

## Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16*

J. Pfitzner und H. G. Schlegel

Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH  
München in Göttingen

Eingegangen am 7. Februar 1973

### Denitrification in *Hydrogenomonas eutropha* Strain *H 16*

**Summary.** The hydrogen bacterium *Hydrogenomonas eutropha* (syn. *Alcaligenes eutrophus*) strain *H 16* is able to grow anaerobically with fructose and nitrate or nitrite, respectively. Autotrophic anaerobic growth under a gas atmosphere of hydrogen and carbon dioxide (90+10 vol-%) with nitrate as the sole hydrogen acceptor is minimal.

During anaerobic growth with nitrate as H-acceptor, two growth phases are distinguishable: During the first phase cell growth occurs with the reduction of nitrate to nitrite, which is accumulated; on the second phase nitrite is reduced with the formation of gaseous nitrogen.

Washed, anaerobically grown cells reduce nitrate and nitrite with the formation of N<sub>2</sub>. Stoichiometric experiments employing hydrogen or fructose as the hydrogen donors are consistent with the conclusion that nitrogen is the sole product of denitrification by these cells. This was confirmed by mass spectrometric analysis of the gas formed. Aerobically grown cells are able to reduce nitrate only to nitrite; when grown in the presence of ammonia, the reduction rate is very low.

The results indicate that strain *H 16* contains only one nitrate reductase. The formation of this enzyme system is not influenced by oxygen, however, is repressed by ammonia.

When employing a purified soluble fraction and particles, nitrite reductases were found in both fractions. The nitrite reductase system is formed only under anaerobic conditions.

**Zusammenfassung.** *Hydrogenomonas eutropha* (syn. *Alcaligenes eutrophus*) Stamm *H 16* wächst anaerob mit Fructose und Nitrat bzw. Nitrit. Autotroph-anaerobes Wachstum unter einer H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (90+10 Vol.-%) mit Nitrat als einzigem Wasserstoff-Acceptor ist minimal.

Während des anaeroben Wachstums mit Nitrat sind zwei Phasen zu unterscheiden. In der ersten Phase erfolgt die Zellvermehrung auf Kosten der Reduktion von Nitrat zu Nitrit; dieses wird angehäuft. In der zweiten Phase wird Nitrit unter Bildung von Stickstoff reduziert.

Gewaschene, anaerob gewachsene Zellen reduzieren Nitrat und Nitrit unter Bildung von N<sub>2</sub>. Stöchiometrische Experimente mit H<sub>2</sub> oder Fructose als H-Donatoren lassen darauf schließen, daß Stickstoff das einzige Produkt der Denitrifikation durch die Zellen ist. Diese Schlußfolgerung wurde durch eine massenspektrometrische Analyse des gebildeten Gases bestätigt. Aerob gewachsene Zellen reduzieren Nitrat nur zu Nitrit. In Gegenwart von Ammonium-Salz gewachsene Zellen reduzieren Nitrat mit sehr geringer Rate.

**Abkürzungen:** MB = Metylenblau; PMS = Phenazinmethosulfat.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Stamm *H 16* über nur eine Nitrat-reductase verfügt. Die Bildung des Enzyms ist durch Ammonium reprimierbar; O<sub>2</sub> ist ohne Einfluß. Die Nitritreductase fand sich sowohl in der löslichen Fraktion als auch in den gereinigten Partikeln lokalisiert. Das Nitritreductase-System wird nur unter anaeroben Bedingungen gebildet.

Die Fähigkeit, aufgrund einer Nitrat-Atmung anaerob zu wachsen, war unter den H<sub>2</sub>-Bakterien nur von *Micrococcus denitrificans* bekannt (Kluyver, 1953). Erst durch die taxonomischen Untersuchungen von Davis *et al.* (1970) wurde bekannt, daß auch Stämme von *Hydrogenomonas eutropha* (syn. *Alcaligenes eutrophus*) unter organotrophen Bedingungen anaerob in Gegenwart von Nitrat zu wachsen vermögen.

Die vorliegende Arbeit berichtet über das Wachstum von *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* unter anaeroben Bedingungen und über Gaswechsellmessungen an gewaschenen Zellen und Zellfraktionen.

### Material und Methoden

*Organismus.* Die Untersuchungen wurden mit *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* (ATCC 17699), synonym *Alcaligenes eutrophus* Stamm 337 (Davis *et al.*, 1970), durchgeführt.

*Wachstumsbedingungen.* Die Zellen wuchsen in einer Mineral-Nährlösung, der bei heterotropher Anzucht 5–10 g Fructose/l, bei autotropher Anzucht 0,5 g NaHCO<sub>3</sub>/l zugesetzt wurden. Die Bestandteile der Mineral-Nährlösung sind (Gramm/Liter): A. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 11,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8; KNO<sub>3</sub>, 3,0 (bzw. KNO<sub>2</sub>, 1,0; bzw. NH<sub>4</sub>Cl, 1,5); Schwermetall-Lösung nach Pfennig u. Lippert (1966), jedoch ohne Eisen und EDTA und unter Verwendung von nur 1,0 ml. B. Fe-NH<sub>4</sub>-Citrat, 0,005; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,2; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,015. A, B und die Kohlenstoff-Quelle wurden getrennt sterilisiert; pH der kompletten Nährlösung wurde auf 7,6 eingestellt. Bei autotropher Anzucht sinkt der pH durch CO<sub>2</sub>-Begasung auf 7,0–7,2. Die Zellen wuchsen in 6 l-Zweihalskolben mit 3 l Nährlösung unter magnetischer Rührung bei 30° C. Zur heterotroph-anaeroben Anzucht diente N<sub>2</sub>, zur autotroph-anaeroben ein Gemisch von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (90+10 Vol.-%) als Atmosphäre. Die Gase wurden durch Waschen mit KHCO<sub>3</sub>-Pyrogallol-Lösung von Sauerstoff befreit. Vor dem Beimpfen wurde die komplette Nährlösung im Kulturgefäß durch längeres Durchströmen mit N<sub>2</sub> anaerob gemacht. Parallel wurden Kontrollkulturen mit Ammonium statt Nitrat bzw. Nitrit angesetzt. In diesen war in keinem Fall Wachstum festzustellen. Heterotroph-aerobe Anzuchten erfolgten unter Belüftung, autotroph-aerobe in Gegenwart eines Gemisches von H<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (70+20+10 Vol.-%). Heterotroph-anaerobe Kulturen wurden z. T. auch in vollständig mit Nährlösung gefüllten Schraubdeckelflaschen angesetzt.

*Reinheitskontrolle.* Vor dem Abernten wurden Ausstriche auf Fructose- und Glucose-Mineralagarplatten (0,5% C-Quelle) gemacht, die nach zweitägiger aerober Bebrütung bei 30° C auf Wachstum und Einheitlichkeit des Koloniebildes hin geprüft wurden. *H. eutropha* wächst nicht mit Glucose.

*Zelldichte.* Als Maß für die Zelldichte diente die Suspensionstrübung bei 436 nm und 1 cm Schichtdicke im Zeiss-Spektralphotometer PM 4.

*Speicherstoffgehalt.* Zur Bestimmung des Gehalts an Speicherstoff (Poly-β-hydroxybuttersäure) wurden die Zellen abzentrifugiert, in 3 ml Na-Hypochlorit-

lösung (Javell'sche Lauge) resuspendiert und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert; dann wurde die Trübung bei 436 nm im Extinktionsbereich zwischen 0 und 0,1 ermittelt („Resttrübung“).

*Nitritbestimmung.* Nitrit wurde nach Nicholas u. Nason (1957) nachgewiesen. Als Testreagentien dienten: A. 330 mg Sulfanilsäure in 75 ml heißem bidest. Wasser gelöst, mit Eisessig auf 100 ml aufgefüllt und B. 500 mg Naphthylamin-1 in 125 ml Eisessig gelöst, mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Der Testansatz besteht aus 0,5 ml Probe, 0,5 ml Lösung A und 2,5 ml B. Der gebildete Azofarbstoff wird nach 10 min bei 546 nm gemessen. 20  $\mu$ mole Nitrit/Ansatz entsprechen einer Extinktion von 0,225. Nitrat, auch wenn es in der zehnfachen Konzentration des Nitrits vorliegt, stört nicht.

*Proteinbestimmung.* Die Proteinbestimmung wurde mit der von Schmidt *et al.* (1963) modifizierten Biuretmethode von La Rivière durchgeführt.

*Gewaschene Zellen und Zellfraktionen.* Die Zellen wurden gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase, im Falle des zweiphasischen Wachstums in der 2. Phase, geerntet. Durch zweimaliges Waschen mit 0,05 M Phosphat-Puffer pH 7,6 erhielt man ruhende Zellen, die sofort zum Einsatz kamen. Zur Herstellung der Zellfraktionen wurden die durch Ultraschallbehandlung (20 kHz, 1 min/2 ml Zellsuspension) gewonnenen Extrakte zunächst durch zweimalige Zentrifugation bei 4000 g (30 min) von größeren Zellfragmenten befreit. Das Überstehende (Rohextrakt) wurde durch einstündige Zentrifugation bei 120000 g in eine gelbliche (lösliche) Fraktion und ein Sediment (die Partikeln) aufgetrennt. Die Partikeln wurden in 0,05 M Phosphat-Puffer pH 7,6 resuspendiert. Ein zweiter Zentrifugationsgang bei 120000 g lieferte die „partikelfreie“ lösliche Fraktion und die gewaschenen Partikeln, an denen die Nitrat- und Nitritreduktion geprüft wurden.

*Manometrische Messungen.* Die Reduktion von Nitrat und Nitrit in Gegenwart von gewaschenen Zellen bzw. von Zellfraktionen wurde manometrisch bei 30° C verfolgt (Rund-Warburg-Apparatur der Fa. Braun, Melsungen; 140 Hin- und Hergänge pro Minute, Amplitude: 4 cm).

Mit ganzen Zellen wurde geprüft: A. Die Nitrat- und Nitritreduktion mit  $H_2$ . Das Reaktionsgemisch enthielt in 2,0 ml 140  $\mu$ mole Phosphatpuffer, pH 7,6; 5  $\mu$ mole  $KNO_3$  (bzw.  $KNO_2$ ); die 2,2 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension. Im Zentralzylinder befanden sich 0,2 ml 20%ige KOH; Atmosphäre:  $H_2$ . B. Die Nitrat- und Nitritreduktion mit Fructose. Das Reaktionsgemisch enthielt in 2,0 ml 140  $\mu$ mole Phosphatpuffer, pH 7,6; 10  $\mu$ mole  $KNO_3$  (bzw.  $KNO_2$ ); 10  $\mu$ mole Fructose; die 2,2 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension; im Zentralzylinder befanden sich 0,2 ml 20%ige KOH; Atmosphäre:  $N_2$ .

Mit Zellfraktionen (lösliche Fraktion, Partikeln) wurden geprüft: A. Die  $H_2$ - $NO_3^-$ ( $NO_2^-$ )-Oxidoreductase; Testansatz wie bei ganzen Zellen. B. Die  $NADH$ - $NO_3^-$ ( $NO_2^-$ )-Oxidoreductase. Das Reaktionsgemisch enthielt in 2,0 ml 140  $\mu$ mole Phosphatpuffer, pH 7,6; 10  $\mu$ mole  $KNO_3$  (bzw.  $KNO_2$ ); 30  $\mu$ mole  $NADH$ ; die 6 bis 9 mg Protein entsprechende Menge Zellfraktion. Als Zusätze wurden z. T. eingesetzt: 20 nmole Phenacinnmethosulfat (PMS) bzw. 0,05 mg Schweineherz-Diaphorase (Boehringer, Mannheim) und 20 nmole Methylblau (MB). Im Zentralzylinder befanden sich 0,2 ml 20%ige KOH; Atmosphäre:  $N_2$ . Die „H-Donator-Nitrat-Oxidoreductase“ katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, die „H-Donator-Nitrit-Oxidoreductase“ die Reduktion von Nitrit zu  $N_2$ .

*Massenspektrometrie.* Als Reaktionsgefäße dienten Warburg-Gefäße, die anstelle des Manometers mit einem Hahn zur Gasprobenentnahme verbunden waren. Das Reaktionsgemisch enthielt in 2,0 ml 140  $\mu$ mole Phosphatpuffer, pH 7,6; 20  $\mu$ mole  $KNO_3$ ; 20  $\mu$ mole Fructose; die 4,0 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension.

Im Zentralzylinder befanden sich 0,2 ml 20%ige KOH. Das Kontrollgefäß enthielt einen Ansatz ohne Fructose. Nach 25 min Spülen der Gefäße mit nachgereinigtem Helium der Fa. Messer-Griesheim, Düsseldorf, (He > 99,9995 Vol.-%) wurde die Reaktion durch Herüberholen von KNO<sub>3</sub> und Fructose aus dem Seitenarm gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 30° C unter Schütteln. Das Ende der Gasbildung wurde mit gleichen Reaktionsansätzen manometrisch festgestellt. Die Gasproben der Kontroll- und Versuchsgefäße wurden unter Hochvakuum (10<sup>-6</sup> Torr) in das Massenspektrometer-System CH 5 der Fa. Varian Mat GmbH, Bremen, überführt. Die Massenspektren wurden bei 30 V Ionisierungspotential im niederen Massenbereich aufgenommen.

*Chemikalien.* NADH und Diaphorase (Schweineherz, Reinheitsgrad I) stammten von Boehringer GmbH, Mannheim; Phenazinmethosulfat von Sigma Chemical Company, St. Louis; die übrigen Chemikalien stammten von der Merck AG, Darmstadt.

## Ergebnisse

### Heterotrophes Wachstum unter anaeroben Bedingungen

*Hydrogenomonas eutropha* H 16 vermag anaerob in einer nitrat- oder nitrithaltigen Mineralnährlösung bei Anwesenheit von Fructose oder von anderen organischen Substraten wie Gluconat, Pyruvat, Fumarat oder Acetat gut zu wachsen. Anaerob wachsen die Zellen nur in einem eng begrenzten pH-Bereich. Größere Zelldichten wurden mit Nitrat und Nitrit nur im Alkalischen (pH-Bereich 7,5–7,9) erreicht (Abb.1). Bei pH 7,0 konnte mit Nitrit keine Zellvermehrung mehr beobachtet werden.

Für das anaerobe Wachstum mit Fructose und Nitrat ist eine ausgeprägte lag-Phase charakteristisch, wenn als Impfgut Zellen verwendet werden, die aerob und mit Ammonium gezogen worden waren. Während des Wachstums mit Nitrat (Abb.2) wird die einem Drittel des eingesetzten Nitrats entsprechende Menge Nitrit vorübergehend in das Nährmedium ausgeschieden. Bei Erreichen der maximalen Nitritkonzentration durchläuft die Kurve der Zelldichte eine zweite lag-Phase. Daraus läßt sich folgern, daß die Zellen während der ersten Phase überwiegend nur Nitrat als H-Acceptor nutzen und zu Nitrit reduzieren, bevor Nitrit und dessen Reduktionsprodukte in der zweiten Wachstumsphase als H-Acceptoren dienen. Über den Vorgang der Regulation lassen sich nur Vermutungen anstellen. Möglicherweise reprimiert Nitrat die Bildung des nitritreduzierenden Systems und/oder Nitrit ist zur Induktion desselben notwendig. Unter ähnlichen Versuchsbedingungen fanden Lam u. Nicholas (1969) bei *Micrococcus denitrificans*, daß die Nitratreductase in der lag-Phase, die Nitritreductase jedoch erst im ersten Drittel des exponentiellen Wachstums induziert wurden. Einen diauxischen Kurvenverlauf für den Zellertrag erhielten die Autoren nicht.

Der beim Wachstum mit Nitrat während der Phase der Nitritanhäufung zu beobachtende pH-Abfall (Abb.2) beruht möglicherweise auf

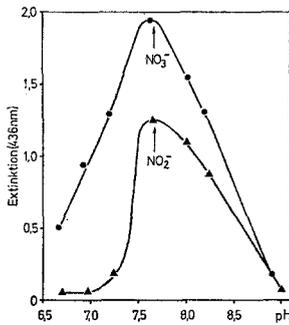


Abb. 1

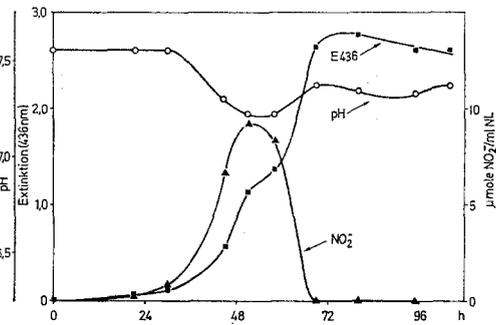


Abb. 2

Abb. 1. Abhängigkeit der Zelldichte vom pH-Wert. Die Zellen wuchsen anaerob mit 0,5% Fructose und 0,3%  $\text{KNO}_3$  bzw. 0,1%  $\text{KNO}_2$  bei verschiedenen AnfangspH-Werten. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die Zelldichte ( $E_{436}$ ) bestimmt

Abb. 2. Anaerobes Wachstum mit Fructose und Nitrat. Zur anaeroben Kultur mit 1% Fructose und 0,3%  $\text{KNO}_3$  wurde mit Ammonium als N-Quelle autotroph-aerob gewachsenen Zellen beimpft. Proben wurden zur Zelldichte-, pH- und Nitritbestimmung entnommen

$\text{CO}_2$ -Bildung aus Fructose. Eine Zunahme des pH im Verlauf der Nitritabnahme im Medium (Abb. 2 und 3) zeigt den ersten Protonenverbrauchenden Schritt der Nitritreduktion an (NO-Bildung?). Nach Nitritverbrauch sinkt der pH-Wert wieder ab. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß an der Nitritreduktion bei *H 16* mindestens zwei voneinander trennbare Teilprozesse beteiligt sind.

#### Autotrophes Wachstum unter anaeroben Bedingungen

In einer Mineral-Nährlösung mit Nitrat als H-Acceptor und N-Quelle unter einer  $\text{H}_2\text{-CO}_2$ -Atmosphäre (90+10 Vol-%) ohne organisches Substrat war das Wachstum sehr gering (Abb. 4). Die Nährlösung war mit Ammonium aerob-autotroph gewachsenen Zellen beimpft worden. Es überraschte, daß die Zelldichte schon unmittelbar nach dem Beimpfen zunahm. Der Verdacht, daß die Zellen Spuren von Sauerstoff nutzten, ließ sich durch Kontrollkulturen entkräften, die statt Nitrat Ammonium enthielten. In diesen nahm die Zelldichte nicht zu. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, beruht die Zunahme der Trübung auf Zellwachstum. Der Anteil der Zellen an Speicherstoff (Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure) war gering und blieb während des Wachstums konstant.

Die diauxische Kurve der Zelldichte dürfte, wie bei Abb. 2, auf die sukzessive Nutzung erst von Nitrat, dann von Nitrit als H-Acceptor zurückzuführen sein. Allerdings wurde unter  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  mehr Nitrit

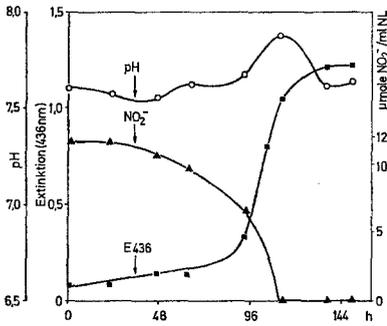


Abb. 3

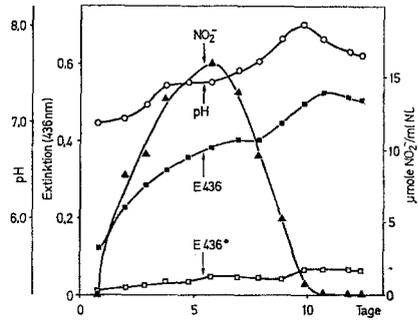


Abb. 4

Abb. 3. Anaerobes Wachstum mit Fructose und Nitrit. Zur anaeroben Kultur mit 0,5% Fructose und 0,1%  $\text{KNO}_2$  wurde mit Ammonium autotroph-aerob gewachsenen Zellen beimpft. Proben wurden zur Zelldichte-, pH- und Nitritbestimmung entnommen

Abb. 4. Anaerobes Wachstum mit  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und Nitrat. Die Nährlösung mit 0,3%  $\text{KNO}_3$  unter einer  $\text{H}_2$ - $\text{CO}_2$ -Atmosphäre (90+10 Vol-%) wurde mit Ammonium autotroph-aerob gewachsenen Zellen beimpft. Anfangs-pH: 7,0. Proben wurden zu Zelldichte-, Speicherstoffgehalts-, pH- und Nitritbestimmungen entnommen. Nach Versuchsende wurde eine Reinheitskontrolle durchgeführt. In einer Kontrollkultur mit 0,15%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  statt  $\text{KNO}_3$  fand keine Vermehrung des Impfgutes statt. Die „Resttrübung“  $\text{E}_{436}$  wurde nach Behandlung mit Na-Hypochlorit bestimmt

(die mehr als 50% des eingesetzten Nitrats entsprechende Menge) in das Medium ausgeschieden als während des Wachstums mit Fructose. Die im Verlauf der Nitritreduktion erfolgende Zunahme der Zelldichte war wesentlich geringer als mit Fructose als Substrat.

### Endprodukte der Denitrifikation

Zur Erfassung der gasförmigen Endprodukte der Denitrifikation wurden die Gasumsätze gewaschener Zellen zunächst nach der manometrischen Methode geprüft. Den mit Fructose und Nitrat anaerob gewachsenen Zellen wurden entweder Fructose oder  $\text{H}_2$  als H-Donatoren geboten.

Bei der organotrophen Nitrat- und Nitritreduktion (Abb. 5) wurden Gasmengen frei, die mit der Bildung von  $\text{N}_2$  oder  $\text{N}_2\text{O}$ , nicht jedoch von  $\text{NO}$  oder  $\text{NH}_3$  zu vereinbaren sind. Theoretisch müßten im Falle von  $\text{N}_2$  ( $\text{N}_2\text{O}$ ) 5  $\mu\text{mole}$  Gas aus 10  $\mu\text{mole}$  Nitrat bzw. Nitrit gebildet werden. Im Versuch wurden aus 10  $\mu\text{mole}$  Nitrat 4,3  $\mu\text{mole}$  und aus 10  $\mu\text{mole}$  Nitrit 4,8  $\mu\text{mole}$  Gas entwickelt.

Wird gasförmiger Wasserstoff als H-Donator angeboten, so läßt sich die Frage nach dem Hauptendprodukt der Nitrat- und Nitritreduktion

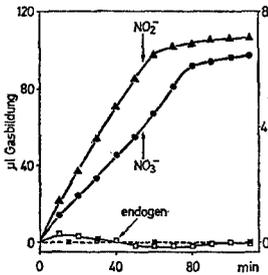


Abb. 5

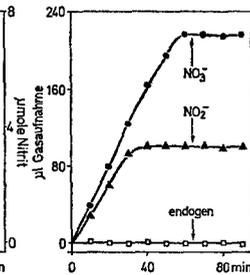


Abb. 6

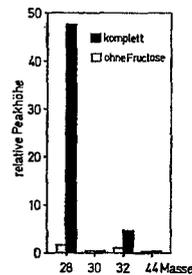


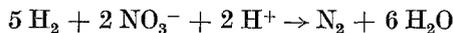
Abb. 7

Abb. 5. Gasbildung durch anaerob mit Nitrat gewachsene Zellen mit Fructose als H-Donator und Nitrit oder Nitrat als H-Acceptor. Die manometrische Messung wurde an gewaschenen Zellen durchgeführt, die anaerob mit 1% Fructose und 0,3%  $\text{KNO}_3$  gewachsen waren. Das Reaktionsgemisch enthielt im Hauptraum 140  $\mu\text{mole}$  Phosphatpuffer, pH 7,6 und die 2,2 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension (2,0 ml); im Seitenarm 10  $\mu\text{mole}$   $\text{KNO}_3$  (bzw.  $\text{KNO}_2$ ) und 10  $\mu\text{mole}$  Fructose; im Zentralzylinder 0,2 ml 20%ige KOH. Atmosphäre:  $\text{N}_2$ . Mit Nitrat wurden mehrere Gefäße angesetzt, in denen — jeweils in einem Gefäß bei einem bestimmten Zeitpunkt — die von den Zellen ausgeschiedene Nitritmenge (gestrichelte Kurve) bestimmt wurde

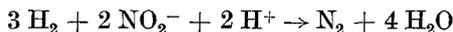
Abb. 6. Gasaufnahme durch anaerob mit Nitrat gewachsene Zellen mit  $\text{H}_2$  als H-Donator und Nitrit oder Nitrat als H-Acceptor. Die manometrische Messung wurde an gewaschenen Zellen durchgeführt, die anaerob mit 1% Fructose und 0,3%  $\text{KNO}_3$  gewachsen waren. Das Reaktionsgemisch (2,0 ml) enthielt im Hauptraum 120  $\mu\text{mole}$  Phosphatpuffer, pH 7,6 und 5  $\mu\text{mole}$   $\text{KNO}_3$  (bzw.  $\text{KNO}_2$ ); im Seitenarm 20  $\mu\text{mole}$  Phosphatpuffer, pH 7,6 und die 2,2 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension; im Zentralzylinder 0,2 ml 20%ige KOH. Atmosphäre:  $\text{H}_2$

Abb. 7. Massenspektrometrische Prüfung des gasförmigen Endprodukts der organotrophen Denitrifikation. Es wurden gewaschene, anaerob mit 1% Fructose und 0,3%  $\text{KNO}_3$  gewachsene Zellen eingesetzt. Als Reaktionsgefäße dienten Warburg-Gefäße. Das 2,0 ml-Reaktionsgemisch enthielt im Hauptraum 140  $\mu\text{mole}$  Phosphatpuffer, pH 7,6, und die 4 mg Protein entsprechende Menge Zellsuspension; im Seitenarm 20  $\mu\text{mole}$   $\text{KNO}_3$  und 20  $\mu\text{mole}$  Fructose; im Zentralzylinder 0,2 ml 20%ige KOH. Atmosphäre: Helium. Ein Kontrollgefäß ohne Fructose wurde angesetzt. Nach Versuchsablauf (vgl. „Material und Methoden“) wurden Gasproben des Kontroll- und Versuchsgefäßes im Massenspektrometer CH 5 geprüft

schon aufgrund von manometrischen Messungen entscheiden. Nach den Gleichungen



und

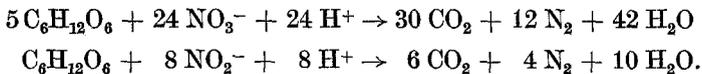


sollten pro mol Nitrat (Nitrit) im Falle der  $\text{N}_2$ -Bildung 2 mole (1 mol) Gas ( $\text{H}_2$  minus  $\text{N}_2$ ) von den Zellen aufgenommen werden; bei der Bildung von  $\text{N}_2\text{O}$  müßten es 1,5 mole (0,5 mol), bei  $\text{NO}$ -Bildung 0,5 mol (0,5 mol Gas-

bildung) und bei der  $\text{NH}_3$ -Freisetzung 3 mole (2 mole) pro mol Nitrat (Nitrit) sein.

Im Versuch wurden bei der Reduktion von 5  $\mu\text{mole}$  Nitrat (Nitrit) 216  $\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{l}$ ) Gas von den Zellen verbraucht (Abb. 6). Das bedeutet, daß pro mol Nitrat (Nitrit) 1,93 mole (0,89 mol) Gas aufgenommen worden waren. Die ermittelten Werte des Gasumsatzes stehen also mit der Bildung von  $\text{N}_2$  als Hauptendprodukt der Denitrifikation im Einklang. Eventuell wird noch etwas  $\text{N}_2\text{O}$  freigesetzt. Nach Versuchsablauf wurde auf Ammonium und Nitrit geprüft; das Resultat war negativ.

Massenspektrometrische Untersuchungen von Gasproben, die nach Ablauf der organotrophen Denitrifikation unter Helium entnommen worden waren, bestätigten, daß mit Fructose als H-Donator Nitrat und Nitrit bis zur Stufe des  $\text{N}_2$  (Masse 28) reduziert werden (Abb. 7).  $\text{N}_2\text{O}$  (Masse 44) konnte nicht einmal in Spuren nachgewiesen werden. Die organotrophe Denitrifikation läßt sich demnach wie folgt formulieren:



#### Nitrat- und Nitritreduktion verschieden gewachsener Zellen

Auch anaerob mit Nitrit gewachsene Zellen reduzierten Nitrat und Nitrit bis zur Stufe des  $\text{N}_2$ . Die Gasfreisetzung aus Nitrat mit Fructose als H-Donator erfolgte bei nitritgewachsenen Zellen (Abb. 8), im Gegensatz zu nitratgewachsenen (Abb. 5), in zwei Phasen: In der ersten Phase wird Nitrat vorwiegend nur zu Nitrit reduziert; die Gasfreisetzung ist gering, und Nitrit wird von den Zellen ausgeschieden (Abb. 8). Wenn die Nitritanhäufung ihr Maximum erreicht, setzt die Phase der Nitritreduktion ein. Sie ist erkennbar an der Abnahme des Nitrits im Medium und an einer Rate der Gasentwicklung, die der mit Nitrit als alleinigem H-Acceptor gleicht. Bei nitratgewachsenen Zellen wird Nitrit, auch in Gegenwart von Nitrat, sofort weiterreduziert (Abb. 5). Bei der Gasfreisetzung aus Nitrit konnten keine Phasen unterschieden werden.

Ein ähnlicher zweiphasischer Gasumsatz war zu beobachten, wenn anaerob mit Nitrit gewachsenen Zellen  $\text{H}_2$  als H-Donator geboten wurde (Abb. 9). Der Verlauf der Gasaufnahme läßt erkennen, daß das Nitrat in einer ersten Phase zu Nitrit reduziert wird.

In Gegenwart nitratgewachsener Zellen erfolgte die Gesamtaufnahme bei der  $\text{H}_2$ -abhängigen Nitratreduktion, ebenso wie die erwähnte Gasfreisetzung aus Nitrat mit Fructose als H-Donator, stets mit gleichbleibender Rate. Diese Zellen vermögen demzufolge die Nitratreduktion ohne größere Akkumulation von Nitrit direkt bis zur  $\text{N}_2$ -Endstufe durchzuführen.

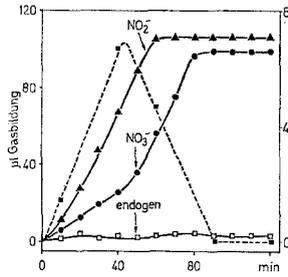


Abb. 8

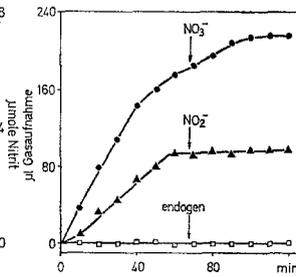


Abb. 9

Abb. 8. Gaswechsel anaerob mit Nitrit gewachsener Zellen mit Fructose als H-Donator und Nitrit oder Nitrat als H-Acceptor. Die Zellen waren anaerob mit 0,5% Fructose und 0,1%  $\text{KNO}_2$  gewachsen. Versuchsansatz wie bei Abb. 5. Die gestrichelte Kurve gibt die von den Zellen ausgeschiedene Nitritmenge an

Abb. 9. Gaswechsel anaerob mit Nitrit gewachsener Zellen mit  $\text{H}_2$  als H-Donator. Die Zellen waren anaerob mit 0,5% Fructose und 0,1%  $\text{KNO}_2$  gewachsen. Versuchsansatz wie bei Abb. 6

Es ist noch unklar, warum sich nitrat- und nitritgewachsene Zellen in der genannten Beziehung unterscheiden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß nitratgewachsene Zellen das vollkommene (komplexe?) System der Denitrifikation besitzen. Nitritgewachsene Zellen reduzieren zwar Nitrat mit hoher Rate zu Nitrit, vermögen jedoch nicht Nitrit in Gegenwart von Nitrat im selben Maße als H-Acceptor zu nutzen.

Mit Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen gewachsen waren, wurden Gasumsatzraten und die Endprodukte der Nitratreduktion bestimmt (Tab. 1). Es ist bemerkenswert, daß unter anaeroben *und* aeroben Wachstumsbedingungen in Gegenwart von Nitrat oder Nitrit und unabhängig von der Anwesenheit von  $\text{H}_2$  eine „ $\text{H}_2$ -Nitrat-Oxidoreductase“ (Reduktionsprodukt Nitrit) mit annähernd gleicher Aktivität gebildet wird. Eine Ausnahme bildeten aerob-autotroph gewachsene Zellen: Sie besaßen eine um mehr als 60% geringere Aktivität.

Eine „ $\text{H}_2$ -Nitrit-Oxidoreductase“ (Reduktionsprodukt  $\text{N}_2$ ) konnte nur bei anaerob gewachsenen Zellen beobachtet werden. Mit Fructose und Nitrat gewachsene Zellen besaßen die hierfür höchste Aktivität. Nur mit Fructose anaerob gewachsene Zellen waren befähigt, mit Fructose als H-Donator Nitrat (Nitrit) bis auf die Stufe des  $\text{N}_2$  zu reduzieren. Autotroph-anaerobe Zellen reduzierten zwar Nitrat in Gegenwart von  $\text{H}_2$  zu  $\text{N}_2$ , mit Fructose jedoch nur bis zu Nitrit. Aerob gewachsene Zellen reduzierten Nitrat generell nur zu Nitrit; aerob mit Ammonium gewachsene Zellen jedoch nur mit äußerst geringer Rate.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das denitrifizierende System ( $\text{N}_2$ -Freisetzung aus Nitrit) bei *H. eutropha* H 16 nur unter

Tabelle 1. Der Einfluß der Wachstumsbedingungen auf die Rate der Nitrat- und Nitritreduktion und die N-Reduktionsprodukte

		H-Donator: H <sub>2</sub>		H-Donator: Fructose		Endprodukte der Nitratreduktion
		H-Acceptor NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H-Acceptor NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H-Acceptor NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H-Acceptor NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
Wachstumsbedingungen		$\frac{\mu\text{mole NO}_2^-}{\text{min} \cdot \text{g Protein}}$	$\frac{\mu\text{mole N}_2}{\text{min} \cdot \text{g Protein}}$	$\frac{\mu\text{mole N}_2^-}{\text{min} \cdot \text{g Protein}}$	$\frac{\mu\text{mole N}_2}{\text{min} \cdot \text{g Protein}}$	
anaerob	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> ; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	72 <sup>a</sup>	n 14	n	1 3	N <sub>2</sub> ; NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Fructose; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	n	21 31	n	23 38	N <sub>2</sub>
	Fructose; NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	73 <sup>a</sup>	n 14	n	n 42	N <sub>2</sub>
aerob	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> ; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26	0 1	n	0 0	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Fructose; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	68	0 0	n	0 0	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Fructose; NH <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1	0 0	n	0 0	(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )

Die anaeroben Zellanzuchten wurden, wie bei den Abb. 2, 3 und 4 angegeben, durchgeführt. Die autotroph-aerobe Zellanzucht erfolgte bei 0,3% KNO<sub>3</sub> unter einer H<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (70+20+10 Vol-%) und pH 7,2, die heterotroph-aerobe bei 0,3% KNO<sub>3</sub> bzw. 0,15% NH<sub>4</sub>Cl und 1% Fructose bei pH 7,6. Als Impfmateriale diente in jedem Falle eine autotroph-aerobe mit Ammonium gewachsene Zellkultur.

Die Gasumsatzraten wurden mit den bei Abb. 5 und 6 angegebenen Testansätzen ermittelt. Nitrit wurde colorimetrisch bestimmt (vgl. „Material und Methoden“).

<sup>a</sup> Zur Aktivitätsberechnung wurde angenommen, daß Nitrat in der ersten Phase der Gasaufnahme quantitativ zu Nitrit umgesetzt wird (vgl. Abb. 9).

n = mit den angewandten Meßmethoden nicht bestimmbar.

anaeroben Bedingungen während des Wachstums mit Nitrat oder Nitrit gebildet wird. Sauerstoff reprimiert die Bildung dieses Systems. Die Nitratreductase ist reprimierbar durch Ammonium.

#### Verteilung der nitrat- und nitritreduzierenden Systeme auf zwei Zellfraktionen

Um einen Einblick in die Verteilung der Nitrat- und Nitritreductase-Aktivitäten bei *H. eutropha* H 16 zu gewinnen, wurden anaerob mit Fructose und Nitrat gewachsene Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und durch fraktionierte Zentrifugation bei 120000 g in eine lösliche Fraktion und ein Sediment (Partikeln) aufgetrennt. An den beiden „gereinigten“ Fraktionen wurde geprüft, inwieweit sie die Nitrat- und Nitritreduktion mit den H-Donatoren H<sub>2</sub> und NADH zu katalysieren vermögen (Tab. 2). Es wurde deutlich, daß nur die Partikelfraktion die

Tabelle 2. Lokalisierung der nitrat- und nitritreduzierenden Systeme in Zellfraktionen

Enzymatische Reaktion	Aktivitäten in $\mu\text{mole H-Acceptor/}$ $\text{min} \cdot \text{g Protein}$	
	120000 g Überstehendes	120000 g Sediment
$\text{H}_2\text{-NO}_3^-$ -Oxidoreductase	0	165
$\text{H}_2\text{-NO}_2^-$ -Oxidoreductase	0	0
$\text{NADH-NO}_3^-$ -Oxidoreductase	0	40
$\text{NADH-NO}_2^-$ -Oxidoreductase	0	0
$\text{NADH(PMS)-NO}_2^-$ -Oxidoreductase	18	12
$\text{NADH (Diaphorase-MB)-NO}_2^-$ - Oxidoreductase	27	8

Die mit Fructose und Nitrat anaerob gewachsenen Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und nach zweimaliger fraktionierter Zentrifugation bei 120000 g in eine „partikelfreie“ lösliche Fraktion und ein Sediment (gewaschene Partikeln) aufgetrennt.

Die Aktivitäten wurden manometrisch bestimmt. Der Test der  $\text{H}_2$ -Nitrat-(Nitrit)-Oxidoreductase wurde wie bei Abb.6 mit 2–6 mg Protein/Ansatz durchgeführt. Die  $\text{NADH-Nitrat(Nitrit)-Oxidoreductase}$  wurde in folgendem Reaktionsgemisch (0,2 ml) gemessen: Im Hauptraum befanden sich 140  $\mu\text{mole}$  Phosphatpuffer, pH 7,6, und die 6–9 mg Protein entsprechende Menge Zellfraktion; im Seitenarm 10  $\mu\text{mole}$   $\text{KNO}_3$  ( $\text{KNO}_2$ ) und 30  $\mu\text{mole}$   $\text{NADH}$ ; im Zentralzylinder 0,2 ml 20%ige  $\text{KOH}$ . Als Zusätze wurden z. T. in den Hauptraum eingesetzt: 20  $\mu\text{mole}$   $\text{PMS (MB)}$  oder 0,05 mg Diaphorase. Atmosphäre:  $\text{N}_2$ .

Nitratreduktion zu Nitrit katalysierte. Als H-Donatoren fungierten  $\text{H}_2$  oder  $\text{NADH}$ . Eine Nitritreduktion zu  $\text{N}_2$  (oder  $\text{N}_2\text{O}$ ?) ließ sich nur mit  $\text{NADH}$  als H-Donator und nur unter Zusatz von Zwischenüberträgern in katalytischen Mengen erzielen. Es wurden Aktivitäten sowohl in der löslichen als auch in der Partikelfraktion gemessen.

Aus den in Tab.2 wiedergegebenen Aktivitätsverteilungen auf zwei Zellfraktionen kann daher geschlossen werden, daß *H 16* aller Wahrscheinlichkeit nach nur eine partikelgebundene Nitratreduktase, jedoch zwei nitritreduzierende Systeme, ein lösliches und ein partikelgebundenes, besitzt. Selbstverständlich können zur Klärung dieser Fragen letztlich nur entsprechende enzymatische Untersuchungen Aufschluß geben.

### Diskussion

In den Arbeiten von Davis *et al.* (1969, 1970) wird eine Aufgliederung der gram-negativen  $\text{H}_2$ -Bakterien in 5 Gruppen vorgeschlagen. Der Befähigung zur Nitrat-Atmung wird in diesem Zusammenhang Bedeutung beigemessen. Nur Angehörige der Gruppe A (*Micrococcus denitrificans*)

und B (*Alcaligenes eutrophus*) sind in der Lage, anaerob mit Nitrat zu wachsen. Als Energie- und C-Quelle wurden Lactat oder Hefeextrakt-Glycerin geboten.

Während sich schon sehr früh Arbeiten mit der Nitrat-Atmung bei *Micrococcus denitrificans* befaßten (Kluyver, 1953; Verhoeven *et al.*, 1954), existieren keinerlei Untersuchungen über die Nitrat-Atmung bei Vertretern der B-Gruppe. *Hydrogenomonas eutropha* (= *Alcaligenes eutrophus*) Stamm *H 16* vermag anaerob in Gegenwart von Nitrat oder Nitrit mit C-Quellen, die er auch aerob nutzt, gut zu wachsen. Das anaerobe Wachstum unter  $H_2$  und  $CO_2$  war hingegen spärlich. Besonders gering war die Zunahme der Zelldichte im Verlauf der Nitritreduktion (vgl. Abb. 4). Es wird vermutet, daß die Ursache ein äußerst ungünstiger ATP-Spiegel autotroph-anaerob wachsender Zellen ist. Der Energiegewinn durch oxydative Phosphorylierung in Kopplung an das denitrifizierende System, also insbesondere an die Nitritreduktion, ist anscheinend wesentlich geringer als der Gewinn durch die Knallgasreaktion ( $H_2$ - $O_2$ -Oxidoreductase). In diese Richtung weist auch eine Beobachtung an autotroph wachsenden Zellen von *Micrococcus denitrificans*; beim Wechsel der Bedingungen von aerob zu anaerob ließ die (ATP-abhängige)  $CO_2$ -Fixierkapazität beträchtlich nach (Banerjee u. Schlegel, 1966).

Mit aerob und anaerob gewachsenen Zellen von *H. eutropha H 16* (Anzucht mit Nitrat oder Nitrit und Fructose) wurden gleiche Raten der Nitratreduktion zu Nitrit gemessen. Dieses Ergebnis spricht nicht für eine „zusätzliche“, unter anaeroben Bedingungen induzierbare Nitratreductase. Auch die Fähigkeit nur der Partikelfraktion, die Nitratreduktion zu Nitrit zu katalysieren, steht mit der Vorstellung im Einklang, daß *H 16* nur eine einzige Nitratreductase besitzt. In Gegenwart der Partikel wurde Chlorat als Substrat mit derselben Rate wie Nitrat reduziert (Pfitzner, 1969). Gemäß der Differenzierung von Pichinoty u. Méténier (1966) besitzt Stamm *H 16* demnach eine Nitratreductase des A-Typs. Die Bildung des Enzyms scheint nur durch Ammonium reprimierbar zu sein; Sauerstoff ist ohne Einfluß.

Hingegen ist das Vorkommen zweier Nitritreductasen nicht ausgeschlossen. Dafür spricht, daß in Gegenwart der löslichen und der Partikelfraktion Nitritreduktion nachgewiesen werden konnte. Das denitrifizierende System, d. h. die Nitritreduktion zu  $N_2$  ( $N_2O$ ) ist bei *H 16* wie bei *Micrococcus denitrificans* (Lam u. Nicholas, 1969) nur unter anaeroben Bedingungen induziert; Sauerstoff reprimiert dessen Synthese.

Für die umsichtige Hilfe bei den Experimenten danken wir Frau M. Kappey-Noerenberg, für die Aufnahme der Massenspektren Fr. A. Jander vom Physik. Chem. Inst. d. Univ. Göttingen.

## Literatur

- Banerjee, A. K., Schlegel, H. G.: Zur Rolle des Hefeextraktes während des chemolithotrophen Wachstums von *Micrococcus denitrificans*. Arch. Mikrobiol. **53**, 132—153 (1966).
- Davis, D. H., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., Mandel, M.: Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: Taxonomic implications. Int. J. Syst. Bact. **19**, 375—390 (1969).
- Davis, D. H., Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Mandel, M.: Taxonomic studies on some gram-negative polarly flagellated "hydrogen bacteria" and related species. Arch. Mikrobiol. **70**, 1—13 (1970).
- Kluyver, A. J.: Some aspects of nitrate reduction. Sym. Microb. Metab., 6. Int. Congr. Microbiol., Rom, pp. 71—91 (1953).
- Lam, Y., Nicholas, D. J. D.: Aerobic and anaerobic respiration in *Micrococcus denitrificans*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **172**, 450—461 (1969).
- Nicholas, D. J. D., Nason, A.: Determination of nitrate and nitrite. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Ed., Methods in enzymology, Vol. 3, pp. 981—984. New York: Academic Press 1957.
- Pfennig, N., Lippert, K. D.: Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. **55**, 245—256 (1966).
- Pfützner, J.: Die NAD-spezifische Hydrogenase und das Elektronentransportsystem von *Hydrogenomonas* H 16. Diss., Göttingen 1969.
- Pichinoty, F., Méténier, G.: Contribution à l'étude de la nitrate-réductase assimilatrice d'une levure. Ann. Inst. Pasteur **111**, 282—313 (1966).
- Schmidt, K., Liaaen-Jensen, S., Schlegel, H. G.: Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von *Chromatium okenii* Perty. Arch. Mikrobiol. **46**, 117—126 (1963).
- Verhoeven, W., Koster, A. L., Van Nievelt, M. C. A.: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. III. *Micrococcus denitrificans*, a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. Antonie v. Leeuwenhoek **20**, 273—284 (1954).

Prof. Dr. H. G. Schlegel  
Institut für Mikrobiologie  
D-3400 Göttingen, Grisebachstraße 8  
Bundesrepublik Deutschland