

Ingo Schmidt

Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha*

Doktorarbeit / Dissertation

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Copyright © 1997 Diplomica Verlag GmbH
ISBN: 9783832412340

Ingo Schmidt

Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha*

Ingo Schmidt

Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha*

Dissertation
an der Universität Hamburg
Mai 1997 Abgabe



Diplomarbeiten Agentur
Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke
und Guido Meyer GbR

Hermannstal 119 k
22119 Hamburg

agentur@diplom.de
www.diplom.de

ID 1234

Schmidt, Ingo: Anaerobe Ammoniakoxidation von Nitrosomonas eutropha/Ingo Schmidt - Hamburg: Diplomarbeiten Agentur, 1999

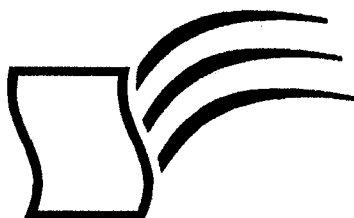
Zugl.: Hamburg, Universität, Dissertation, 1997

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey, Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke & Guido Meyer GbR
Diplomarbeiten Agentur, <http://www.diplom.de>, Hamburg
Printed in Germany



Diplomarbeiten Agentur

Wissensquellen gewinnbringend nutzen

Qualität, Praxisrelevanz und Aktualität zeichnen unsere Studien aus. Wir bieten Ihnen im Auftrag unserer Autorinnen und Autoren Wirtschaftsstudien und wissenschaftliche Abschlussarbeiten – Dissertationen, Diplomarbeiten, Magisterarbeiten, Staatsexamensarbeiten und Studienarbeiten zum Kauf. Sie wurden an deutschen Universitäten, Fachhochschulen, Akademien oder vergleichbaren Institutionen der Europäischen Union geschrieben. Der Notendurchschnitt liegt bei 1,5.

Wettbewerbsvorteile verschaffen – Vergleichen Sie den Preis unserer Studien mit den Honoraren externer Berater. Um dieses Wissen selbst zusammenzutragen, müssten Sie viel Zeit und Geld aufbringen.

<http://www.diplom.de> bietet Ihnen unser vollständiges Lieferprogramm mit mehreren tausend Studien im Internet. Neben dem Online-Katalog und der Online-Suchmaschine für Ihre Recherche steht Ihnen auch eine Online-Bestellfunktion zur Verfügung. Inhaltliche Zusammenfassungen und Inhaltsverzeichnisse zu jeder Studie sind im Internet einsehbar.

Individueller Service – Gerne senden wir Ihnen auch unseren Papierkatalog zu. Bitte fordern Sie Ihr individuelles Exemplar bei uns an. Für Fragen, Anregungen und individuelle Anfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir freuen uns auf eine gute Zusammenarbeit

Ihr Team der Diplomarbeiten Agentur

Dipl. Kfm. Dipl. Hdl. Björn Bedey –
Dipl. Wi.-Ing. Martin Haschke —
und Guido Meyer GbR —

Hermannstal 119 k —
22119 Hamburg —

Fon: 040 / 655 99 20 —
Fax: 040 / 655 99 222 —

agentur@diplom.de —
www.diplom.de —

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Problemstellung und Ziel der Arbeit.....	3
2.2 Mikrobiologische Grundlagen.....	4
2.3 Stickoxide: Mikrobiologische und physikalisch-chemische Grundlagen.....	13
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Bakterienstämme.....	16
3.2 Nährmedien.....	17
3.2.1 Medium I: Mineralisches Nährmedium für Ammoniakoxidanten.....	17
3.2.2 Medium II: Nährmedium für Ammoniakoxidanten.....	18
3.2.3 Medium III: Nährmedium für heterotrophe Organismen.....	18
3.2.4 Medium IV: Nährmedium für denitrifizierende Ammoniakoxidanten.....	18
3.2.5 Puffer für zellfreie Extrakte von Ammoniakoxidanten.....	20
3.3 Kulturführung.....	21
3.4 Reinheitskontrolle.....	22
3.5 Ernten der Bakterienzellen.....	23
3.6 Aktivitätstest für Ammoniakoxidanten.....	23
3.7 Analytische Nachweismethoden.....	24
3.7.1 Bestimmung der Zellzahlen.....	24
3.7.2 Bestimmung von Ammonium.....	24
3.7.3 Bestimmung von Nitrit und Nitrat.....	25
3.7.4 Bestimmung von Hydroxylamin.....	26
3.7.5 Bestimmung von Stickoxiden in Gasen.....	26
3.7.6 Bestimmung von Sauerstoff, Stickstoff, Distickstoffoxid und Kohlendioxid in Gasen.....	27
3.7.7 Bestimmung von Sauerstoff in Flüssigkeiten.....	29

3.7.8	Bestimmung von ATP und NADH.....	30
3.7.9	Bestimmung von Protein.....	32
3.7.10	Bestimmung von Poly- β -hydroxybuttersäure.....	33
3.7.11	Bestimmung von Glycerin.....	34
3.7.12	Herstellung zellfreier Extrakte von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	35
3.8	Aufnahme von Differenzspektren.....	36
3.9	Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	37
3.10	Aufbau der Laborversuchsanlage.....	38
3.11	Berechnungen für die Ergebnisdarstellung.....	41
3.11.1	Berechnung der spezifischen Aktivität.....	41
3.11.2	Berechnung des spezifischen Nutzeffekts.....	42
3.11.3	Berechnung der prozentualen Inhibition der Ammoniakoxidation.....	42
3.11.4	Berechnung des Zellertrages.....	43
3.11.5	Berechnung der Frachten der Gaskomponenten im Roh- und Abgas.....	43
3.11.6	Berechnung des Stickstoffverlustes.....	44
3.11.7	Berechnung der Löslichkeit von Gasen in Wasser.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Anaerobe Ammoniakoxidation und Denitrifikation von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	45
4.1.1	Anaerobe Ammoniakoxidation.....	45
4.1.2	Anaerobe Denitrifikation.....	49
4.2	Einfluß der NO ₂ - und O ₂ -Konzentrationen auf die anaerobe bzw. aerobe Ammoniakoxidation von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	50
4.2.1	Einfluß der NO ₂ - und O ₂ -Konzentrationen auf den N-Verlust, den Nutzeffekt und die Glycerinexkretion sowie auf die NADH-, ATP- und PHB-Konzentration.....	52
4.3	Anaerobes Zellwachstum von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	54
4.4	Einfluß unterschiedlicher NO _x - und DMPS-Konzentrationen auf die Ammoniakoxidation und den N-Verlust von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	56
4.4.1	Einfluß von NO und NO ₂	56
4.4.2	Einfluß von NO und DMPS.....	57
4.4.2.1	Anoxische Bedingungen.....	58
4.4.2.2	Oxische Bedingungen.....	59
4.5	Einfluß der Anzuchsbedingungen auf die anaerobe Ammoniakoxidation von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	61

4.6 Einfluß wechselnder Sauerstoffkonzentrationen auf die Ammoniak-oxidation von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	64
4.7 Anaerobe Ammoniakoxidation von <i>Nitrosomonas europaea</i> und <i>Nitrosolobus multiformis</i>	65
4.8 Anaerobe Denitrifikation von <i>Nitrosomonas eutropha</i> mit Wasserstoff als Elektronendonator	66
4.9 Untersuchung von Differenzspektren von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	69
4.10 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	71
4.11 Anaerobe Ammoniakoxidation in zellfreien Rohextrakten von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	74
4.12 Anaerobe Ammoniakoxidation in zellfreien Fraktionen von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	77
4.12.1 Anaerobe Ammoniakoxidation in vorgereinigten Enzym- und Membranfraktionen	80
4.13 Einsatz spezifischer Hemmstoffe gegen die HAO und die AMO in zellfreien Extrakten von <i>Nitrosomonas eutropha</i>	81
4.13.1 Hemmung der HAO	81
4.13.2 Hemmung der AMO	82
4.14 Anaerobe Ammoniakoxidation in zellfreien Extrakten mit N ₂ O ₄ als Oxidationsmittel	84
4.15 Bestimmung des K _m -Wertes der anaeroben Ammoniakoxidation in zellfreien Extrakten	85
4.15.1 K _m -Wert	85
4.15.2 Effekt des pH-Wertes auf den K _m -Wert	86
4.16 Einfluß von Sauerstoff auf die Ammoniakoxidation in zellfreien Extrakten	87
5 Diskussion.....	89
6 Bibliographie.....	102

Veröffentlichung

Abkürzungsverzeichnis

a	spezifische Aktivität
Abb.	Abbildung
ad.	auffüllen auf
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMO	Ammonium-Monooxygenase
AMP	Adenosinmonophosphat
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
C _{fl}	Löslichkeit von Gasen in Wasser
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
C _{red}	Mole des in den Zellen gebundenen Kohlenstoffs
d	Tag
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ΔG^0	Reaktionsenthalpie
F	Fracht
fmol	Femtomol
g	Gramm
G	Gasstrom
Gl.	Reaktionsgleichung
GTP	Guanosintriphosphat
• g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAO	Hydroxylamin-Oxidoreduktase
h ν	Energie eines Photons für eine elektromagnetische Welle der Frequenz ν ; h = Plancksches Wirkungsquantum
I	Inhibition
ICM	intracytoplasmatische Membranen
kb	Kilobasen
kbar	Kilobar
K _c	für die Reduktion von 1 mol CO ₂ zur Zellsubstanz [CH ₂ O] erforderlicher Energiebetrag
kJ	Kilojoule
K _m	Michaelis-Konstante [μ M]
K _N	bei der Oxidation von 1 mol Ammoniak freigesetzter Energiebetrag

Abkürzungen

kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
M	molar ($= \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
mbar	Millibar
ml	Milliliter
mM	millimolar ($= \text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
mmol	Millimol
mol	Mol
MTT	Thiazolylblau (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
mV	Millivolt
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar ($= \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
μmol	Mikromol
N	Normalität
NAD	oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
N.N.	nomen nescio
N_{ox}	Mole des oxidierten Stickstoffs
N-Verlust	Stickstoffverlust
P	Proteinmasse
p.a.	pro analysis
Pa	Pascal
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
PHB	Poly- β -hydroxybuttersäure
pK_s	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K_s (Säure)
ppb	parts per billion
PP_i	Diphosphat
ppm	parts per million
Pr	Proteinzunahme
S	Substratverbrauch
S_0	Ammoniumkonzentration in der Probe am Beginn des Versuches
S_1	Ammoniumkonzentration in der Probe am Ende des Versuches
$S_{r,0}$	Ammoniumkonzentration in der Referenzprobe am Beginn des Versuches
$S_{r,1}$	Ammoniumkonzentration in der Referenzprobe am Ende des Versuches
t	Zeit

Abkürzungen

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett (-es Licht)
v/v	Volumen pro Volumen
VwV	Verwaltungsvorschrift
w/w	Masse pro Masse

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein neuer Stoffwechseltyp – die anaerobe Ammoniakoxidation – bei chemolithoautotrophen Ammoniakoxidanten nachgewiesen. Weiterhin wurde eine Methode für die Untersuchung des Ammoniak oxidierenden Systems in zellfreien Extrakten entwickelt.

Unter anoxischen Bedingungen oxidierten Zellen von *Nitrosomonas eutropha*, *Nitrosomonas europaea* und *Nitrosolobus multiformis* Ammoniak mit Stickstoffdioxid bzw. Distickstofftetraoxid ($\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$) als Oxidationsmittel über das Zwischenprodukt Hydroxylamin zu Nitrit. Als weiteres Produkt konnte Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen werden. Bis zu 50 % des entstandenen Nitrits wurden zu molekularem Stickstoff denitrifiziert. Als Zwischenprodukt der Denitrifikation traten geringe Mengen von N_2O auf.

Bei *Nitrosomonas eutropha* war die anaerobe Ammoniakoxidation mit einer ATP- und NADH-Produktion sowie mit einem Zellwachstum verbunden. Der Nutzeffekt betrug ca. 14 %. Der PHB-Gehalt der Zellen stieg um maximal $20 \text{ mg} \cdot \text{g Protein}^{-1}$ an, und bis zu 3 % des fixierten Kohlendioxids wurden als Glycerin in das Medium exkretiert.

Die höchsten spezifischen anaeroben Ammoniakoxidationsaktivitäten wurden bei *Nitrosomonas eutropha* mit $129,4 \mu\text{mol} \cdot \text{g Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in einer Helium-Atmosphäre mit 25 ppm NO_2 ermittelt. Die Ammoniakoxidationsrate lag um den Faktor 10 niedriger als unter oxischen Bedingungen. Die Zugabe von Stickstoffmonoxid wirkte sich stark hemmend auf die anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität aus. Diese inhibitorische Wirkung konnte durch die Zugabe von 2,3-Dimercapto-1-Propansulfonat (DMPS), einer NO komplexierenden Verbindung, deutlich vermindert werden.

Unter oxischen Bedingungen führte NO nur zu einer geringen Hemmung der Ammoniakoxidationsaktivität. Allerdings wurde in Gegenwart von Sauerstoff die Ammoniakoxidation durch DMPS zeitweise vollständig gehemmt. Durch die Zugabe von NO oder NO_2 konnte die Zeitdauer dieser Inhibition erheblich verkürzt werden.

Auf die aerobe und anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas eutropha* hatte NO_2 weiterhin folgende Effekte:

- ◆ In einer NO_2 -haltigen oxischen Atmosphäre angezogene Zellen wiesen in den ersten 30 Stunden eine signifikant höhere anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität auf als Zellen, die in einer NO_2 -freien Atmosphäre angezogen worden waren.
- ◆ Ein fünfmaliger Wechsel zwischen anoxischen und oxischen Bedingungen innerhalb von fünf Tagen führte zu einer starken Abnahme der Ammoniakoxidationsaktivität.

Demgegenüber blieben die Ammoniakoxidationsaktivitäten in Gegenwart von 25 ppm NO_2 über diesen Zeitraum nahezu unverändert.

- ◆ Neben Ammoniak konnte unter anoxischen Bedingungen auch Wasserstoff als alleiniger Elektronendonator und Nitrit als Elektronenakzeptor genutzt werden. Bei der Umstellung auf einen Ammoniak oxidierenden Stoffwechsel war die Überlebensrate der Organismen deutlich größer, wenn die Gasatmosphäre während der Umstellung mit NO_2 angereichert worden war.

Erstmals konnte nach Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation in zellfreien Fraktionen von *Nitrosomonas eutropha* eine anaerobe Ammoniakoxidationsaktivität nachgewiesen werden. Während der Ammoniakoxidation wurde ein NO_2 -Verbrauch bei gleichzeitiger NO-Produktion beobachtet. Durch spezifische Hemmung der Hydroxylaminoxidation mit Hydrazin konnte gezeigt werden, daß der NO_2 -Verbrauch und die NO-Produktion direkt an die Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin gekoppelt waren.

Es wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 zwischen der Ammoniakoxidationsrate und der Hydroxylaminproduktionsrate sowie zwischen der NO_2 -Verbrauchsrate und der NO-Produktionsrate ermittelt. Das Verhältnis zwischen der Ammoniakoxidationsrate und der NO_2 -Verbrauchsrate bzw. der NO-Produktionsrate betrug 1:2.

In zellfreien Extrakten konnte auch nach der Absenkung der Temperatur von 25 °C auf 4 °C eine anaerobe Ammoniakoxidation nachgewiesen werden. Da bei dieser Temperatur Stickstoffdioxid nahezu vollständig als Dimer (N_2O_4) vorliegt, ist zu vermuten, daß N_2O_4 und nicht NO_2 das eigentliche Oxidationsmittel bei der anaeroben Ammoniakoxidation ist.

Der K_m -Wert des Ammoniak oxidierenden Systems in zellfreien Extrakten von *Nitrosomonas eutropha* lag für pH-Werte zwischen 6,75 und 8,25 bei ca. 20 μM Ammoniak. Demgegenüber war der K_m -Wert hinsichtlich des Substrates Ammonium sehr stark vom pH-Wert abhängig. Die Ergebnisse bestätigen den in der Literatur beschriebenen Befund, daß Ammonium in seiner nicht protonierten Form (Ammoniak) als Substrat für die Ammoniakoxidation genutzt wird.

Sauerstoff wirkte sich stark hemmend auf die Ammoniakoxidationsaktivität zellfreier Systeme aus. Unter dem Einfluß von NO_2 konnte allerdings auch unter oxischen Bedingungen eine geringe Ammoniakoxidation nachgewiesen werden.