS zeigt, daß außer PHBS keine anderen Speicherstoffe gebildet werden. Die Extinktion kann also zum Maß für die PHBS-Zunahme erhoben werden. Während des Speichervorganges im Zuge der  $CO_2$ -Fixierung hat die Extinktion auf das 1,65fache zugenommen, das Zelltrockengewicht jedoch nur um den Faktor 1,49. Bei der Speicherung von PHBS steigt also die Extinktion um den Faktor  $\frac{1,65}{1,49} = 1,1$  rascher an als das Zellgewicht. Dieser Faktor ist darauf zurückzuführen, daß PHBS als fettartige Substanz stärker lichtbrechend ist als die übrigen Zellsubstanzen und dadurch zu einer höheren Lichtstreuung führt.

### III. Die Synthese von PHBS aus organischen Substraten unter verschiedenen Bedingungen

In der folgenden Versuchsserie wurde die Speicherstoffbildung durch „ruhende“ Zellen mit elf verschiedenen Substraten untersucht. Als Maß für die PHBS-Speicherung diente dabei die Extinktionszunahme. Zur Sicherung wurde parallel zu jedem Versuch eine quantitative PHBS-Bestimmung durchgeführt.

Neben der Einbaureate der Säuren unter Luft interessierte die Geschwindigkeit des Einbaus unter einem  $CO_2$ -freien und  $CO_2$ -haltigen

Gemisch aus  $H_2 + O_2$ . Es wurde angenommen, daß Knallgas als zusätzliche Energiequelle den Einbauprozess beschleunigen würde und daß sich beim Einbau unter  $H_2 + O_2 + CO_2$  möglicherweise der organotrophe und der chemolithotrophe Speicherungsprozess addieren würden. Parallel zur Einbaugeschwindigkeit wurde die Oxydation der einzelnen Substrate gemessen. Abb. 9 und 10 a/b geben den Verlauf von typischen Versuchen

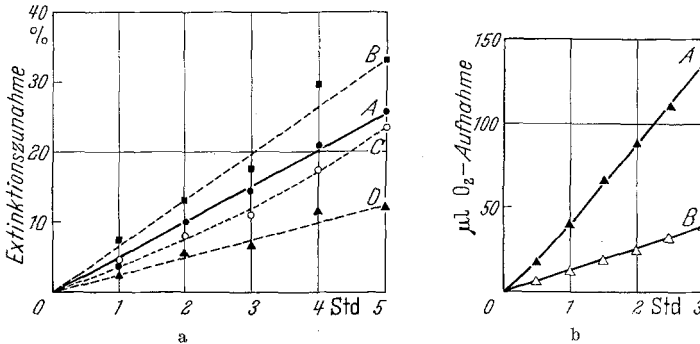


Abb. 9a und b. Einbau und Oxydation von BTS (Stamm H 16). Die Suspensionen wurden nach chemolithotrophem Wachstum geerntet, zweimal in Puffer (pH 7) gewaschen und darin aufgenommen. Der Einbauversuch (Abb. 9) wurde nach der Methode 4 angesetzt. Jeder Kolben enthielt 50 ml Suspension.

Gasatmosphäre	Zeichen
A 80% $H_2 + 10\% O_2 + 10\% CO_2$	—●—●—
B 80% $H_2 + 10\% O_2 + 10\% CO_2$	—■—■—
C 80% $H_2 + 10\% O_2 + 10\% N_2$	—○—○—
D Luft	—▲—▲—
	2 ml 5%ige organische Säure
	2 ml 5%ige organische Säure
	2 ml 5%ige organische Säure

Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit (Abb. 9a) wurde in jedes Warburggefäß 2,5 ml Suspension sowie 0,2 ml 20%ige KOH für den Zentralzylinder einpipettiert. Als Substrat wurde 0,12 ml 5%iger organischer Säure in den Seitenarm gegeben. Endvolumen 3,00 ml. A Substratatmung ▲—▲—▲; B endogene Atmung △—△—△

wieder. In Tab. 5 sind die Ergebnisse der Einbauversuche mit organischen Säuren zusammengestellt.

Unter Luft werden die einzelnen Säuren mit verschiedener Geschwindigkeit eingebaut. Am schnellsten läuft die PHBS-Synthese mit HBS, MiS und ES ab. Demgegenüber erfolgt mit ÄS, Glycerin und Glykolsäure keine Extinktionszunahme; mit Isobuttersäure und Propionsäure steigt sie nur ganz schwach an. Crotonsäure, Buttersäure, BSS und BTS werden mit mittleren Geschwindigkeiten zu PHBS umgesetzt.

In Anbetracht der hohen Geschwindigkeit, mit der HBS zum Polymeren umgesetzt wird, erscheint die Geschwindigkeit der  $O_2$ -Aufnahme recht gering (Tab. 5). Diese hohe Einbaurrate bei geringer Oxydationsleistung läßt sich damit erklären, daß zur Polymerisation von HBS wesentlich weniger Energie notwendig ist als zu der mehrere Schritte umfassenden Synthese von PHBS aus den anderen organischen Säuren. Von einer geringen  $O_2$ -Aufnahme ist auch der Einbau von BTS begleitet. Die Assimilation von BSS, die ungefähr mit der gleichen Geschwindigkeit verläuft, scheint zwei- bis dreimal so viel Oxydationsenergie zu



erfordern. Dem Einbau von MiS läuft ein sehr hoher  $O_2$ -Verbrauch parallel. Auf Grund dieser Ergebnisse ist es erklärlich, daß der synthetische Wirkungsgrad für BTS relativ hoch, der für MiS auffallend niedrig war (vgl. Tab.3). Der synthetische Wirkungsgrad sagt also etwas über das Verhältnis von Oxydation zu Assimilation, d.h. über die Rentabilität des Einbaus, aber nichts über die Geschwindigkeit der Assimilation selbst aus. — Die synthetischen Wirkungsgrade bei  $pH$  7 sind übrigens

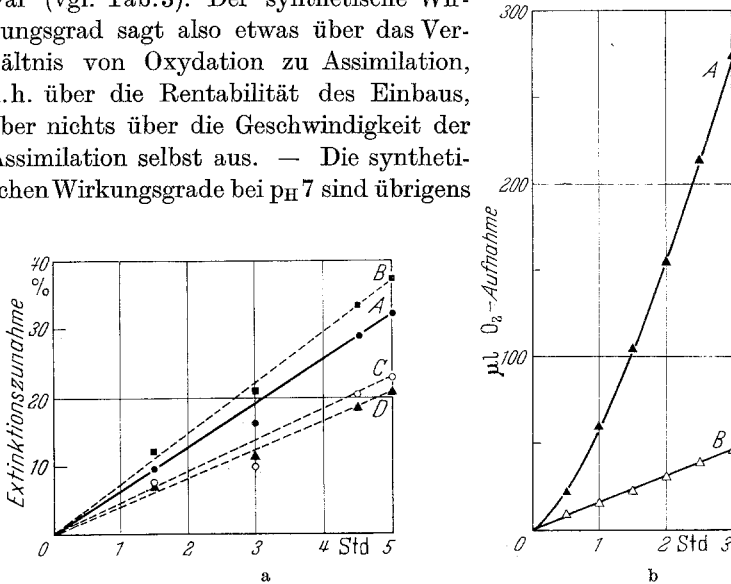


Abb.10a und b. Einbau und Oxydation von BSS. Bedingungen wie bei Abb.9a und b

Tabelle 5. Einbau- und Oxydationsgeschwindigkeiten der getesteten Substrate

Substrate	Extinktionszunahme nach 5 Std unter Luft*	Substratoxydation Leeratmung
Brenztraubensäure	58,4%	2,9
Bernsteinsäure	65,3%	6,4
Äpfelsäure	keine Zunahme	2,9
Hydroxybuttersäure	260,0%	5,0
Essigsäure	79,8%	7,1
Milchsäure	111,4%	12,1
Glycerin	keine Zunahme	0,7
Glykolsäure	keine Zunahme	1,0
Buttersäure	69,8%	3,2
Isobuttersäure	3,8%	1,7
Crotonsäure	70,6%	4,8
Propionsäure	15,2	4,3

\* Bezogen auf chemolithotrophe Speicherung (100%). Bedingungen wie bei Abb.9a—10b.

größer als die bei  $pH$  6. Für ES und MiS wurden im neutralen Bereich Werte von 1,22 und 1,59 gefunden, die einem Einbau von 55% bzw. 61% entsprachen. Wie bereits erwähnt wurde, beruhen diese Unterschiede auf einer Verzögerung des Assimilationsprozesses im sauren  $pH$ -Bereich.

Der Einbau der organischen Säuren unter den verschiedenen Gasatmosphären verlief nicht bei allen Substraten gleichartig. Lediglich mit BTS und BSS als Substraten wurde die Einbaugeschwindigkeit in Gegenwart von Knallgas als zusätzlicher Energiequelle beschleunigt. Eine weitere Steigerung der Geschwindigkeit der PHBS-Synthese wurde durch zusätzliche Verabreichungen von Kohlendioxyd bewirkt. Mit BTS

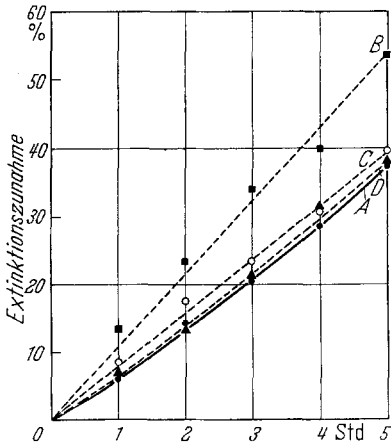


Abb. 11

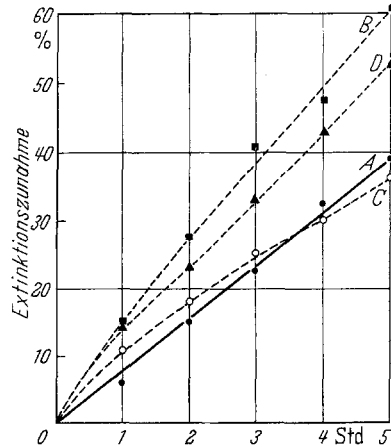


Abb. 12

Abb. 11. Einbau von *MiS*. Bedingungen wie bei Abb. 9 a und 10 a. Veränderte Gasatmosphären: A 70%  $H_2$  + 20%  $O_2$  + 10%  $CO_2$ ; B 70%  $H_2$  + 20%  $O_2$  + 10%  $CO_2$ ; C 70%  $H_2$  + 20%  $O_2$  + 10%  $N_2$ ; D Luft

Abb. 12. Einbau von *HBS*. Bedingungen wie bei Abb. 11

und BSS scheint also die Synthese von PHBS aus den organischen Substraten und aus  $CO_2$  nebeneinander herzulaufen.

ÄS wird unter Luft überhaupt nicht eingebaut; unter  $H_2 + O_2$  kommt es zu einer signifikanten Extinktionszunahme. Möglicherweise beruht diese auf einer Fixierung des durch Oxydation frei gewordenen Kohlendioxyds.

Der Einbau der am schnellsten zur PHBS-Synthese führenden Substrate HBS, *MiS* und ES unterscheidet sich von den obengenannten Substraten weitgehend. Bei diesen Substraten erfolgte die PHBS-Synthese unter Luft rascher als unter  $H_2 + O_2$ . Der Einbau von ES verlief unter  $H_2 + O_2 + CO_2$  sogar langsamer als unter Luft.

Die Einbauversuche mit HBS, ES und *MiS* wurden unter Verwendung von Gasgemischen wiederholt, in dem der  $O_2$ -Gehalt dem der Luft entsprach (20%  $O_2$ ; Abb. 11–13). Bei Gleichheit des  $O_2$ -Partialdrucks in den Gefäßen mit Luft und Knallgas war die Rate der PHBS-Synthese aus *MiS* in allen Fällen unter  $H_2 + O_2$  größer als unter Luft, wenn auch nur um wenige Prozente. HBS und ES wurden aber auch bei aneinander

angeglichenen  $O_2$ -Konzentrationen unter Luft rascher als unter Knallgas zu PHBS aufgebaut. Für HBS als Substrat ist diese Erscheinung bereits mitgeteilt worden (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961). Auch unter  $H_2 + O_2 + CO_2$  verläuft die PHBS-Synthese mit ES als Substrat langsamer als unter Luft.

Die Deutung dieser gut reproduzierbaren Befunde bereitet beträchtliche Schwierigkeiten und verführt zu ad hoc-Hypothesen. Es ist zu vermuten, daß die Enzyme zur Aufnahme in die Zelle (Permease) bzw. zur Aktivierung der ES (Thiokinase) erst während des Umsatzes von ES gebildet werden; nach den Befunden erfolgt diese induzierte Enzyymbildung am schnellsten unter Luft. In Gegenwart von Wasserstoff war in keinem Fall eine Beschleunigung der PHBS-Synthese im Laufe der Versuchszeit festzustellen. Besonders merkwürdig erscheint der Befund, daß selbst die PHBS-Synthese

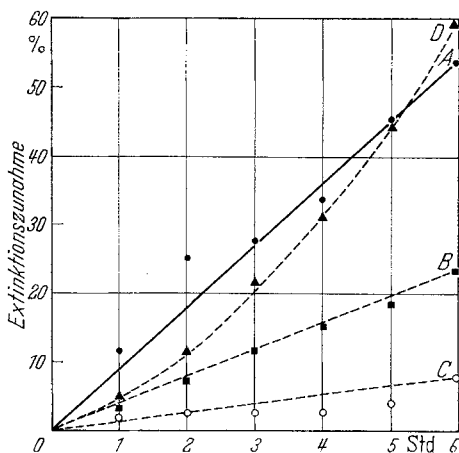


Abb. 13. Einbau von ES. Bedingungen wie bei Abb. 11

unter chemolithotrophen Bedingungen (unter  $H_2 + O_2 + CO_2$ ) in Gegenwart von ES verlangsamt abläuft. ES scheint demnach die Synthesefähigkeit der Zellen schwerwiegend zu beeinträchtigen.

Sowohl im Falle der HBS als auch der ES als Substrat ist an die Möglichkeit zu denken, daß ein Mangel an Kohlendioxyd die Synthese von Acetacetyl-CoA und PHBS erschwert. Daß  $CO_2$  zur Synthese von Acetacetyl-CoA notwendig ist, haben Untersuchungen an tierischen Enzymsystemen gezeigt (WAKIL, TITSCHNER u. GIBSON 1959). Ob zur Polymerisation von HBS über  $\beta$ -Hydroxybutyryl-CoA ebenfalls eine durch  $CO_2$  katalysierte Aktivierung beteiligt ist — unter Umständen mit Hydroxyäthyl-malonyl-CoA als Intermediärprodukt —, bleibt zu prüfen.

Die Extinktionskurven, welche die PHBS-Bildung mit ES als Substrat unter Luft wiedergeben, zeigen eine starke Aufkrümmung (vgl. Abb. 13). Ein ähnliches Bild gab der Einbauversuch mit Crotonsäure als Substrat. Die Geschwindigkeiten der PHBS-Synthese nahmen im Laufe des Versuchs bedeutend zu. Die zum Einbau notwendigen Enzyme wurden also erst durch Induktionswirkung des Substrats in größerem Umfang gebildet.

Im Zusammenhang mit den oben geschilderten Versuchen erschien es von Interesse, die PHBS-Synthese an Zellen zu verfolgen, welche mit ES

vorinkubiert worden waren. Die Suspension wurde deshalb in den letzten 13 Std ihres Wachstums mit 0,2% ES (pH 7) versehen und dann in der üblichen Weise geerntet und im Versuch getestet. Das Ergebnis zeigt Abb. 14a und b. Schon zu Beginn des Versuchs verläuft der Einbau unter Luft mit hoher, konstant bleibender Geschwindigkeit. Setzt man die Extinktionszunahme der Kontrolle gleich 100%, so errechnet sich für den Einbau von ES nach 3 Std ein Wert von 224%, der fast den von HBS (260%) erreicht. Da auch die Oxydations-

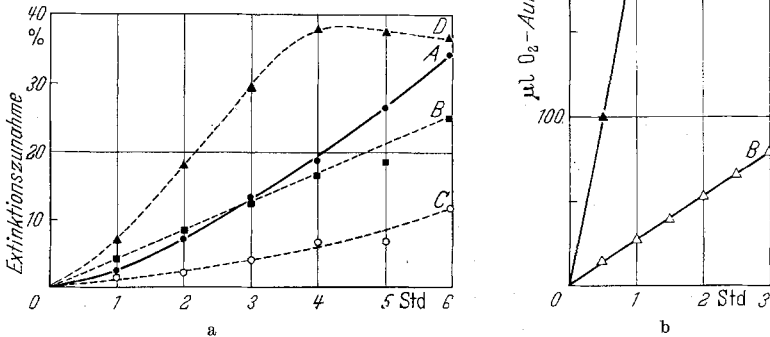


Abb. 14a und b. Einbau und Oxydation von ES durch eine mit ES vorinkubierte Suspension. Die Suspension wurde 42 Std in Minerallösung unter Knallgasatmosphäre herangezogen. 13 Std vor der Ernte wurden zu 1000 ml Minerallösung 40 ml einer 5%igen ES-Lösung zugesetzt. Die Suspension wurde zweimal in Puffer (pH 7) gewaschen und darin aufgeschwemmt (Extinktion 3,2). Versuchsanordnung und Symbole wie bei Abb. 9a–10b

geschwindigkeit gesteigert ist, ist das Substrat bereits nach 4 Std verbraucht. Das Verhältnis von Substratoxydation zu endogener Atmung beträgt hier 8,3 gegenüber 7,1 bei den Zellen, welche nicht an ES angepaßt worden waren.

Auch in diesem Versuch kommt die gegenseitige Beeinflussung von organotrophem und chemolithotrophem Stoffwechsel zum Ausdruck. Die PHBS-Bildung läuft unter Knallgas erheblich langsamer ab als unter Luft. Umgekehrt wird die PHBS-Synthese aus  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  durch ES gehemmt.

#### E. Einfluß organischer Substrate auf die autotrophe $\text{CO}_2$ -Fixierung

Die letzten Versuche hatten gezeigt, daß gewaschene Suspensionen von *Hydrogenomonas* sowohl aus den gasförmigen Komponenten  $\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{CO}_2$  als auch mit organischen Säuren als Substraten PHBS aufzubauen vermögen. Wurden durch geeignete Bedingungen beide Reaktionen ermöglicht, so beeinflussten sich die Reaktionen gegenseitig

mehr oder weniger ausgeprägt. Bei den meisten Säuren stieg die Extinktion unter einer Atmosphäre von  $H_2 + O_2 + CO_2$  rascher an als unter Luft; mit ES als Substrat war ein umgekehrter Effekt zu beobachten. Auf Grund der vorangehenden Untersuchungen war anzunehmen, daß die  $CO_2$ -Fixierung mit dem Einbau organischer Säuren simultan abläuft. Ob und in welchem Maße die Rate der  $CO_2$ -Fixierung durch die verschiedenen organischen Säuren beeinflusst wird, sollten Versuche unter Verwendung von radioaktivem Kohlendioxyd klären.

### I. Höhe der $CO_2$ -Fixierung in Gegenwart verschiedener organischer Säuren und Glycerin bei chemolithotroph gewachsenen Zellen

Es wurde die Geschwindigkeit des  $CO_2$ -Einbaus durch chemolithotroph gewachsene Zellen unter Knallgasatmosphäre in Gegenwart von

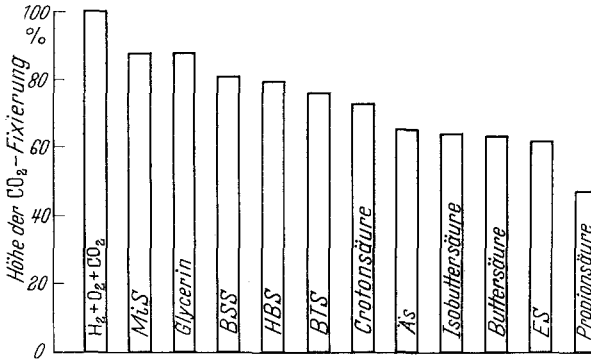


Abb. 15. Höhe der  $CO_2$ -Fixierung in Gegenwart verschiedener organischer Substrate. Chemolithotroph herangezogene, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntete Suspensionen wurden zweimal in  $CO_2$ -freiem Puffer (pH 7) gewaschen, darin aufgenommen und auf  $E = 0,4$  eingestellt. Versuchsapparat unter Methodik (4); jedes Gefäß wurde mit 25 ml Suspension und 1 ml 5%igem neutralem  $CO_2$ -freiem Substrat, das Kontrollgefäß mit 1 ml  $CO_2$ -freiem dest. Wasser versehen. Gasatmosphäre: 80%  $H_2 + 10\% O_2 + 10\% N_2$  ( $CO_2$ -frei). Nach 45 min wurden in alle Kolben je 1 ml 0,1 n NaOH  $^{14}CO_2$ -Lösung (1000 Imp/ $\mu$ Mol) injiziert; stündlich wurden 2 ml Suspension entnommen

jeweils einem von elf verschiedenen organischen Substraten gemessen. Aus technischen Gründen konnten in jedem Versuch nur wenige Säuren getestet werden; daher wurde bei jedem Versuch die reine autotrophe  $CO_2$ -Fixierung (in Abwesenheit eines organischen Substrats) gemessen; die in Gegenwart der organischen Substrate bestimmten  $CO_2$ -Fixationsraten wurden auf diesen Wert, der willkürlich gleich 100% gesetzt wurde, bezogen. In Abb. 15 sind die auf die autotrophe Kontrolle bezogenen Fixierungsleistungen dargestellt.

Alle getesteten organischen Substrate, sogar einschließlich derer, welche unter Luft nicht zu PHBS synthetisiert wurden, verringern die Geschwindigkeit der  $CO_2$ -Fixierung. Die am meisten ausgeprägte Hemmung der  $CO_2$ -Fixierung wäre in Gegenwart der am besten zur Synthese

geeigneten Säuren HBS, MiS und ES zu erwarten gewesen, weil gerade diese Säuren mit der autotrophen  $\text{CO}_2$ -Fixierung in Konkurrenz treten sollten. Aber gerade in Gegenwart von Milchsäure wurde die  $\text{CO}_2$ -Fixierung am wenigsten beeinflusst. Auch HBS zeigte nicht den erwarteten Effekt. Propionsäure, welche nur äußerst langsam eingebaut wird, hemmt die  $\text{CO}_2$ -Fixierung am stärksten, nämlich um 55%. Eine Deutung des beobachteten Verhaltens und eine Korrelation zu den Einbauversuchen ist nicht möglich.

## II. $\text{CO}_2$ -Fixierung in Gegenwart von Essigsäure durch Zellen, die mit Essigsäure vorinkubiert und nicht vorinkubiert waren

Aus Abb. 13 ist zu ersehen, daß die Rate der PHBS-Synthese mit ES als Substrat rasch ansteigt; die Aufkrümmung der Kurven deutet darauf hin, daß die zur Aufnahme und Aktivierung von ES notwendigen Enzyme im Laufe der Versuchsdauer induktiv gebildet werden. Mit ES

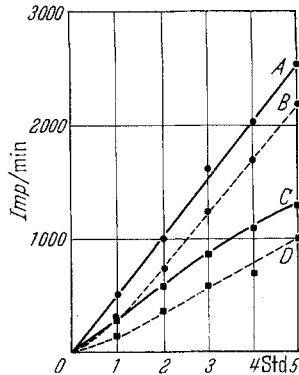


Abb. 16.  $\text{CO}_2$ -Fixierung in Gegenwart von Essigsäure durch Zellen, die mit Essigsäure vorinkubiert und nicht vorinkubiert waren. Zellen, welche 10 Std chemolithotroph gewachsen waren und den Extinktionswert 0,4 erreicht hatten, wurden abzentrifugiert, gewaschen, in der gleichen Menge sterilen Puffers ( $\text{pH}$  7) wieder aufgenommen und auf zwei Kolben verteilt. Kolben 1 wurde mit 0,2% ES, Kolben 2 mit der gleichen Menge dest. Wassers versehen. Beide Kolben wurden unter 80%  $\text{H}_2$  + 10%  $\text{O}_2$  + 10%  $\text{CO}_2$  12 Std bei 28°C geführt. Beide Suspensionen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in der gleichen Menge  $\text{CO}_2$ -freien Puffers ( $\text{pH}$  7) aufgenommen. Die Suspensionen hatten gleichen Proteingehalt, obwohl sie sich in den Extinktionswerten (auf Grund der verschiedenartigen Speicherung) unterschieden.

Versuchsapparatur wie Abb. 15. Die Gefäße wurden mit 25 ml Suspension gefüllt. Substrat: 0,2% ES ( $\text{CO}_2$ -frei). Gasgemisch: 80%  $\text{H}_2$  + 10%  $\text{O}_2$  + 10%  $\text{N}_2$ . Nach 45 min wurden je Kolben 1 ml 0,1 n  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ -Lösung (1000 Imp/ $\mu\text{Mol}$ ) injiziert. Stündlich wurden je 2 ml Suspension entnommen.

Ansatz:	Zellsuspension	Zusatz	Zeichen
A	—	—	●—●
B	mit ES vorinkubiert	—	○---○
C	—	0,2% ES	■—■
D	mit ES vorinkubiert	0,2% ES	■---■

vorinkubierte Zellen sollten daher in der Lage sein, PHBS mit einer hohen Geschwindigkeit aus ES aufzubauen.

In den folgenden Versuchen sollte die Vorstellung überprüft werden, daß zwischen der Synthese von PHBS aus dem organischen Substrat und

aus Kohlendioxyd eine Konkurrenzbeziehung besteht. Die  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch Zellen, die an ES adaptiert waren und ES sehr rasch einzubauen vermögen, sollte also durch zusätzlich verabreichte ES stärker unterdrückt werden als die  $\text{CO}_2$ -Fixierung von nicht adaptierten Zellen.

Eine chemolithotroph herangezogene Zellsuspension wurde geteilt: die eine wurde ohne Zusatz, die andere mit 0,2% ES 12 Std lang unter  $\text{CO}_2$ -haltigem Knallgas inkubiert. Beide Suspensionen wurden gewaschen und je eine Probe mit und eine Probe ohne ES unter  $^{14}\text{C}$  enthaltendem Knallgas geschüttelt.

Wie aus Abb. 16 zu ersehen ist, wird die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Fixierung durch ES in beiden Fällen herabgesetzt. ES hemmt die  $\text{CO}_2$ -Fixierung sowohl bei den adaptierten (um 54%) als auch bei den nicht-adaptierten Zellen (um 49%). Dieser Befund entspricht nicht der Annahme, daß ES und  $\text{CO}_2$  um die Verwertung zur Synthese von PHBS konkurrieren, sondern deutet auf eine mehr direkte Beziehung. In erster Linie dürfte an eine Beeinflussung der Permeationsfähigkeit zu denken sein. Inwieweit sich Anionen bei der Stoffaufnahme in die Zelle gegenseitig beeinflussen, ist noch recht unklar. Die Verhältnisse liegen von Substrat zu Substrat verschieden. Über ausgeprägte Unterschiede bei der Aufnahme von Lysin und Glutaminsäure durch Streptokokken berichtet GALE (1947).

### Diskussion

Die meisten der bisher an Knallgasbakterien erhaltenen Ergebnisse sind an nicht genügend homogenem Material gewonnen worden.

Für viele Untersuchungen wurden Knallgasbakterien auf der Agaroberfläche herangezogen, gewaschen und durch Homogenisieren in Suspension gebracht. Erst durch die Einführung der Schüttelkultur (BERGMANN, TOWNE u. BURRIS 1958; LINDAY u. SYRETT 1958) und der Heranzucht im geschlossenen Gaskreislauf (WILSON, STOUT, POWELSON u. KOFFLER 1953; COHEN u. BURRIS 1955; BERGMANN, TOWNE u. BURRIS 1958) wurden optimale Wachstumsbedingungen geschaffen. Diesen Kulturverfahren noch anhaftende Schwierigkeiten wurden durch ein Submersrührverfahren überwunden (SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK 1961).

Für die Kultur auf Agar war es gleichgültig, ob der Organismus in Flüssigkeitskultur in Form eines Häutchens oder als homogene Suspension wuchs. Da bei Submerskultur die Bildung von Flocken möglichst unterbleiben soll, wurde versucht, neue Stämme zu isolieren, die weder in Ruhekultur noch in bewegten Nährlösungen Zellkonglomerate bildeten. Auf die Anreicherung von „Häutchen“- und „Suspensionsbildner“-gerichtete Versuche hatten die Isolierung beider „Wuchsformen“ zum Erfolg. Wie sich in Wachstumsversuchen mit beiden Typen herausstellte, handelt es sich um ein weitgehend konstantes Merkmal. Suspensionsbildner wachsen sowohl in bewegter Kultur als auch in Ruhekultur in Form einer homogenen Suspension, während Häutchenbildner in Ruhekultur Kahmhäute, in Schüttelkultur meistens Flocken bilden.

Auf den schädigenden Einfluß höherer  $O_2$ -Partialdrücke auf das Wachstum von *Hydrogenomonas* wurde man überall dort aufmerksam, wo mit dünnen Suspensionen, geringen Impfmengen oder auf Agaroberflächen gearbeitet wurde (LASCELLES u. STILL 1946; SCHATZ u. BOVELL 1952; SCHLEGEL 1953; PACKER u. VISHNIAC 1955; ATKINSON 1956 IV). Steht der  $O_2$ -Partialdruck in der Gasphase mit dem in der Flüssigkeitsphase im Gleichgewicht und ist der  $O_2$ -Konsum der suspendierten Organismen gering, so wirken schon  $O_2$ -Konzentrationen von mehr als 5% wachstumshemmend. Wird der Sauerstoff durch die Organismen aber rascher aufgenommen, als er aus der Gasphase nachdiffundieren kann, so werden viel höhere  $O_2$ -Partialdrücke vertragen; durch sie wird die Vermehrungsrate der Zellen sogar bedeutend gesteigert. Zur Einsicht in diese Zusammenhänge haben die vorliegenden Untersuchungen geführt. Die Annahme erscheint begründet, daß die Zellen bei zahlreichen Untersuchungen, die unter „aeroben“ Bedingungen durchgeführt wurden, unter  $O_2$ -Mangel litten. Während man bei manometrischen Messungen in der Warburgapparatur seit jeher darauf bedacht war, die Zellkonzentration in den Grenzen zu halten, in denen Zelldichte und Gaswechsel einander proportional waren, haben entsprechende Überlegungen in der Wachstumsphysiologie wenig Berücksichtigung gefunden. Einander widersprechende Angaben über den Einfluß des  $O_2$ -Partialdruckes auf Stoffwechselprozesse wie Nitratreduktion, Denitrifikation, Milchsäuregärung und andere können auf das Ungleichgewicht der  $O_2$ -Partialdrücke in Gas- und Flüssigkeitsphase zurückgeführt werden.

Methylenblau ist bereits zu mehreren Untersuchungen über den  $H_2$ -Stoffwechsel als H-Acceptor herangezogen worden (SCHLEGEL 1953; PACKER u. VISHNIAC 1955); in vielen Fällen dient es als H-Acceptor zur Bestimmung der Hydrogenase zellfreier Präparate und intakter Zellen (STEPHENSON u. STICKLAND 1933; LASCELLES u. STILL 1946; ATKINSON u. McFADDEN 1954; SADANA u. JAGANNATHAN 1956). Aus den hier vorgelegten Versuchen geht hervor, daß mit Methylenblau als H-Acceptor die maximale Hydrogenaseaktivität der Zellen erfaßt wird. Die Geschwindigkeit der  $H_2$ -Aufnahme war etwa dreimal so groß wie beim aeroben Knallgasumsatz (bei Ausschluß von Kohlendioxyd) und etwa gleich der beim aeroben Knallgasumsatz in Gegenwart von Kohlendioxyd gemessenen. Dieser Befund bestätigt die Versuche BARTHAS (1962) in schöner Weise: Die  $H_2$ -Oxydation wird durch  $CO_2$  etwa auf das Drei- bis Vierfache gegenüber der  $CO_2$ -freien Kontrolle beschleunigt; unter den Bedingungen des  $CO_2$ -haltigen Ansatzes scheint die Hydrogenase voll ausgelastet zu sein; bei Verhinderung synthetischer Leistungen durch  $CO_2$ -Entziehung wird die  $H_2$ -Oxydation gehemmt. Durch Methylenblau werden die mit dem Adenosinphosphatcyclus verbundenen Schritte der Elektronentransportkette überbrückt, bzw. entkoppelt, und es kommt



zur maximalen  $H_2$ -Oxydationsrate auch bei Abwesenheit von  $CO_2$ . Es ist noch nicht sicher, ob man Methylenblau als entkoppelndes Agens anzusehen hat (SCHLEGEL u. BARTHA 1961).

Die Befunde vorangegangener Untersuchungen entsprechen sich insofern, als bei chemolithotroph gewachsenen Knallgasbakterien die Aktivität der Dehydrogenasen erhalten bleibt, wenn auch eine nennenswerte Steigerung der Aktivität durch die Induktion durch das Substrat zustande kommt. Für einzelne Substrate liegen aber sogar für ein- und denselben Stamm widersprechende Befunde vor. Nach SCHATZ u. BOVELL (1952) oxydieren autotroph gewachsene Zellen von *Hydrogenomonas facilis* Glucose; ATKINSON (1955) konnte diese Beobachtung ebensowenig bestätigen wie andere Autoren. Auch meine Stämme waren durchweg unfähig, auf Zuckern zu wachsen oder sie zu oxydieren. Andererseits ist von *Pseudomonas saccharophila*, einem Organismus der als Knallgasbakterium isoliert worden ist, die Befähigung zur Verwertung von Zuckern bekannt (DOUDOROFF 1942).

Die Frage, ob  $H_2$  und organische Substrate durch chemolithotroph gewachsene Zellen gemeinsam oxydiert werden können, ist mehrfach positiv beantwortet worden (KLUYVER u. MANTEN 1942; WILSON, STOUT, POWELSON u. KOFFLER 1953; SCHLEGEL 1954a). Mit diesen älteren Beobachtungen stehen die vorgelegten Befunde im großen und ganzen im Einklang. Milchsäure wird mit dem höchsten  $Q_{O_2}$  oxydiert.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen stand die Synthese von PHBS und die Eignung verschiedener organischer Säuren als Substrate der oxydativen Assimilation. Die Ergebnisse entsprechen insofern den Erwartungen, als die monomere  $\beta$ -Hydroxybuttersäure mit besonders hoher Geschwindigkeit eingebaut wird (Tab. 5). In weitem Abstand folgen Milchsäure, Essigsäure und die übrigen organischen Säuren. Nur bei wenigen Säuren, insbesondere Essigsäure und Crotonsäure, nimmt die Syntheserate mit der Zeit auffallend zu.

Die Tatsache, daß die PHBS-Synthese durch eine gleichzeitig ablaufende  $H_2$ -Oxydation gefördert wird, erscheint plausibel. Mit den meisten Substraten ist die Syntheseleistung unter  $CO_2$ -haltigem Knallgas erheblich größer als unter Luft. Die Synthese von PHBS aus den organischen Substraten und aus  $CO_2 + H_2$  laufen also nebeneinander ab. Eine ausgesprochene Steigerung der Syntheserate durch  $CO_2$ -freies Knallgas war jedoch nicht zu beobachten. Bei der oxydativen Assimilation organischer Substrate scheint demnach zwangsläufig genügend Energie zur Synthese von PHBS freizuwerden, so daß durch eine parallel laufende  $H_2$ -Oxydation keine Steigerung möglich ist.

Im Augenblick unverstündlich erscheint der Befund, daß die PHBS-Syntheserate mit Essigsäure als Substrat durch  $H_2$  herabgesetzt wird. Für  $\beta$ -Hydroxybuttersäure ist der Effekt nicht so stark ausgeprägt und

wurde bereits mitgeteilt (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961). Sowohl an Essigsäure (durch Vorinkubation) angepaßte als auch nicht adaptierte Zellen sprechen auf  $H_2$  mit einer Depression an. Umgekehrt wird auch die PHBS-Synthese unter chemolithotrophen Bedingungen ( $H_2 + O_2 + CO_2$ ) durch Essigsäure herabgesetzt. Im Falle der Essigsäure ist die gegenseitige Beeinflussung von Syntheseprozessen aus  $CO_2$  und organischem Substrat besonders ausgeprägt. Da Essigsäure auch dem Speicherprodukt PHBS besonders nahesteht, verdienen die genannten Interferenzphänomene eine neue eingehende Untersuchung.

Aus den Versuchen über die Beeinflussung der chemolithotrophen  $CO_2$ -Fixierung durch organische Säuren ist der Schluß zu ziehen, daß dieser Vorgang durch organische Substrate nicht beschleunigt, wohl aber gehemmt werden kann. Inwieweit Konkurrenzbeziehungen vorliegen, ist nicht geprüft worden. Im Durchschnitt scheint der chemosynthetische Stoffwechsel durch organische Substrate weniger beeinträchtigt zu werden als die Verwertung organischer Substrate durch die  $H_2$ -Oxydation.

### Zusammenfassung

1. Aus Erd- und Schlammproben wurden zehn fakultativ chemolithotroph wachsende *Hydrogenomonas*-Stämme angereichert und isoliert.

2. Bei chemolithotroph wachsenden Zellen nimmt das Zellgewicht während der exponentiellen Wachstumsphase fortlaufend ab. Bei Rührung der Nährlösung mit 650 U/min erfolgt die Zellvermehrung unter einer Atmosphäre von 65%  $H_2 + 5\% CO_2 + 30\% O_2$  von  $4 \cdot 10^7$  bis  $2 \cdot 10^9$  Zellen/ml exponentiell. Während die Zellzahl in der stationären Phase annähernd konstant bleibt, nimmt die Trübung der Suspension infolge Speicherstoffsynthese (Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure) weiterhin zu.

3. Die Geschwindigkeit der  $H_2$ -Aufnahme durch gewaschene, chemolithotroph herangezogene Zellen ist in Abwesenheit von Kohlendioxyd mit Methylenblau als H-Acceptor etwa dreimal so hoch wie mit Sauerstoff. Unter einem Gemisch von  $H_2 + O_2$  erhöht  $CO_2$  die Rate der  $H_2$ -Oxydation ebenfalls auf das Dreifache der  $CO_2$ -freien Kontrolle. Unter denselben Bedingungen steigern zugesetzte organische Säuren (Brenztraubensäure,  $\beta$ -Hydroxybuttersäure) die Rate der  $H_2$ -Aufnahme maximal um nur 30%.

4. Gewaschene, chemolithotroph gewachsene Zellen assimilieren organische Substrate oxydativ und bauen Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure auf; die Syntheserate ist mit Hydroxybuttersäure, Milchsäure und Essigsäure am höchsten. Während die Syntheserate bei den meisten organischen Substraten durch gleichzeitige  $H_2$ -Oxydation gesteigert wird, wird die Synthese aus Essigsäure und Hydroxybuttersäure durch  $H_2$  gehemmt. In Gegenwart organischer Säuren verläuft die autotrophe  $CO_2$ -Fixierung langsamer als ohne organische Substrate.

Herrn Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL danke ich für seine Anleitung und mannigfache Hilfe.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützten Forschungsprogramms durchgeführt.

### Literatur

- ATKINSON, D. E.: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. II. The adaptive oxydation of organic substrates. *J. Bact.* **69**, 310—315 (1955).
- ATKINSON, D. E.: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. IV. The inhibition of hydrogenase by oxygen. *J. biol. Chem.* **218**, 557—564 (1956).
- ATKINSON, D. E., and B. A. MCFADDEN: The biochemistry of *Hydrogenomonas*. I. The hydrogenase of *Hydrogenomonas facilis* in cell-free preparations. *J. biol. Chem.* **210**, 885—893 (1954).
- BARTHA, R.: Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter *Hydrogenomonas*-Stämme. *Arch. Mikrobiol.* **41**, 313—350 (1962).
- BELJAJEWA, M. J.: On chemosynthesis in hydrogen bacteria. *Mikrobiologija* **27**, 547—555 (1960).
- BERGMAN, F. H., J. C. TOWNE and R. H. BURRIS: Assimilation of carbon dioxide by hydrogen bacteria. *J. biol. Chem.* **230**, 13—24 (1958).
- COHEN, J. S., and R. H. BURRIS: A method for the culture of hydrogen bacteria. *J. Bact.* **69**, 316—319 (1955).
- DOUDOROFF, M.: The oxydative assimilation of sugars and related substances by *Pseudomonas saccharophila* with a contribution to the problem of the direct respiration of di- and polysaccharides. *Enzymologia* **9**, 59—72 (1942).
- DOUDOROFF, M., and B. STANIER: Role of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature (Lond.)* **183**, 1440—1442 (1959).
- FORSYTH, W. G. C., A. C. HAYWARD and I. B. ROBERTS: Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in aerobic gram-negative bacteria. *Nature (Lond.)* **183**, 800—801 (1958).
- FRASER, D., and H. R. MAHLER: The effect of nucleases on the reproduction of T3 bacteriophage in protoplasts of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem.* **69**, 166—177 (1957).
- GALE, E. F.: The assimilation of certain aminoacids by bacteria. 1. The passage of certain amino-acids across the cell wall and their concentration in the internal environment of *Streptococcus faecalis*. *J. gen. Microbiol.* **1**, 53—76 (1947).
- HIRSCH, P.: Wasserstoffaktivierung und Chemoautotrophie bei Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* **39**, 360—373 (1961).
- KANAI, R., S. MIYACHI and A. TAKAMIYA: Knallgas-reaction linked fixation of labelled carbon dioxide in an autotrophic *Streptomyces*. *Nature (Lond.)* **188**, 873—875. (1960).
- KANDLER, O.: Über den synthetischen Wirkungsgrad in vitro kultivierter Embryonen, Wurzeln und Sprosse. *Z. Naturforsch.* **8b**, 109—117 (1953).
- KASERER, H.: Über die Oxydation des Wasserstoffs und des Methans durch Mikroorganismen. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **15**, 573—576 (1906).
- KASERER, H.: Die Oxydation des Wasserstoffs durch Mikroorganismen. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **16**, 681—696, 769—715 (1906).
- KISTNER, A.: Conditions determining the oxydation of carbon monoxide and of hydrogen by *Hydrogenomonas carboxydovorans*. *Proc. kon. ned. Akad. Wet.* **57**, 186—195 (1954).
- KLUYVER, A. J., and A. MANTEN: Some observations on the metabolism of bacteria oxidizing molecular hydrogen. *Antonie v. Leeuwenhoek* **8**, 71—86 (1942).

- LAMANNA, C., and M. F. MALLETTE: Basic bacteriology and its biological and chemical background. 2. Ed., p. 309—359. Baltimore: Williams & Wilkins Comp. 1959.
- LASCELLES, J., and J. L. STILL: Utilization of molecular hydrogen by bacteria. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. **24**, 37—48 (1946).
- LEBEDEFF, A. F.: Über die Assimilation des Kohlenstoffs bei wasserstoffoxydierenden Bakterien. Biochem. Z. **7**, 1 (1908).
- LEMOIGNE, M., B. DELAPORTE et M. CROSON: Contribution à l'étude botanique et biochimique des bactéries du genre *Bacillus*. Valeur du test des lipides  $\beta$ -hydroxybutyriques pour la caractérisation des espèces. Ann. Inst. Pasteur **70**, 224—233 (1944).
- LEMOIGNE, M., et H. GIRARD: Réserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez *Azotobacter chroococcum*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **217**, 557—558 (1943).
- LEWINE, H. B., and H. WOLOCHOW: Occurrence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Ps. pseudomallei*. J. Bact. **79**, 305—306 (1960).
- LINDAY, E. M., and P. J. SYRETT: The induced synthesis of hydrogenase by *Hydrogenomonas facilis*. J. gen. Microbiol. **19**, 223—227 (1958).
- MORRIS, M. B., and J. B. ROBERTS: A group of *Pseudomonas* able to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. Nature (Lond.) **183**, 1538—1539 (1959).
- NIKLEWSKI, B.: Ein Beitrag zur Kenntnis wasserstoffoxydierender Mikroorganismen. II. Zbl. Bakt., II. Abt. **20**, 469—473 (1908).
- NIKLEWSKI, B.: Über die Wasserstoffaktivierung durch Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der neuen Gattung *Hydrogenomonas agilis*. Zbl. Bakt., II. Abt. **40**, 430—433 (1914).
- PACKER, L., and W. VISHNIAC: Hydrogen metabolism in a *Hydrogenomonas* sp. Bact. Proc. 1954, 111.
- PACKER, L., and W. VISHNIAC: Chemosynthetic fixation of carbon dioxide and characteristics of hydrogenase in resting cell suspensions of *Hydrogenomonas ruhlandii* nov. spec. J. Bact. **70**, 216—223 (1955).
- PELCZAR, M. J.: Manual of Microbiological Methods, p. 140—168. New York: McGraw-Hill Comp. 1957.
- PELTIER, G. L., C. E. GEORGI and L. F. LINDGREN: Laboratory Manual for General Bacteriology. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons 1952.
- LA RIVIÈRE, J. W. M.: On the microbial metabolism of the tartaric acid isomers. Diss. Delft 1958.
- ROMANOVA, A. K., and N. G. DOMAN: Fixation products of labelled carbon dioxide in hydrogen bacteria in the course of chemosynthesis. Mikrobiologija **29**, 795—801 (1960).
- RUHLAND, W.: Aktivierung von Wasserstoff und CO<sub>2</sub>-Assimilation durch Bakterien. Ber. dtsh. bot. Ges. **40**, 180—184 (1922).
- RUHLAND, W.: Beiträge zur Physiologie der Knallgasbakterien. Jb. wiss. Biol. **63**, 321—389 (1924).
- SADANA, J. C., and A. V. JAGANNATHAN: Purification and properties of the hydrogenase of *Desulfotribrio desulfuricans*. Biochim. biophys. Acta **19**, 440—452 (1956).
- DE SAUSSURE, TH.: Mem. Soc. phys. et hist. nat. Genève **8**, 136 (1939).
- SCHATZ, A., and C. BOVELL: Growth and hydrogenase activity of a new bacterium *Hydrogenomonas facilis*. J. Bact. **63**, 87—93 (1952).
- SCHLEGEL, H. G.: Physiologische Untersuchungen an wasserstoffoxydierenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **18**, 362—390 (1953).
- SCHLEGEL, H. G.: Zur Frage der gleichzeitigen Oxydation von molekularem Wasserstoff und organischen Substraten durch Knallgasbakterien. Wiss. Z. Univ. Halle **4**, 95—98 (1954a).

- SCHLEGEL, H. G.: Untersuchungen über den Phosphatstoffwechsel der wasserstoffoxydierenden Bakterien. Arch. Mikrobiol. **21**, 127—155 (1954b).
- SCHLEGEL, H. G., u. R. BARTHA: „Leerlauf“-H<sub>2</sub>-Oxydation und „Rückkopplung“ bei Knallgasbakterien. Naturwissenschaften **10**, 414—415 (1961a).
- SCHLEGEL, H. G., u. R. BARTHA: Hemmungsanalytische Untersuchungen zum „Rückkopplungseffekt“ bei *Hydrogenomonas*. Z. Naturforsch. (im Druck) (1961b).
- SCHLEGEL, H. G., G. GOTTSCHALK and R. BARTHA: Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas-Bacteria (*Hydrogenomonas*). Nature (Lond.) **191**, 463—465 (1961).
- SCHLEGEL, H. G., H. KALTWASSER u. G. GOTTSCHALK: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **38**, 209—222 (1961).
- SCHLEGEL, H. G., u. R. LAFFERTY: Radioaktivitätsmessung an Einzellern auf Membranfiltern. Arch. Mikrobiol. **38**, 52—54 (1961).
- SMITHIES, W. R., N. E. GIBBONS and S. T. BAYLEY: The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. Canad. J. Microbiol. **1**, 605—613 (1955).
- STEPHENSON, M., and L. H. STICKLAND: Hydrogenase. III. The bacterial formation of methan by the reduction of one carbon compounds by molecular hydrogen. Biochem. J. **27**, 1517—1527 (1933).
- WAKIL, S. J., E. B. TITSCHENER and D. M. GIBSON: Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. VI. Spectrophotometric assay and stoichiometry of fatty acid synthesis. Biochim. biophys. Acta **34**, 227—233 (1959).
- WILSON, E., H. A. STOUT, D. POWELSON and H. KOFFLER: Comparative biochemistry of the hydrogen bacteria. J. Bact. **65**, 283—287 (1953).
- WITTENBERGER, C. L., and R. REPASKE: Studies on hydrogen oxidation in cell-free extracts of *Hydrogenomonas eutropha*. Biochim. biophys. Acta **47**, 542—552 (1961).

Dr. ERIKA WILDE, 34 Göttingen, von Ossietzky-Straße 1