

# **Eingrenzung der Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon bei „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**  
**- Dr. rer. nat. -**

angenommene Dissertation von

**Mirjam Kant**

(geb. Trinkler)

geb. am 16. Mai 1990 in Arnstadt

Oldenburg, April 2016

Die Untersuchungen für die vorliegende Doktorarbeit wurden von Oktober 2014 bis Februar 2016 an der Carl von Ossietzky Universität in Oldenburg durchgeführt.

1. Gutachter: **Prof. Dr. Ralf Rabus**
2. Gutachter: **Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch**

Tag der Disputation: **31.05.2016**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>Abstract</b>	<b>12</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>13</b>
1.1 Aromatische Verbindungen . . . . .	13
1.1.1 Chemische Eigenschaften . . . . .	13
1.1.2 Vorkommen . . . . .	13
1.2 „ <i>Aromatoleum aromaticum</i> “ EbN1 . . . . .	14
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften . . . . .	14
1.2.2 Genom . . . . .	15
1.3 Abbau aromatischer Verbindungen . . . . .	15
1.3.1 Aerober Abbau . . . . .	15
1.3.2 Anaerober Abbau . . . . .	16
1.3.3 Anaerober Abbau von 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon .	17
1.3.3.1 Abbauweg (peripherer Abbau) . . . . .	18
1.3.3.2 Sensor/Regulator-System und Bindestellen am Gencluster	19
1.4 Schwellenwertkonzentration . . . . .	20
1.5 Hemmung der Genexpression/Proteinbiosynthese . . . . .	21
1.5.1 Rifampicin als Transkriptionshemmer . . . . .	21
1.5.2 Kanamycin als Translationshemmer . . . . .	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Organismus . . . . .	23
2.2 Medium . . . . .	23
2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung . . . . .	23

2.2.2	Substrate . . . . .	25
2.2.3	Antibiotika . . . . .	25
2.3	Versuchsaufbau . . . . .	26
2.3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau . . . . .	26
2.3.2	Anpassungen . . . . .	26
2.3.3	Probennahme . . . . .	27
2.4	Chromatographische Analysen . . . . .	27
2.4.1	HPLC . . . . .	27
2.4.2	IC . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Optimierung des Versuchdesigns . . . . .	29
3.1.1	Einstellung der Benzoatkonzentration . . . . .	30
3.1.2	Antibiotikazugabe als Nachweis des Induktionsvorganges . . . . .	35
3.1.2.1	Kanamycin . . . . .	35
3.1.2.2	Rifampicin . . . . .	37
3.2	Eingrenzung der Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
4.1	Einfluss von Antibiotika auf den Induktionsvorgang . . . . .	44
4.1.1	Kanamycin . . . . .	44
4.1.2	Rifampicin . . . . .	45
4.2	Eingrenzung der regulatorisch wirksamen <i>in vivo</i> Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>49</b>
	<b>Referenzen</b>	<b>56</b>
<b>A</b>	<b>Appendix</b>	<b>57</b>
A.1	Zusätze für das Medium für nitratreduzierende Bakterien . . . . .	57
A.1.1	Vitamin B12 . . . . .	57
A.1.2	Vitamin-Mix . . . . .	57
A.1.3	Spurenelemente . . . . .	58
A.1.4	Selenit/Wolfram . . . . .	58
A.1.5	Natriumhydrogencarbonat . . . . .	59
A.1.6	Salzsäure . . . . .	59
A.1.7	Ascorbat . . . . .	60

A.2	Wachstumsexperimente - Graphen . . . . .	60
A.2.1	Einstellung der Benzoatkonzentration . . . . .	60
A.2.2	Kanamycin . . . . .	62
A.2.3	Rifampicin . . . . .	63
A.3	Wachstumsexperimente - Startwerte . . . . .	68
	<b>Erklärung</b>	<b>74</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>75</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Anaerober Abbauweg von 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenon zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA in „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 . . . . .	18
2	Schematische Darstellung des Genclusters für den Abbau von 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenon, den Sensor/Regulator und das Effluxsystems bei „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 inklusive der vorgeschlagenen Funktionsweise des Sensor/Regulator-Proteins und seiner Bindestellen an der DNA . . . . .	19
3	Schematischer Aufbau einer Medienflasche mit Abfüllvorrichtung . . . . .	24
4	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. I] . . . . .	30
5	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat, 10 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon und der zusätzlichen Zugabe von Nitrat (5 mM) [Nr. V] . . . . .	31
6	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat, 10 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon ohne zusätzliche Zugabe von Nitrat [Nr. VI] . . . . .	32
7	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon [Nr. VII] . . . . .	32
8	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,25 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon [Nr. VIII] . . . . .	33
9	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon [Nr. IX] . . . . .	33
10	Vergleich des Wachstums von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon bei unterschiedlicher Zugabezeit von 4-Hydroxyacetophenon [Nr. X] . . . . .	34
11	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe verschiedener Kanamycinkonzentrationen [Nr. KM-I] . . . . .	36
12	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 400 $\mu$ g x mL <sup>-1</sup> Rifampicin [Nr. R-I] . . . . .	38

13	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin [Nr. R-II] . . . . .	40
14	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin [Nr. R-III] . . . . .	41
15	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 20 h des Versuchs [Nr. R-IV] . . . . .	41
16	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 20 h des Versuchs [Nr. R-V] . . . . .	42
17	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 50 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 12 h des Versuchs [Nr. R-VI] . . . . .	42
18	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 nM 4-Hydroxyacetophenon, Ausschnitt der ersten 14 h des Versuchs [Nr. R-VIII] . . . . .	43
A1	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. II] . . . . .	60
A2	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 100 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon [Nr. III] . . . . .	61
A3	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 10 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon [Nr. IV] . . . . .	61
A4	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-II] . . . . .	62
A5	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-III] . . . . .	62
A6	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-IV] . . . . .	63
A7	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 50 $\mu$ g x mL <sup>-1</sup> Rifampicin [Nr. R-I] . . . . .	63

A8	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu\text{M}$ 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 100 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Rifampicin [Nr. R-I] . . . . .	64
A9	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu\text{M}$ 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 200 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Rifampicin [Nr. R-I] . . . . .	64
A10	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu\text{M}$ 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 50 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ Kanamycin [Nr. R-I] . . . . .	65
A11	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 $\mu\text{M}$ 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 0,8 mL DMSO [Nr. R-I] . . . . .	65
A12	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 $\mu\text{M}$ 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 100 h des Versuchs [Nr. R-IV] . . . . .	66
A13	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, vollständiger Versuchszeitraum [Nr. R-V] . . . . .	66
A14	Wachstum von „ <i>A. aromaticum</i> “ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 50 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, vollständiger Versuchszeitraum [Nr. R-VI] . . . . .	67

# Tabellenverzeichnis

1	Zusammensetzung des Mediums für nitratreduzierende Bakterien [1 L] . . .	24
2	Abnahmegeschwindigkeit von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium . . .	47
A1	Vitamin-Mix für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [0,1 L] . . .	57
A2	Spurenelement-Stammlösung (komplexiert) für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [1 L] . . . . .	58
A3	Selenit/Wolfram-Stammlösung für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [1 L] . . . . .	59
A4	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. I bis III] . . . . .	68
A5	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. IV bis VII] . . . . .	69
A6	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. VIII bis K-I] . . . . .	70
A7	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. K-II bis R-II] . . . . .	71
A8	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. R-III bis R-VII] . . . . .	72
A9	Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuch Nr. R-VIII] . . . . .	73

# Abkürzungsverzeichnis

4-HAP	4-Hydroxyacetophenon
Bz	Benzoat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fig.	Figure
H <sub>2</sub> O <sub>mp</sub>	Wasser, filtriert durch 0,2 µM Celluloseacetatmembran
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	Ionenchromatographie
K	Kanamycin
n.a.	Nicht analysiert
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte (vermessen bei 660 nm)
OD <sub>max</sub>	Maximale optische Dichte (vermessen bei 660 nm)
R	Rifampicin
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
Tab.	Tabelle

## Zusammenfassung

Bei aromatischen Verbindungen handelt es sich um die zweithäufigste Gruppe organischer Moleküle in der Natur. Sie kommen beispielsweise als aromatische Aminosäuren vor oder in Form von Lignin und sekundären Pflanzenstoffen. Zusätzlich können sie als Bestandteil von Erdöl und dessen Produkten durch Unfälle in die Natur gelangen. Durch ihr häufiges Vorkommen und ihren Energiegehalt sind sie eine attraktive Kohlenstoff- und Energiequelle für verschiedene Organismen, vor allem für Bakterien. Aufgrund der Stabilität des aromatischen Ringes benötigen diese Organismen jedoch spezielle biochemische Strategien für den Abbau. Eine besondere Schwierigkeit stellt dabei der Abbau aromatischer Verbindungen unter anoxischen Bedingungen dar.

Bei „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 handelt es sich um einen Vertreter des „*Aromatoleum*“/*Azoarcus/Thauera*-Clusters, welcher eine Vielzahl aromatischer Verbindungen unter anoxischen Bedingungen verstoffwechseln kann. Die komplette Sequenzierung und manuelle Annotation des Genoms zeigte, dass für einen Teil dieser Abbauwege die Genexpression über Sensor/Regulator-Systeme kontrolliert wird. Das bedeutet, die in den Abbau involvierten Gene werden nur in Gegenwart des entsprechenden Substrates exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher *in vivo* Schwellenwert überschritten werden muss, um einen Abbauweg „anzuschalten“. 4-Hydroxyacetophenon wurde aufgrund seiner chemischen Eigenschaften und des involvierten Sensor/Regulator-Systems als Modellsubstrat ausgewählt. Um auszuschließen, dass der beobachtete Substratverbrauch auf abiotische Effekte wie beispielsweise Adsorption zurückzuführen ist, wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, bei denen *de novo* Genexpression durch Antibiotika unterdrückt wurde. Basierend auf den vorliegenden Daten konnte der Schwellenwert für 4-Hydroxyacetophenon auf unter 50 nM eingegrenzt werden. Weitere Experimente, die aufgrund der Detektionsgrenze der eingesetzten Analysemethode (HPLC) nicht vollständig ausgewertet werden konnten, deuten an, dass der Schwellenwert möglicherweise unter 10 nM 4-Hydroxyacetophenon liegen könnte.

## Abstract

Aromatic compounds are the second most abundant class of organic molecules in nature. For example, they occur in nature as aromatic amino acids or as plant derived components like lignin or secondary metabolites. Furthermore they are a major component of crude oil and its products and can be released into the environment during accidents. Due to their occurrence in nature and their energy content they are an attractive carbon source for many organisms, especially bacteria. Due to the stability of the aromatic ring these organisms require specific biochemical mechanisms for the degradation of these compounds. Under anoxic conditions, the degradation of aromatic compounds is even more challenging than in the presence of oxygen.

„*Aromatoleum aromaticum*“ strain EbN1 is a member of the so-called „*Aromatoleum*“/*Azoarcus/Thauera*-cluster, which is able to degrade a broad variety of aromatic compounds under anoxic conditions. Complete sequencing of the genome, followed by manual annotation, showed, that some of the degradation pathways are controlled by sensor/regulator-systems. Therefore involved genes are only expressed in the presence of the respective substrate.

The present work investigated which *in vivo* threshold concentration is necessary to activate such a sensor/regulator-system. 4-Hydroxyacetophenone was chosen as model substrate due to its chemical properties and the involved sensor/regulator-system. To exclude that the observed investigations were influenced by abiotic effects like adsorption, experiments were performed to exclude *de novo* gene expression by addition of antibiotics.

Based on the gained data, the threshold concentration of 4-hydroxyacetophenone for the induction of the corresponding sensor/regulator system could be limited to a value of 50 nM. Further experiments, which could not be analyzed completely due to detection limits of the analytical system (HPLC), suggest, that the threshold concentration might be lower than 10 nM.

# 1 Einführung

## 1.1 Aromatische Verbindungen

### 1.1.1 Chemische Eigenschaften

Aromatische Verbindungen bilden eine Untergruppe der Kohlenwasserstoffen und gehören damit zu einer der wichtigsten Klassen organischer Verbindungen [53]. Diese Zuordnung bedeutet, dass aromatische Verbindungen aus Wasserstoff und Kohlenstoff bestehen [53]. Zusätzlich können durch elektrophile aromatische Substitution funktionelle Gruppen angehängt werden, welche nicht aus den genannten Elementen bestehen [53]. Allen aromatischen Verbindungen ist gemein, dass sie aus mindestens einem aromatischen Ringsystem bestehen, welches sechs Kohlenstoffatome und 6 Wasserstoffatome enthält [53]. Dabei sind die Kohlenstoffatome so miteinander verknüpft, dass ein regelmäßiges Sechseck gebildet wird, zusätzlich ist ein Wasserstoffatom an jedem Kohlenstoffatom gebunden [22]. Im Ring bildet sich ein konjugiertes Doppelbindungssystem, das heißt, die  $\pi$ -Elektronen sind ober- und unterhalb des Ringes gleichmäßig verteilt [22]. Die besondere Stabilität des Benzolringes beruht auf den delokalisierten  $\pi$ -Elektronen, deren Anzahl der Hückelregel entsprechen muss ( $4n+2$ ) [22, 53]. Dadurch kommt es zur sogenannten Resonanz-Stabilisierung [53].

### 1.1.2 Vorkommen

Aromatische Verbindungen kommen natürlicherweise in Form der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin in allen Lebewesen vor [16]. Zusätzlich bestehen Pflanzen durch das gebildete Lignin (Hauptbestandteil: Phenylpropan) und sekundären Pflanzenstoffen zu bis zu 25 % aus aromatischen Verbindungen [16]. Des Weiteren sind aromatische Kohlenwasserstoffe wichtige Bestandteile von Erdöl, beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie einfache aromatische Verbindungen wie Benzol, Toluol, Ethylbenzol oder Xylen (zusammengefasst als BTEX) [53]. Die Förderung, der Transport und die Verarbeitung von Erdöl und Erdölprodukten sowie Unfälle bei diesen Prozessen sind in der heutigen Zeit mengenmäßig am wichtigsten für ihren Eintrag in die Umwelt [16, 53].

## 1.2 „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1

### 1.2.1 Allgemeine Eigenschaften

„*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 wurde erstmals im Jahre 1995 beschrieben, nachdem dieser zusammen mit weiteren anaeroben Organismen aus Sedimentproben verschiedener aquatischer Süßwassergewässer aus dem Raum Bremen (u.a. der Weser) isoliert werden konnte [38]. Die Abkürzung EbN1 beschreibt, dass der Organismus mit Ethylbenzol und Nitrat angereichert und isoliert wurde [38]. Es war damit das erste bekannte Bakterium mit der Fähigkeit Ethylbenzol unter anoxischen Bedingungen abbauen zu können [38]. Phylogenetische Analysen zeigten eine Verwandtschaft mit Vertretern der Gattungen *Azoarcus* und *Thauera* [38]. Daher wird EbN1 in das *Azoarcus/Thauera*-Cluster eingeordnet und zählt zu den  $\beta$ -Proteobakterien [38, 52]. Nach der Isolierung des Stammes EbN1 und detaillierter Analyse seiner metabolischen Fähigkeiten, Phylogenie und seines Genoms wurde vorgeschlagen, das Cluster um die Gattung „*Aromatoleum*“ zu erweitern und Stamm EbN1 unter dem Namen „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 in diese Gattung einzugliedern [26]. Eine offizielle taxonomische Beschreibung ist jedoch bislang nicht erfolgt.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten ovale bis stäbchenförmige Einzelzellen mit einer Breite von 0,6 bis 0,8  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 1,5 bis 2,5  $\mu\text{m}$ , welche bei der Kultivierung auf festem Nährmedium ockerfarbene (Agar in anoxischen Röhren) bis hellbraune (Agarplatte) Kolonien mit einer Größe bis zu 2 mm Durchmesser bilden [38, 54]. Wachstum kann bei Temperaturen zwischen 17 und 40 °C beobachtet werden (Optimum 31 °C) [38]. Der pH Bereich, in welchem Wachstum möglich ist, liegt zwischen 6,4 und 8,1, wobei der pH für optimales Wachstum zwischen 7,1 und 7,4 liegt [38]. Der G+C Gehalt beträgt 65 mol% [38].

Besonders hervorzuheben ist die Fähigkeit von „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1, aromatische Verbindungen unter anoxischen Bedingungen abzubauen [38]. Gegenwärtig sind 24 verschiedene aromatische Verbindungen sowie deren anaerobe Abbauwege bekannt [40]. Einige aromatische Substrate, beispielsweise Benzoat oder Benzaldehyd, können auch unter oxischen Bedingungen abgebaut werden [38]. Zudem können auch nicht-aromatische Substanzen wie Succinat, Lactat oder Ethanol unter anoxischen sowie oxischen Bedingungen genutzt werden [38].

## 1.2.2 Genom

Das Genom von „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 wurde vollständig sequenziert und manuell annotiert [39]. Es umfasst 4603 vorhergesagte Proteine, welche auf einem zirkulär geschlossenem Chromosom mit einer Größe von 4,3 Mb und zwei Plasmiden mit 0,21 und 0,22 Mb codiert sind [39]. Durch die Sequenzierung konnten beispielsweise Abbauwege von aromatischen Substraten genauer bestimmt werden, außerdem konnten verschiedene Sensor/Regulator-Systeme identifiziert werden [39, 40].

## 1.3 Abbau aromatischer Verbindungen

Obwohl aromatische Verbindungen in ihren verschiedenen Formen in der Umwelt häufig vorkommen und aufgrund ihres hohen Energiegehaltes prinzipiell attraktive Substrate sind, werden sie nur von vergleichsweise wenigen Organismen zur Energiegewinnung genutzt [16, 40, 53]. Der Hauptgrund dafür ist die hohe Stabilität des aromatischen Ringes, dessen Abbau besondere Strategien erfordert [16, 53]. Die meisten Organismen, die in der Lage sind, aromatische Verbindungen aufzuspalten, lassen sich im Reich der Pilze (nur aerober Abbau) und bei den Bakterien (aerober und anaerober Abbau) finden [16]. In dieser Arbeit wird auf den Abbau aromatischer Verbindungen durch Bakterien eingegangen. Sowohl beim aeroben als auch beim anaeroben Abbau von aromatischen Verbindungen durch Bakterien werden die verschiedenen Aromaten über periphere Reaktionssequenzen zu einem zentralen, aromatischen Intermediat umgewandelt [15]. Erst bei diesem erfolgt dann die Spaltung des aromatischen Ringes und Umwandlung zu Acetyl-CoA, welches beispielsweise im Citratzyklus endoxidiert werden kann (zentraler Stoffwechselweg) [15].

### 1.3.1 Aerober Abbau

Beim Abbau aromatischer Verbindungen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) zum zentralen Intermediat werden verschiedene, teils substratspezifische, Oxygenasen genutzt [15, 35]. In Abhängigkeit vom Typ des Ausgangssubstrates werden unterschiedliche zentrale Intermediate gebildet [15, 16]. So wird Brenzcatechin gebildet, wenn als Ausgangsprodukt beispielsweise Benzol, Benzoat, Toluol, L-Tryptophan oder Anthracen vorliegen [15, 16]. Dabei wird das Ausgangssubstrat durch einen Multienzymkomplex, der zur Klasse der Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen gehört, in einen Vertreter der Arene-*cis*-Dihydrodiolen umgewandelt, indem zwei Sauerstoffatome an den aromatischen Ring angelagert werden [18, 35]. Anschließend wird mittels Dehydrogenierung durch eine *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase Brenzcatechin gebildet [18, 35]. Protochatechuat wiederum entsteht als zentrales Intermediat beim Abbau von Substraten, die häufig bereits eine Hydroxyl-

Gruppe tragen, wie beispielsweise 3-Hydroxybenzoat oder 4-Hydroxybenzoat, durch Flavinmonooxygenasen [14, 16, 50]. Dabei wird ein Sauerstoffatom in das Ausgangssubstrat eingefügt [14, 35]. Weitere zentrale Intermedie beim aeroben Abbau aromatischer Verbindungen sind beispielsweise Gentsat und Homogentsat [15].

Beispielhaft soll im Folgenden der Abbau von Brenzcatechin dargestellt werden (Protocatechuat wird ähnlich abgebaut). Je nach Position der ersten Oxygenierung wird entweder der *ortho*- oder *meta*-Spaltungsweg besprochen [15]. Beim *ortho*-Spaltungsweg erfolgt die Ringspaltung durch das Hinzufügen zweier Sauerstoffatome durch die Catechol-1,2-Dioxygenase, so dass *cis,cis*-Muconat entsteht, welches durch ein Muconat lactonisierendes Enzym zu Muconolacton umgewandelt wird [15]. Durch eine Isomerisierung wird die Doppelbindung umgelagert und es entsteht 4-Oxadipatenollacton [15]. Eine Lactonase synthetisiert im Anschluss die Bildung von  $\beta$ -Keto adipat, auf welches von einem Succinyl-CoA der CoA-Rest übertragen wird [15]. Das aktivierte  $\beta$ -Keto adipyl-CoA wird thiolytisch unter Übertragung eines weiteren CoA-Restes in Succinyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten, wobei das entstehende Succinyl-CoA zur Aktivierung des nächsten  $\beta$ -Keto adipats genutzt wird [15].

Im *meta*-Spaltungsweg erfolgt im ersten Schritt ebenfalls eine Oxygenierung durch die Catechol-2,3-Dioxygenase, so dass 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd entsteht [15]. Von diesem wird hydrolytisch Ameisensäure abgespalten, so dass 2-Oxo-penta-4-enoat entsteht, welches durch die Anlagerung von Wasser in 4-Hydroxy-2-oxo-valerat umgewandelt wird [15]. Im letzten Schritt entsteht aus diesem durch eine Aldolspaltung Acetaldehyd und Pyruvat, welche in den Zentralstoffwechsel eingespeist werden können [15].

### 1.3.2 Anaerober Abbau

Steht kein O<sub>2</sub> zur Verfügung, können aromatische Verbindungen nicht mit der Hilfe von Oxygenasen abgebaut werden [16]. Wie beim aeroben Abbau gezeigt, erfolgt auch beim anaeroben Abbau zuerst die Umwandlung der verschiedenen aromatischen Verbindungen zu einem zentralen Intermediat [15, 16, 40]. Bei diesem handelt es sich in den meisten Fällen um Benzoyl-CoA [16, 40]. Alternativ können auch einige weitere Substrate zu CoA-Thioestern umgewandelt werden, die Ringspaltung erfolgt wie die von Benzoyl-CoA [16, 40]. Beispiele hierfür wären 2-Aminobenzoat bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 oder 3-Hydroxybenzoat bei anderen Bakterien (die Dearomatisierung von 3-Hydroxybenzoyl-CoA bei EbN1 erfolgt ähnlich, jedoch nicht identisch zu der von Benzoyl-CoA) [16, 40]. Eine weitere Gruppe bilden phenolische Substanzen, welche zwei oder mehr Hydroxylgruppen enthalten (in *meta*-Position zueinander angeordnet), wie Resazorin oder Phloroglucin [16]. Bei diesen wird zuerst durch das Hinzufügen einer Hydroxylgruppe der aromatische Ring destabilisiert und

weiter reduziert durch Ferredoxin- oder NADPH-abhängige Reduktasen [16, 42]. Die Ringspaltung erfolgt im Anschluss durch Hydrolasen, schließlich werden durch thiolytische Spaltung Acetyl-CoA-Einheiten gebildet [42].

Da Benzoyl-CoA das bedeutendste zentrale Intermediat im Aromatenabbau darstellt, so auch bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1, wird im Folgenden der anaerobe Abbau von Benzoyl-CoA detailliert dargestellt [15, 16, 40]. Im ersten Schritt erfolgt die Reduktion (Dearomatisierung) von Benzoyl-CoA durch die Benzoyl-CoA-Reduktase unter der Spaltung zweier ATP zu ADP und  $P_i$  [5, 6, 7, 16]. Die dabei freigesetzte Energie wird benötigt, um die vom Ferredoxin bereitgestellten Elektronen auf ein ausreichend negatives Redoxpotential „zu heben“ [16]. Dadurch kommt es zu einer teilweisen Reduktion des aromatischen Ringes, es entsteht Cyclohexadien-Carboxyl-CoA (Dienoyl-CoA) [15, 16, 40]. Der weitere Abbau erfolgt über  $\beta$ -Oxidations-ähnliche Reaktionen [15, 16, 40]. Dabei wird das Dienoyl-CoA durch die Dienoyl-CoA-Hydratase, Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und die Oxoacyl-CoA-Hydrolase in 3-Hydroxypimelyl-CoA umgewandelt [15, 16, 40]. Am Ende erfolgt der Abbau des 3-Hydroxypimelyl-CoA zu drei Acetyl-CoA Molekülen ( $+ CO_2 + 6 [H]$ ) durch  $\beta$ -Oxidation [15, 16].

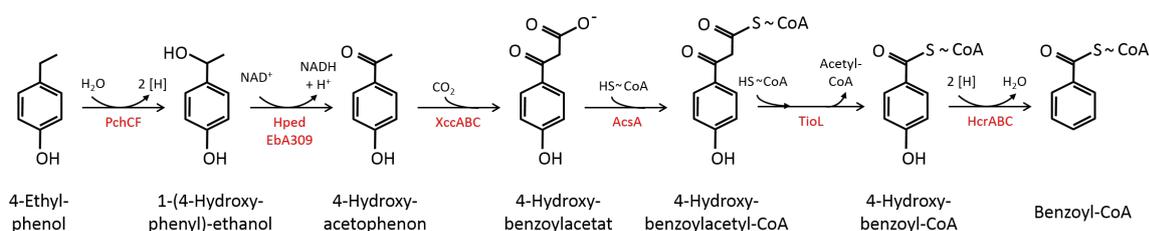
### 1.3.3 Anaerober Abbau von 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon

Für die exemplarische Bestimmung der regulatorisch wirksamen Schwellenwertkonzentration einer aromatischen Verbindung bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 wurde 4-Hydroxyacetophenon ausgewählt. 4-Hydroxyacetophenon ist ein Zwischenprodukt des anaeroben 4-Ethylphenolabbaus, es kann jedoch genau wie 4-Ethylphenol das entsprechende Sensor/Regulator-System aktivieren [40, 55]. Im Gegensatz zu vielen anderen aromatischen Verbindungen, die durch „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 genutzt werden können und für die Sensor/Regulator-Systeme vorgeschlagen wurden (beispielsweise Toluol, *p*-Cresol), scheinen 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon nur an das 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenon Sensor/Regulator-System zu binden [40]. Zusätzlich scheint dieser Sensor/Regulator das einzige System zu sein, an welches sowohl die Ausgangssubstanz als auch ein zugehöriges Abbau-Intermediat binden kann [40]. Bei anderen Aromaten, für die ein Sensor/Regulator-System vorgeschlagen wurde, deuten differenzielle proteomische Daten darauf hin, dass das Sensor/Regulator-System durch dem Effektor strukturell ähnliche Verbindungen, welche jedoch keine Abbau-Intermediate sind, aktiviert werden kann (das Sensor/Regulator-System für Toluol reagiert beispielsweise auf *p*-Cresol) [40]. Im Falle von Ethylbenzol und Acetophenon, welches ein Intermediat des Ethylbenzolabbaus ist, hingegen gibt es separate, spezifische Sensor/Regulator-Systeme für beide Substanzen [40].

Aus diesem Grund haben sich 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon als Substanzen für die Etablierung eines Versuchsdesigns zur Bestimmung der Schwellenwertkonzentration angeboten. Da 4-Ethylphenol in Wasser kaum löslich ist, muss die Zugabe zu einer Kultur über eine Trägerphase (2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan), erfolgen [55]. Dieses 2-Phasen-System führt zu signifikanten analytischen Schwierigkeiten. Bei dem besser wasserlöslichen 4-Hydroxyacetophenon stellt sich dieses Problem nicht. Daher wurde es für die Experimente dieser Arbeit ausgewählt.

### 1.3.3.1 Abbauweg (peripherer Abbau)

4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon werden bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 über den selben Abbauweg zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA abgebaut [55]. Bei 4-Ethylphenol wird dabei durch eine initiale Dehydrogenation durch die 4-Ethylphenolmethylhydroxylase (vorausgesetzt) eine Hydroxylgruppe an die Methylengruppe angelagert, wodurch 1-(4-Hydroxyphenyl)-ethanol gebildet wird [55]. Diese Hydroxylgruppe wird anschließend durch die 1-(4-Hydroxyphenyl)-Ethanoldehydrogenase (strikt (*R*)-spezifisch) oxidiert [9, 25, 55]. Es entsteht 4-Hydroxyacetophenon, an welches durch die 4-Hydroxyacetophenoncarboxylase (vorausgesetzt) eine Carboxylgruppe angefügt wird, so dass 4-Hydroxybenzoylacetat entsteht [55]. Diese Carboxylgruppe wird durch die Acetoacetyl-CoA-Synthetase (vorausgesetzt) mit Coenzym A aktiviert [55]. Im Anschluss wird von dem gebildeten 4-Hydroxybenzoylacetat Acetyl-CoA thiolytisch abgespalten und erneut Coenzym A angelagert, so dass 4-Hydroxybenzoyl-CoA entsteht [55]. Im letzten Schritt erfolgt die reduktive Entfernung der Hydroxylgruppe durch die 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase, wodurch das zentrale Intermediat Benzoyl-CoA gebildet wird (siehe Kapitel 1.3.2) [55].

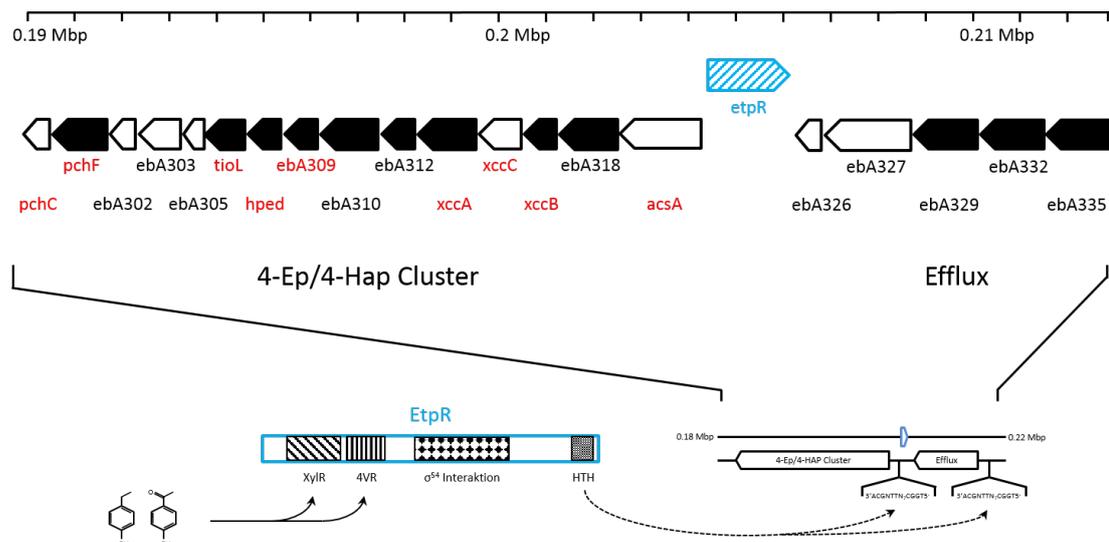


**Abbildung 1. Anaerober Abbauweg von 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenon zum zentralen Intermediat Benzoyl-CoA in „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1.**

Enzymnamen der gezeigten Genprodukte (rot): PchCF = 4-Ethylphenolmethylhydroxylase, Hped = 1-(4-Hydroxyphenyl)-Ethanoldehydrogenase, EbA309 = Ethanoldehydrogenase, XccABC = 4-Hydroxyacetophenoncarboxylase, AcsA = Acetoacetyl-CoA-Synthetase, TioL = Thiolase, HcrABC = 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase; Reaktionsschema übernommen von [55] (Schritte 4-Hydroxybenzoylacetat und 4-Hydroxybenzoylacetatyl-CoA hier ausführlicher dargestellt), mit Anpassungen nach [9, 25].

### 1.3.3.2 Sensor/Regulator-System und Bindestellen am Gencluster

Die Gene, welche die Proteine codieren, die für den Abbau von 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon verantwortlich sind, sind in einem 15 kbp großen katabolen Gencluster angeordnet (Fig. 2) [10]. In direkter Nachbarschaft befindet sich ein Gencluster für ein vorhergesagtes Effluxsystem, wahrscheinlich für 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon [10, 55]. Beide Aromaten wirken bei höheren Konzentrationen zytotoxisch [40, 55]. Ein Aufnahmesystem hingegen ist nicht notwendig, da die beiden Verbindungen aufgrund ihrer Hydrophobizität frei in die Zelle diffundieren können [40]. Das Gen für das Sensor/Regulator-Protein (EtpR) ist zwischen beiden Genclustern lokalisiert [10, 55]. Die essentielle Bedeutung von EtpR wurde durch knockout Mutagenese nachgewiesen [10]. Zu diesen molekular-genetischen Arbeiten habe ich durch physiologische Experimente beigetragen [10]. Diese befassten sich vor allem mit der Aufnahme von 4-Ethylphenol in Gegenwart von Kanamycin und der Kultivierung der Deletionsmutante  $\Delta etpR$  und der entsprechenden Komplementationsmutante mit verschiedenen Substraten und Substratgemischen [10].



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung des Genclusters für den Abbau von 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenon, dem Sensor/Regulator und dem Effluxsystem bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 inklusive der vorgeschlagenen Funktionsweise des Sensor/Regulator-Proteins und seiner Bindestellen an der DNA.

Die Skala gibt die Lokalisation der Gene im Chromosom anhand ihrer Nukleotidposition an; Im Gencluster rot markierte Gene codieren die Enzyme, welche am 4-Ethylphenol/4-Hydroxyacetophenonabbau beteiligt sind; blau markiert ist der Sensor sowie das für ihn codierende Gen; Abbildung übernommen von [55] (Gencluster) und [40] (Sensor/Regulator-Protein mit Bindestellen in der DNA), mit Anpassungen nach [9, 10, 25].

EtpR ist ein  $\sigma^{54}$ -abhängiges Sensor/Regulator-System [10, 40]. Es besitzt zwei Bindestellen für 4-Ethylphenol und 4-Hydroxyacetophenon (XylR = transkriptionelles Regulatorprotein, 4VR = 4-Vinylreduktase), eine Bindestelle für den  $\sigma^{54}$ -Faktor und die DNA-Bindestelle mit Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) [40]. Nach der Bindung von 4-Ethylphenol oder 4-Hydroxyacetophenon und des  $\sigma^{54}$ -Faktors zu den jeweiligen Bindestellen, kann sich das aktivierte Sensor/Regulator-System an die entsprechenden DNA-Bindestellen anlagern und die Transkription der beiden Gencluster aktivieren [40]. Es ist dabei für die Aktivierung unerheblich, ob 4-Ethylphenol oder 4-Hydroxyacetophenon vorliegt [40]. In dieser Untersuchung sollte für 4-Hydroxyacetophenon auf der Basis von *in vivo* Versuchen abgeleitet werden, welche Effektkonzentration für die Wirksamkeit von EtpR erreicht werden muss (Schwellenwert).

### 1.4 Schwellenwertkonzentration

Eine Schwellenwertkonzentration wird als die „Konzentration eines Signalstoffs, oberhalb (oder unterhalb) der eine spezifische Zellreaktion (z.B. die Aktivierung eines Gens) ausgelöst wird“ [45] definiert. Bei Bakterien kann ein Schwellenwert so beispielsweise als die niedrigste in der Umwelt vorliegende Konzentration eines bestimmten Stoffes angesehen werden, durch die ein Sensor-/Regulator-System aktiviert wird und somit das Ablesen des für die Aufnahme und Abbau des entsprechenden Stoffes vorhandene Gencluster induziert wird.

Zu Substratschwellenwerten, insbesondere bei anaeroben Bakterien, liegen nur wenige Daten vor. Ein Grund dafür mag sein, dass der Schwerpunkt vieler Studien darauf liegt, Mikroorganismen zu identifizieren, die möglichst große Mengen eines Stoffes umsetzen können und ein bestimmtes Produkt liefern. Genetische Untersuchungen wiederum beschäftigen sich vor allem damit, Gene oder Gencluster zu identifizieren, welche es dem Bakterium ermöglichen, einen bestimmten Stoff umzusetzen. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, werden in den meisten Untersuchungen Konzentrationen verwendet, welche deutlich über den in der Umwelt vorkommenden liegen. Zuletzt war es lange Zeit nur schwer möglich war, Konzentrationen zu bestimmen, welche in den Bereich von Schwellenwertkonzentrationen fielen. Die Entwicklung immer neuer Analysemethoden und die Verbesserung bereits bestehender Methoden ermöglichen es mittlerweile, Konzentrationen einfacher und genauer zu bestimmen. Wenn diese Entwicklung anhält, wird es vermutlich in Zukunft dazu kommen, dass die Untersuchung von Schwellenwertkonzentrationen weiter ansteigt. Dies kann besonders wichtig im Hinblick auf Stoffe sein, welche bereits in sehr geringen Konzentrationen toxische Auswirkungen in der Umwelt verursachen.

## 1.5 Hemmung der Genexpression/Proteinbiosynthese

### 1.5.1 Rifampicin als Transkriptionshemmer

Rifampicin wurde für diese Arbeit ausgewählt, da es sehr wirksam die Transkription hemmt. Rifampicin (oder Rifampin) zählt durch seine chemische Struktur zur Klasse der Ansamycine, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die namensgebende Ansabrücke eine aromatische Struktur (bei Rifampicin den Naphtholring) überspannt [3, 11]. Die Rifamycine, wie die Gruppe der Ansamycine genannt werden, zu denen Rifampicin zählt, umfassen dabei die Antibiotika, welche von *Amycolatopsis mediterranei* (seit 1986 [33]; Erstbeschreibung 1957 als „*Streptomyces mediterranei*“ [43], Reklassifizierung als *Nocardia mediterranei* 1969 [48]) und *Amycolatopsis rifamycina* (eigenständige Art seit 2004 [4], vorher *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095) produziert werden oder aus diesen hergestellt werden können [51]. Rifampicin, welches über mehrere Zwischenschritte aus Rifamycin B hergestellt werden kann, wurde 1965 entdeckt und ab 1968 zu therapeutischen Zwecken eingesetzt [43]. Es ist bis heute ein wichtiges Antibiotikum bei der Behandlung von Tuberkulose, aufgrund seiner guten Wirksamkeit gegen ein weites Spektrum Gram-positiver sowie Gram-negativer Bakterien findet es jedoch auch in anderen Bereichen wie beispielsweise bei Untersuchungen zur DNA-abhängigen RNA-Polymerase seine Anwendung [17, 43, 51].

Generell kann Rifampicin von Bakterien durch Diffusionsprozesse aufgenommen werden [11]. Bei Gram-negativen Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* kann es aufgrund der chemischen Eigenschaften von Rifampicin (moderate bis hohe Hydrophobizität;  $M_r = 823 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ) jedoch vorkommen, dass besonders die Diffusion durch die äußere Membran erschwert wird [21, 37]. Aus diesem Grund werden für Gram-negative Bakterien häufig höhere Mengen an Rifampicin benötigt, um einen hemmenden Effekt zu erzielen [17]. Ist die äußere Membran jedoch überwunden, kann Rifampicin die Peptidoglykanschicht und das Periplasma ungehindert passieren und durch passive Diffusion durch die Cytoplasmamembran in das Cytoplasma gelangen [21]. Anschließend lagert es sich in einer Bindungstasche (nicht aktives Zentrum) der  $\beta$ -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase an diese an [11, 23]. Eine vollständige Inhibierung der Transkription durch Rifampicin kann jedoch nur erfolgen, wenn Rifampicin vorhanden war, bevor der Transkriptionsprozess in Gang gesetzt wurde [11, 24, 44]. Rifampicin verhindert nicht die Anlagerung der DNA-abhängige RNA-Polymerase an die Promotorregion der DNA und die Bildung des Holoenzymes, sondern greift in die Elongation des mRNA-Stranges ein, sobald die erste (seltener nach der zweiten) Phosphodiesterbrücke gebildet wird, so dass die Verlängerung der mRNA unterbunden wird [24, 34, 44].

## 1.5.2 Kanamycin als Translationshemmer

Kanamycin findet in der Wissenschaft häufig Verwendung, um in die Proteinbiosynthese von Bakterien einzugreifen und die Produktion neuer Proteine zu unterdrücken, ohne dass die Zellintegrität zerstört wird.

Kanamycin wird von *Streptomyces kanamyceticus* gebildet und zählt zur Klasse der Aminoglykoside [46, 49]. Bei den Vertretern dieser Klasse handelt es sich um aus Zuckern aufgebaute Moleküle, welche zusätzlich Amino- und Hydroxygruppen tragen [30]. Wie Aminoglykosiden, insbesondere Kanamycin, über die Zellhülle ins Cytoplasma gelangen, ist nicht vollständig geklärt [21, 47]. Für Gram-negative Bakterien hat sich bei Versuchen mit Streptomycin und Gentamicin gezeigt, dass sich diese nach der Zugabe innerhalb kürzester Zeit an anionischen Bindestellen an der Außenseite der äußeren Membran anlagern und anschließend entweder durch Porene Diffusion oder durch einen selbst-induzierten Transportmechanismus aufgenommen werden und in das Periplasma gelangen [19, 20, 21, 47]. Der genutzte Mechanismus scheint dabei artabhängig zu sein [20, 21, 47]. Der anschließende irreversible Transport durch die Cytoplasmamembran erfolgt in zwei energieabhängigen Phasen (EDP = energy dependent phase), wobei die langsame Aufnahmephase EDPI von der schnelleren Aufnahmephase EDPII gefolgt wird [8, 20, 21, 47]. Die benötigte Energie wird dabei vermutlich durch den Protonengradienten bereitgestellt [20]. Anschließend binden Aminoglykoside nahe der A-Stelle der 16S rRNA [30, 41, 56]. Nach der Bindung kommt es zu einer Änderung der Struktur der A-Stelle, wodurch die Codon-Anticodon-Interaktion gestört und dadurch die Verlängerung der Proteinkette verhindert wird [30, 46]. Zusätzlich führt die Anwesenheit von Aminoglykosiden häufig zu einem fehlerhaften Ablesen des genetischen Codes, was die Proteinbiosynthese zusätzlich erschwert [13]. Es hat sich gezeigt, dass dieser Prozess konzentrationsabhängig ist und durch den Einsatz höherer Konzentrationen verstärkt wird [13].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismus

Die Experimente wurden mit dem Bakterium "*Aromatoleum aromaticum*" Stamm EbN1 durchgeführt. Die Ausgangskultur bildete ein Glycerolstock aus dem Jahr 2000. Aus diesem Glycerolstock wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  mit anaeroben Medium für nitratreduzierende Bakterien (4 mM Benzoat, 7 mM Nitrat) in Schraubdeckelröhrchen (10 mL Medium) angesetzt. Die Anpassung auf das verwendete Substrat erfolgte über 5 Passagen im Röhrchen (15 mL Medium). Anschließend wurde ein Upscaling auf 80 mL und 200 mL Flaschen vorgenommen. Ausgehend von diesen und folgenden Passagen wurden Kulturen zum Inokulieren der Experimente angesetzt. Kulturen, welche die maximale optische Dichte (OD) erreicht hatten, wurden bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2 Medium

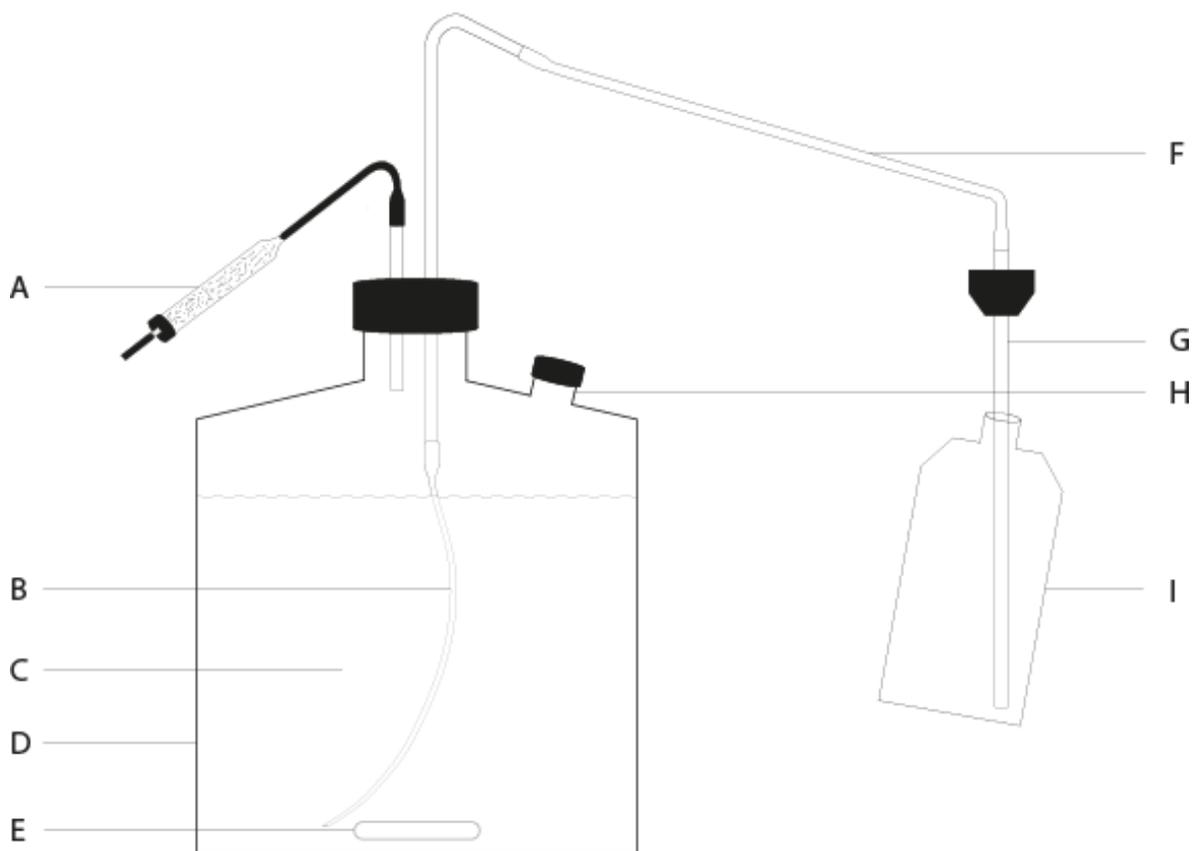
#### 2.2.1 Zusammensetzung und Herstellung

Das Medium für nitratreduzierende Bakterien (NM) wurde in  $H_2O_{mp}$  angesetzt (Tab. 1, 1. Schritt). Soweit nicht anders gekennzeichnet wurden in dieser Arbeit Chemikalien mit Analysegrad von Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder einem anderen Hersteller mit gleichem Analysegrad verwendet.  $NaNO_3$  wurde entsprechend der benötigten Endkonzentration (7 mM  $NaNO_3$ :  $0,6 \text{ g} \times L^{-1}$ , 10 mM  $NaNO_3$ :  $0,85 \text{ g} \times L^{-1}$ ) zugegeben oder nach dem Autoklavieren aus einer sterilen Stammlösung hinzugefügt. Zur einfacheren Handhabung wurde eine zehnfach konzentrierte Lösung hergestellt und vor dem Autoklavieren mit  $H_2O_{mp}$  zu einer einfach konzentrierten Lösung verdünnt.

Zur Anaerobisierung wurde das Medium in einer Glasflasche (1, 2 oder 5 L Volumen) für 25 min bei 121 °C autoklaviert. Sobald das Medium auf 80 °C abgekühlt war, wurde die Glasflasche aus dem Autoklav entnommen und für 10 bis 15 min mit  $N_2$  begast, um Restsauerstoff aus der Gasphase zu entfernen und eine anoxische Atmosphäre zu schaffen. Nach Abkühlung des Mediums auf Zimmertemperatur erfolgte die Zugabe der restlichen Komponenten (Tab. 1, 2. Schritt) in der aufgeführten Reihenfolge aus sterilen Stammlösungen.

**Tabelle 1. Zusammensetzung des Mediums für nitratreduzierende Bakterien [1 L].**

1. Schritt		2. Schritt	
Chemikalie	Einwaage [g]	Stammlösung	Volumen [mL]
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,1	Vitamin B12	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	Vitamin-Mix	1
NH <sub>4</sub> Cl	0,3	Spurenelemente (komplexiert)	1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5	Selenit/Wolfram Lösung	1
NaNO <sub>3</sub>	variabel	NaHCO <sub>3</sub> (1M)	40
		HCl (2 M)	variabel
		Ascorbat (1 M)	4



**Abbildung 3. Schematischer Aufbau einer Medienflasche mit Abfüllvorrichtung.**

A: Gaszufluss durch steriler Filterwatte; B: Steigrohr und Förderschlauch für Medium; C: steriles Medium; D: Widdelflasche; E: Magnetrührstab; F: Anschlusssystem für Abfüllstab; G: Abfüllstab; H: Zugabeöffnung für Medienzusätze; I: sterile Achteckflasche

Vor der Zugabe des Carbonatpuffers wurde die Begasung von  $N_2$  auf  $N_2/CO_2$  (90%/10%) umgestellt, um ein Ausgasen ( $CO_2$ ) des Carbonatpuffers zu vermeiden. Nach dessen Zugabe wurde der pH überprüft und mit HCl auf 7,2 bis 7,3 eingestellt. Anschließend wurde die Ascorbat-Stammlösung zugegeben.

Im Anschluss wurden die Flaschen mit Hilfe des angeschlossenen Abfüllstabes bis zu einer markierten Höhe befüllt (Fig. 3). Die befüllten Flaschen wurden sofort für 60 bis 90 s mit  $N_2/CO_2$  (90%/10%) begast und anschließend mit einem sterilen Nitrilkautschukstopfen verschlossen. Nach Verschließen konnte das für das Einstellen der gewünschten Konzentration benötigte Volumen an Benzoat, 4-Hydroxyacetophenon oder Nitrat unter Zuhilfenahme von Spritzen aus sterilen Stammlösungen zugefügt werden.

## 2.2.2 Substrate

Für die Untersuchung der Schwellenwertkonzentration wurde eine zweistufige Versuchsanordnung genutzt. Als Grundsubstrat diente Benzoat ( $C_7H_5O_2$ ), in Konzentrationen (Vorexperimente) von 1 bis 0,125 mM. Nitrat ( $NO_3^-$ ) war in einer Konzentration von 10, 7 oder 5 mM vorhanden. In den Hauptexperimenten wurden 0,125 mM Benzoat und 5 mM Nitrat verwendet. Für die Einstellung der Benzoatkonzentration wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 M, 0,25 M oder 0,1 M verwendet, welche separat steril angesetzt wurden. Die Konzentration der sterilen Nitratlösung betrug 1 M.

Als Testsubstrat für die Bestimmung der Schwellenwertkonzentration wurde 4-Hydroxyacetophenon ( $C_8H_8O_2$ ) verwendet. Die eingesetzte Konzentration variierte von 1 mM bis 10 nM, die Konzentrationen der genutzten Stammlösungen reichten von 0,1 M bis 1  $\mu$ M. Die Stammlösungen wurden, ausgehend von einer 0,1 M Stammlösung, schrittweise im Verhältnis 1 zu 10 mit  $H_2O_{mp}$  verdünnt. Alle Stammlösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

## 2.2.3 Antibiotika

Für die Inhibierungsexperimente wurden Kanamycin und Rifampicin verwendet. Für die Kanamycin-Stammlösung ( $0,02 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$ ) wurde Kanamycinsulfat in  $H_2O_{mp}$  gelöst, sterilfiltriert und in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Zum Ansetzen der Rifampicin-Stammlösung ( $0,1 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$ ) wurden 5 mL steriles Dimethylsulfoxid auf 0,5 g Rifampicin (gebrauchsfertig abgewogen in Braunglasflasche,  $\geq 90\%$ , Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend erfolgte das Aliquotieren in sterile Reaktionsgefäße, welche mit Aluminiumfolie ummantelt waren, um den Kontakt mit Licht zu minimieren. Die Stammlösungen wurden bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert und erst kurz vor der Zugabe zum Medium aufgetaut.

## 2.3 Versuchsaufbau

### 2.3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Um die Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon zu identifizieren, wurde in Wachstumsexperimenten untersucht, ob die Zugabe von verschiedenen 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen zu benzoatadaptierten Kulturen eine physiologische Antwort auslöst. Letztere wurde an Hand folgender Parameter untersucht: optische Dichte und Konzentration von 4-Hydroxyacetophenon. Zusätzlich wurde analysiert, ob Intermediate des 4-Hydroxyacetophenonabbaus im Medium nachgewiesen werden konnten.

Für die Versuche wurden Achteckflaschen mit einem Gesamtvolumen von 500 mL (davon 400 mL Medium) oder 200 mL (Gesamtvolumen: 250 mL) verwendet. Das Experiment setzt sich aus zwei Phasen zusammen: der Anzuchtphase und der Testphase.

Für die Anzuchtphase wurde das Benzoat-haltige Medium mit 3% (v/v) einer seit maximal einem Tag durchgewachsenen Vorkultur (NM, 2 mM Benzoat, 10 mM  $\text{NO}_3^-$ ) angeimpft. Die Nitratkonzentration im Medium wurde so gewählt, dass das Wachstum durch die Kohlenstoffquelle limitiert war. Anschließend wurde die optische Dichte bestimmt und Proben für die Bestimmung der Benzoatkonzentration entnommen, bis die Kultur ihre maximale optische Dichte erreicht hatte, welche mit dem vollständigen Verbrauch von Benzoat sowie eventuell gebildeten Intermediaten übereinstimmt.

Nach Erreichen der maximalen optischen Dichte wurde 4-Hydroxyacetophenon zugegeben und die Entwicklung der optischen Dichte sowie die Veränderung der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Kulturüberstand untersucht. Bei hohen Konzentrationen von 4-Hydroxyacetophenon ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) wurde zu diesem Zeitpunkt bei einigen Experimenten zusätzlich Nitrat nachgegeben, um eine Nitratlimitation auszuschließen.

Kanamycin wurde zum selben Zeitpunkt wie 4-Hydroxyacetophenon hinzugegeben. Rifampicin wurde hingegen bereits 30 min vor der Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon zugegeben. Die Messintervalle wurden in Abhängigkeit der Substratkonzentration im Medium gewählt. Um abiotische Einflüsse auf die Substratkonzentration auszuschließen, wurden nicht inokulierte Kontrollen mitgeführt und beprobt.

### 2.3.2 Anpassungen

Während der Etablierung des Versuchsaufbaus unterlag dieser einiger Veränderungen. Dies betraf beispielsweise die Anzahl und die Behandlung mitgeführter Kontrollen, den Zeitpunkt der Zugabe verschiedener Substanzen und die Anzahl von Replikaten. Eine Übersicht über die einzelnen Versuche findet sich im Anhang.

### 2.3.3 Probennahme

Zu jedem Messzeitpunkt wurden 1 bis 3 mL Kulturflüssigkeit pro Flasche steril mit Einmalspritzen entnommen. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 660 nm (UV-vis Spectrometer 1240; Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Für die Bestimmung der Substrat- und Intermediatskonzentration im Medium wurden 1 bis 2 mL Kulturflüssigkeit abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm/20817 g; 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Kulturüberstand wurde in Einmalreaktionsgefäße überführt und anschließend direkt bearbeitet oder eingefroren und bei -20 °C bis -50 °C bis zur Probenaufarbeitung gelagert.

## 2.4 Chromatographische Analysen

### 2.4.1 HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde genutzt, um die Konzentration der Substrate Benzoat und 4-Hydroxyacetophenon im Kulturüberstand zu bestimmen. Eingesetzt wurden UltiMate 3000 RSLC Systeme (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), welche durch ihre Ausstattung entweder für die Bestimmung von 4-Hydroxyacetophenon  $>$  oder  $<$  1  $\mu\text{M}$  geeignet waren. Die applizierte Methoden ermöglichten es außerdem, im selben Analyseschritt Intermediate wie 4-Hydroxybenzoate nachzuweisen und zu quantifizieren.

Für die Analyse von Wachstumsexperimenten mit 1  $\mu\text{M}$ -1 mM 4-Hydroxyacetophenon wurden ausgewählte Proben im Verhältnis 1:5 verdünnt und angesäuert (6 % Acetonitril, pH 2,0) und anschließend sterilfiltriert (regenerierte Cellulose oder Polytetrafluorethylen; 0,2  $\mu\text{m}$ ). Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten als Doppelinjektion aus dem vorbereiteten Ansatz, die Temperatur des Autosamplers betrug 20 °C. Für die Auftrennung der einzelnen aromatischen Komponenten wurde eine Acclaim 120 C18 reversed-Phase Trennsäule (Länge: 250 mm, innerer Durchmesser: 2,1 mm, Partikelgröße des Packmaterials: 5  $\mu\text{m}$ ; Thermo Fisher Scientific) verwendet, welche während der Analyse auf 25 °C temperiert war. Die Analyse wurde mit einem nicht-linearen Gradienten (5-90% Acetonitril) bei einer Flussrate von 0,5 mL  $\times$  min<sup>-1</sup> durchgeführt. Während der Analyse wurden Laufmittel A (5% Acetonitril, pH 2,8) und Laufmittel B (90% Acetonitril, pH 3,2) nach folgendem Schema automatisch vermischt, um die gewünschte Acetonitrilkonzentration zu erhalten. Es ist jeweils angegeben, welcher Anteil von Laufmittel B eingesetzt wurde: 0,0-2,0 min 0,2%, 2,0-3,0 min 0,2-10,0%, 3,0-13,5 min 10,0-40,0%, 13,5-16,5 min 40,0-99,8%, 16,5-19,5 min 99,8%, 19,5-22,5 min 99,8-0,2%, 22,5-24,5 min 0,2%.

Die Retentionszeit von Benzoat lag bei 11,8 min (236 nm), die von 4-Hydroxyacetophenon bei 9,4 min (260 nm). Des weiteren wurden 4-Hydroxybenzoat bei 7,3 min (270 nm), 4-Hydroxybenzaldehyd bei 8,7 min (270 nm), *p*-Cresol bei 13,7 min (220 nm) und 4-Ethylphenol bei 16,7 min (220 nm) detektiert.

Bei Wachstumsexperimenten mit  $< 1 \mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon wurden die unverdünnten Proben angesäuert (1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 20-40  $\mu\text{L}$  pro 1000  $\mu\text{L}$  Probe) und sterilfiltriert (Polytetrafluorethylen, 0,2  $\mu\text{m}$ ). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte als Doppelinjektionen je Probe, der Autosampler hatte eine konstante Temperatur von 20 °C. Da die Proben nahezu unverdünnt vermessen wurden, wurde nach Proben, die Rifampicin enthielten, ein separater Waschschritt durchgeführt. Die Auftrennung der aromatischen Komponenten erfolgte mit einer Accucore C18 reversed-Phase Trennsäule (Länge : 150 mm; innerer Durchmesser: 1 mm, Partikelgröße des Packmaterials: 3  $\mu\text{M}$ ; Thermo Fisher Scientific) bei einer Flussrate von 0,1 mL  $\times$  min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 35 °C. Die verwendeten Laufmittel entsprachen in ihrer Zusammensetzung denen, die für die Analyse mit der Acclaim 120 C18 reversed-Phase Trennsäule eingesetzt wurden. Der Gradient verlief wie folgend angegeben (Prozentangabe entspricht dem Anteil von Laufmittel B): 0,0-2,5 min 3,0%, 2,5-6,5 min 3-65%, 6,5-7,5 min 65,0-99,0%, 7,5-9,0 min 99,0%, 9,0-11,0 min 99,0-3,0%, 11,0-16,0 min 3,0%.

Benzoat konnte bei einer Retentionszeit von 8,7 bis 9,2 min (229 nm) nachgewiesen werden, die Retentionszeit von 4-Hydroxyacetophenon lag zwischen 5,7 und 6,5 min (275 nm). Zusätzlich konnten 4-Hydroxybenzoat bei 2,7 min (255 nm), 4-Hydroxybenzaldehyd bei 4,5 min (275 nm), *p*-Cresol bei 9,8 min (220 nm) und 4-Ethylphenol bei 10,7 min (220 nm) detektiert werden.

### 2.4.2 IC

Ionenchromatographie (IC) wurde genutzt, um die Konzentrationen von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) und Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) zu bestimmen. Für die Analyse wurde ein ICS 1100 Ionenchromatographiesystem (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welches mit einer IonPac™ AG9-HC Separationssäule (Länge: 250 mm, innerer Durchmesser: 4 mm, Partikelgröße des Packmaterials: 9  $\mu\text{m}$ ; Thermo Fisher Scientific) ausgestattet war. Die Trennung von Nitrat und Nitrit erfolgte mit einem isokratischen Natriumcarbonatgradienten (9 mM) bei einer Flussrate von 1 mL  $\times$  min<sup>-1</sup> und einer Säulentemperatur von 25 °C. Vor der Analyse wurden die Proben mit  $\text{H}_2\text{O}_{mp}$  im Verhältnis 1:5 verdünnt. Jede Probe wurde doppelt vermessen (Doppelinjektion), der Autosampler war auf 15 °C temperiert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm, Nitrat konnte bei einer Retentionszeit von 10,8 bis 13,6 min nachgewiesen werden, Nitrit bei 7,6 bis 9,1 min.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Optimierung des Versuchdesigns

Für die Bestimmung der Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon bei „*Aromatoleum aromaticum*“ Stamm EbN1 wurden zweiphasige Wachstumsexperimente durchgeführt. Die Anzuchtphase diente dazu, „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit einer einzelnen aromatischen Referenzkohlenstoffquelle, hier Benzoat, anzuziehen und eine Kultur mit einer ausreichend hohen Zelldichte für die eigentliche Testphase zu erhalten. Dabei war es wichtig, dass die Kultur während der Anzuchtphase erkennbares Wachstum im Sinne von Biomasseproduktion, nachweisbar über den Anstieg der optischen Dichte, aufwies. Es konnte mittels der HPLC-Analyse nachgewiesen werden, dass der Zeitpunkt, an welchem die maximale optische Dichte erreicht wurde, identisch mit dem Zeitpunkt war, an welchem Benzoat entweder im Medium nicht mehr nachweisbar war oder die Konzentration auf einem sehr niedrigen Niveau stagnierte. Daher konnte nach dem Erreichen der maximalen optischen Dichte die eigentliche Testphase mit der Zugabe von 4-Hydroxyacetophenons begonnen werden. Die Benzoatkonzentration sollte jedoch auch so niedrig gewählt werden, dass die Zelldichte nicht zu hoch war, da sonst nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das 4-Hydroxyacetophenon nicht nur durch biologische Prozesse sondern durch passive Elimination (beispielsweise Anheftung an äußere Zellmembran) aus dem Medium entfernt wird. Aus diesem Grund wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um das endgültige Testdesign zu bestimmen. Im Anschluss sollte unter Verwendung ausgewählter Antibiotika, welche die Genexpression/Proteinsynthese verhindern, geprüft werden, ob die beobachteten Prozesse tatsächlich biologischen Ursprungs waren.

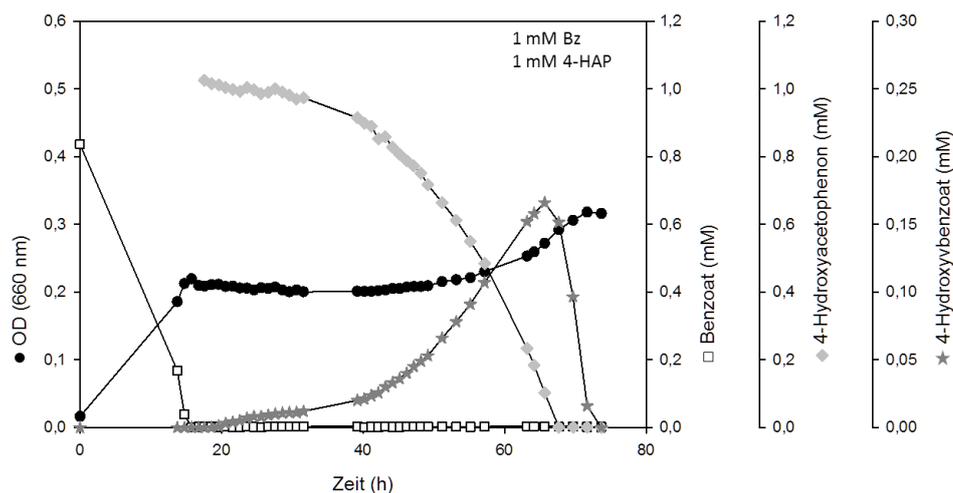
Die Bestimmung des Wachstums über die optische Dichte erfolgte in Triplikaten, zusätzlich wurde bei einem der Triplikate die Substratkonzentration im Medium mittels HPLC bestimmt. Im Appendix (Kapitel A.3) sind alle durch HPLC (Benzoat, 4-Hydroxyacetophenon) oder IC (Nitrat) ermittelten Startwerte unter der entsprechenden Nummer des Experimentes aufgeführt. Zur vereinfachten Unterscheidung wurden die Experimente wie folgt aufgeteilt: Die Experimente Nr. I bis Nr. X umfassen die Experimente, welche zur Einstellung der optimalen Benzoatkonzentration durchgeführt wurden (Kapitel 3.1.1). Die Experimente, bei welchen Antibiotika zugegeben wurde, sind entsprechend des verwendeten Antibiotikums

aufgeteilt. Unter den Versuchen mit den Nummern K-I bis K-IV sind die Experimente aufgeführt, bei welchen Kanamycin verwendet wurde (Kapitel 3.1.2.1). Wurde hingegen Rifampicin verwendet, sind die Experimente mit einem „R“ gekennzeichnet (Nr. R-I bis Nr. VIII, Kapitel 3.1.2.2). Diese Experimente wurden zudem genutzt, um die Schwellenwertkonzentration einzugrenzen (Kapitel 3.2).

### 3.1.1 Einstellung der Benzoatkonzentration

Die ersten vier Experimenten wurde mit 1 mM Benzoat und 1 mM bis 10  $\mu$ M 4-Hydroxyacetophenon durchgeführt (Fig. 4, A1, A2, A3). Es wurde außerdem getestet, welche Nitrat-Startkonzentration nötig war: Dafür waren 10 oder 7 mM Nitrat im Medium beim Inokulieren vorhanden, es wurden zudem 5 mM Nitrat am Start der Testphase zugegeben. Diese schrittweise Zugabe erfolgte, da Nitrat in hohen Konzentrationen toxisch wirken und das Wachstum negativ beeinflussen kann.

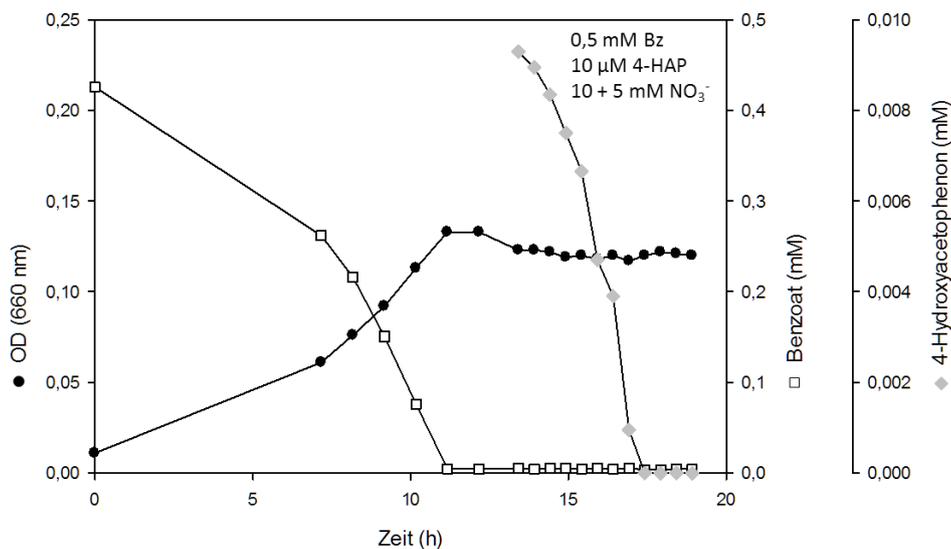
In den Experimenten mit 1 mM 4-Hydroxyacetophenonkonzentration (Fig. 4, A1), zeigte sich, dass zeitgleich mit dem Verbrauch von 4-Hydroxyacetophenon ein Anstieg einer zweiten aromatischen Substanz nachweisbar war. Aufgrund von Retentionszeit und Absorptionsspektrum wurde diese als 4-Hydroxybenzoat identifiziert. Mit 0,164 bis 0,166 mM wurde die maximale Konzentration erreicht, wenn kein 4-Hydroxyacetophenon mehr nachweisbar war. Anschließend sank die Konzentration von 4-Hydroxybenzoat rasch ab und war nach 4 bis 8 h nicht mehr nachweisbar.



**Abbildung 4. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. I].**

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM); ★, 4-Hydroxybenzoat (mM).

In den Experimenten mit geringeren 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen war keine relevante Akkumulation eines Intermediates nachweisbar (Fig. A2, A3). Ein Anstieg der optischen Dichte nach Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons war in Experimenten sichtbar, bei denen mindestens 100  $\mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon zugegeben wurde. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Induktionsphase nur bei einer 4-Hydroxyacetophenonkonzentration von 1 mM beobachtet werden konnte.



**Abbildung 5.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat, 10  $\mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon und der zusätzlichen Zugabe von Nitrat (5 mM) [Nr. V].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

Im nächsten Schritt wurde die Benzoatkonzentration auf 0,5 mM abgesenkt, um die Zelldichte zu Beginn der Testphase zu verringern. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe von Nitrat am Beginn der Testphase bei verringerter Benzoatkonzentration notwendig war. Da die Experimente Nr. V (zusätzliche Gabe von 5 mM  $\text{NO}_3^-$ , Fig. 5) und Nr. VI (keine zusätzliche  $\text{NO}_3^-$ -Gabe, Fig. 6) nur minimale Unterschiede aufwiesen, wurde bei den folgenden Experimenten auf die zusätzliche Gabe von Nitrat verzichtet. Es zeigte sich außerdem durch die Analyse der Nitrat- und Nitritkonzentration im Medium mittels IC, dass ein Großteil des zugegebenen Nitrats nicht genutzt wurde. Daher wurde für alle folgenden Experimente 5 mM Nitrat eingesetzt.

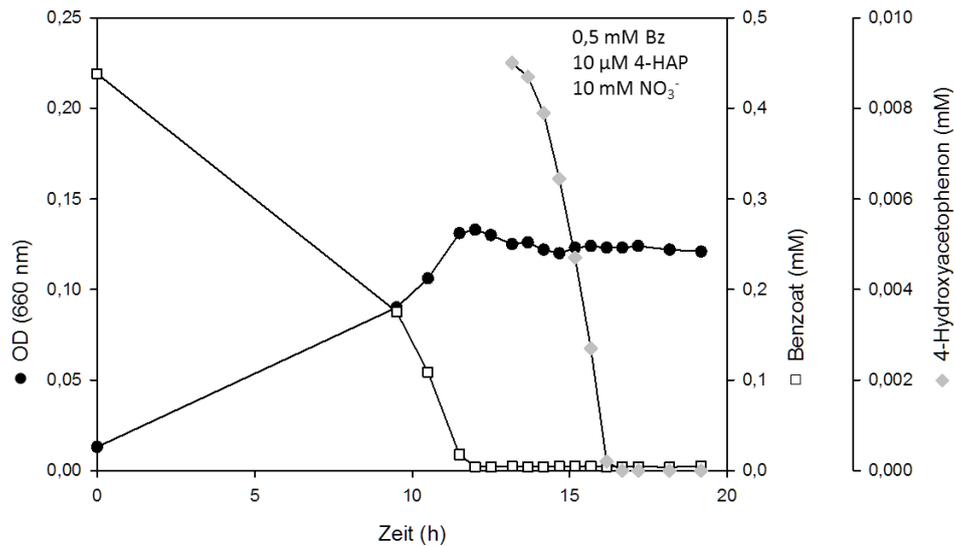


Abbildung 6. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat, 10 µM 4-Hydroxyacetophenon ohne zusätzliche Zugabe von Nitrat [Nr. VI].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

In den Experimenten Nr. VII bis Nr. IX (Fig. 7, 8, 9) sind die Auswirkungen von veränderten Benzoat-Startkonzentrationen auf das Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 dargestellt. Die während der Testphase zugegebene angestrebte 4-Hydroxyacetophenonkonzentration betrug bei allen Experimenten 0,001 mM.

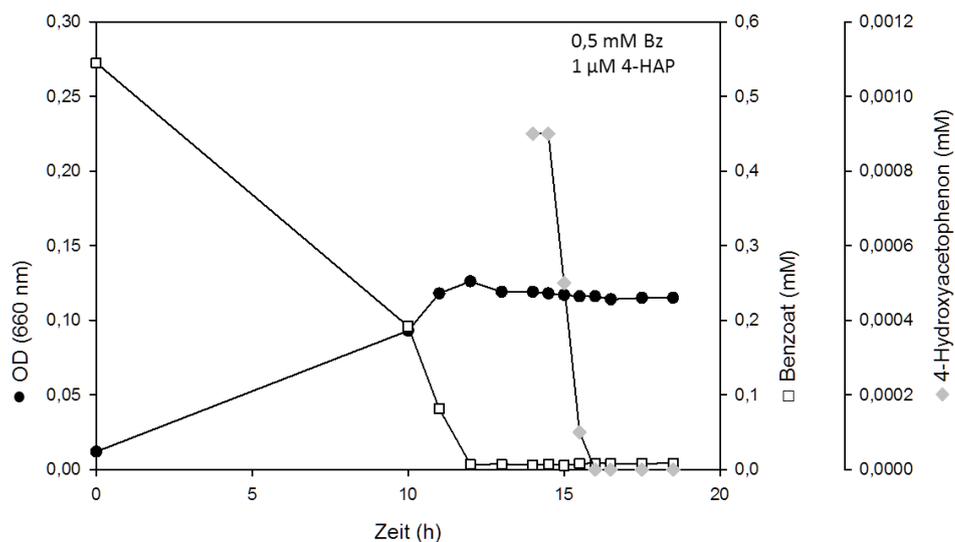
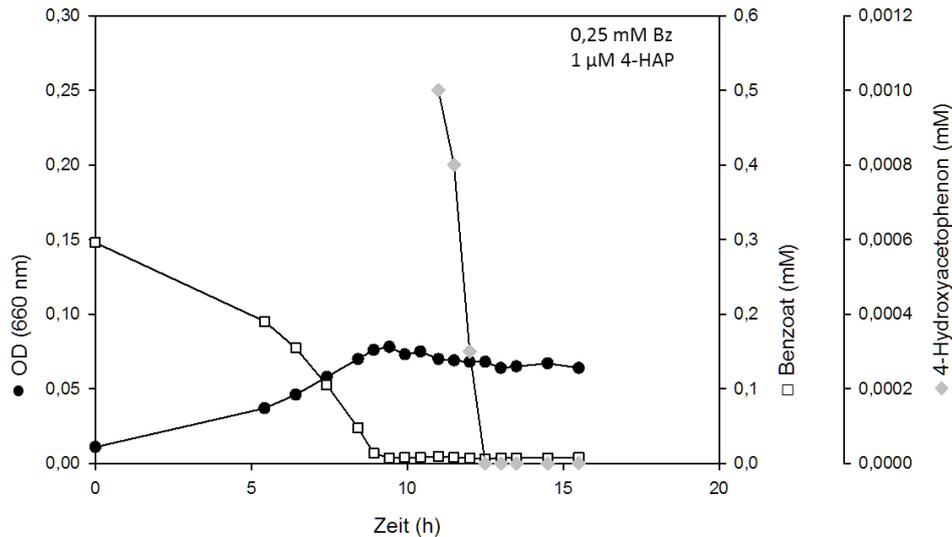


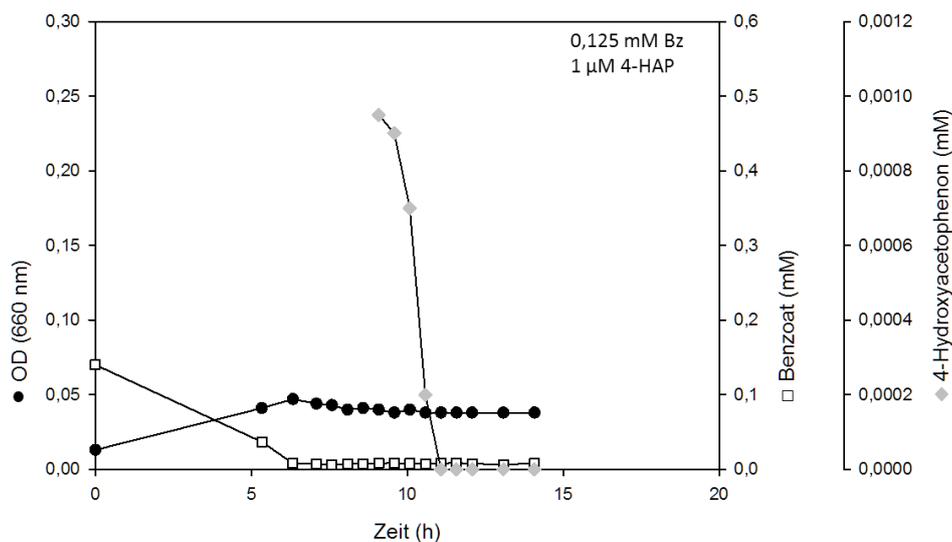
Abbildung 7. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,5 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. VII].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).



**Abbildung 8. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,25 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. VIII].**

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).



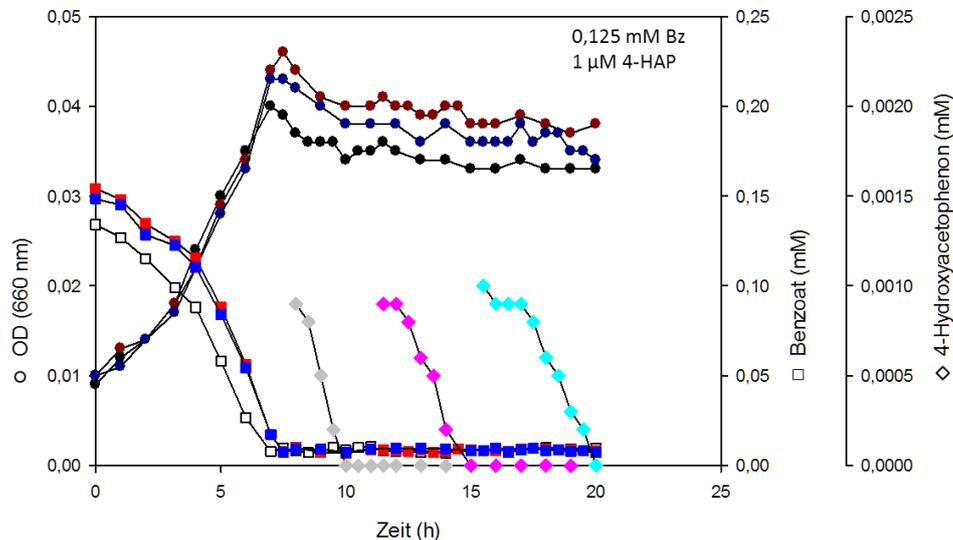
**Abbildung 9. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. IX].**

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

Die Reduktion der Benzoat-Startkonzentration von 0,5 mM (Nr. VII) auf 0,125 mM (Nr. IX) resultierte in einer niedrigeren maximalen optischen Dichte am Ende der Anzuchtphase (Nr. VII: 0,126; Nr. VIII: 0,078; Nr. IX: 0,047) und einer Verkürzung der Anzuchtphase von 12 h auf 7 h. Ein relevanter Unterschied in der Abnahme der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Kulturmedium während der Testphase zwischen den einzelnen Versuchen bestand nicht.

Die Experimente zeigten außerdem, dass der Schwellenwert für 4-Hydroxyacetophenon niedriger als  $1 \mu\text{M}$  lag und 4-Hydroxyacetophenon innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes (3 bis 4 h nach Zugabe) im Medium nicht mehr nachweisbar war.

Im Versuch Nr. X wurde untersucht, welchen Einfluss die Dauer zwischen dem Erreichen der maximalen optischen Dichte in der Anzuchtphase und der Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon auf dessen Abnahme vom Kulturüberstand hat. Es zeigte sich, dass bei einer Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons 1 h nach dem Erreichen der maximalen optischen Dichte seine Konzentration sofort abzusinken begann, bis 2 h nach Zugabe kein 4-Hydroxyacetophenon im Medium nachweisbar war. Wurde die Zeitspanne zwischen Erreichen der  $OD_{max}$  und der Zugabe auf 4 h verlängert, war die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration für 0,5 h stabil und sank anschließend innerhalb von 2,5 h unter die Nachweisgrenze. Bei einer Erweiterung dieser Zeitspanne auf 7,5 h nach  $OD_{max}$  zeigte sich, dass für ein Zeitfenster von 1,5 h die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration nahezu stabil blieb und anschließend im Verlauf von 3 h unter die Nachweisgrenze absank. Damit konnte gezeigt werden, dass die Länge der Zeitspanne zwischen dem Erreichen von  $OD_{max}$  und der Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon sowohl die Zeitspanne zwischen Zugabe und dem Beginn des Absinkens der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration als auch die Geschwindigkeit der vollständigen Eliminierung von 4-Hydroxyacetophenons beeinflusst.



**Abbildung 10.** Vergleich des Wachstums von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit  $0,125 \text{ mM}$  Benzoat und  $1 \mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon bei unterschiedlicher Zugabezeit von 4-Hydroxyacetophenon [Nr. X].

○, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◇, 4-Hydroxyacetophenon (mM)

●, □, ◇ Kultur A, Zugabe 4-Hydroxyacetophenon 1 h nach  $OD_{max}$ ; ●, ■, ◆, Kultur B, Zugabe 4-Hydroxyacetophenon 4 h nach  $OD_{max}$ ; ●, ■, ◆, Kultur C, Zugabe 4-Hydroxyacetophenon 7,5 h nach  $OD_{max}$ .

Basierend auf den Ergebnissen der Versuche Nr. I bis Nr. IX wurde das endgültige Versuchsdesign für alle folgenden Versuche beschlossen. Die Startkonzentration für Benzoat sollte 0,125 mM betragen, da bei dieser Konzentration trotz der niedrigen  $OD_{max}$  das Wachstum der Kultur eindeutig feststellbar war. Als Startkonzentration für Nitrat wurden 5 mM ausgewählt, da nach dem vollständigen Verbrauches des Benzoats während der Anzuchtphase noch eine ausreichende Menge an Nitrat für die Testphase im Medium vorhanden war. Die Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons sollte so schnell wie möglich nach Erreichen von  $OD_{max}$  erfolgen, um etwaige Zeiteffekte (Nr. X) gering zu halten.

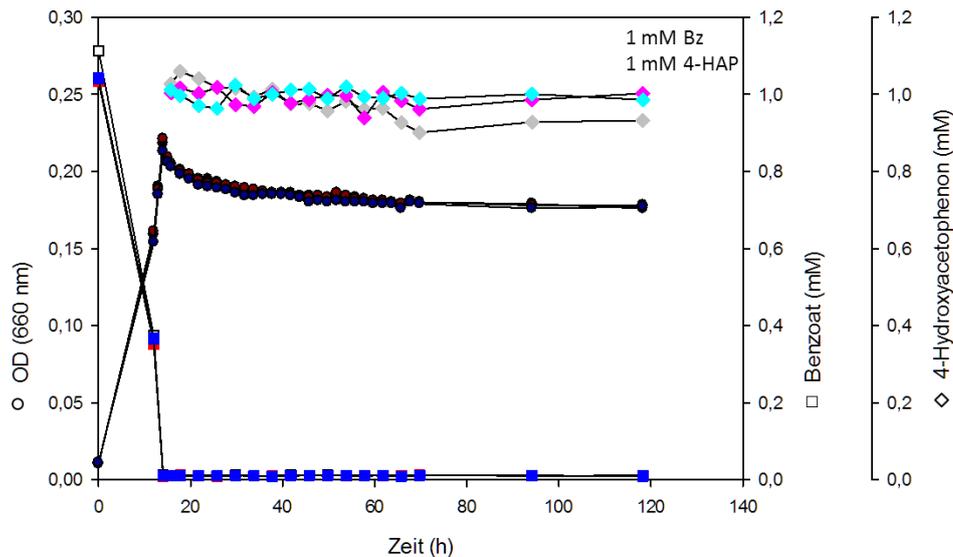
### 3.1.2 Antibiotikazugabe als Nachweis des Induktionsvorganges

Für den Beweis, dass die beobachteten Effekte auf biologischen Prozessen beruhen, wurden Antibiotika gewählt, welche die Genexpression/Proteinbiosynthese inhibieren. Dadurch wird verhindert, dass nach der Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon Proteine gebildet werden, die in seinen Abbau involviert sind.

Zuerst wurde das translationshemmende Antibiotikum Kanamycin getestet. Während der Versuche zeigte sich jedoch nur eine unzureichende Hemmung, das bedeutet, die Abnahme von 4-Hydroxyacetophenon konnte nicht unterbunden werden. Daher wurde im Anschluss das transkriptionshemmende Antibiotikum Rifampicin getestet. Im Gegensatz zu Kanamycin konnte mit dem Einsatz von Rifampicin die 4-Hydroxyacetophenonabnahme für einen signifikanten Zeitraum vollständig gehemmt werden.

#### 3.1.2.1 Kanamycin

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die verwendete Konzentration von Kanamycin zu einer Hemmung der Verwertung von 4-Hydroxyacetophenon führt (Nr. K-I; Fig. 11). Zu diesem Zweck wurde das Experiment Nr. K-I mit den Parametern von Versuch Nr. I mit einer Zugabe von 25, 50 oder 75  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Kanamycin wiederholt. Da sich keine konzentrationsabhängigen Effekte zeigten und die Aufnahme von 4-Hydroxyacetophenon bei allen Konzentrationen gleichsam unterdrückt war, wurde 50  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Kanamycin in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt.



**Abbildung 11.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe verschiedener Kanamycinkonzentrationen [Nr. KM-I].

○, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◇, 4-Hydroxyacetophenon (mM);

●, □, ◇, Kultur A, Zugabe von  $25 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Kanamycin; ●, ■, ◆, Kultur C, Zugabe von  $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Kanamycin; ●, ■, ◆, Kultur E, Zugabe von  $75 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Kanamycin.

Bei diesen Versuchen wurden untersucht, ob der beobachtete Effekt, dass die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration in Gegenwart von Kanamycin im Medium über die Zeit stabil blieb, sich mit dem endgültigen Versuchsdesign replizieren lässt. Wie sich jedoch zeigte, kam es in Abhängigkeit der eingesetzten 4-Hydroxyacetophenonkonzentration zu unterschiedlichen Effekten. Wurden  $1 \mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon zugegeben, waren die Unterschiede im Abnahmeprofil von 4-Hydroxyacetophenon im Medium zwischen einer mit Kanamycin behandelten Kultur und einer unbehandelten Referenzkultur minimal (Nr. K-II; Fig A4). Wurde die zugegebene 4-Hydroxyacetophenon auf  $10 \mu\text{M}$  erhöht, zeigte sich, dass es sowohl in der Referenzkultur als auch in der Testkultur zu einer Reduktion von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium kam. Die Abnahmeprofile unterschieden sich jedoch: Während in der unbehandelten Referenzkultur nach 4 h kein 4-Hydroxyacetophenon nachweisbar war, war in der mit Kanamycin behandelten Kultur erst nach etwa 10 h kein 4-Hydroxyacetophenon mehr nachweisbar (Nr. K-III; Fig A5). Die Zugabe von Kanamycin resultierte in diesem Fall in einer Verlangsamung der 4-Hydroxyacetophenonaufnahme.

Noch stärker kam dieser Effekt beim Experiment mit  $100 \mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon zum Tragen. In der Referenzkultur war 4-Hydroxyacetophenon 10 h nach der Zugabe nicht mehr im Kulturüberstand nachweisbar. In der mit Kanamycin behandelten Testkultur zeigte sich allerdings ein Abnahmeprofil, welches für die aktive Aufnahme eines Stoffes unter physiologischen Bedingungen ungewöhnlich war. Die Abnahme der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration

zentration erfolgte linear, zusätzlich konnte beobachtet werden, dass sich das Intermediat 4-Hydroxybenzoat im Kulturüberstand akkumulierte. Aufgrund der nichtphysiologischen Abnahme wurde das Experiment abgebrochen, es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch nach 67 h noch 4-Hydroxyacetophenon in einer Konzentration von 0,029 mM im Medium nachweisbar war (Nr. K-IV; Fig A6).

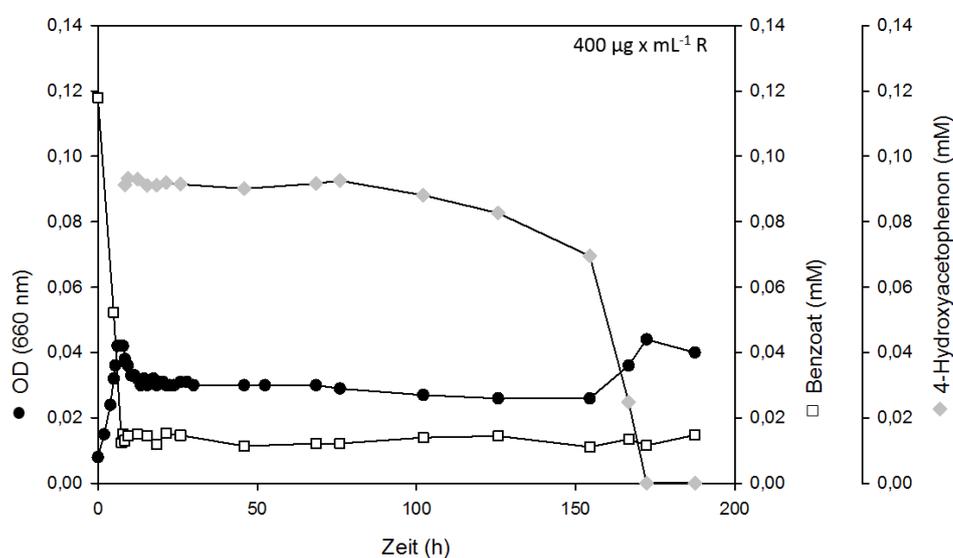
Aufgrund dieser Experimente zeigte sich, dass Kanamycin kein geeignetes Antibiotikum war, um die Elimination von 4-Hydroxyactophenon durch abiotische Prozesse auszuschließen. Daher wurden die Experimente mit Rifampicin wiederholt und fortgeführt.

### 3.1.2.2 Rifampicin

In einem ersten Experiment wurde getestet, welche Rifampicinkonzentration (50, 100, 200 oder 400  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) zu den besten Resultaten hinsichtlich der Hemmung der Abnahme von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium führte. Da Rifampicin aufgrund seiner Lösungseigenschaften in DMSO anstatt in  $\text{H}_2\text{O}_{mp}$  gelöst werden musste, wurde mit einer weiteren Kultur überprüft, ob eine Zugabe von 0,8 mL DMSO Einfluss auf das Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 hat. 0,8 mL DMSO entsprechen dabei dem Volumen an DMSO, welches in einer 200 mL Kultur vorliegt, wenn eine Endkonzentration von 400  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin im Medium erreicht werden soll. Zusätzlich wurde in diesem Experiment eingeführt, dass die Zugabe von 4-Hydroxyactophenon etwa eine halbe Stunde nach der Zugabe des Antibiotikums erfolgte. Aus diesem Grund wurde eine weitere Testflasche mitgeführt, mit welcher überprüft werden sollte, ob Kanamycin unter diesen Umständen die Abnahme von 4-Hydroxyactophenon aus dem Medium unterbindet.

Es zeigte sich, dass bei sämtlichen Rifampicinkonzentrationen die Hemmung der 4-Hydroxyactophenonabnahme im Medium ein zeitweiliger Effekt war, wobei die Zeitspanne der vollständigen Hemmung abhängig war von der zugegebenen Menge an Rifampicin. Die genaue Zeitspanne zwischen vollständiger Hemmung und dem Zeitpunkt, an welchem die Konzentration von 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Medium abzusinken begann, konnte nicht immer klar begrenzt werden. Es ist aber erkennbar, dass bei höheren Rifampicinkonzentrationen diese verlängert war. Sie variierte von etwa 40 h (50  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin, Fig. A7) über 60 h (100  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin, Fig. A8) und 110 h (200  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin, Fig. A9) bis zu etwa 150 h (400  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin, Fig. 12). Die Geschwindigkeit der 4-Hydroxyacetophenonabnahme unterschied sich ebenfalls in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Rifampicin: Während die Zeitspanne zwischen Beginn des Absinkens der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration bis zu dem Zeitpunkt, an dem kein 4-Hydroxyacetophenon mehr im Medium nachweisbar war, bei einer Zugabe von Rifampicin in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  über 100 Stunden betrug, verringerte sie sich

bei  $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin auf etwa 80 h. Bei  $200 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin verringerte sie sich weiter auf 40 h, und bei  $400 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  auf 30 h, wobei der stärkste Abfall innerhalb der letzten 5 h auftrat. Um die bestmögliche Hemmleistung für die folgenden Versuche zu erhalten, wurde daher die Konzentration von  $400 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin ausgewählt. In den weiteren Kontrollen zeigte sich, dass die alleinige Gabe von DMSO keinen Einfluss auf das Wachstum der Kultur hatte und DMSO daher als Lösungsmittel für Rifampicin verwendet werden konnte. Für Kanamycin ergab sich trotz Einwirkzeit wiederum keine Hemmung der 4-Hydroxyacetophenonabnahme. Daher wurden die Versuche mit Kanamycin nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 12.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100  $\mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von  $400 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

Im Anschluss an die Bestimmung der zu verwendenden Rifampicinkonzentration erfolgten die Tests mit verschiedenen 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen. Getestet und ausgewertet wurden folgende Konzentrationen: 100  $\mu\text{M}$  (Nr. R-II; Fig. 13), 10  $\mu\text{M}$  (Nr. R-III; Fig. 14), 1  $\mu\text{M}$  (Nr. R-IV; Fig. 15 und A12), 100 nM (Nr. R-V; Fig. 16 und A14) und 50 nM (Nr. R-VI; Fig. 17 und A13). Zusätzlich wurden noch Experimente mit der Zugabe von 30 nM (Nr. R-VII) und 10 nM 4-Hydroxyacetophenon (Nr. R-VIII) durchgeführt. Da es allerdings während der Analyse der Proben von Versuch Nr. R-VIII zu ungeklärten Problemen bei der HPLC-Analyse (überlagernde Peaks zur Retentionszeit von 4-Hydroxyacetophenon) kam, war es bisher nicht möglich diese Versuche vollständig auszuwerten. Für Nr. R-VIII war es lediglich möglich, das Abnahmeprofil einer nicht mit Rifampicin behandelten Referenzkultur zu bestimmen (Fig. 18), allerdings konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden.

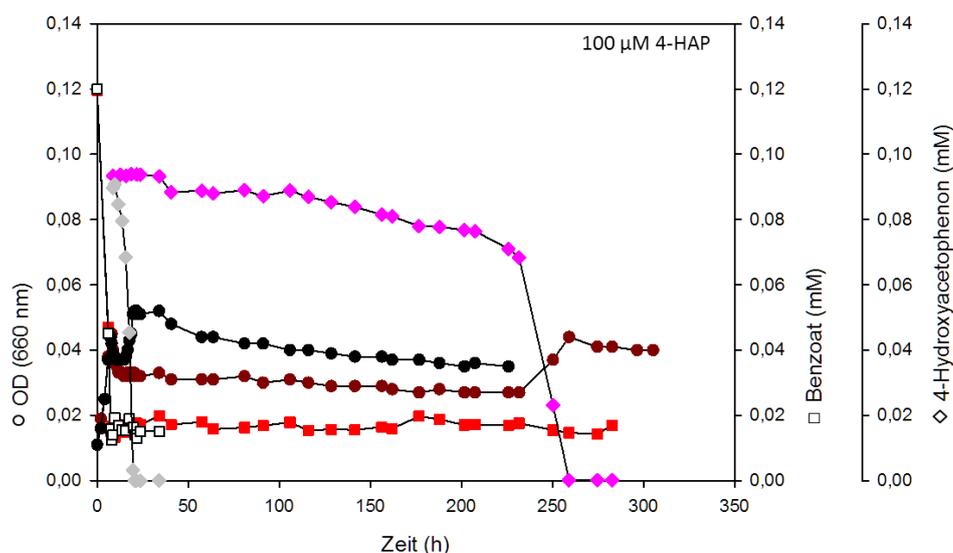
Die zugegebene 4-Hydroxyacetophenonkonzentration beeinflusste die Wirkdauer des Rifampicins sehr deutlich, sodass die im ersten Experiment gefundene Hemmzeit von 150 h meist deutlich unterschritten wurde. Die Wirkdauer des Rifampicins war jedoch im Großteil aller Fälle deutlich länger als die Zeit, in welcher in einer unbehandelten Referenzkultur 4-Hydroxyacetophenon nicht mehr im Medium nachweisbar war. Aus diesem Grund zeigte sich Rifampicin als geeignet, um zu zeigen, dass die Abnahme des 4-Hydroxyacetophenons nicht durch abiotischen Prozessen beeinflusst wurde. Lediglich beim Versuch Nr. R-VI deutet die Auswertung der HPLC-Daten daraufhin, dass es über die Zeit zu einer linearen Regression des 4-Hydroxyacetophenons im Medium kommt, welche durch Rifampicin nicht vollständig unterbunden wird, was auf einen abiotischen Prozess hindeuten kann. Um eine genaue Aussage darüber zu treffen, ob es sich hierbei um eine passive Abnahme handelt, die nicht durch Rifampicin unterdrückt werden kann, oder ob das Rifampicin hier ein anderes Muster im Verlust der Wirksamkeit zeigt, kann aufgrund der Datenlage nicht geklärt werden. Für den Versuch Nr. R-V (100 nM 4-Hydroxyacetophenon) ist der Zeitpunkt an welchem Rifampicin seine Wirkung verliert, ebenfalls nicht bestimmbar, allerdings ist hier keine lineare Abnahme der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Medium zu erkennen. Für eine genauere Aussage über die Wirksamkeit von Rifampicin über die Hemmung der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration unter 50 nM fehlen allerdings weitere Daten. Für Konzentrationen über 50 nM 4-Hydroxyacetophenon erscheint Rifampicin als geeignetes Antibiotikum.

## 3.2 Eingrenzung der Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon

Mit dem etablierten Testdesign wurden folgende 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen untersucht, um die Schwellenwertkonzentration zu bestimmen beziehungsweise einzugrenzen: 100  $\mu\text{M}$  (Nr. R-II; Fig. 13), 10  $\mu\text{M}$  (Nr. R-III; Fig. 14), 1  $\mu\text{M}$  (Nr. R-IV; Fig. 15 und A12), 100 nM (Nr. R-V; Fig. 16 und A14) und 50 nM (Nr. R-VI; Fig. 17 und A13) sowie eine unvollständige Analyse eines Versuchs mit 10 nM 4-Hydroxyacetophenon (Nr. R-VIII). Für alle Konzentrationen wurde das Abnahmeprofil der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration aus dem Medium festgestellt. Zusätzlich wurde im selben Versuch überprüft, wie sich das Abnahmeprofil ändert, wenn Rifampicin zugegeben wird. Die Ergebnisse für die mit Rifampicin behandelten Kulturen sind im Kapitel 3.1.2.2 beschrieben.

Die Analyse der Daten ergab, dass die Zeitspanne zwischen Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons und dem Zeitpunkt, an welchem kein 4-Hydroxyacetophenon mehr nachweisbar war (oder eine minimale Konzentration, welche sich über mehrere Messzeitpunkte nicht

mehr signifikant änderte), kürzer wurde, je weniger 4-Hydroxyacetophenon zugegeben wurde. Berechnete man jedoch aus den Daten die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration, welche pro Zeiteinheit aus dem Medium entfernt wurde, zeigte sich, dass mit  $5,973 \mu\text{M/h}$  die Konzentration am schnellsten bei der höchsten Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon absank. Für die weiteren Experimente ergaben sich folgende Raten:  $1,546 \mu\text{M/h}$  (Nr. R-III),  $0,300 \mu\text{M/h}$  (Nr. R-IV),  $0,053 \mu\text{M/h}$  (Nr. R-V) und  $0,037 \mu\text{M/h}$  (Nr. R-VI). Trotz verkürzten Eliminationszeitraum bei den niedrigeren Konzentrationen wurden die höchsten Eliminationsraten bei hohen Konzentrationen erreicht.



**Abbildung 13. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100  $\mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin [Nr. R-II].**

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

Ein Anstieg der optischen Dichte konnte nur mit  $100 \mu\text{M}$  4-Hydroxyacetophenon beobachtet werden. Bei allen Versuchen wurde ein Absinken der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration beobachtet, entweder bis kein 4-Hydroxyacetophenon mehr nachweisbar war oder einem Wert nahe der Nachweisgrenze, welcher sich über die Zeit nicht mehr signifikant veränderte. Bei Versuch Nr. R-VIII war es nicht möglich festzustellen, welcher Endwert erreicht wurde, da dieser unterhalb der Nachweisgrenze lag. Zudem war das 4-Hydroxyacetophenon auf Grund seiner niedrigen Startkonzentration schwer als diskreter Peak im HPLC-Chromatogramm zuzuordnen. Zudem ist es in diesem Experiment nicht möglich, eine Aussage über eine mit Rifampicin behandelte Kultur zu treffen, da die Auswertung dieser Daten aufgrund von Analyseschwierigkeiten nicht möglich war. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass der beobachtete Effekt auf abiotische Prozesse zurückzuführen ist.

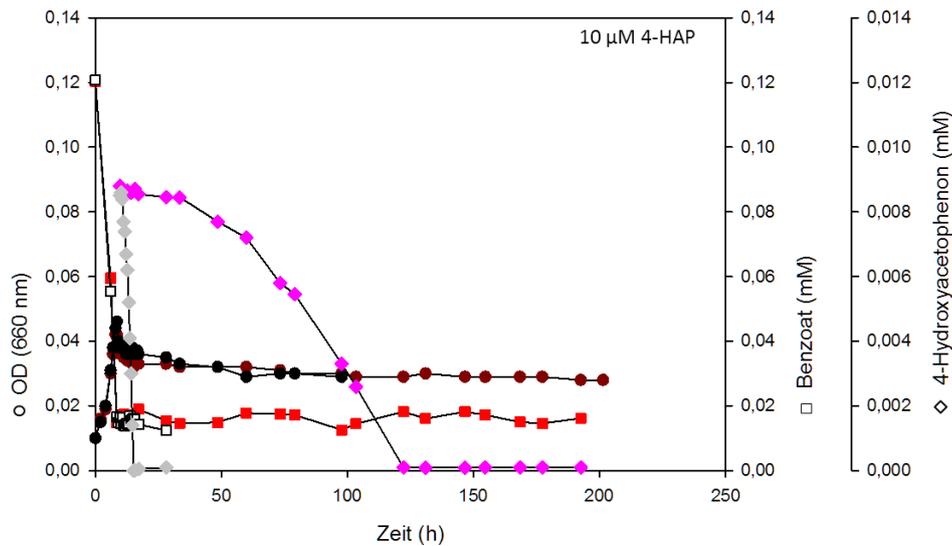


Abbildung 14. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin [Nr. R-III].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

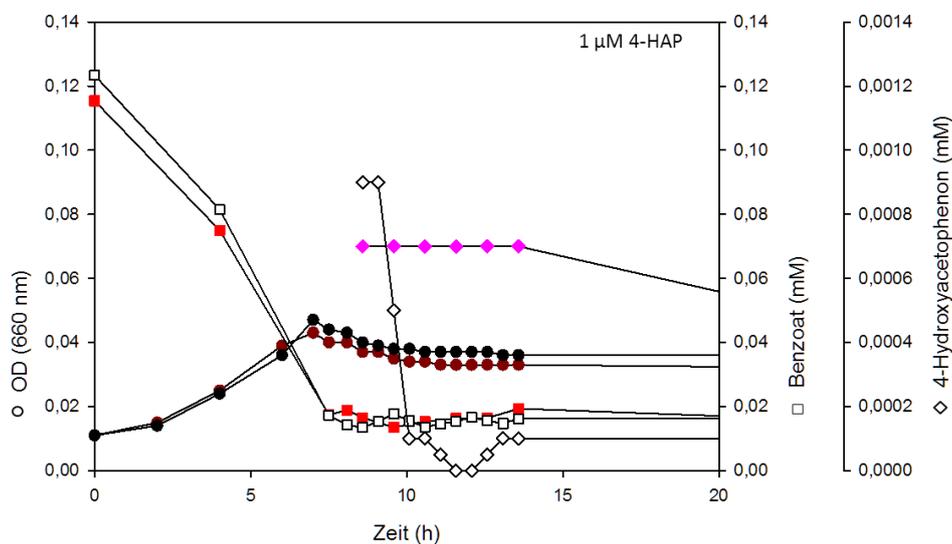


Abbildung 15. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 20 h des Versuchs [Nr. R-IV].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

### 3 Ergebnisse

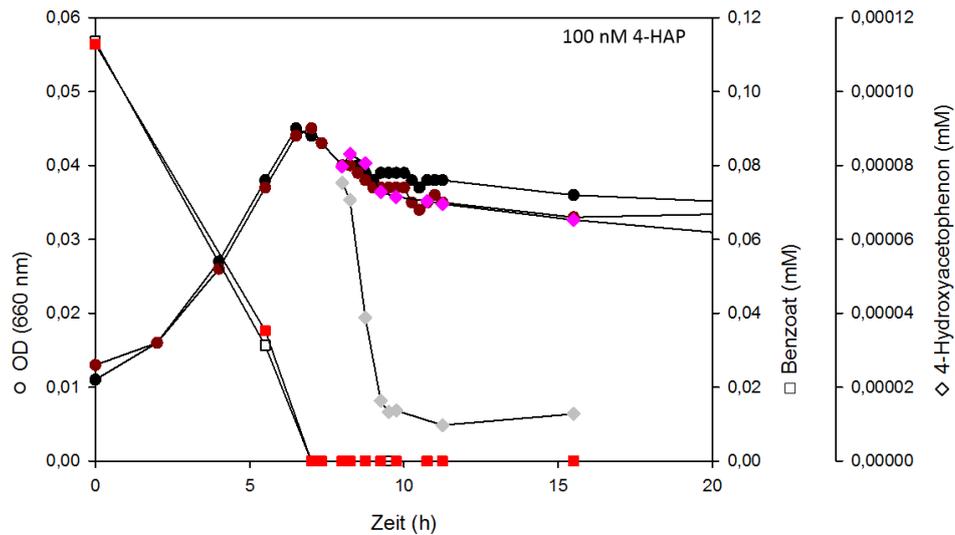


Abbildung 16. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 20 h des Versuchs [Nr. R-V].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

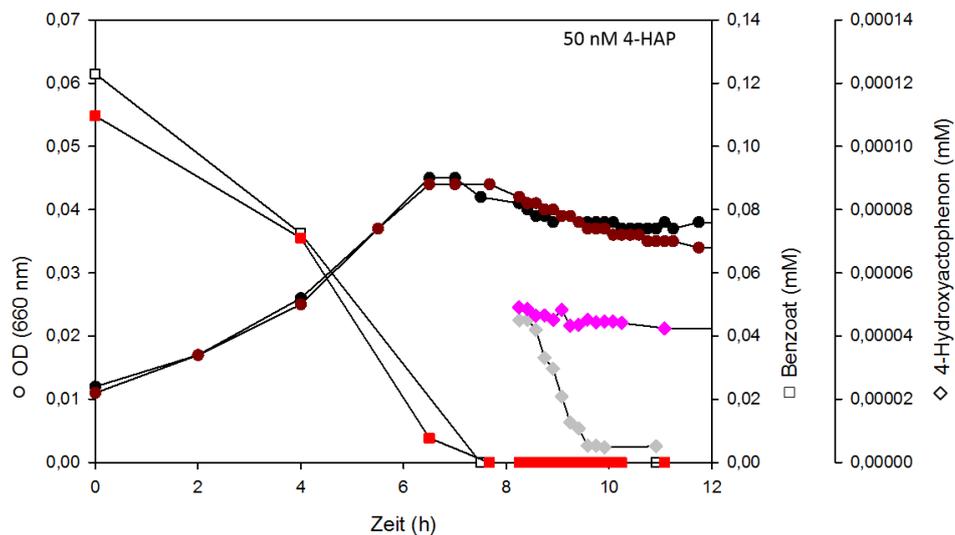
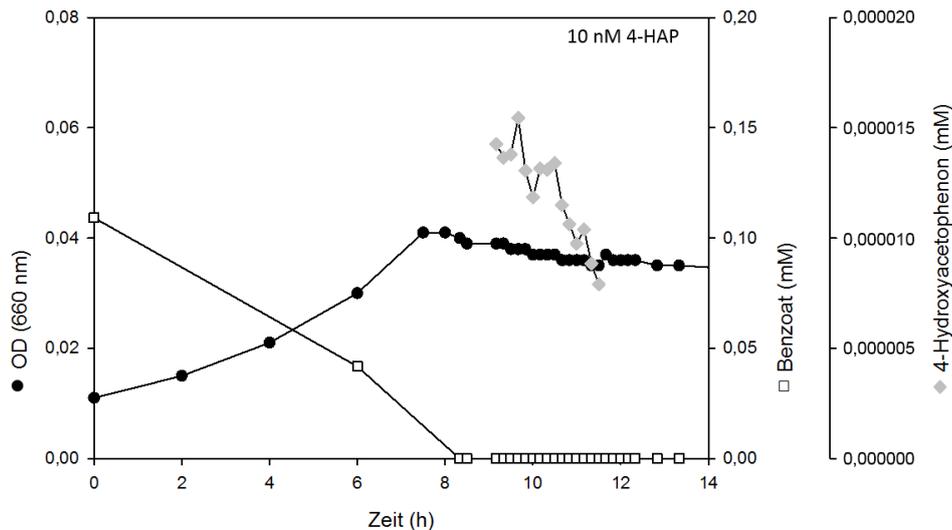


Abbildung 17. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 50 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 12 h des Versuchs [Nr. R-VI].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.



**Abbildung 18.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 nM 4-Hydroxyacetophenon, Ausschnitt der ersten 14 h des Versuchs [Nr. R-VIII].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin.

Da bei keinem der Versuche beobachtet werden konnte, dass nach Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons die Konzentration im Medium stabil blieb, konnte der Schwellenwert für 4-Hydroxyacetophenon nicht bestimmt werden. Es war allerdings möglich, den Schwellenwert auf eine Konzentration unter 50 nM 4-Hydroxyacetophenon einzugrenzen. Es wurden zudem Versuche durchgeführt, bei welchem eine Zugabe von 30 oder 10 nM 4-Hydroxyacetophenon erfolgte. Aufgrund von wiederholten Problemen bei der HPLC-Analyse war es jedoch nicht möglich zu einer eindeutigen Aussage zu kommen. Es gibt erste Hinweise darauf, dass der Schwellenwert unter 10 nM liegt, allerdings hat die bisherige Auswertung nur Hinweise darauf erbracht und erfordert weitere Untersuchungen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von Antibiotika auf den Induktionsvorgang

#### 4.1.1 Kanamycin

Die Zugabe von Kanamycin zu Kulturen von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 erzielte nur bei hohen Benzoat- und 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen eine gute Wirksamkeit. Bei Versuchen mit deutlich niedrigeren Konzentrationen zeigte sich jedoch bei der höchsten getesteten 4-Hydroxyacetophenonkonzentration (100 mM) eine lineare Abnahme des Aromaten aus dem Medium bei gleichzeitigem linearem Anstieg der Konzentration des Intermediats 4-Hydroxybenzoat. Mit sinkender 4-Hydroxyacetophenonkonzentration näherte sich das Abnahmeverhalten von 4-Hydroxyacetophenon immer näher an das einer unbehandelten Kultur an.

Die genauen Gründe für das beobachtete Verhalten sind unklar. Eine unvollständige Hemmung der Translation nach Zugabe des Kanamycins wäre eine Möglichkeit für diesen Vorgang. Ein Grund dafür wäre, dass Kanamycin und 4-Hydroxyacetophenon zeitgleich zur Kultur hinzugegeben wurden und dadurch die Einwirkzeit für Kanamycin zu gering war. Dadurch kann es zu einem teilweisen Abbau von 4-Hydroxyacetophenon gekommen sein, woraus die Bildung von 4-Hydroxybenzoat resultierte, welches sich im Medium akkumulierte. Der genaue Aufnahmemechanismus für Kanamycin und die Dauer bis zur Wirkung bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 ist unbekannt, allerdings konnte für *Escherichia coli* und *Streptomyces kanamyceticus* gezeigt werden, dass die initiale Aufnahme verschiedener aminoglykosidischer Antibiotika sehr schnell erfolgen kann [1, 2, 20, 36]. In einem weiteren Experiment erfolgte die Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon erst 30 min nach der Zugabe des Antibiotikums. Doch zeigte sich auch hier keine Änderung zu den vorherigen Ergebnissen (Fig. A10). Dies weist darauf hin, dass der beobachtete Effekt unabhängig von der Einwirkzeit zwischen Zugabe von Kanamycin und 4-Hydroxyacetophenon ist.

Ein Grund dafür, dass auch nach der Zugabe von Kanamycin die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Medium abnimmt, könnte ein genereller Effekt sein, welcher nach Zugabe von Kanamycin häufig beobachtet wurde. Dabei kommt es - vermutlich aufgrund der umfassenden Hemmung der Proteinbiosynthese - zu Schäden in der äußeren Membran, wodurch diese

durchlässiger werden kann [1, 20, 27]. Dadurch könnte es zu einem erleichterten Durchdringens des 4-Hydroxyacetophenons durch die äußere Membran kommen. Gelangt es weiter ins Cytoplasma, kann es sich dort in hohen Konzentrationen akkumulieren, da aufgrund der Proteinbiosynthesehemmung durch Kanamycin das Effluxsystem für 4-Hydroxyacetophenon nicht ausgebildet werden kann [40, 55].

### 4.1.2 Rifampicin

Im Gegensatz zu Kanamycin, bei welchem die Hemmung erst während der Translation stattfindet, unterbindet Rifampicin bereits die Transkription der DNA, wodurch verhindert wird, das mRNA-Transkripte der Gene des 4-Hydroxyacetophenonabbaus in der Zelle gebildet werden [11, 24, 30].

Damit Rifampicin seine volle Wirksamkeit erreicht, ist es notwendig, dass es bereits an die DNA-abhängige RNA-Polymerase gebunden hat, bevor die Bildung von mRNA beginnt [44, 51]. Aus diesem Grund wurde eine Zeitspanne von etwa 30 Minuten zwischen der Zugabe von Rifampicin zur Kultur und der anschließenden Zugabe von 4-Hydroxyacetophenon gewählt. Die experimentellen Daten legen nahe, dass diese Zeit ausreicht, um die Transkription vollständig zu inhibieren.

Eine weitere Änderung musste beim Lösungsmittel des Antibiotikums vorgenommen werden. Während Kanamycin in Wasser gut löslich ist, war es aufgrund der Hydrophobizität von Rifampicin erforderlich, DMSO als Lösungsmittel einzusetzen. Dieses kann in höheren Konzentrationen Bakterien schädigen und im Wachstum hemmen [29]. Allerdings lag Rifampicin nur in einer Endkonzentration von etwa 0,4 % (v/v) in der Kultur vor, was deutlich unter den Werten liegt, die negative Effekte auf Gram-negative Bakterien haben [29]. In einer Kontrolle, zu welcher DMSO ohne Rifampicin in der entsprechenden Konzentration zugefügt wurde, gab es keine Hinweise auf negative (Absinken der optischen Dichte durch zytotoxische Effekte) oder positive Effekte (Anstieg der optischen Dichte nach Verstoffwechslung als Substrat) durch die Zugabe (Fig. A11). DMSO kann somit als Lösungsmittel für Rifampicin genutzt werden, ohne das Experiment an sich zu beeinflussen.

Ein weiterer zu beachtender Punkt war das Einstellen der richtigen Rifampicinkonzentration im Medium. Rifampicin findet vor allem in der Therapie gegen Gram-positive Bakterien, beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, seine Anwendung. Gram-Positive Bakterien reagieren empfindlicher auf Rifampicin als Gram-negative Bakterien [17]. Aus diesem Grund werden für die vollständige Hemmung der Proteinbiosynthese bei Gram-negativen Bakterien, wie „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1, höhere Konzentration von Rifampicin benötigt [17, 54]. In einer früheren Studie wurden  $400 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Rifampicin als Konzentration beschrieben, bei der eine wirksame Hemmung erfolgt [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde

zusätzlich untersucht, ob mit niedrigeren Rifampicin-Konzentrationen (50, 100 oder 200  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) ebenfalls eine vollständige Hemmung erreicht werden kann. Es zeigte sich, dass bei allen eingesetzten Konzentrationen die 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Medium eine Zeit lang stabil blieb, was auf eine Hemmung der Proteinbiosynthese schließen lässt. Die Zeitdauer variierte dabei mit der eingesetzten Rifampicinkonzentration, so dass für die weiteren Experimente die Konzentration von 400  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  ausgewählt wurde, da hierbei die hemmende Wirkung am längsten anhielt. Weitere Experimente zeigten, dass auch die eingesetzte 4-Hydroxyacetophenonkonzentration einen Einfluss auf die Dauer der Hemmung hatte (Abnahme der Hemmdauer mit sinkender Konzentration). Es konnte nicht geklärt werden, warum Rifampicin in dieser Arbeit eine bakteriostatische Wirkung zeigte, obwohl es in der Literatur allgemein als bakteriozid beschrieben wird [17]. Mögliche Erklärungen wären das Rifampicin während der Kultivierung seine Wirkung verliert, da es wegen verschiedenen kritischen Faktoren wie erhöhter Temperatur oder Lichteinwirkung seine Funktionalität beeinträchtigt wird. Allgemein wird beschrieben, dass Rifampicin (Reinstoff sowie Stammlösung) dunkel und bei niedrigen Temperaturen gelagert werden soll [12, 28, 31, 32]. Die Stammlösung, gelöst in DMSO, ist bei diesen Bedingungen zwischen 2 Wochen [12] bis zu mindestens 8 Monaten [28] haltbar. Über die Stabilität von Rifampicin in Kultivierungsmedium konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Die meisten Angaben beziehen sich auf Rifampicin, welches mit aufgereinigter DNA-abhängiger RNA-Polymerase reagiert [34, 57]. Dabei wurde eine mittlere Lebensdauer des Komplexes von etwa 60 Minuten beschrieben, im Ganzellsystem ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Lebensdauer davon abweicht [34, 57]. Aufgrund des experimentellen Designs war es nicht möglich, die Kultivierungstemperatur zu senken, um die Stabilität des Rifampicins zu erhöhen. Der Einfluss von Licht wurde versucht weitestgehend zu minimieren (Einschlagen der Kulturen in lichtundurchlässiges Material, dunkle Lagerung). Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass sich in der Kultur einige Zellen befinden, die aufgrund natürlicher Mutation eine Resistenz gegen Rifampicin aufweisen. Aufgrund positiver Selektion in Gegenwart von Rifampicin könnten sich diese bei längerer Kultivierung gegenüber den Zellen ohne Resistenzen durchsetzen und dadurch 4-Hydroxyacetophenon nutzen. Insgesamt lässt sich jedoch nicht eindeutig feststellen, ob der beobachtete Effekt der zeitweiligen Hemmung der Induktion auf einen Verlust der Wirkweise des Rifampicins durch äußere Umstände, Resistenzbildung oder einen bakteriostatischen Vorgang zurückzuführen ist.

Bei Betrachtung aller Experimente, bei denen Rifampicin eingesetzt wurde, lässt sich aber abschließend sagen, dass sich Rifampicin als geeignet erwiesen hat, die Induktion der in den Abbau von 4-Hydroxyacetophenon involvierten Gene wirkungsvoll für den Zeitraum zu unterdrücken, in dem diese normalerweise stattfinden würde. Dadurch kann eine Elimination von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium durch abiotische Prozesse weitestgehend aus-

geschlossen werden. Lediglich bei sehr niedrigen 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen (50 nM) gibt es Hinweise darauf, dass es zu einer abiotischen Elimination von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium in Gegenwart von Rifampicin gekommen sein könnte.

## 4.2 Eingrenzung der regulatorisch wirksamen *in vivo* Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon

In dieser Arbeit wurde versucht, die *in vivo* regulatorisch wirksame Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 so weit wie möglich einzugrenzen. Die Schwellenwertkonzentration ist definiert als die niedrigste Konzentration, welche eine Reaktion der Zelle (hier: Induktion des Genclusters, in welchem die in den Abbau von 4-Hydroxyacetophenon involvierten Gene organisiert sind) hervorruft [45]. Die Bestimmung erfolgte *in vivo*, es wurde daher analytisch überprüft, ob es zu einer Abnahme der 4-Hydroxyacetophenonkonzentration im Medium nach seiner Zugabe zu einer nicht-adaptierten Kultur kam. Das würde indirekt auf einen Abbau durch die Produkte der aktivierten Gene hindeuten. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf andere, abiotische Prozesse zurückzuführen waren, wurden Kontrollexperimente mit Antibiotika durchgeführt, bei welchen die Induktion der Genexpression inhibiert wurde.

Was bei den verschiedenen Experimenten auffiel, war die Geschwindigkeit der Abnahme des 4-Hydroxyacetophenons aus dem Medium. Diese wird mit abnehmender 4-Hydroxyacetophenonkonzentration immer geringer (Tab. 2). Bei der höchsten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) wurde ein Anstieg der optischen Dichte beobachtet, dieser könnte die schnelle Abnahme er-

**Tabelle 2. Abnahmegeschwindigkeit von 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium.**

Versuch Nr.	Konzentration	Abnahmegeschwindigkeit [ $\mu\text{M} \times \text{h}^{-1}$ ]
R-II	100,00 $\mu\text{M}$	5,973
R-III	10,00 $\mu\text{M}$	1,546
R-IV	1,00 $\mu\text{M}$	0,300
R-V	100 nM	0,053
R-VI	50 nM	0,037
R-VII	30 nM	n.a.
R-VIII	10 nM	n.a.

erklären, da hier durch den Anstieg der Zelldichte mehr 4-Hydroxyacetophenon aus dem Medium schneller aufgenommen und verwertet werden kann. Die Abnahme der Aufnahmegeschwindigkeit bei niedrigeren Konzentrationen beruht vermutlich zum einen darauf, dass sich die Anfangszellzahl nicht ändert, wodurch nur eine begrenzte Zahl von Zellen das 4-Hydroxyacetophenon aufnehmen kann. Da 4-Hydroxyacetophenon kein spezifisches Aufnahmesystem erfordert, sondern die Zellwand einfach durchqueren kann, ist zusätzlich die Diffusionsgeschwindigkeit bei niedrigeren Konzentrationen geringer [40].

Die regulatorisch wirksame Schwellenwertkonzentration konnte auf unter 50 nM 4-Hydroxyacetophenon eingegrenzt werden. Weitere Experimente, die aufgrund von Analyseproblemen nicht reproduzierbar und vollständig ausgewertet werden konnten, deuten daraufhin, dass die Schwellenwertkonzentration sogar unter 10 nM liegen könnte. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass zumindest bei Konzentrationen unter 50 nM die Abnahme teilweise auch auf abiotischen Prozessen beruhen könnte. Für eine abschließende Aussage wären allerdings weitere Analysen notwendig.

## 5 Ausblick

Nachdem die regulatorisch wirksame *in vivo* Schwellenwertkonzentration von 4-Hydroxyacetophenon bei „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 auf unter 50 nM eingegrenzt werden konnte, ist es nun notwendig, diese durch molekularbiologische Untersuchungen zu verifizieren. Dadurch, dass der Abbau von 4-Hydroxyacetophenon durch die Induktion der entsprechenden Gene kontrolliert wird, wäre es sinnvoll, mittels RT-PCR die entsprechenden Transkripte nachzuweisen, beispielsweise *pchF* und *xccA* [54]. Da bei niedrigen Konzentrationen 4-Hydroxyacetophenon ohne Verzögerung abnimmt und bereits nach einer relativ geringen Zeitspanne nicht mehr nachweisbar ist (oder nur in sehr geringen Mengen), sollten die Proben in sehr kurzen Zeitintervallen nach Zugabe des 4-Hydroxyacetophenons genommen werden. Durch mehrfache Probenahme könnte die Induktionszeit bestimmt werden. Problematisch könnten die sehr geringen Zelldichten werden, da bei geringer Biomasse und auch die Menge an Transkripten klein sein wird.

Eine weitere Fragestellung könnte sein, welche Auswirkungen die verschiedenen 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen auf die Synthese der Proteine des 4-Hydroxyacetophenonabbaus haben. Um biologische Variabilität zu berücksichtigen sollten parallele Massenkultivierungen durchgeführt werden.

Weiteres Augenmerk sollte auf die Lösung des analytischen Problems (HPLC) bei der Analyse der Proben gelegt werden. Hierbei handelte es sich um eine Überlagerung des 4-Hydroxyacetophenonpeaks durch eine zweite, unbekannte Substanz. Bei höheren 4-Hydroxyacetophenonkonzentration fiel dieser vermutlich nicht auf, da er dort deutlich unter der eingesetzten 4-Hydroxyacetophenonkonzentration lag oder durch Verdünnung der Probe unterhalb der Nachweisgrenze lag. Da bei sehr niedrigen 4-Hydroxyacetophenonkonzentrationen keine Verdünnung der Probe mehr stattfinden konnte, überlagerte er den Peak bei eingesetzten Konzentrationen wie 10 nM zu stark, um die Konzentration von 4-Hydroxyacetophenon bestimmen zu können. Dieser Peak trat allerdings nicht in jeder Analyse auf, so dass es auch möglich wäre, dass bestimmte Änderungen im Laufmittel sein Auftreten und seine Stärke beeinflussen. Es könnte daher versucht werden, durch weitere Änderungen am Laufmittel diesen von 4-Hydroxyacetophenon abzutrennen. Ebenfalls anbieten könnten sich eine Aufkonzentration der Probe, wobei untersucht werden müsste, ob es in diesem Falle ebenfalls zur Aufkonzentration des zweiten Stoffes kommen kann.

Nach Durchführung der vorgeschlagenen Untersuchungen wäre es zudem möglich, die Bestimmung des Schwellenwertes für weitere aromatische Verbindungen durchzuführen. Neben 4-Ethylphenol könnten hierbei auch weitere aromatische Verbindungen untersucht werden, für die bereits Sensor/Regulator-Systeme bekannt sind.

## Referenzen

- [1] Anand N, Davis BD (1960) Effect of streptomycin on *Escherichia coli*. [a] Damage by streptomycin to the cell membrane of *Escherichia coli*. *Nature* 185:22–23
- [2] Anand N, Davis BD, Armitage AK (1960) Effect of streptomycin on *Escherichia coli*. [b] Uptake of streptomycine by *Escherichia coli*. *Nature* 185:23–24
- [3] August PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Müller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR, Floss HG (1998) Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S6990. *Chem Biol* 5:69–79
- [4] Bala S, Khanna R, Dadhwal M, Prabakaran SR, Shivaji S, Cullum J, Lal R (2004) Reclassification of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 46095 as *Amycolatopsis rifamycinica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1145–1149
- [5] Boll M, Fuchs G (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234:921–933
- [6] Boll M, Fuchs G (1998) Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 251:946–954
- [7] Boll M, Albracht SSP, Fuchs G (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism - a study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur J Biochem* 244:840–851
- [8] Bryan L, Van den Elzen H (1976) Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 9:928–938

- [9] Büsing I, Höffken HW, Breuer M, Wöhlbrand L, Hauer B, Rabus R (2015) Molecular genetic and crystal structural analysis of 1-(4-hydroxyphenyl)-ethanol dehydrogenase from „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25:327–339
- [10] Büsing I, Kant M, Dörries M, Wöhlbrand L, Rabus R (2015) The predicted  $\sigma^{54}$ -dependent regulator EtpR is essential for expression of genes for anaerobic *p*-ethylphenol and *p*-hydroxyacetophenone degradation in „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. *BMC Microbiol* 15:251
- [11] Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104:901–912
- [12] Carl Roth GmbH + Co KG (2016) Datenblatt Spezifikation. Karlsruhe, URL [https://www.carlroth.com/\discretionary{-}{-}{-}{-}de/de/Life-Science/\discretionary{-}{-}{-}{-}Mikro\discretionary{-}{-}{-}{-}bio\discretionary{-}{-}{-}{-}logie/\discretionary{-}{-}{-}{-}Antibiotika-Anti\discretionary{-}{-}{-}{-}my\discretionary{-}{-}{-}{-}ko\discretionary{-}{-}{-}{-}ti\discretionary{-}{-}{-}{-}ka/\discretionary{-}{-}{-}{-}Antibiotika/Rifampicin/p/000000060003fa4c00040023\\_de](https://www.carlroth.com/\discretionary{-}{-}{-}{-}de/de/Life-Science/\discretionary{-}{-}{-}{-}Mikro\discretionary{-}{-}{-}{-}bio\discretionary{-}{-}{-}{-}logie/\discretionary{-}{-}{-}{-}Antibiotika-Anti\discretionary{-}{-}{-}{-}my\discretionary{-}{-}{-}{-}ko\discretionary{-}{-}{-}{-}ti\discretionary{-}{-}{-}{-}ka/\discretionary{-}{-}{-}{-}Antibiotika/Rifampicin/p/000000060003fa4c00040023_de), Abrufdatum: 27.03.16
- [13] Davies J, Davis BD (1968) Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem* 243:3312–3316
- [14] Entsch B, Massey V, Claiborne A (1987) para-Hydroxybenzoate hydroxylase containing 6-hydroxy-FAD is an effective enzyme with modified reaction mechanisms. *J Biol Chem* 262:6060–6068
- [15] Fuchs G (2007) Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, 8. Auflage
- [16] Fuchs G, Boll M, Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 9:803–816
- [17] Furesz S (1970) Chemical and biological properties of rifampicin. *Antibiot Chemother* 16:316–351
- [18] Gibson DT, Parales RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11:236–243

- 
- [19] Hancock R, Raffle VJ, Nicas TI (1981) Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 19:777–785
- [20] Hancock REW (1981) Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother* 8:429–445
- [21] Hancock REW, Bell A (1988) Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:713–720
- [22] Hart H, Craine LE, Hart DJ, Kindler N (1999) *Organische Chemie*. Wiley-VCH Weinheim, 2.Auflage
- [23] Hartmann G, Honikel KO, Knüsel F, Nüesch J (1967) The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim Biophys Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 145:843–844
- [24] Hinkle DC, Mangel WF, Chamberlin MJ (1972) Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA: IV. The effect of rifampicin on binding and on RNA chain initiation. *J Mol Biol* 70:209–220
- [25] Höffken HW, Duong M, Friedrich T, Breuer M, Hauer B, Reinhardt R, Rabus R, Heider J (2006) Crystal structure and enzyme kinetics of the (S)-specific 1-phenylethanol dehydrogenase of the denitrifying bacterium strain EbN1. *Biochemistry* 45:82–93
- [26] Hufnagel P, Rabus R (2006) Mass spectrometric identification of proteins in complex post-genomic projects. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11:53–81
- [27] Iida K, Koike M (1974) Cell wall alterations of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 5:95–97
- [28] Karlson AG, Ulrich JA (1969) Stability of rifampin in dimethylsulfoxide. *Appl Microbiol* 18:692–693
- [29] Kligman AM (1965) Dimethyl sulfoxide-part 2. *JAMA* 193:923–928
- [30] Kotra LP, Haddad J, Mobashery S (2000) Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agents Ch* 44:3249–3256
- [31] Lautenschläger, O and Hildebrandt, S (2016) Datenblatt Spezifikation. Karlsruhe, URL [https://www.carlroth.com/downloads/spez/de/4/SPEZ\\_4163\\_DE.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/spez/de/4/SPEZ_4163_DE.pdf), Abrufdatum: 27.03.16

- [32] Lautenschläger, O and Hildebrandt, S (2016) Sicherheitsdatenblatt. Karlsruhe, URL [https://www.carlroth.com/downloads/spez/de/4/SPEZ\\_4163\\_DE.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/spez/de/4/SPEZ_4163_DE.pdf), Abrufdatum: 27.03.16
- [33] Lechevalier MP, Prauser H, Labeda DP, Ruan JS (1986) Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 36:29–37
- [34] McClure WR, Cech CL (1978) On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* 253:8949–8956
- [35] Pérez-Pantoja D, González B, Pieper DH (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis KN, McGenity JR T und Van Der Meer, De Lorenzo V (Hrsg.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer, Berlin, 1. Auflage, Seiten 800–837
- [36] Plotz PH, Dubin DT, Davis BD (1961) Influence of salts on the uptake of streptomycin by *Escherichia coli*. *Nature* 191:1324–1325
- [37] Pugsley AP, Zimmerman W, Wehrli W (1987) Highly efficient uptake of a rifamycin derivative via the FhuA-TonB-dependent uptake route in *Escherichia coli*. *Microbiology* 133:3505–3511
- [38] Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163:96–103
- [39] Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F, Reinhardt R (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183:27–36
- [40] Rabus R, Trautwein K, Wöhlbrand L (2014) Towards habitat-oriented systems biology of „*Aromatoleum aromaticum*“ EbN1. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:3371–3388
- [41] Recht MI, Fourmy D, Blanchard SC, Dahlquist KD, Puglisi JD (1996) RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol* 262:421–436
- [42] Schink B, Philipp B, Müller J (2000) Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 87:12–23
- [43] Sensi P (1983) History of the development of rifampin. *Rev Infect Dis* 5(Supplement 3):402–406

- [44] Sippel A, Hartmann G (1968) Mode of action of rifamycin on the RNA polymerase reaction. *Biochim Biophys Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 157:218–219
- [45] Spektrum Akademischer Verlag (1999) Definition Schwellenwertkonzentration. Heidelberg, URL <http://www.discretionary.de/discretionaryspektrum/discretionary.de/discretionarylexikon/discretionarybiologie/discretionaryschwellen/discretionarywert/discretionarykon/discretionaryzen/discretionarytra/discretionarytion/discretionary60244>, Abrufdatum: 20.03.16
- [46] Suzuki J, Kunimoto T, Hori M (1970) Effects of kanamycin on protein synthesis: inhibition of elongation of peptide chains. *J Antibiot* 23:99–101
- [47] Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 51:439–457
- [48] Thiemann JE, Zucco G, Pelizza G (1969) A proposal for the transfer of *Streptomyces mediterranei* Margalith and Beretta 1960 to the genus *Nocardia* as *Nocardia mediterranea* (Margalith and Beretta) comb. nov. *Arch Mikrobiol* 67:147–155
- [49] Umezawa H (1958) Kanamycin: its discovery. *Ann N Y Acad Scir* 76:20–26
- [50] Van Berkel WJH, Kamerbeek NM, Fraaije MW (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotech* 124:670–689
- [51] Wehrli W, Staehelin M (1971) Actions of the rifamycins. *Bacteriol Rev* 35:290–309
- [52] Widdel F, Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12:259–276
- [53] Wilkes H, Schwarzbauer J (2010) Hydrocarbons : An introduction to structure, physico-chemical properties and natural occurrence. In: Timmis KN, McGenity JR T und Van Der Meer, De Lorenzo V (Hrsg.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer, Berlin, 1. Auflage, Seiten 3–48
- [54] Wöhlbrand L, Rabus R (2009) Development of a genetic system for the denitrifying bacterium „*Aromatoleum aromaticum*“ strain EbN1. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17:41–52

- [55] Wöhlbrand L, Wilkes H, Halder T, Rabus R (2008) Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by „*Aromatoleum aromaticum*“ strain EbN1: pathway, regulation, and involved proteins. *J Bacteriol* 190:5699–5709
- [56] Wong CH, Hendrix M, Priestley ES, Greenberg WA (1998) Specificity of aminoglycoside antibiotics for the A-site of the decoding region of ribosomal RNA. *Chem Biol* 5:397–406
- [57] Yarbrough LR, Wu FY, Wu CW (1976) Molecular mechanism of the rifampicin-RNA polymerase interaction. *Biochemistry* 15:2669–2676

# A Appendix

## A.1 Zusätze für das Medium für nitratreduzierende Bakterien

### A.1.1 Vitamin B12

Für die Vitamin B12-Lösung (Cyanocobalamin) wurden 0,0025 g Cyanocobalamin in 50 mL  $H_2O_{mp}$  gelöst und anschließend in sterile Enghalsflaschen sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit. Da Cyanocobalamin lichtempfindlich ist, wurden die Enghalsflaschen sowie alle Gefäße, die während des Ansatzes der Lösung genutzt wurden, mit lichtundurchlässiger Folie umhüllt.

### A.1.2 Vitamin-Mix

Tabelle A1. Vitamin-Mix für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [0,1 L].

Substanz	Einwaage [g]
4-Aminobenzoensäure	0,0040
D-(+)-Biotin	0,0010
Nikotinsäure	0,0100
D-(+)-Panthotensäure Calciumsalz	0,0050
Pyridoxin Hydrochlorid	0,0150
DL- $\alpha$ -lipid Säure	0,0015
Folsäure	0,0040
2-Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz	0,2500

Der Vitamin-Mix wurde in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (25 mM, pH 7.1) angesetzt. Im Anschluss wurde die Lösung in autoklavierte Enghalsflaschen sterilfiltriert und in Dunkelheit bei 4 °C gelagert. Da einige Bestandteile des Vitamin-Mixes lichtempfindlich sind, wurden die Enghalsflaschen sowie während der Herstellung der Lösung genutzte Gefäße in lichtundurchlässiger Folie eingeschlagen.

### A.1.3 Spurenelemente

Für die Spurenelement-Stammlösung (komplexiert) (Tab. A2) wurden 800 mL  $\text{H}_2\text{O}_{mp}$  vorgelegt. Nachdem alle aufgeführten Chemikalien hinzugegeben wurden, wird der pH auf 6,5 eingestellt. Anschließend wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{mp}$  auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Zum Sterilisieren wurden etwa 40 mL Spurenelement-Stammlösung in Enghalsflaschen gefüllt und bei 121 °C für 20 bis 25 min autoklaviert.

**Tabelle A2. Spurenelement-Stammlösung (komplexiert) für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [1 L].**

Chemikalie	Einwaage [g]
$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	5,200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,100
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,030
$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,190
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,024
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,029
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,144
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,036

### A.1.4 Selenit/Wolfram

Für die Selenit/Wolfram-Stammlösung wurden alle aufgeführten Chemikalien (Tab. A3) in  $\text{H}_2\text{O}_{mp}$  gelöst. Lagerung und Handhabung waren identisch zu der der Spurenelement-Stammlösung.

**Tabelle A3. Selenit/Wolfram-Stammlösung für das Medium für nitratreduzierende Bakterien [1 L].**

Chemikalie	Einwaage [g]
NaOH	0,400
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,006
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,008

### A.1.5 Natriumhydrogencarbonat

Für die Natriumhydrogencarbonat-Stammlösung (1 M) wurden 84,01 g NaHCO<sub>3</sub> in 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> gegeben und anschließend auf das Endvolumen von 1000 mL aufgefüllt. Der Messzylinder wurde mit Parafilm bedeckt, um ein Ausgasen des Carbonats während des Lösevorgangs (30-60 min) zu verhindern. Nach vollständiger Lösung des NaHCO<sub>3</sub> wurde das benötigte Volumen (20, 40 oder 80 mL) mit Hilfe von Messzylindern abgemessen und in saubere Serumflaschen überführt, welche sofort mit Septen verschlossen und zusätzlich vercrimpt wurden.

In den dicht verschlossenen Serumflaschen erfolgte anschließend ein Austausch der Gasphase, bei der die in der Flasche vorliegende Gasphase durch CO<sub>2</sub> ersetzt wurde. Dazu wurde mit einer Vakuumpumpe die Gasphase entfernt und anschließend durch CO<sub>2</sub> ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Zuletzt erfolgte ein Ausgleich des Druckes auf etwa 0,4 bar. Für den Autoklavierungsvorgang (121 °C, 25 min) wurden die Flaschen in ein Gestell eingespannt, welches das selbstständige Öffnen der Flaschen bei Überdruck verhinderte. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

### A.1.6 Salzsäure

Für die HCl-Stammlösung (2 M) wurden 70 mL H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> in Messzylinder vorgelegt, 16,56 mL HCl (37 %) zugefügt und auf das Endvolumen von 100 mL mit H<sub>2</sub>O<sub>mp</sub> aufgefüllt. Die HCl-Lösung wurde in Enghalsflaschen (30-40 mL) aufgeteilt und bei 121 °C für 20 bis 25 min autoklaviert.

## A.1.7 Ascorbat

Zum Ansetzen von Ascorbat wird anoxisches Wasser verwendet, um zu vermeiden, dass Ascorbat durch enthaltenen Sauerstoff oxidiert wird. Dazu wird  $H_2O_{mp}$  in Serumflaschen autoklaviert und aus dem Autoklaven entnommen, sobald dieser auf 80 °C abgekühlt ist. Anschließend werden die Flaschen sofort für 1 bis 2 min mit  $N_2$  begast und luftdicht verschlossen. Nachdem das  $H_2O_{mp}$  auf Raumtemperatur abgekühlt ist, erfolgt ein Druckausgleich mit  $N_2$ , welches durch eine Kanüle zugeführt wird.

Das Ansetzen der Ascorbat-Stammlösung erfolgt im Eisbad. Dafür wird ein Messzylinder mit  $N_2$  begast und nach etwa 1 bis 2 min ein Teil des anoxischen Wassers vorgelegt. Um das Lösen des Ascorbats zu ermöglichen, werden pro 100 mL Endvolumen 8 mL NaOH (10 M) zugegeben. Im Anschluss werden 17,6 g (L)-Ascorbinsäure zugegeben. Nach vollständiger Lösung der (L)-Ascorbinsäure wird der pH überprüft und gegebenenfalls mit NaOH (4 mM) auf pH 7 eingestellt. Nachdem das Auffüllen auf das Endvolumen mit anoxischem Wasser erfolgt ist, wird die Ascorbat-Lösung in sterile, mit  $N_2$  begaste Druckgefäße sterilfiltriert (0,2  $\mu$ M, RC-Filter). Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

## A.2 Wachstumsexperimente - Graphen

### A.2.1 Einstellung der Benzoatkonzentration

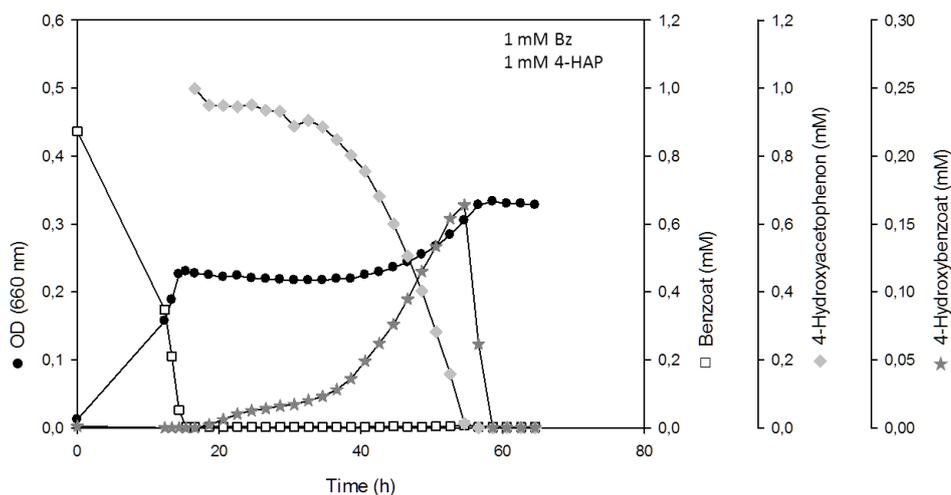
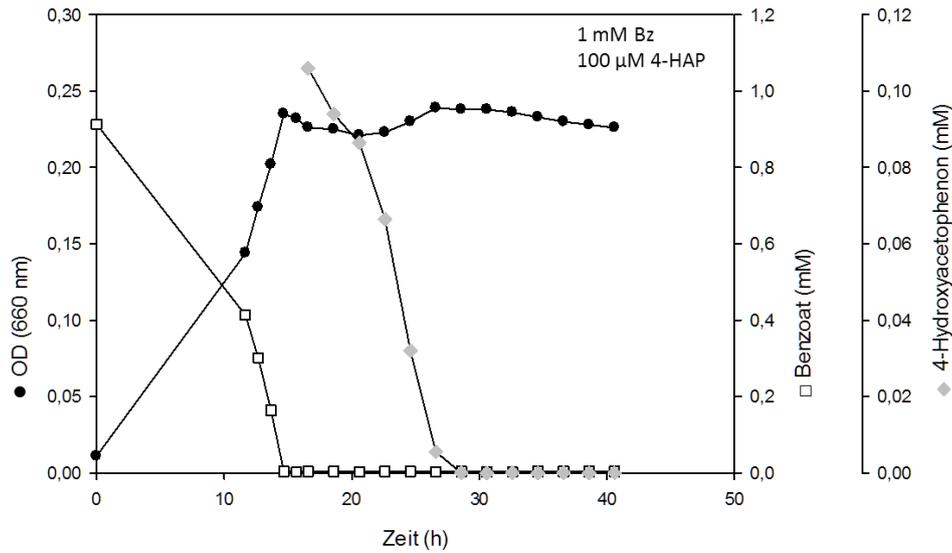


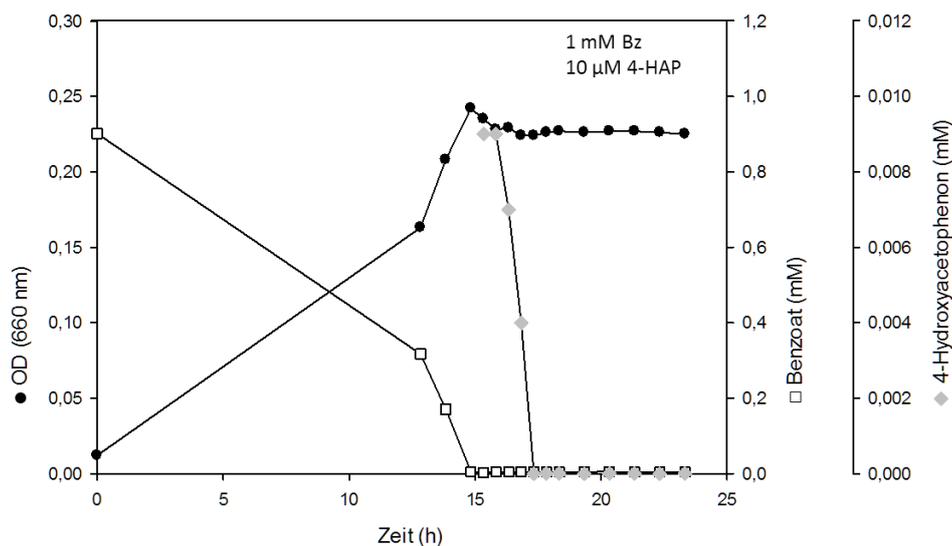
Abbildung A1. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 1 mM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. II].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM); ★, 4-Hydroxybenzoat (mM).



**Abbildung A2. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. III].**

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).



**Abbildung A3. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 1 mM Benzoat und 10 µM 4-Hydroxyacetophenon [Nr. IV].**

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

## A.2.2 Kanamycin

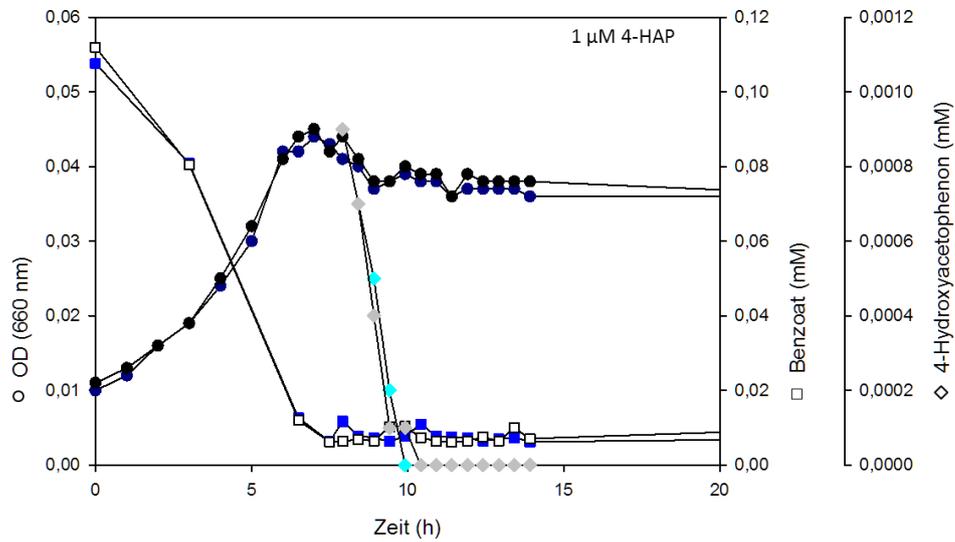


Abbildung A4. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-II].

○, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◇, 4-Hydroxyacetophenon (mM)

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Kanamycin-Zugabe; ●, ■, ◆, Testkultur, Kanamycin-Zugabe.

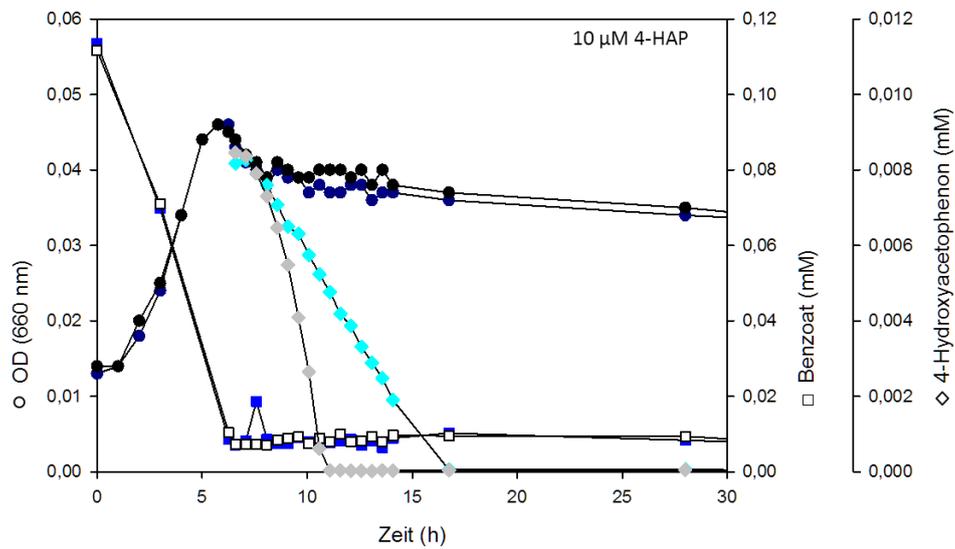


Abbildung A5. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 10 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-III].

○, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◇, 4-Hydroxyacetophenon (mM)

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Kanamycin-Zugabe; ●, ■, ◆, Testkultur, Kanamycin-Zugabe.

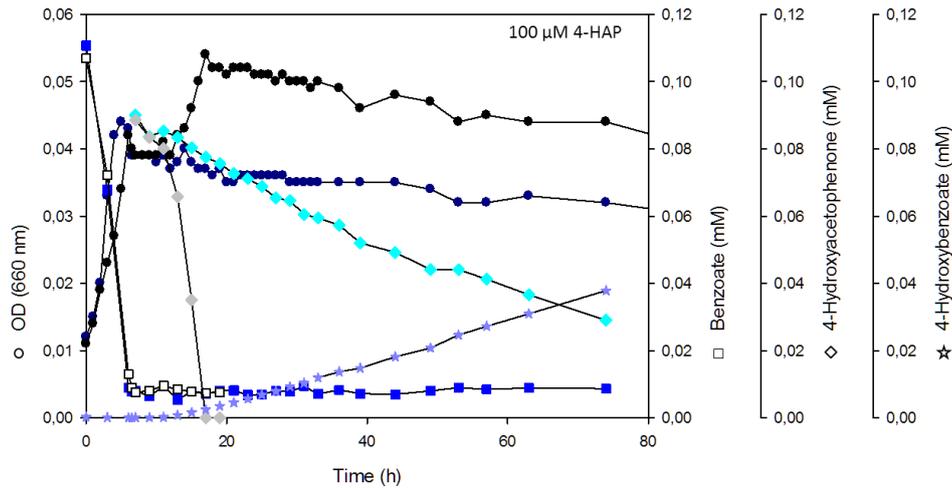


Abbildung A6. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Kanamycin [Nr. KM-IV].

○, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◇, 4-Hydroxyacetophenon (mM); ☆, 4-Hydroxybenzoat (mM)

●, □, ◇, Kontrollkultur, keine Kanamycin-Zugabe; ●, ■, ◆, ☆, Testkultur, mit Kanamycin-Zugabe.

### A.2.3 Rifampicin

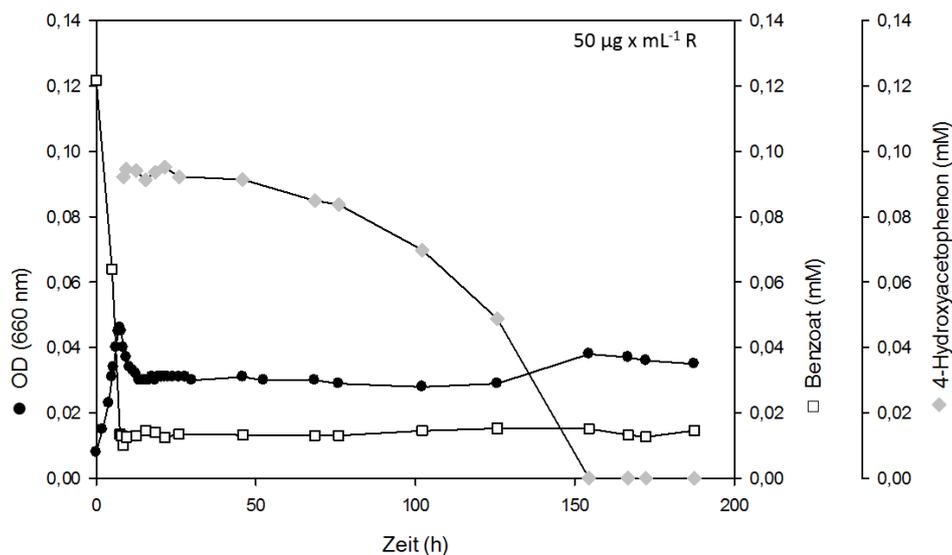


Abbildung A7. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 50 µg x mL<sup>-1</sup> Rifampicin [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

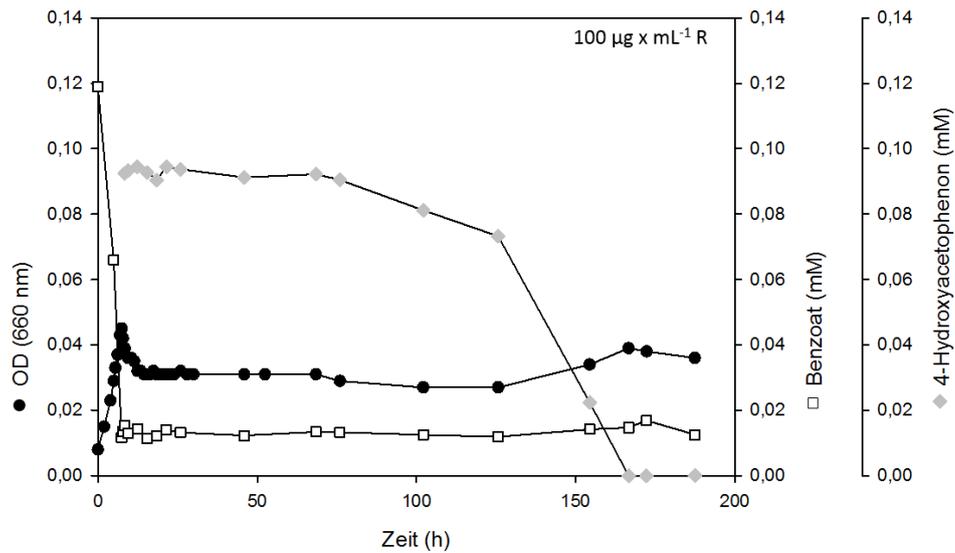


Abbildung A8. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 100 µg x mL<sup>-1</sup> Rifampicin [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

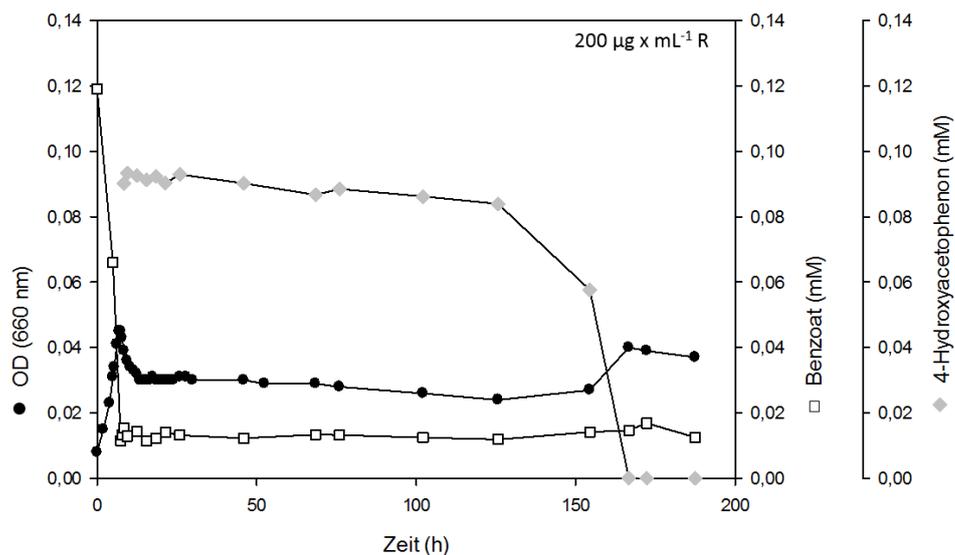
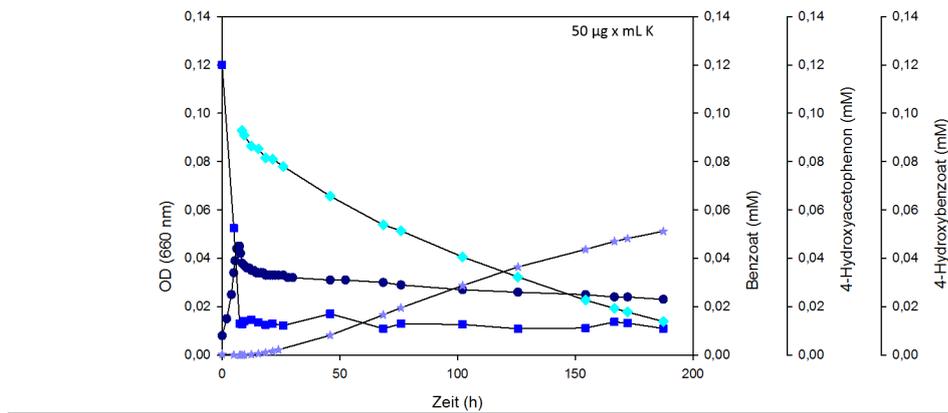


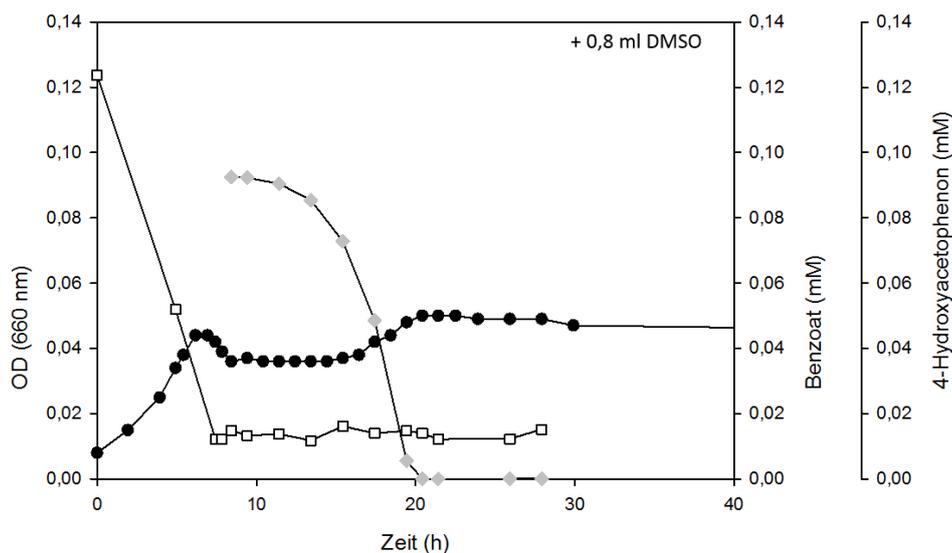
Abbildung A9. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 200 µg x mL<sup>-1</sup> Rifampicin [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).



**Abbildung A10.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von  $50 \mu\text{g x mL}^{-1}$  Kanamycin [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); ■, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM), ☆, 4-Hydroxybenzoat [mM9].



**Abbildung A11.** Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 µM 4-Hydroxyacetophenon bei Zugabe von 0,8 mL DMSO [Nr. R-I].

●, OD (660 nm); □, Benzoat (mM); ◆, 4-Hydroxyacetophenon (mM).

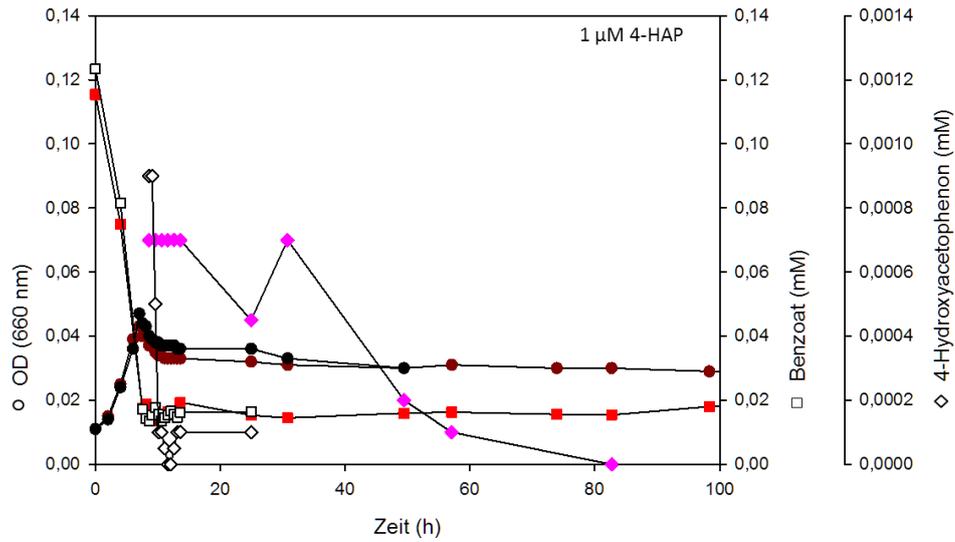


Abbildung A12. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 1 µM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, Ausschnitt der ersten 100 h des Versuchs [Nr. R-IV].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

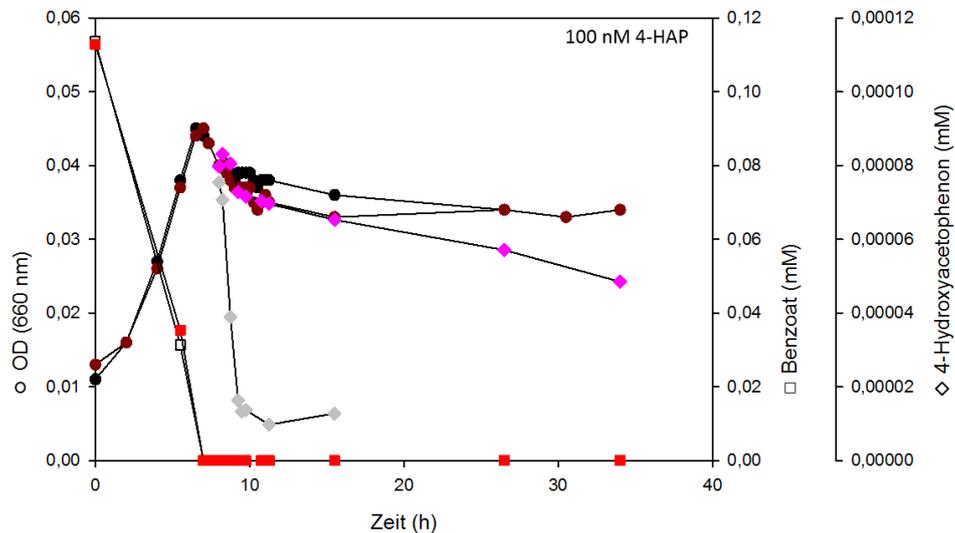
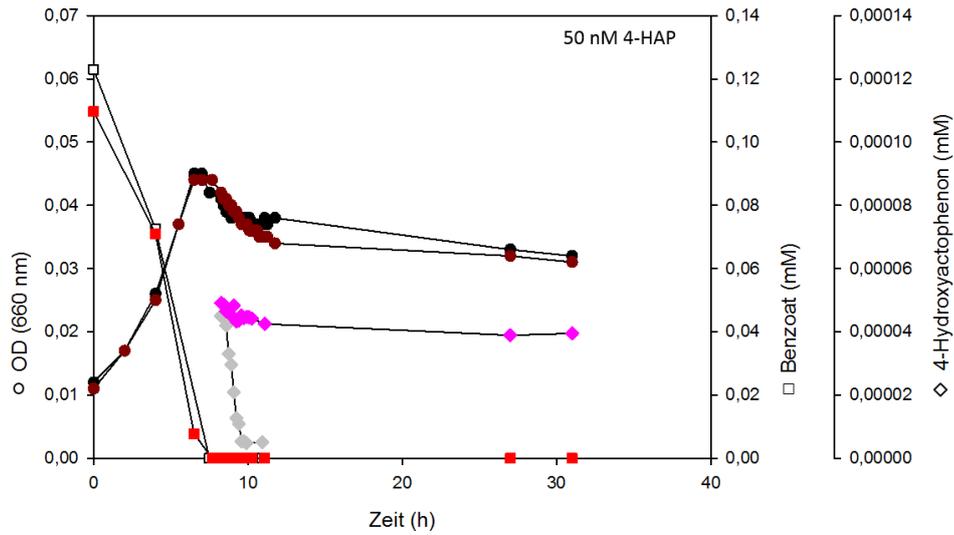


Abbildung A13. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 100 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, vollständiger Versuchszeitraum [Nr. R-V].

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.



**Abbildung A14. Wachstum von „*A. aromaticum*“ Stamm EbN1 mit 0,125 mM Benzoat und 50 nM 4-Hydroxyacetophenon sowie teilweiser Zugabe von Rifampicin, vollständiger Versuchszeitraum [Nr. R-VI].**

●, □, ◆, Kontrollkultur, keine Zugabe von Rifampicin; ●, ■, ◆, Testkultur, Rifampicin-Zugabe.

### A.3 Wachstumsexperimente - Startwerte

**Tabelle A4. Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuche Nr. I bis III].**

Nummer	Kultur	Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Startwert	
				Nitrat, 1. Zugabe (mM)	Nitrat, 2. Zugabe (mM)
I	A	0,8365	1,0250	n.a.	n.a.
	B	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	D	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	E	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	F	n.a.	-	n.a.	-
	G	n.a.	-	n.a.	n.a.
	H	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	I	n.a.	n.a.	n.a.	-
II	A	0,8725	0,9990	9,8885	4,8110
	B	n.a.	n.a.	9,1655	4,6360
	C	n.a.	n.a.	9,6360	4,5645
	D	n.a.	n.a.	9,3835	-
	E	n.a.	-	9,9030	4,5125
	F	n.a.	n.a.	9,9415	-
	G	n.a.	-	10,0220	-
	H	n.a.	n.a.	10,2605	5,0440
III	A	0,9140	0,1060	5,8075	2,7745
	B	n.a.	n.a.	5,8520	3,0170
	C	n.a.	n.a.	5,7965	2,9455
	D	n.a.	-	5,9130	2,7855
	E	n.a.	-	5,7030	-
	F	n.a.	-	5,7870	2,6390
	G	n.a.	n.a.	5,9895	-

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

Tabelle A5. Startwerte - HPLC &amp; IC -Analyse [Versuche Nr. IV bis VII].

Nummer	Kultur	Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Startwert	
				Nitrat, 1. Zugabe (mM)	Nitrat, 2. Zugabe (mM)
IV	A	0,9015	0,0090	6,7070	4,4445
	B	n.a.	n.a.	6,9620	4,6035
	C	n.a.	n.a.	7,1740	4,6855
	D	n.a.	-	7,1165	3,8400
	E	n.a.	-	7,0340	-
	F	n.a.	-	6,8265	4,6295
	G	n.a.	n.a.	7,1165	-
V	A	0,4261	0,0093	8,9565	4,3800
	B	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	D	n.a.	-	8,7820	4,4390
	E	n.a.	-	8,6925	-
	F	n.a.	-	9,2370	-
	G	n.a.	n.a.	9,1135	4,1010
VI	A	0,4382	0,0090	8,8305	-
	B	n.a.	n.a.	n.a.	-
	C	n.a.	n.a.	n.a.	-
	D	n.a.	-	n.a.	-
	E	n.a.	-	8,8910	-
	F	n.a.	-	9,2645	-
	G	n.a.	n.a.	9,2405	-
VII	A	0,5450	0,0009	4,5305	-
	B	n.a.	n.a.	4,4820	-
	C	n.a.	n.a.	4,5450	-
	D	n.a.	-	4,7055	-
	E	n.a.	-	4,6690	-
	F	n.a.	n.a.	4,6200	-

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

Tabelle A6. Startwerte - HPLC &amp; IC -Analyse [Versuche Nr. VIII bis K-I].

Nummer	Kultur	Startwert		
		Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Nitrat, (mM)
VIII	A	0,2960	0,0010	4,5885
	B	n.a.	n.a.	4,2720
	C	n.a.	n.a.	4,4685
	D	n.a.	-	4,5100
	E	n.a.	-	4,3470
	F	n.a.	n.a.	4,5835
IX	A	0,1400	0,00095	4,5030
	B	n.a.	n.a.	4,3695
	C	n.a.	n.a.	4,3910
	D	n.a.	-	4,5035
	E	n.a.	-	4,6230
	F	n.a.	n.a.	4,6170
VI	A	0,1342	0,0009	4,3815
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	0,1544	0,0009	4,2990
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	0,1485	0,0010	4,5710
	F	n.a.	n.a.	n.a.
	G	n.a.	n.a.	4,1375
	H	n.a.	n.a.	4,7170
K-I	A	1,1134	1,0271	9,2761
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	1,0330	1,00330	9,4379
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	1,0418	1,0112	9,3805
	F	n.a.	n.a.	n.a.
	G	n.a.	n.a.	9,2736
	H	n.a.	n.a.	n.a.
	I	n.a.	n.a.	10,2336

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

Tabelle A7. Startwerte - HPLC &amp; IC -Analyse [Versuche Nr. K-II bis R-II].

Nummer	Kultur	Startwert		
		Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Nitrat, (mM)
K-II	A	0,107600	0,000900	4,843000
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	0,104800	0,000900	4,689000
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	n.a.	n.a.	4,788500
	F	0,112000	0,000900	4,838000
	G	n.a.	n.a.	4,810500
K-III	A	0,113500	0,008170	4,585700
	B	0,108600	0,008285	4,523400
	C	0,106100	0,008450	4,715700
	D	0,109900	-	4,570000
	E	0,111600	0,008460	4,687500
	F	0,109300	0,008075	4,714600
K-IV	A	0,110700	0,090000	4,819400
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	0,107000	0,088600	4,786600
	F	n.a.	n.a.	n.a.
R-I	A	0,12300	0,09150	4,90850
	B	0,12170	0,09220	4,86240
	C	0,11890	0,09250	4,87060
	D	0,12010	0,09020	4,88620
	E	0,11800	0,09140	4,81230
	F	0,12000	0,09280	4,78640
	G	0,12370	0,09250	4,78280
	H	0,12460	0,09520	4,95880
R-II	A	0,11960	0,09330	4,85350
	B	0,11720	0,09360	4,84040
	C	0,11670	0,08860	4,85500
	D	0,12000	0,08960	4,88430
	E	0,12170	0,09340	5,00730

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

Tabelle A8. Startwerte - HPLC &amp; IC -Analyse [Versuche Nr. R-III bis R-VII].

Nummer	Kultur	Startwert		
		Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Nitrat, (mM)
R-III	A	0,12030	0,00880	4,84500
	B	0,11220	0,007550	5,12440
	C	0,10910	0,00680	5,22260
	D	0,12070	0,00850	4,78600
	E	0,10600	0,00920	5,48520
R-IV	A	0,11540	0,00070	4,84700
	B	0,12010	0,00050	5,03800
	C	0,11900	0,00070	5,04000
	D	0,12340	0,00090	5,00150
	E	0,11580	0,00100	4,99650
R-V	A	0,11360	0,0000754	4,3338
	B	n.a.	n.a.	4,1792
	C	n.a.	n.a.	n.a.
	D	0,11285	0,0000797	n.a.
	E	n.a.	n.a.	4,4928
	F	n.a.	n.a.	n.a.
R-VI	A	0,12300	0,00004500	n.a.
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.
	D	0,10966	0,0000491	n.a.
	E	n.a.	n.a.	n.a.
	F	n.a.	n.a.	n.a.
	G	n.a.	n.a.	n.a.
	H	n.a.	n.a.	n.a.
R-VII	A	n.a.	n.a.	n.a.
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	n.a.	n.a.	n.a.
	F	n.a.	n.a.	n.a.
	G	n.a.	n.a.	n.a.
	H	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

**Tabelle A9. Startwerte - HPLC & IC -Analyse [Versuch Nr. R-VIII].**

Nummer	Kultur	Startwert		
		Benzoat (mM)	4-HAP (mM)	Nitrat, (mM)
R-VIII	A	0,1092	1,4250e-5	n.a.
	B	n.a.	n.a.	n.a.
	C	n.a.	n.a.	n.a.
	D	n.a.	n.a.	n.a.
	E	n.a.	n.a.	n.a.
	F	n.a.	n.a.	n.a.
	G	n.a.	n.a.	n.a.
	H	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nicht analysiert, - = keine Zugabe erfolgt

# Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Außerdem versichere ich, dass ich die allgemeinen Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit und Veröffentlichung, wie sie in den Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg festgelegt sind, befolgt habe.

Oldenburg, 11. April 2016

Ort, Datum

---

Mirjam Kant

## Danksagung

Hier möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne die diese Arbeit diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Bei Prof. Dr. Ralf Rabus möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Vielen Dank für die vielen interessante Diskussionen, Vorschläge und Ideen, welche mir geholfen haben, neue Wege bei der Bearbeitung der Thematik zu beschreiten.

Prof. Dr. Karl Wilhelm-Koch möchte ich für seine hilfreichen Anmerkungen und Vorschläge im Rahmen meiner Thesis-Komitees danken und für seine Arbeit als Zweitprüfer.

Dr. Beate Grünberg möchte ich für ihre Arbeit als Koordinatorin unseres Graduiertenkollegs danken. Außerdem vielen Dank für die Hilfe bei den vielen, kleinen Problemen die während der Zeit als PhD-Student auftauchen, insbesondere für die Unterstützung, als es ans Schreiben der Arbeit ging.

Bei Dr. Lars Wöhlbrand und Dr. Kathleen Trautwein möchte ich mich dafür bedanken, mir bei der Einarbeitung in die Thematik der Kultivierung anaerober Organismen geholfen zu haben und für die Unterstützung bei der Planung der Versuche.

Bei Christina Hinrichs möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir gezeigt hat, wie anaerobes Arbeiten funktioniert. Außerdem vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche und der Arbeit im Labor.

Marvin Dörries möchte ich für die Einweisung und umfangreiche Unterstützung bei der Arbeit mit HPLC und IC danken. Die Geräte haben weniger Probleme gemacht, sobald du in der Nähe warst.

Auch meiner restlichen Arbeitsgruppe möchte ich für die interessanten Gespräche und die schöne Zeit danken. Besonderer Dank gilt meinen Bürokollegen für die nette Atmosphäre im Büro und die tolle Gesellschaft - besonders bei Nachtschichten. Vielen Dank an Jannes für das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Lars, welcher mich während der gesamten Zeit unterstützt hat, mir in schwierigen Situationen beigestanden ist und am Ende dafür gesorgt hat, dass sich das Schreiben der Arbeit nicht in die Länge gezogen hat. Außerdem vielen Dank an meine restliche Familie für die Zusprache während der gesamten Zeit der Doktorarbeit. besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinem Bruder, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen.