

**HOCHDRUCKUNTERSUCHUNGEN AN  
THERMOPHILEN BAKTERIEN**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der Naturwissenschaftlichen Fakultät III**

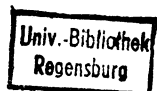
**(Biologie und Vorklinische Medizin) der Universität Regensburg**

vorgelegt von  
Günther Bernhardt  
aus Schierling

1986

Di 27141

230 / WF . 5200 . B 527



62220

**Promotionsgesuch eingereicht am:**

**Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Rainer Jaenicke**

**Prüfungsausschuß:**

## Inhaltsverzeichnis

I.	Allgemeiner Teil .....	1
1.	Einführung .....	1
2.	Extrembiotope , Baro -und Thermophilie .....	1
2.1.	Tiefsee und Barophilie .....	2
2.2.	Hochtemperaturbiotope und Thermophilie .....	4
2.3.	Hydrothermale Felder: Korrelation von extremer Thermo- und Barophilie.....	7
3.	Thermostabilität und Hochdruck .....	8
3.1.	Allgemeine Druckeffekte auf chemische Reaktionen .....	9
3.2.	Druck - Temperaturbeziehung bei Biopolymeren .....	13
4.	Zielsetzung .....	14
II.	Experimenteller Teil .....	16
1.	Chemikalien .....	16
2.	Geräte .....	17
2.1.	pH Messung .....	17
2.2.	Zentrifugen .....	17
2.3.	Kompensationsschreiber .....	17
2.4.	Densitometer zum Scannen von Gelen.....	17
2.5.	Netzgeräte für Elektrophorese und Elektrofokussierung.	17
2.6.	Szintillationszähler .....	17
2.7.	Spektralphotometer .....	17
2.8.	Hochdruckapparaturen .....	18
2.8.1.	Druckerzeugung und Druckübertragung .....	18
2.8.2.	Druckmessung .....	18
2.8.3.	Temperierung .....	18
2.9.	Temperaturmessung .....	18
3.	Hilfsmittel zur Anzucht der Mikroorganismen .....	19
4.	Herstellung der Kulturmedien .....	19
5.	Kuturmedien .....	20
5.1.	Für <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> .....	20
5.2.	Für <i>Methanothermus fervidus</i> .....	22
5.3.	Für <i>Pyrodictium occultum</i> .....	23
5.4.	Für <i>Thermotoga maritima</i> .....	24
6.	Organismen und Anzuchtbedingungen für Stammkulturen ..	24
6.1.	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> .....	24
6.2.	<i>Methanothermus fervidus</i> .....	25
6.3.	<i>Pyrodictium occultum</i> .....	25

6.4.	<i>Thermotoga maritima</i> .....	26
7.	Beimpfung und Inkubation .....	26
8.	Aufbewahren der Stammkulturen .....	26
9.	Quantifizierung des Wachstums .....	27
9.1.	Bestimmung der Bakterienmasse .....	27
9.1.1.	Extinktionsmessung .....	27
9.1.2.	Bestimmung der Bakterienmasse durch Aminosäureanalyse .....	27
9.2.	Bestimmung der Zellzahl .....	29
9.2.1.	Gesamtzellzahl .....	29
9.2.2.	Lebendkeimzahl .....	30
10.	Elektronenmikroskopie .....	30
11.	SDS - Gelelektrophorese und Färbung .....	31
12.	Radioaktive Markierung .....	31
13.	Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	31
13.1.	Lösungen .....	32
13.2.	Probenvorbereitung .....	35
13.2.1.	Standardmethode .....	35
13.2.2.	Alternativmethode .....	36
13.3.	Erste Dimension (isoelektrische Fokussierung).....	36
13.3.1.	Vorbereitung der Röhrchen .....	36
13.3.2.	IEF - Gele .....	37
13.3.3.	IEF - Bedingungen .....	37
13.3.4.	Umäquilibrieren der IEF - Gele .....	37
13.4.	Zweite Dimension .....	38
13.5.	Färbung und Behandlung mit Verstärker .....	38
14.	Autoradiographie .....	39
III.	Ergebnisse und Diskussion .....	40
1.	Wahl der Organismen .....	40
2.	Screening in Stahlbehältern .....	40
3.	Anzucht von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> auf Formiat .....	43
4.	Thermostabilität der Kulturmedien unter erhöhtem Druck .....	45
5.	Entwicklung der Kulturgefäße .....	45
5.1.	Orientierende Vorversuche .....	45
5.2.	Nickel-Tuben .....	46
5.3.	Prüfung auf H <sub>2</sub> -Dichtigkeit .....	47
5.4.	Prüfung auf Druck-Dichtigkeit .....	47
5.5.	Gasaustausch in den Ni-Tuben .....	47



6.	Stabilität von Aminosäuren, Polyglycin und extrem thermophilen Bakterien unter "Black Smoker"-Bedingungen .....	49
6.1.	Versuche zur Anzucht von <i>Thermotoga maritima</i> bei 250°C, 300°C und 265 bar über 6 h (Bedingungen von Baross & Deming) und 16 h .....	50
6.1.1.	Temperierung des Autoklaven .....	50
6.1.2.	Geringfügige Wachstumshemmung von MSB 8 bei 82°C durch erhöhten hydrostatischen Druck .....	52
6.1.3.	Inkubation von MSB 8 unter hydrothermalen Bedingungen.	53
6.1.4.	Aminosäureanalyse von MSB 8 Suspensionen.....	53
6.2.	Stabilität von Aminosäuren bei 250°C und 260 bar .....	55
6.3.	Hydrothermale Stabilität von Polyglycin und Zellen von <i>Pyrodictium occultum</i> .....	61
6.3.1.	Polyglycin .....	61
6.3.2.	Zellen von <i>Pyrodictium occultum</i> .....	61
7.	Optimierung der Anzuchtbedingungen von <i>Methanococcus thermolithotrophicus</i> unter Hochdruck.....	63
7.1.	Bestimmung der Zellmasse von <i>Mc. thermolithotrophicus</i>	63
7.1.1	Bei Atmosphärendruck .....	63
7.1.2	Nach der Hochdruckbehandlung .....	64
7.2.	Die Druckabhängigkeit des Wachstums in verschiedenen Kulturmedien .....	66
7.3.	Einfluß von verschiedenen Puffersubstanzen auf das Wachstum von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> in Schüttelkulturen (65°C, 2 bar) .....	68
7.4.	pH-Abhängigkeit des Wachstums in MG <sup>-</sup> H .....	69
7.4.1.	Meßanordnung .....	69
7.4.2.	Kalibrierung der Meßkette bei 20°C und 65°C .....	71
7.4.3.	pH-Abhängigkeit des Wachstums .....	72
7.4.4.	Bestimmung von Ni und Cu im Medium unter hydrothermalen Bedingungen .....	74
7.4.5.	Einfluß von CO <sub>2</sub> auf das Wachstum unter Druck .....	75
7.4.5.1.	Löslichkeit von CO <sub>2</sub> .....	75
7.4.5.2.	pH-Messung unter Hochdruck bei 65°C .....	77

7.4.5.2.1	Typ und Charakteristik der verwendeten elektrochemischen Kette .....	77
7.4.5.2.2	Druckabhängigkeit der pH-Werte in verschiedenen Medien in Gegenwart und in Abwesenheit von CO <sub>2</sub> bei 65°C	79
7.4.5.3.	Einfluß hoher CO <sub>2</sub> Konzentrationen auf den pH-Wert von MG <sup>-</sup> H bei 65°C unter erhöhtem Druck .....	81
7.4.5.4.	Druckabhängigkeit der Zellausbeute in Gegenwart und in Abwesenheit von HEPES und PIPES .....	84
8.	Hochtemperatur-Hochdruckapparatur zur Aufnahme von Wachstumskurven .....	86
9.	Druckeinflüsse auf das Temperaturoptimum von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> .....	89
10.	Hochdruckeinflüsse auf die Zellmorphologie .....	91
11.	Druckabhängigkeit der Wachstumskurven bei verschiedenen Temperaturen .....	93
12.	Druckadaptation von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> bei nicht optimalen Bedingungen (56°C und 220 bar) .....	96
13.	Stabilität und Morphologie von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> in Abhängigkeit von der Substratkonzentration .....	98
14.	Veränderungen des Aminosäuremusters unter Hochdruck .....	103
15.	Massenspektrometrie .....	109
16.	Fluoreszenzspektren der Säurehydrolysate von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> -Zellen .....	112
17.	Proteinmuster von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> bei Atmosphärendruck und bei 500 bar und 65°C .....	113
17.1.	Bedingungen für die radioaktive Markierung .....	113
17.1.1.	Anzucht in HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Mangelmedium in reiner H <sub>2</sub> - Atmosphäre .....	113
17.2	SDS-PAGE von <i>Mc. thermolithotrophicus</i> Gesamtprotein .....	115
17.3	Radioaktive Markierung und Einbau von <sup>14</sup> NaHCO <sub>3</sub> ....	117
17.4	Autoradiographische Analyse von SDS-Gelel.	118
17.5.	Optimierung der isoelektrischen Fokussierung .....	119
17.6.	2-D-Gele von Proben unter Standardbedingungen und unter Hochdruck .....	121
III.	Zusammenfassende Diskussion .....	125
IV.	Zusammenfassung .....	137
V.	Literaturverzeichnis .....	139

# HOCHDRUCKUNTERSUCHUNGEN AN THERMOPHILEN BAKTERIEN

## I. Allgemeiner Teil

### 1. Einführung

Seit den Anfängen der Bakteriologie gegen Mitte des vorigen Jahrhunderts standen beinahe ausschließlich solche Organismen im Mittelpunkt der mikrobiologischen Forschung, die ihren Lebensraum mit dem Menschen teilen. In erster Linie sind hier die Krankheitserreger anzuführen, Bodenbakterien oder aber Mikroben, die zur Produktion von Nahrungsmitteln, Chemikalien und Pharmaka einsetzbar sind und dadurch technologische Bedeutung erlangt haben. Der Großteil dieser Mikroorganismengruppen ist gekennzeichnet durch die Ähnlichkeit ihrer Wachstumsansprüche hinsichtlich der physikochemischen Parameter Temperatur und Druck. Im Vergleich zu kosmischen Verhältnissen zeichnen sich die meisten, bislang untersuchten, terrestrischen und aquatischen Biotope durch gemäßigte Temperaturwerte aus. Dasselbe gilt für den ökologischen Faktor Druck, der zudem zeitlich konstant ist. Aktives tierisches, pflanzliches und mikrobielles Leben (mit Einschränkungen) ist auf einen engen Temperaturbereich, der sich von etwa  $-2$  bis  $+50^{\circ}\text{C}$  erstreckt, beschränkt. Die Zahlenangaben geben in diesem Falle nicht die klimatischen Verhältnisse wieder, sondern die tatsächliche Temperatur im Organismus (Schmidt-Nielsen, 1975).

### 2. Extrembiotope, Baro-und Thermophilie

Erst in allerjüngster Zeit ist es gelungen, in die extremen Biotope unseres Planeten vorzudringen und Untersuchungsmaterial für geologische, mikrobiologische, aber auch biochemische Fragestellungen zu gewinnen. Die Entwicklung der benötigten technischen Hilfsmittel wie z.B. geeigneter Tauchboote, Vorrichtungen und Gerätschaften zum Aufspüren und zur

anschließenden Entnahme von Boden- und Wasserproben (unter hohen hydrostatischen Drücken und sehr hohen Temperaturen) war hierfür Voraussetzung (Macdonald u. Luyendyk, 1981; Tabor et al., 1981; Jannasch et al., 1984; Colwell u. Tabor, 1982).

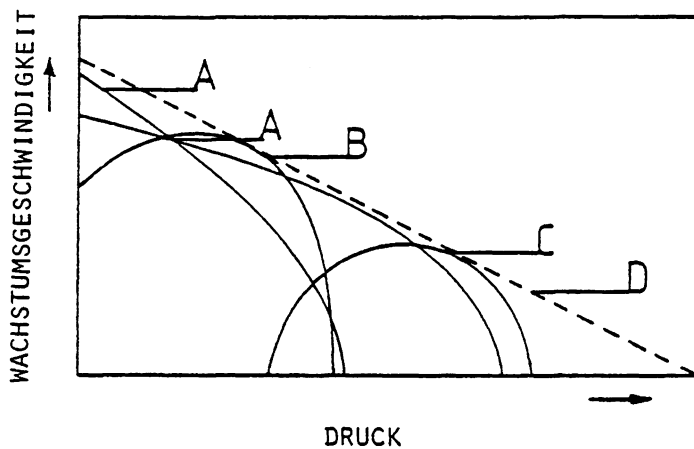
## 2.1. Tiefsee und Barophilie

Mit einem Volumen von  $1,37 \cdot 10^9 \text{ km}^3$  machen auf der Erde die Wassermassen der Ozeane mit durchschnittlichen Meerestiefen von 3800 m ( $P = 380 \text{ bar}$ ) den größten Teil der Biosphäre aus. Hoher hydrostatischer Druck ( $P > 1000 \text{ bar}$ ), niedrige Temperatur ( $2 - 4^\circ \text{C}$ ), absolute Dunkelheit und Nahrungsknappheit kennzeichnen die extremen Tiefen (Macdonald, 1975; Marshall, 1979). Obwohl sich frühere Expeditionen lediglich auf ausgedehnte Bereiche der Abyssalzone beschränkten (2000 - 6000 m; Regnard, 1891), ist seit einiger Zeit erwiesen, daß trotz der extremen Bedingungen, selbst in den größten Tiefen, (z.B. Marianengraben, 11034 m) Lebewesen angetroffen werden, neben Mikroorganismen vorzugsweise Würmer, Muscheln, Crustaceen, Mollusken und Fische (Bruun, 1951 u. 1956; Marshall, 1954). Angesichts dieser ökologischen Befunde stellte sich die Frage, ob die in der Tiefsee lebenden Organismen an die physikalischen und ernährungsphysiologischen Bedingungen in besonderer Weise angepaßt sind oder nicht. Die Existenz tatsächlich "barophiler" Lebewesen war bis vor kurzem kontrovers (ZoBell u. Morita, 1957; Kriss, 1962; ZoBell, 1970, Morita, 1972; Marquis, 1976; Marquis u. Matsumura, 1978).

Der Terminus "Barophilie", der zuerst von ZoBell und Johnson (1949) eingeführt worden ist, wird heutzutage in zweierlei Weise gebraucht:

- Optimales Wachstum wird erst bei Drücken oberhalb 1 bar (Wachstum auch bei Normaldruck und bei  $P > \text{Atmosphärendruck}$ ) beobachtet (Erhöhtes Wachstum als Folge von verbesserter Substratversorgung unter Druck (Gaslöslichkeit !)) fällt nicht unter diese Definition).

- Erhöhter Druck ist für Wachstum und Vermehrung absolut erforderlich (bei Atmosphärendruck keinerlei Wachstum).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Wachstums von Mikroorganismen in Abhängigkeit vom hydrostatischem Druck; das Schema basiert auf den bisher verfügbaren Daten.

- A: Barotoleranz unterschiedlichen Ausmaßes über verschiedene Druckbereiche.
- B: Barophilie
- C: Obligate Barophilie
- D: Kontinuierliche Wachstumsabnahme bei Druckerhöhung

In Abb. 1 sind die Verhältnisse zur Verdeutlichung nach Jannasch (1984) schematisch dargestellt. Wachstum und metabolische Aktivität natürlich vorkommender Mikroorganismenpopulationen, wie auch die Vermehrung von Reinkulturen sind bis zu einem gewissen Grade "barotolerant". Mit anderen Worten: Bakterien sind in der Lage, erhöhte hydrostatische Drücke unterschiedlicher Höhe bis zu artspezifischen Maximalwerten zu tolerieren.

Der eindeutige Beweis für die Existenz von barophilen Bakterien wurde erstmals 1979 von A.A. Yayanos gemeinsam mit A.S. Dietz und R. Van Boxtel erbracht, als es gelang durch Anwendung einer Verdünnungstechnik in Silica-Gel Medium, das reichlich mit organischen Nährstoffen supplementiert war (Dietz und Yayanos, 1978) einen Spirillen-ähnlichen Mikroorganismus aus 5000 m Tiefe zu isolieren. Wachstum und Vermehrung mit einem breiten Optimum um 500 bar wurden bis 1000 bar beobachtet, mit einer Verdopplungszeit von 8 - 9 h bei 2 - 4°C. Das 30 - fach verlangsamte Wachstum bei 1 bar ( 2 - 4°C ) gegenüber den Optimalbedingungen ( 500 bar, 2 - 4°C ) beweist den barophilen Charakter dieses Organismus eindeutig. Aus einem Amphipoden, der im Marianengraben ( ca. 10050 m Tiefe ) gefangen wurde, isolierten dieselben Autoren einen "Obligat Barophilen": Mit einer Generationszeit von 33 h wächst dieser Stamm relativ gut bei 1000 bar und 2°C, verglichen mit den optimalen Wachstumsparametern ( Generationszeit 25 h ) bei 690 bar. Bei hydrostatischen Drücken kleiner 350 bar bleiben Wachstum und Vermehrung völlig aus, d.h. erhöhter Druck ist unbedingt erforderlich. Von Deming wurden weitere Barophile aus dem Gastrointestinaltrakt von Amphipoden und das Sediment bewohnenden Holothurien isoliert (Deming und Colwell, 1982 Deming und Colwell, 1982 a; Deming et al. 1981).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß die oben beschriebenen Mikroorganismen, sowie auch sehr viele barotolerante Stämme im psychrophilen Bereich gefunden werden. So ist an dieser Stelle noch unklar, ob eine positive Korrelation zwischen niedrigen Temperaturen ( 2 - 4°C ) und Barophilie bzw. obligater Barophilie bestehen muß (Yayanos et al. 1982; Jannasch und Taylor, 1984 )

## 2.2. Hochtemperaturbiotope und Thermophilie

Die Verfügbarkeit flüssigen Wassers ist eine essentielle Voraussetzung für Leben. Die bislang bekannten extrem Thermophilen wurden allesamt im Laufe des letzten Jahrzehnts aus submarinen Hydrothermalfeldern und vulkanischen Quellen des Festlands isoliert wie z.B. aus Solfatarenfeldern sowie aus kochenden Schlamm - und Wasserlöchern. Auch anthropogene

Hochtemperaturgebiete wie Überlaufwässer von Geothermalkraftwerken, Heißwasserbohrungen oder auch schwelende Kohlehalden sind Biotope für extrem Thermophile, die fast ausschließlich zu den Archaeobakterien gehören (Brock, 1978; Stetter, 1985; Stetter u. König, 1983). Das bislang extremst thermophile Bakterium ist *Pyrodictium occultum*. Es gedeiht in Laborkultur optimal bei 105°C, hat eine obere Wachstumsgrenze von 110°C, stellt aber Wachstum und Vermehrung bei Temperaturen unter 82°C vollständig ein (Stetter et al. 1983 )

In diesem Zusammenhang muß betont werden, daß extrem Thermophile unbedingt hohe Temperaturen zum Wachstum benötigen und daher im mesophilen Bereich keinerlei Aktivität zeigen.

Da Thermophilie kein taxonomisches Kriterium darstellt, beruht die allgemein akzeptierte Kategorisierung in thermotolerant, thermophil und extrem (extremst) thermophil auf ziemlich willkürlich gewählten Kardinaltemperaturen (Sonnleitner, 1983;). Heinen nannte extrem thermophile Bakterien wie *Bacillus caldolyticus*, *B.caldotenax* und *B.caldovelox* "caldoaktiv" (Heinen und Heinen, 1972 ), Aragno hingegen bezeichnete alle Organismen als thermophile Bakterien sobald die Wachstumstemperatur über 45°C lag. Diese starre Methode zur Klassifizierung kann zu formalen Problemen führen, so bei *B.caldolyticus* der aus einer 84°C heißen Quelle isoliert wurde. Daß *B. caldolyticus* aber bei 105°C kultivierbar sei (Heinen u. Lauwers, 1981), ist heute widerlegt (König, persönliche Mitteilung). Die angeführten Beispiele zeigen, wie unklar und verschwommen die Terminologie thermophiler Organismen ist. Die thermophile Grenze bei 55-60°C ist willkürlich gewählt; die Orientierung an Kardinaltemperaturen erscheint wenig sinnvoll (Brock, 1986). In der Tabelle 1 wird eine Einteilung nach der optimalen Wachstumstemperatur versucht.

**Tabelle 1:** Einteilung der Bakterien nach der optimalen Wachstumstemperatur.

Bezeichnung	$T_{\text{opt}}$
psychrophil	$< 20^{\circ}\text{C}$
mesophil	$> 20^{\circ}\text{C} < 42^{\circ}\text{C}$
thermophil	$> 42^{\circ}\text{C} < 79^{\circ}\text{C}$
extrem thermophile	$> 79^{\circ}\text{C} < 100^{\circ}\text{C}$
pyrophil *	über dem Siedepunkt des Wassers

\* Stetter (persönliche Mitteilung).

Um wässrige Kulturmedien auf  $105$  bzw.  $110^{\circ}\text{C}$  zu bringen, mußten Heinen und Stetter die Wachstumsexperimente bei leichtem Überdruck ( $P > 1 \text{ bar}$ ) ausführen.



### 2.3. Hydrothermale Felder: Korrelation von extremer Thermo- und Barophilie

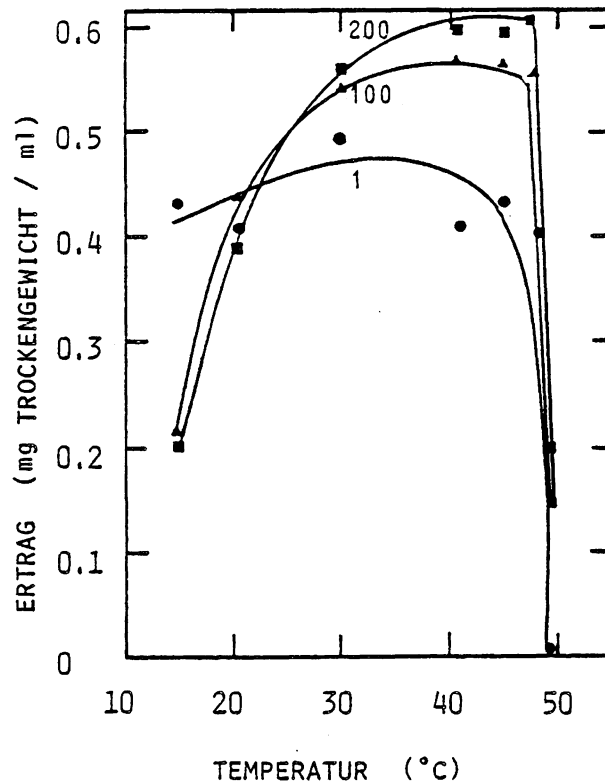
Die heißen Quellen in der Tiefsee wurden bei der Suche nach vulkanischer Aktivität, wie sie die Theorie der Plattentektonik voraussagte, an marinen Verwerfungszonen entdeckt (Williams et al. , 1974; Lister 1977; Edmond et al., 1982; Rona et al. , 1984). An diesen Zonen, die sich 25000 Meilen über Atlantik, Pazifik und den Indischen Ozean erstrecken, gerät frisch ausgetretene Lava in Kontakt mit Meerwasser, das in Erdspalten bis in einige Kilometer Tiefe, eindringt. Die Berührung mit dem über  $350^{\circ}\text{C}$  heißen Basalt verwandelt das Meerwasser in eine hydrothermale Flüssigkeit, in welcher molekularer Wasserstoff,  $\text{H}_2\text{S}$  und Methan angereichert sind. Vermischt sich die aufsteigende Flüssigkeit mit sauerstoffhaltigem Meerwasser, so tritt sie als "warme Quelle" am Meeresgrund, gegen den dort herrschenden hydrostatischen Druck mit  $8 - 23^{\circ}\text{C}$  und einer Geschwindigkeit von  $1 - 2 \text{ cm sec}^{-1}$  wieder aus. Findet keine Vermischung statt, so spricht man von "heißen Quellen" (Schlote, weiße und schwarze Raucher). Die Wassertemperatur beträgt dann ca.  $350^{\circ}\text{C}$  bei Drücken von 250 -300 bar und einer Ausströmgeschwindigkeit von  $2 \text{ m sec}^{-1}$ . Warme Quellen können Sauerstoff enthalten oder auch nicht, heiße Quellen hingegen sind immer anoxisch (Jannasch und Taylor, 1984 )

In der Umgebung der warmen Quellen bei  $8 - 20^{\circ}\text{C}$  ist die Bakterienflora äußerst reichhaltig und vielfältig, so daß die Isolierung von z.B. Schwefeloxidierern, Manganoxidierern und einem thermophilen Methanogenen gelang ( $T_{\text{opt}} = 86^{\circ}\text{C}$ ) (Jannasch, 1984; Jones et al. , 1983 ). Dennoch ist es der Arbeitsgruppe um Jannasch bisher niemals geglückt, Zellen in heißen Emissionen ( $338 - 350^{\circ}\text{C}$ ) nachzuweisen (Epifluoreszenz und ATP - Bestimmung) (Jannasch, 1985 ). Bei der Studie von Baross und Deming (1983), in der bakterielle Mischpopulationen, die aus einem "heißen" Raucher ( $306^{\circ}\text{C}$ ) isoliert wurden und unter einem hohen hydrostatischen Druck ( 265 bar ) erst bei  $250^{\circ}\text{C}$  optimal wachsen sollen, stellt sich unmittelbar die Frage, ob es sich bei diesem Befund um Kontaminationen oder Artefakte handelt. Ob durch den hohen hydrostatischen Druck das Temperaturoptimum zu solch extrem hohen Temperaturen hin

verschoben werden kann, bedarf immer noch der Bestätigung.

### 3. Thermostabilität und Hochdruck

Untersuchungen von ZoBell und Johnson ( 1949 ) zeigen eindeutig, daß mesophile Bakterien bei höheren Temperaturen ( 20 → 40° ) gegenüber Hochdruck weniger empfindlich sind. Will man Druckeffekte untersuchen, dann ist es unbedingt notwendig Temperaturen genau zu spezifizieren.



**Abb. 2:** Wachstumsertrag von *E.coli* Kulturen bei Atmosphärendruck (●), 100 atm (▲) und 200 atm (■) in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur (nach Marquis, 1976).

Hoher hydrostatischer Druck ist in der Lage, das Temperatur-optimum mesophiler Organismen um ein paar Grad Celsius zu höheren Temperaturen hin zu verschieben (Marquis und Matsumura, 1978). Malatdehydrogenase aus *B. stearothermophilus* (  $T_{opt} = 55^{\circ}C$  ) weist noch bei  $105^{\circ}C$  enzymatische Aktivität auf; dies aber nur bei einem Druck von 1700 bar (Morita und Mathemeier, 1964; Morita, 1972).

### 3. 1. Allgemeine Druckeffekte auf chemische Reaktionen

Die meisten chemischen Reaktionen gehen mit Volumenänderungen einher, da in der Regel die Summe der partiellen molaren Volumina der Edukte nicht identisch ist mit der Summe der partiellen molaren Volumina der Produkte.

Aufgrund des Braun - le Chatelier'schen Prinzips (s.u.) treten Druckwirkungen immer dann auf, wenn chemische Reaktionen mit Volumenänderungen verknüpft sind. In der Hochdruckchemie werden zwei Arten der Volumenänderung betrachtet:

- Das Reaktionsvolumen  $\Delta V$

- Das Aktivierungsvolumen  $\Delta V^*$

Beide gehen in die folgenden Beziehungen ein, die zugleich die Möglichkeit zu ihrer experimentellen Bestimmung erkennen lassen:

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial P} \right)_T = - \frac{\Delta V}{R \cdot T} \quad ( 1 )$$

$$\left( \frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T = - \frac{\Delta V^*}{R \cdot T} \quad ( 2 )$$

K = Gleichgewichtskonstante,

k = Geschwindigkeitskonstante,

R = allg. Gaskonstante ( 82,06 ml . atm / mol . °K ),

T = abs. Temperatur in °K,

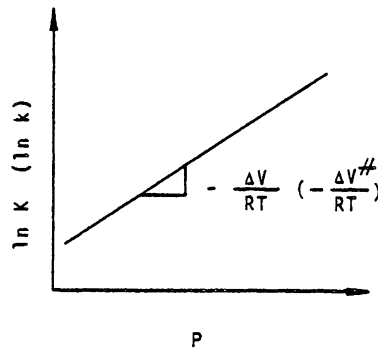
P = Druck.

Zur Herleitung dieser Beziehungen aus thermodynamischen Grundgleichungen sei auf Weale (1967), Johnson und Eyring (1970 ) und Schmid (1977) verwiesen.

Wenn sowohl  $\Delta V$  als auch  $\Delta V^*$  unabhängig vom Druck sind, dann sollte nach Gleichung 1 und 2 die Auftragung von  $\ln K$  ( $\ln k$ ) gegen  $P$  eine Gerade mit der Steigung :

$$- \frac{\Delta V}{R \cdot T} \quad \left( - \frac{\Delta V^*}{R \cdot T} \right)$$

ergeben.



**Abb. 3:** Auftragung des natürlichen Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten (bzw. Geschwindigkeitskonstanten) gegen den Druck.

In biologischen Systemen ist dies die Ausnahme, da  $\Delta V$  druckabhängig ist; es treten in dieser Auftragung fast immer Abweichungen von der Idealität auf, da sich die Kompressibilitäten der Edukte und Produkte in der Regel unterscheiden. Trotz dieser Abweichungen sind  $\Delta V$  und  $\Delta V^*$  ein geeignetes quantitatives Maß zur Beurteilung der Druckabhängigkeit chemischer sowie biologischer Prozesse.

In der Barobiologie verwendet man gewöhnlich die integrierten Formen obiger Gleichungen, um  $\Delta V$  und  $\Delta V^*$  aus Meßdaten zu berechnen, welche man bei Atmosphärendruck und entsprechenden

höheren Drücken gewonnen hat:

$$\Delta V = \frac{2,30 R \cdot T}{P - 1} \log \frac{K_1}{K_P} \quad ( 3 )$$

$$\Delta V^* = \frac{2,30 R \cdot T}{P - 1} \log \frac{k_1}{k_P} \quad ( 4 )$$

$K_1$  und  $K_P$  = Gleichgewichtskonstante unter Atmosphärendruck und unter erhöhtem Druck.

$k_1$  und  $k_P$  = Geschwindigkeitskonstante unter Atmosphärendruck und unter erhöhtem Druck.

Nach dem Braun - le Chatelier'schen Prinzip liegt bei Reaktionen, die unter Volumenzunahme (positives  $\Delta V$ ) verlaufen das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte; bei Volumenabnahme (negatives  $\Delta V$ ) auf der Seite der Produkte. Ebenso führt positives  $\Delta V^*$  zu einer Verlangsamung, negatives  $\Delta V^*$  zu einer Beschleunigung der Reaktion. Die Gleichungen 2 und 4 sind auf jeden beliebigen Prozeß anwendbar, sofern man in der Lage ist, Geschwindigkeitsdaten zu gewinnen; es lassen sich also auch für so komplexe Reaktionen, wie sie bei Bakterienwachstum und Biolumineszenz vorliegen, Aktivierungsvolumina bestimmen. Ihre molekulare (mechanistische) Deutung bereitet allerdings oft große Schwierigkeiten (Le Noble, 1967; Asano u. Le Noble, 1978). Im Gegensatz zum Aktivierungsvolumen sind die Reaktionsvolumina der direkten Messung durch Dilatometrie oder Dichtebestimmung unmittelbar zugänglich, sofern das Reaktionsvolumen druckunabhängig ist.

In Tab. 2 ist eine Auswahl von Änderungen des Reaktionsvolumens, die biologische Bedeutung besitzen, aufgelistet (Jaenicke, 1981, 1983).

**Tabelle 2:** Volumenänderungen ( $\Delta V$ ) die mit biochemisch wichtigen Reaktionen (25°C) assoziiert sind.

Reaktion	Beispiel	$\Delta V$ (cm <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )
Neutralisation	$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$	+ 21.3
oder Ionenpaar-Bildung	$CO_3^{2-} + 2H^+ \rightarrow HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2CO_3$	+ 25.5
	$Protein-COO^- + H^+ \rightarrow Protein-COOH$	+ 10.0
	$Protein-NH_3^+ + OH^- \rightarrow Protein-NH_2 + H_2O$	+ 20.0
H-Brücken-Bildung	$(HCOOH)_2$ in $H_2O$	- 4.1
	Poly-L-Lysin (Helix-Bildung)	- 1.0
	Poly (A+U) (Helix-Bildung)	+ 1.0 <sup>a</sup>
Hydrophobe Solvation	$(CH_4)_{Hexan} \rightarrow (CH_4)_{H_2O}$	- 22.7
Protein Assoziation	Quellen von Elastin in $H_2O$	- 6.0
(pro Untereinheit)	Tubulin (Propagation)	+ 90.0
	Ribosom (E.coli, 30 S + 50 S $\rightarrow$ 70 S)	+ 240.0
Protein-Denaturierung	Myoglobin (pH 5, 20°C)	- 98.0
oder Dissoziation	LDH ( $M_4 \rightarrow 4M$ )	- 390.0

<sup>a</sup> Für DNA-Denaturierung: 0 - 2.7 cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup> (pro Basenpaar)

Im Gegensatz zu der Auffassung, daß Druck auch in biologisch relevanten Bereichen die Eigenschaften des Wassers merklich beeinflusst (Drost - Hansen, 1972) zeigen neuere Untersuchungen, daß die wohlbekannten Anomalien des Wassers bei diesen Drücken erhalten bleiben, ohne daß sich die Solvations-eigenschaften ändern (Lang und Lüdemann, 1982).

Wie aus Tab.2 zu entnehmen ist, sind es vorrangig die sog. schwachen Wechselwirkungen, die jeglicher Art von Biopolymeren Struktur, Stabilität und Funktionalität verleihen, die durch hohe hydrostatische Drücke beeinflusst werden.

Die Auswirkungen von Druck und Temperatur auf Proteine und Enzymsysteme wurden von Jaenicke ( 1981 ) ausführlich diskutiert.

### 3.2. Druck - Temperaturbeziehung bei Biopolymeren

Würde man naiverweise die ideale Gasgleichung auf Biopolymere anwenden, so müßte man eine reziproke Beziehung zwischen den Parametern Druck und Temperatur erwarten. Druck und Temperatur sollten antagonistisch wirken. Selbst bei isolierter Betrachtung nur der schwachen Wechselwirkungen gilt diese Abhängigkeit nicht (Suzuki u. Taniguchi, 1972).

Tab. 4 gibt Beispiele für das Vorzeichen von  $\Delta V$  und  $\Delta H$  für 3 Bindungstypen wieder:

Wechselwirkung	Vorzeichen $\Delta V$	Vorzeichen $\Delta H$
H - Brücken	-	-
Hydrophobe WW	+(a)	+(b)
Ionische WW	+	+ oder -

(a) : Vorzeichen von  $\Delta V$  kehrt sich bei Drücken über 1000 bar bzw. 3000 bar um.

(b) : Vorzeichen für  $\Delta H$  kehrt sich bei Temperaturen  $> 65^{\circ}\text{C}$  um.

Behandelt man nun die Wirkung von P und T im Hinblick auf komplexe Systeme wie Biopolymere, Organelle oder ganze Organismen, so dürfte es schwer fallen, die Auswirkungen auf Stoffwechsel, Struktur, Wachstum und Vermehrung von Mikroorganismen abzuschätzen. Hinzu kommt, daß die Aktivierungsvolumina wichtiger Stoffwechselreaktionen unterschiedliche Vorzeichen haben können. Biochemische Reaktionen lassen sich bezüglich ihrer Druckabhängigkeit in 3 Gruppen einteilen:

1. Druckabhängige Reaktionen mit negativem  $\Delta V^*$  - Wert
2. Druckabhängige Reaktionen mit positivem  $\Delta V^*$  - Wert
3. Druckunabhängige Reaktionen ohne Nettoänderung des Volumens.

Die Gruppenzugehörigkeit wird vorrangig bestimmt durch die Struktur der Ausgangsstoffe und die Strukturen der "aktivierten" Übergangskomplexe.

Da sich diese Strukturen je nach Temperatur verändern können, bedeutet dies, daß der Druck - je nach Temperatur - auf ein einzelnes Enzym alle drei genannten Auswirkungen haben kann.

Die Summation der Folgen von

- unterschiedlichen Druckeffekten auf verschiedene Enzyme und
- unterschiedlicher Druckabhängigkeit jedes einzelnen Enzyms

bei verschiedenen Temperaturen wirkt sich gravierend auf den Stoffwechsel aus (Hochachka u. Somero, 1980).

#### 4. Zielsetzung

Im Anschluß an Druckuntersuchungen an Enzymen als isolierte Zellbestandteile (Jaenicke u. Koberstein, 1968; 1971; Schmid, 1977; Schade, 1979; Müller, 1981; Seifert, 1984) lag es nahe, den Einfluß hoher Drücke auf die komplexe Gesamtheit der Zelle eines einfachen Organismus zu untersuchen. Voraussetzung hierfür war die Umrüstung des bereits vorhandenen



Instrumentariums bzw. die Entwicklung neuer Kulturtechniken unter Hochdruck und bei hohen Temperaturen, da bisher ausschließlich psychro - und mesophile Bakterien bezüglich der Korrelation von Druck und Temperatur untersucht worden sind. Zunächst einmal stand das Wachstumsverhalten von thermophilen und extrem thermophilen Archaeobakterien im Vordergrund. Da sich aus Marquis' und ZoBell's Arbeiten die Tendenz abzeichnete, daß sich beim Einwirken von Hochdruck das Temperaturoptimum bzw. das T-maximum zu höheren Werten hin verschiebt, bot dies einen weiteren Anreiz für Hochdruckuntersuchungen an extrem Thermophilen, zumal bei der Anwendung hoher hydrostatischer Drücke im Zusammenwirken mit hohen Temperaturen zusätzliche Probleme auftreten können, wie Pyrolyse von organischen Verbindungen oder die Entstehung von toxischen Produkten. Nach dem spektakulären Bericht von Baross und Deming, der weltweit Aufsehen erregte und sogar zu den "Sieben Weltwundern" der Neuzeit gerechnet wurde (Thomas, 1983) bestand eine weitere Herausforderung darin, zu sehen, wo die obere Temperaturgrenze für Biomoleküle und Organismen anzusetzen ist. Daß derartige Fragestellungen durchaus praktische Bedeutung haben, sei an drei Beispielen kurz skizziert:

Das Interesse der Biotechnologen konzentriert sich in letzter Zeit hauptsächlich auf den Einsatz extrem thermophiler Organismen, um z.B. Kontaminationen zu vermeiden, Kühlprobleme auszuräumen, Produktivität zu steigern ( $Q_{10}$ ), Mischungsprobleme zu verringern (herabgesetzte Viskosität des Mediums) und somit im Endeffekt den Produktionsprozeß zu beschleunigen und zu verbilligen.

Die Vorteile extrem thermophiler Bakterien bzw. ihrer Enzyme gegenüber mesophilen, in biotechnologischer Hinsicht, werden von Ljungdahl et al. (1981), de Rosa et al. (1980), Zeikus (1979), Zeikus et al. (1980) und Brock (1986) in aller Ausführlichkeit aufgelistet.

Kommerzielles Interesse an baro - thermophilen Mikroorganismen zum Zwecke der Erdölförderung gab der Erdöl - Mikrobiologie in den letzten Jahren neuen Aufschwung (Bubela, 1978; Herbert und Gilbert 1984).

## II. Experimenteller Teil

### 1. Chemikalien

Sofern erhältlich, wurden Substanzen von höchster Reinheit verwendet; die Herstellung der Kulturmedien erfolgte mit Chemikalien vom Reinheitsgrad p. A. Es wurde ausschließlich quarz - bidestilliertes Wasser benutzt.

Von Amersham (Braunschweig) wurde  $^{14}\text{C}$  markiertes  $\text{NaHCO}_3$  bezogen; für die Aminosäurepyrolyse - Experimente unter hydrothermalen Bedingungen stammte der Aminosäurestandard Typ H von der Firma Benson (Reno). LKB (München) lieferte die Ampholine pH 3,5 - 10 bzw. 5 - 7 zur isoelektrischen Fokussierung. Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas und Tris von Boehringer (Mannheim) wurden bei der 2 D - Elektrophorese verwendet.

Weitere Bezugsquellen waren:

Agfa Gevaert (Leverkusen) für Rodinal

BioRad für Molekulargewichtsmarker

Fluka (Neu Ulm) für Essigsäure, Triethylamin, Mercaptoethanol, Ethanthiol, Glutaraldehyd, Formaldehyd, Brij 35, Agarose, Cystein.HCl.H<sub>2</sub>O, Acetonitril für HPLC, Orthophthaldialdehyd, Aminosäurekit kristallin, und Ovalbumin aus getrockneten Hühnereiern.

Serva (Heidelberg) für Acrylamid, Bisacrylamid, SDS, Bromphenolblau, Citrullin und Ornithin.

Sigma (München) für Hepes, Aminosäurestandard AA - S - 18, HCl (5 N) constant boiling, Silbernitrat, CO<sub>2</sub> - Diagnostic kit, Molekulargewichtsmarker Typ high und low, Ribonuclease aus Rinderpankreas und Nonidet P 40.

Roth (Karlsruhe) für DTE und Harnstoff.

Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt) für Acetonitril (HPLC - Grade) und Quickszint 212.

Alle Substanzen die darüber hinaus verwendet wurden, stammten von Merck (Darmstadt).

## 2. Geräte

### 2.1. pH Messung

Zur routinemäßigen pH Messung standen folgende Geräte und Elektroden zur Verfügung:

WTW pH Digi 510 (Wissenschaftlich - Technische Werkstätten), Präzisions - pH - Meter Typ pH 34 (Knick),  $\phi$  60 pH Meter (Beckmann), Digital - pH - Meter Typ 643 (Knick), 405 - MS - 6343 a 120 und Lot - 405 - M 3, pH 1.....11,  $0^{\circ}$ -  $70^{\circ}$ C (In-gold).

### 2.2. Zentrifugen

Kleine Volumina wurden in einer Beckmann Microfuge TM 11, größere Volumina in einer Sorvall RC - 5 - B mit Rotor SS 34 bzw. GSA zentrifugiert.

### 2.3. Kompensationsschreiber

W + W Recorder Tarkan (W + W Electronic Inc.) und Servogor S.

### 2.4. Densitometer zum Scannen von Gelen

Quick Scan Densitometer (Desaga) und Ultrosan Laser - Densitometer mit Apple II b (LKB) und Drucker (Epson).

### 2.5. Netzgeräte für Elektrophorese und Elektrofokussierung

Power Supply 500/200 (Desaga) und Electrophoresis Power Supply Model 493 (Instrumental Specialities Company).

### 2.6. Szintillationszähler

LS 7000 Microprocessor controlled (Beckman).

### 2.7. Spektralphotometer

Cary 118 für Absorptionsspektren, zur Densitometrie der Bakteriensuspensionen wurden verwendet:

Spectronic 710 (Bausch & Lomb), Spectrophotometer UV - 110 - 02 (Shimadzu); ein Fluoreszenz Spectrophotometer MPF - 44 A (Perkin Elmer) wurde zur Prüfung der Reaktionsgefäße auf Dichtigkeit herangezogen.

## 2.8. Hochdruckapparaturen

### 2.8.1. Druckerzeugung und Druckübertragung

Bei den Screening-Experimenten bzw. den Versuchen zur Ertragsbestimmung wurden die bereits vorhandenen Einrichtungen, wie von Schmid (1977) und Müller (1981) beschrieben, verwendet. Neben dem von Schade (1979) entwickelten Autoklaven wurde zusätzlich ein kommerzieller Autoklav (High Pressure Equipment) eingesetzt. Druckkapillaren, Druckventile und Spindelpressen stammten ebenfalls von High Pressure Equipment. Als Drucküberträgermedien dienten entweder eine 1 : 1 Mischung von Petrolether (100 - 140) mit Dialla (Shell) oder Ethylenglycol.

### 2.8.2. Druckmessung

Je nach den gewünschten Druckverhältnissen waren die verwendeten Manometer der Firma Wika (Klingenberg) von der Güteklasse DIN 0,6 für Maximaldrucke von 60, 250, 400, 600 und 1600 bar ausgelegt. Für Drücke > 250 bar wurde ein Manometer mit einer Genauigkeit von 0,1 %, Solid Front - CM - 31784 (Heise) zugeschaltet.

### 2.8.3. Temperierung

Die Thermostatisierung erfolgte entweder direkt im Trockenschrank oder, wie von Schmid (1977) beschrieben, mittels eines Thermostaten vom Typ T 52 (Haake), bzw. durch elektrische Beheizung.

## 2.9. Temperaturmessung

Bei jedem Experiment wurde die aktuelle Temperatur (T) im Inneren des Autoklaven mit einem Chromel - Alumel Thermoele-

ment, Thermocoax CA 4 S 500 mit fertigbearbeiteten Anschlüssen (Philips, Kassel) während des gesamten Versuchsverlaufs gemessen und über einen Kompensationsschreiber registriert. (Referenz:  $T_0$  im Eisbad).

### 3. Hilfsmittel zur Anzucht der Mikroorganismen

Serumflaschen, Glas Typ III (Bormioli), Rollrandröhrchen aus Borosilicat - Glas (Schott), Chlorbutylkautschuk - Stopfen (Bellco Glas), Steilbrustflaschen und Siliconstopfen (Laborcenter), Einmalspritzen (Ersta bzw. Primo) mit Sterikan Kanülen (Luer, Braun - Melsungen), Sterilfilter  $0,2 \mu\text{m}$  (Sartorius), Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc.), Vakuumpumpe ES 50 (Edwards), Magnetventile (Festo), Gase und Gasgemische (Linde).

### 4. Herstellung der Kulturmedien

Alle Medienbestandteile, außer das Reduktionsmittel  $\text{Na}_2\text{S}$ , wurden in Steilbrustflaschen eingewogen und in ca. 950 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Um unerwünschtes Entweichen von  $\text{H}_2\text{S}$  zu vermeiden, wurde das  $\text{Na}_2\text{S}$  erst unmittelbar vor dem Erreichen des gewünschten pH - Wertes zugesetzt. Mit Ausnahme von MGF - Medium wurde bei allen übrigen Kulturmedien der pH mit 50 %-iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (bei MGF mit 50 %-iger  $\text{H}_2\text{CO}_2$  eingestellt; anschließend wurde auf 1 l aufgefüllt. Um strikt anaerobe Verhältnisse zu schaffen, wurden alle Medien bis zur völligen Entfärbung des Redoxindikators Resazurin mit  $\text{N}_2$  begast. Das Abfüllen der Medien (20 bzw. 10 ml) in die Kulturgefäße (Serumflaschen und Rollrandröhrchen) erfolgte in einer Anaerobenkammer in einer Atmosphäre aus 95 %  $\text{N}_2$  und 5 %  $\text{H}_2$  (Formiergas) unter geringem Überdruck. Serumflaschen und Rollrandröhrchen wurden mit Chlorbutylkautschuk - Stopfen verschlossen. Außerhalb der Anaerobenkammer wurden die Stopfen mit Aluminiumkappen gesichert. Der Gasaustausch erfolgte nach dreimaligem Evakuieren an einer Gasstation (Balch et al. , 1979) vor dem Sterilisieren. Alle Medien, außer MGF und MMS, wurden mit einem Gasgemisch aus 80 %  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  bei einem Druck von 2 bar überschichtet. Bei MGF bestand die Gasphase aus 80 %  $\text{N}_2$  und 20 %  $\text{CO}_2$ ;

bei MMS entweder aus  $N_2$  /  $CO_2$  (80 : 20) oder aus reinem Stickstoff. Mit Ausnahme des Mediums für *Pyrodictium*, wurden alle Kulturmedien bei  $121^\circ C$  und 2 bar 20 min. sterilisiert; SME wurde 60 min. inkubiert.

## 5. Kulturmedien (Angaben jeweils für 1 L)

### 5.1. Für *Methanococcus thermolithotrophicus*

a):MG, pH 6,9

KCl	0,34 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	4,30 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3,45 g
$NH_4Cl$	0,25 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,14 g
$K_2PO_4$	0,14 g
NaCl	18,00 g
$NaHCO_3$	10,00 g
NaAc	1,00 g
*Mineralienelexier	10,00 ml
** Vitamine	10,00 ml
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$ (0,2%)	1,00 ml
Resazurin	1,00 ml
L-Cystein	0,50 g
Hefeextrakt	2,00 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	2,00 g
$Na_2S \cdot 9H_2O$	0,50 g
$H_2O$	ad 1,00 L

b): $MG^-$ , pH 6,9

Enthält alle Bestandteile von MG, außer Hefeextrakt und Pepton.

c):MGG, pH 6,9

Enthält alle Bestandteile von  $\text{MG}^-$ , außer NaAc, Cystein und Vitaminen.

\*, \*\*Mineralienelexier und Vitamine nach Balch et al. (1979)

d):MGF, pH 6,5

Enthält sämtliche Bestandteile von MG, wobei  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  jedoch durch 0,14 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ersetzt wurde. Ferner wurden 15.00 g Na-Formiat und Spuren von  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  zugesetzt. Die pH Einstellung auf 6,5 erfolgte mit 50% -iger Ameisensäure. Die Gasphase bestand aus  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80:20) bei einem Druck von 2 bar.

\* Mineralienelexier

Titriplex I	1,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,00 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
NaCl	1.00 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{ZnSO}_4$	0,10 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10,00 mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	10,00 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	10,00 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,00 mg
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1,00 L

Der pH wurde mit KOH auf 6,5 eingestellt.

## \*\*Vitamine

D(+)-Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Vitamin B <sub>1</sub>	5,0 mg
" B <sub>2</sub>	5,0 mg
" B <sub>6</sub>	10,0 mg
" B <sub>12</sub>	0,1 mg
Nicotinsäure	5,0 mg
Pantothensäure	5,0 mg
Paraaminobenzoessäure	5,0 mg
D, L α-Liponsäure	5,0 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1,0 L

Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4° gelagert.

## 5.2. Für *Methanothermus fervidus*

a): MM, pH 6,5

Mineralien 1 <sup>+</sup>	37.5 ml
Mineralien 2 <sup>++</sup>	37,5 ml
Ni(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (0,2%)	1,0 ml
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0,2%)	1,0 ml
Mineralienelexier	10,0 ml
Resazurin (0,1%)	1,0 ml
(2-Mercaptoethansulfonsäure (0,1%)	10,0 ml)
NaHCO <sub>3</sub>	6,0 g
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	0,5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1,0 l



b): MS, pH 6,5

Enthält alle Bestandteile von MM und ist zusätzlich  
supplemeniert mit:

NaAc	5,0 g
Hefeextrakt (Merck)	2,0 g
Pepton (Merck)	2,0 g
L-Cystein . HCl .H <sub>2</sub> O	0,5 g
Vitaminen	10,0 ml

\*Mineralien 1:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g
H <sub>2</sub> O	
	ad 1.0 L

\*\* Mineralien 2:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0 g
NaCl	12,0 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,4 g
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.6 g
H <sub>2</sub> O	ad 1,0 L

5.3. Für *Pyrodictium occultum*

Meerwasser, synthetisch (Budelmann)*	500 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml
Mineralienelexier + 0,02% Ni(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )	10 ml
Resazurin (0,1%)	1 ml
Zitronensäure	1,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Hefeextrakt (Difco)	0,2 g
Schwefelblüte	25,0 g
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	0,5 g

\*Synthetisches Meerwasser (Budelmann) ca, 100 L, pH 8,2

NaCl (Siedespeisesalz)	2,770 kg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,700 kg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,550 kg
KCl	0,065 kg
NaBr	10,00 g
SnCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,50 g
Citrat	1,50 g
KJ	5,00 mg
CaCl <sub>2</sub> enthärtetes Wasser	15,0 kg
Leitungswasser	75,0 kg

#### 5.4. Für *Thermotoga maritima*

MMS, pH 6,5:

synthetisches Meerwasser	500 ml
H <sub>2</sub> O	500 ml
Ni(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (0,2%)	1,0 ml
Mineralienelexier	10,0 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Stärke	5,0 g
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	0,5 g

### 6. Organismen und Anzuchtbedingungen für Stammkulturen

#### 6.1. *Methanococcus thermolithotrophicus*,

ein gram - negatives, coccoides, thermophiles, bewegliches Archaeobakterium ist in der Lage sowohl aus H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> als auch aus Formiat Energie zu gewinnen; Acetat kann nicht verwertet werden. Es wächst im Bereich von 30° - 70° C autotroph, mit einer Verdopplungszeit von ca. 65 min. bei der optimalen Temperatur von 65° C (Huber et al. 1982). In Ultradünnschnitten läßt sich elektronenoptisch eine zarte Zellhülle, die wahrscheinlich aus Protein besteht, nachweisen (König u. Stetter, 1986) In Präparationen solcher Hüllen konnten weder

Muraminsäure, noch Glykoproteine nachgewiesen werden. In die Zellhülle inseriert ein Schopf aus etwa 20 Geißeln, mit einer Länge von ca. 3  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 20 nm polar. 20 ml Medium, MGG, MG,  $\text{MG}^-$ ,  $\text{MG}^-\text{H}$  (MGF) wurden 5% -ig beimpft und in Serumflaschen, welche ein Gasgemisch aus 80%  $\text{H}_2$  und 20%  $\text{CO}_2$  (80%  $\text{N}_2$  und 20%  $\text{CO}_2$ ) bei einem Druck von 2 bar enthielten, bei 65° C im Glycerinbad über Nacht geschüttelt.

#### 6.2. *Methanothermus fervidus*

ist ein gram - positiver, extrem thermophiler Methanogener, der im Temperaturbereich von 65 - 97° C wächst; bei der optimalen Wachstumstemperatur von 83° C beträgt die Verdopplungszeit etwa 170 min (Stetter et al. 1981). Die komplexe Zellhülle ist aus zwei Schichten aufgebaut; die innere besteht aus Pseudomurein, die äußere aus Glycoprotein (König, pers. Mitteilung). 20 ml MM bzw MS - Medium wurden 5% -ig beimpft und 48 h unter 2 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80 : 20) in Serumflaschen im Glycerinbad oder im Brutschrank geschüttelt.

#### 6.3. *Pyrodictium occultum*

ist ein strikt anaerobes, kolonienbildendes, extremst thermophiles, scheibenförmiges Archaeobakterium. Die Zellen haften dem Substrat Schwefel an; sie sind durch Filamente netzförmig untereinander verbunden. Es wächst von 80 - 110° C mit einem Optimum bei 105° C und einer Verdopplungszeit von 110 min; unterhalb von 80° C findet keinerlei Wachstum statt. *Pyrodictium* ist somit bisher das extremst thermophile Lebewesen überhaupt (Stetter, 1982; Stetter et al. 1983). Die Zellhülle enthält kein Murein, sondern besteht aus einem S -Layer aus hexagonal angeordneten Monomeren aus Proteinen, die mit Perjodat - Schiff - Reagens anfärbbar sind.

20 ml SME - Medium wurden in Serumflaschen 5% -ig (1% -ig) beimpft, mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (2 bar) als Gasphase. Die Inkubation erfolgte bei 105° C im Trockenschrank ohne Schütteln über 24 h. Nach Erneuerung der Gasphase wurde weitere 24 h bei 105° C bebrütet.

#### 6.4. *Thermotoga maritima*

ist ein strikt anaerobes, stäbchenförmiges, extrem thermophiles Eubakterium, das von 55 - 90° C kultivierbar ist. Im T - Optimum bei 80° C beträgt die Verdopplungszeit ca. 75 min. (Huber et al. 1986). Das Stäbchen ist von einem charakteristischen, ballonförmigen S - Layer umgeben. In der Zellwandfraktion konnte neben Muraminsäure auch N - Acetylglucosamin nachgewiesen werden; die Membranfraktion besteht neben Fettsäuren ( C<sub>12</sub> - C<sub>18</sub>) zusätzlich aus Isoprenoid - Phytylethern. Die Gattung *Thermotoga* repräsentiert somit einen tief eingeschnittenen Ast innerhalb der Eubakterien. 10 ml MMS - Medium wurden bei 80° C unter 2 bar N<sub>2</sub> in Rollrandröhrchen ohne Schütteln im Trockenschrank bebrütet. Die Animpfdichte war 5 %.

#### 7. Beimpfung und Inkubation

Sofern nicht anders angegeben, wurden die abgekühlten Medien unter sterilen Bedingungen (Clostridien !) mit Einmalspritzen, die zuvor mit dem gewünschten Gasgemisch O<sub>2</sub> - frei gespült worden waren, ca. 5 % -ig beimpft. Die Inkubation erfolgte entweder in mit Glycerin gefüllten Schüttlern oder in Temperaturschränken mit Schütteleinrichtung.

#### 8. Aufbewahren der Stammkulturen

Da die Zellen von *Mc. thermolithotrophicus* und in besonderem Maße von *Mt. fervidus* nach dem Aufbrauchen der Substrate H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> spontan lysieren (König et al. , 1985), wurde in der logarithmischen bzw. der stationären Phase erneut ein Gasaustausch vorgenommen. Die Stammkulturen wurden bei 4°C aufbewahrt; so dienten sie für mindestens 6 Monate als ausgezeichnetes Inoculum.

## 9. Quantifizierung des Wachstums

### 9.1. Bestimmung der Bakterienmasse

#### 9.1.1. Extinktionsmessung

Alle Trübungsmessungen wurden bei 578 bzw. 450 nm in Halbmikroküvetten ( $d = 1$  cm) durchgeführt. Durch entsprechendes Verdünnen der Bakteriensuspensionen mit dem jeweiligen Medium wurde gewährleistet, daß sich die scheinbare Extinktion auf den Linearitätsbereich von 0,05 - 0,30 O.D. beschränkte. Bei 578 nm wurde zur Reduktion des Resazurins spurenweise Natriumdithionit zugesetzt.

#### 9.1.2. Bestimmung der Bakterienmasse durch Aminosäure - Analyse\*

##### a) Hydrolyse

Das Sediment von 1 ml Zellsuspension nach Zentrifugation (13000 rpm, 15 min.) wurde in 100  $\mu$ l  $H_2O$  resuspendiert und in Fiolax - Reagensgläser (mit Chromschwefelsäure gereinigt, mit  $H_2O$  gespült und bei 250°C getrocknet) quantitativ überführt. Nach Abdampfen des Wassers bei ca. 50°C im Wasserstrahlvakuum (Exsikkator im Trockenschrank) wurden 50  $\mu$ l 5 N HCl (constant boiling) zugesetzt; die Gläschen wurden unter vermindertem Druck (15 torr) abgeschmolzen und 20 h bei 110°C im Trockenschrank inkubiert.

##### b) Probenvorbereitung

Nach Abziehen der Salzsäure wurde der gelb - braune Rückstand in 200  $\mu$ l  $H_2O$  aufgenommen und millipore - filtriert.

##### c) Derivatisierung

Je 20  $\mu$ l Probe wurden mit 40  $\mu$ l Derivatisierungsreagens<sup>a</sup> durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette 20 s lang gemischt; nach 1 min. wurde das Volumen der Probeschleife (10 bzw. 20  $\mu$ l) auf die HPLC - Säule appliziert.

<sup>a</sup>Derivatisierungsreagens (täglich frisch hergestellt)

1,25 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 10,3<sup>b</sup>

50  $\mu\text{l}$  0,745 M ethanolische Lösung von Orthophthaldialdehyd  
(100 mg / ml)

25  $\mu\text{l}$  Brij 35 (10 mg / ml)

7  $\mu\text{l}$  Ethanthiol

<sup>b</sup>70,98 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden in 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, der pH mit 1 N NaOH auf 10,3 gebracht und auf 1 l aufgefüllt. Alle für die HPLC verwendeten Lösungsmittel und Reagentien wurden steril filtriert.

#### d) HPLC - Bedingungen

Das HPLC System bestand aus einem Spectra Physics SP 8700 solvent delivery system mit Helium - Entgasungseinrichtung, einer SP 8700 Zwei - Kolben - Pumpe und einem Rheodyne Injektorventil. Die Aminosäurederivate wurden auf einer 4,6 x 250 mm Stahlsäule mit Servachrom - Packung: Polyol - Si - 100 - RP -18, 5  $\mu\text{m}$  (Serva, Heidelberg) bei Raumtemperatur getrennt. Die Detektion erfolgte bei 455 nm ( $\lambda_{\text{EX}} = 360 \text{ nm}$ ) entweder mit einem Festwellenlängendetektor, Spectra / glow filter fluorimeter (Gilson), oder einem Gerät mit variabler Wellenlänge (F 1000, Merck - Hitachi).

Lösungsmittel A<sup>c</sup> bestand aus 0,01875 M Triethylamin - Essigsäure, pH 7,5; Lösungsmittel B war Acetonitril.

<sup>c</sup>Es wurden 1,088 ml Eisessig in ca. 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt; nach Zusatz von 2,79 ml Triethylamin wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1.0 l ergänzt.

Gradient:

Zeit (min.)	LM A (%)	LM B (%)
0,0	100	0
38,0	62	38
48,0	30	70
48,1	0	100
49,9	0	100

Die Flußrate betrug 2 ml / min..

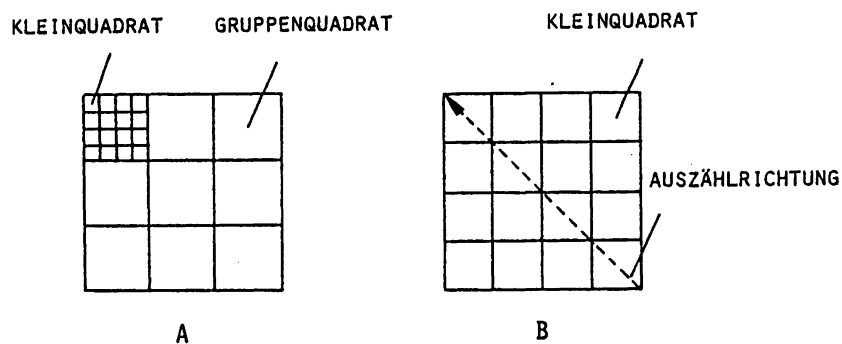
Die Chromatogramme wurden auf einem SP 4700 (bzw. 4720) - Integrator aufgezeichnet.

\*Durch Modifikation des von Larsen und West (1981) beschriebenen Verfahrens wurden Trennleistung und Auflösungsvermögen entscheidend verbessert.

## 9.2. Bestimmung der Zellzahl

### 9.2.1. Gesamtzellzahl

Die Gesamtkeimzahlbestimmung wurde in einer Neubauer -Zählkammer (Fläche  $0,0025 \text{ mm}^2$ , Tiefe  $0,02 \text{ mm}$ ) unter einem Zeiss - Standardmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Objektiv 40 x, Okular 12 x, Phako 2) durchgeführt. Die Proben wurden mit Medium jeweils so verdünnt, daß eine Zellzahl von 50 - 60 pro Gruppenquadrat nicht überschritten wurde. Um die starke Eigenbewegung von *Mc. thermolithothrophicus* zu unterdrücken wurde den Kulturen Formaldehyd (19 : 1) zugesetzt. Jede Probe wurde sowohl mit, als auch ohne Formaldehydzusatz gezählt. Pro Zählansatz wurden 5 Gruppenquadrate ausgezählt; in einem Gruppenquadrat wurde die Summe der Zellen in 4 Kleinquadraten diagonal bestimmt. In der Regel wurden pro Probe 6 (bzw.) 4 Zählansätze durchgeführt.



**Abb. 4:** Neubauer Zählkammer

A: Übersicht (9 Gruppenquadrate)

B: Gruppenquadrat (16 Kleinquadrate)

Die Gesamtzellzahl / ml ergibt sich nach:

$$\frac{\Sigma \text{ (Summe von 5 Diagonalen)}}{N} \cdot 10^6 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

wobei N die Anzahl der Zählansätze ist.

### 9.2.2 Lebendkeimzahl

Bei *Mt. fervidus* und *Mc. thermolitotrophicus* diente der fluoreszierende Kofaktor  $F_{420}$  (Eirich et al., 1978, 1979) zur Abschätzung der Lebendkeimzahl d.h. zur Unterscheidung intakter Organismen von Membranfragmenten und Partikeln die bei extremen Temperaturen unter Hochdruck gebildet werden. Es wurde die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro Gesichtsfeld der Probe (Objektiv 100x, Occular 12x, Ölimmer-sion) mit der Anzahl der fluoreszierenden Zellen im beimpften Medium, die über mehrere Gesichtsfelder gemittelt wurden, verglichen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Zeiss Standard Fluoreszenzmikroskop mit Anregungsfilter H 436 und einem Emissionsfilter LP 470 bestimmt.

## 12. Elektronenmikroskopie

Die mit Glutaraldehyd (25g/L) fixierten Zellen wurden auf mit Collodium beschichtete Netze aufgebracht und im Hochvakuum mit Platiniridium unter einem Winkel von  $7^{\circ}$  schräg bedampft. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden mit einem JEOLJEM 100 C Elektronenmikroskop bei 80 kV mit einer Objektiva-pertur von 40  $\mu\text{m}$ .



## 11. SDS-Gelelektrophorese und Färbung

Die SDS-PAGE wurden routinemäßig nach Laemli (1970) durchgeführt.

Silberfärbung:

Fixieren in 40% Ethanol und 7% Essigsäure $\geq$ 2 h	(1 L)
2 x Waschen in 10% Ethanol, je 10 min	(1 L)
3 x Waschen in Wasser, je 15 min	(1 L)
Färben in 0.1% Silbernitrat, 60 min	(200 ml)
Entwickeln in 3% Natriumcarbonat mit 0.02% Formaldehyd (40%), ca. 10 min	(200 ml)
Spülen mit Wasser	(500 ml)
Stoppen mit 1% Essigsäure, 30 min	(200 ml)

Sofern Abschwächen nötig ist

3 x mit Wasser waschen, je 5 min

Mit Abschwächer nach Farmer (0.5%) ca. 15 sec (100 ml)  
behandeln; anschließend mit Leitungswasser  
ausgiebig spülen.

## 12. Radioaktive Markierung

Da *Mc. thermolittotrophicus* Acetat und Cystein nicht verwertet wurde mit  $^{14}\text{C}$   $\text{NaHCO}_3$  markiert. Die Markierung erfolgte bei den Vorversuchen in Serumflaschen, bei den Druckexperimenten und den zugehörigen Kontrollen in Nickeltuben. 100 bzw. 150  $\mu\text{Ci}$  wurden 20 bzw. 40 ml Mangelmedium  $\text{MG}^-\text{H}$ , mit einem Gehalt von 2 g "kaltem"  $\text{NaHCO}_3$  pro Liter zugesetzt. Die Anzucht erfolgte ohne zusätzliches  $\text{CO}_2$  in einer Atmosphäre aus reinem Wasserstoff bei 2 bzw. 4 bar und  $65^\circ\text{C}$  über 10 bzw. 14 Stunden.

## 13. Zweidimensionale Gelelektrophorese (O'Farrell, 1974, O'Farrell et al., 1977)

### 13.1 Lösungen

Reagenzien	Zusammensetzung	Aufbewahrung
Ammonium- persulfat	250 mg $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ +2.35 ml $\text{H}_2\text{O}$	Kühlschrank (+4°C)
Gel overlay (8 M Harnstoff)	12 g Harnstoff 25 ml $\text{H}_2\text{O}$	Einfrieren (je 200 $\mu\text{l}$ )
1 M $\text{H}_3\text{PO}_4$	13.5 ml $\text{H}_3\text{PO}$ (85%) 200 ml $\text{H}_2\text{O}$	Raumtemperatur
IEF-Gel- Stammlösung	708 mg Acrylamid 40.5 mg Bisacrylamid  1.78 ml $\text{H}_2\text{O}$	frisch zubereiten
Lower-Gel- buffer pH 8.9	36.3 g Tris-Base (HCl) $\rightarrow$ pH 8.9 0.8 g SDS 200 ml $\text{H}_2\text{O}$	Raumtemperatur
Lysis-buffer	5.7 g Harnstoff 2 ml Nonidet P 40 (10%) 0.5 ml $\beta$ -Mercapto- ethanol 0.4 ml Ampholine (pH 5 - 7) 0.1 ml Ampholine (pH 3.5 - 10) 2.4 ml $\text{H}_2\text{O}$	Einfrieren (je 400 $\mu\text{l}$ )
0.02 M NaOH	0.8 g NaOH 1 L $\text{H}_2\text{O}$	frisch herstellen
Nonidet P 40 (10%)	1 g Nonidet P 40 9 ml $\text{H}_2\text{O}$	Kühlschrank (4°C)

SDS-Laufpuffer	3 g Tris-Base 24.4 g Glycin 1 g SDS H <sub>2</sub> O in 1 L (1:10 verdünnen)	frisch herstellen
Sample overlay	1.38 g Harnstoff 50 µl Ampholine (pH 5 - 7) 12.5 µl Ampholine (pH 3.5 - 10) 1.25 ml H <sub>2</sub> O	einfrieren (je 200 µl)
SDS-Trenn-Gel	58.4g Acrylamid 1.6 g Bisacrylamid (filtrieren)	Kühlschrank (4°C) im Dunkel
RNase/DNase	je 1 mg/ml Soni- cation-buffer	frisch herstellen
SDS-Sample- buffer pH 6.8	20 g Glycerin 4.6 g SDS 1.51 g Tris-Base (HCl) → pH 6.8 10 ml β-Mercapto- ethanol 200 µl Bromphenol- Blau (0.5%) in 200 ml H <sub>2</sub> O	Kühlschrank (4°C)
Sonication- buffer pH 7.4	1.2 g Tris-Base (HCl) → pH 7.4 1.02 g MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O in 100 ml H <sub>2</sub> O	Kühlschrank (4°C)
Upper-Gel- buffer pH 6.8	12.1 g Tris-Base (HCl) → pH 6.8 0.8 g SDS	Kühlschrank (4°C)

# Pipettierschema:

IEF-Gele	Anzahl der Gele	
Reagenzien	8	13
Harnstoff	1.15 g	1.87 g
Acrylamid (IEF)	266 $\mu$ l	440 $\mu$ l
Nonidet P 40 (10%)	400 $\mu$ l	670 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	400 $\mu$ l	670 $\mu$ l
Ampholine **		
pH 5 - 7	80 $\mu$ l	133 $\mu$ l
pH 3.5 - 10	20 $\mu$ l	33 $\mu$ l
Gesamtvolumen	2.0 ml	3.3 ml

	Entgasen	im	Exsikkator
Ammoniumpersulfat (10%)	2.0 $\mu$ l		3.3 $\mu$ l
TEMED	1.4 $\mu$ l		2.3 $\mu$ l

\* Um das Ausfallen von Harnstoff in den Gelen zu verhindern, muß entweder Harnstoff vom Reinheitsgrad ultrapur verwendet, oder der Harnstoff vom Reinheitsgrad p.a. umkristallisiert werden.

\*\* Ampholine stellen ein ausgezeichnetes Substrat für Mikroorganismen dar und müssen daher aus den Vorratsgefäßen steril entnommen werden.

SDS-Trenn-Gele	Anzahl der Gele	
Reagenzien	2	4
Lower-Gel-buffer	14.25 ml	28.5 ml
Acrylamid Stammlösung	21.85 ml	43.7 ml
H <sub>2</sub> O	20.45 ml	41.3 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	212.5 $\mu$ l	425 $\mu$ l
TEMED	27 $\mu$ l	54 $\mu$ l

SDS-Sammel-Gele (5%)	Anzahl der Gele	
Reagenzien	2	4
Upper-Gel-buffer	3.13 ml	6.25 ml
Acrylamid Stammlösung	1.88 ml	3.75 ml
H <sub>2</sub> O	7.5 ml	15.0 ml
Ammoniumpersulfat	17.8 µl	35.5 µl
TEMED	8.9 µl	17.8 µl

## 13.2 Probenvorbereitung

### 13.2.1 Standardmethode

Je nach Bewachungsgrad der Zellsuspension wurden 10 - 40 ml Zellen (0.2 - 0.8 OD) 20 min bei 12 000 g abzentrifugiert. Da *Mc. thermolittotrophicus* in Sonication-buffer spontan lysiert, wurde auf diesen, ansonsten obligatorischen, Waschvorgang verzichtet. Das Sediment wurde in 50 µl Sonication-buffer resuspendiert (sofern mit Sonication-buffer gewaschen werden kann, verbleiben gewöhnlich 50 µl Zellsuspension nach Abdekantieren des Überstandes zurück). Die Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit Sonication-buffer auf das Volumen von 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurde im Eisbad stoßweise (3 - 5 sec, mit Branson Sonifier Typ B 15, Stufe 3) etwa 15 mal mit dem Microtip beschallt. Nach dem Zellaufschluß wurden 10 µl eines Gemisches aus RNase und DNase (jeweils 1 mg/ml) zugesetzt und bei Raumtemperatur mindestens 20 min inkubiert, um den vollständigen Verdau der Nukleinsäuren zu gewährleisten. Pro µl Zellaufschluß wurde 1 mg Harnstoff zugesetzt; dabei wurde berücksichtigt, daß 10 µl am Microtip haften blieben. Anschließend wurde zum Gesamtvolumen (Zellaufschluß plus Harnstoff) ein Aliquot Lysis-buffer zugegeben (z.B. zu 200 µl Zellaufschluß plus 190 mg Harnstoff 380 µl Lysis-buffer). Sofern die Proben nicht sofort auf die isoelektrische Focussierung aufgegeben wurden, wurden sie

schockgefroren und bei  $-84^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 13.2.2 Alternativmethode

Zur Probenvorbereitung wurde eine alternative Methode ausprobiert: 10 ml Zellsuspension (ca. OD 1.0) wurden mit Trichlor-essigsäure (Endkonzentration 10%) versetzt und 20 min bei 12 000 g zentrifugiert; dann wurden 25 ml Aceton hinzugefügt und 1 h im Eisbad inkubiert. Der nach 15 min bei 12 000 g erhaltene Niederschlag wurde im Exsikkator getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  Tris.HCl, pH 7.4 (100 mM) gelöst; der Tris-Puffer wurde mit 0.05 M  $\text{MgCl}_2$  supplementiert, da die DNase  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängig ist. Die Beschallung erfolgte nach dem Transfer in Eppendorf-Reaktionsgefäße; im Weiteren wurde wie oben beschrieben verfahren.

Für *Mc. thermolithotrophicus* erschien diese Technik zu aufwendig; die Probenvorbereitung (wie unter 12.2.1 beschrieben) wurde bei allen abgebildeten Elektroferogrammen angewandt und lieferte gute Ergebnisse.

## 13.3 Erste Dimension (isoelektrische Focussierung)

### 13.3.1 Vorbereitung der Röhrchen

Die isoelektrische Focussierung wurde in 15 cm langen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1.5 mm durchgeführt. Nach dem Zurechtschneiden wurde beide Enden mit Schmirgelpapier geglättet und anschließend mit Polierpapier behandelt (Rundschmelzen führt zu ungleichmäßigen Querschnitten). Vor jeder IEF wurden die Glasröhrchen gründlichst gereinigt (geschieht dies unzureichend, kristallisiert der Harnstoff während der Polymerisation der Gele aus).

Reinigung:

Chromschwefelsäure, 30 - 45 min (nicht länger, da die Glasoberfläche verätzt wird, bzw. Säure in das Glas diffundiert). Gründlichst mit  $\text{H}_2\text{O}$  spülen.

KOH/Ethanol (30 g KOH/150 ml Ethanol, 30 min). Gründliches Spülen mit  $\text{H}_2\text{O}$ ; Trocknen bei  $100^{\circ}\text{C}$  im Trockenschrank.

### 13.3.2 IEF-Gele

Die Röhrchen wurden vom unteren Ende in einer Höhe von 12 cm markiert und mittels Gummiringen senkrecht an einer vierkantigen Glasflasche befestigt, nachdem die unteren Enden mit Parafilm verschlossen worden waren. Die Lösungen für die Gele, bestehend aus IEF-Stammlösung, Harnstoff, Nonidet P 40, Ampholinen und  $H_2O$ , wurden gemäß dem Pipettierschema gemischt und im Exsikkator entgast. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wurde die Lösung mittels einer Injektionsspritze, mit einer 15 cm langen Kanüle, an deren Spitze ein kurzer Teflonschlauch angesetzt war, unter Vermeidung von Gasblasenbildung eingefüllt (es wurde mehrmals auf Blasenfreiheit kontrolliert). Diese IEF-Lösung wurde mit ca 15 ml Gel-overlay vorsichtig überschichtet und 30 - 40 min zur Polymerisation bei Raumtemperatur stehengelassen.

### 13.3.3 IEF-Bedingungen

Nach dem Auspolymerisieren wurde der Parafilm entfernt und die Röhrchen in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt; die Gel-overlay-Lösung wurde von den Gelen abgehoben. Der Anodenpuffer (in der unteren Kammer) bestand aus 0.01 M  $H_3PO_4$  (10 ml 1 M  $H_3PO_4$ /L). Der Kathodenpuffer 0.02 M NaOH (0.8 g NaOH  $\approx$  5 NaOH Plätzchen/L), wurde nach Entgasen in die obere Kammer gefüllt. Nach dem Spülen der Geloberflächen mit dem Kathodenpuffer wurden pro Gel 10 bis 15  $\mu$ l Probe mittels einer variablen Pipette aufgetragen (an der Pipettenspitze wurde eine Kanüle mit Parafilm befestigt). Die Proben wurden vor dem Anlegen der Spannung mit 12  $\mu$ l Sample-overlay überschichtet. Die IEF wurde 15 h bei 400 V, dann 1 h bei 800 V durchgeführt.

### 13.3.4 Umäquilibrieren der IEF-Gele

Die Gele wurden aus den Röhrchen mittels SDS-sample buffer mit einer Injektionsspritze in SDS-sample buffer in Reagenzgläser überführt und 30 min bei Raumtemperatur dialysiert.

Sofern die IEF-Gele nicht sofort weiter verwendet wurden, wurden sie schockgefrohren und bei  $-84^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 13.4 Zweite Dimension

Zur SDS PAGE wurden gleichzeitig zwei Gele hintereinander stehend in einer Apparatur gefahren, um gleiche Bedingungen für verschiedene Proben zu schaffen (z. B. ohne Druck und mit Druck). Die Glasplatten waren so geschnitten, daß in der Mitte eine Aussparung von 13.5 cm verblieb, in die die IEF-Gele eingelegt werden konnten. Die Gel-Dicke betrug 1.5 mm (Kunststoff spacer).

Durch Übersichten mit Wasser wurde für eine scharfe Oberkante (zwischen Trenn-Gel und Sammel-Gel) gesorgt. Die Gele wurden gemäß dem Pipettierschema gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur SDS PAGE wurden die IEF-Gele in einem Teesieb aufgefangen, mit Pinzette und Präpariernadel auf einem 13 cm langen und 2 cm breitem Plexiglasstreifen ausgebreitet und auf die SDS-Gele aufgebracht, die bereits in der mit Puffer gefüllten Apparatur eingespannt waren. Zur Markierung der Laufront wurde über die gesamte Gel-Breite Bromphenol Blau in Glycerin aufgetragen. Nachdem die Farbstoff-Front bei 200 V ca 1 cm in das Sammelgel eingewandert war, wurde bei 7 Watt pro Gel (40 mA) über 7 Stunden bei Raumtemperatur getrennt.

#### 13.5 Färbung und Behandlung mit Verstärker zur Verkürzung der Autoradiographiezeit (Faktor 20 - 40)

Die Gele wurden in der Regel silbergefärbt, danach erfolgte die Behandlung mit Verstärker:

Schütteln in Dimethylsulfoxid (je 300 ml)	2 x 30 min
---	------------

Schütteln in 20% PPO (Diphenyloxazol in Dimethylsulfoxid w/w) (je 300 ml)	30 min
---	--------

Schütteln in Leitungswasser (je 500 ml)	4 x 15 min
---	------------

Anschließend wurden die Gele auf Filterpapier (Watman) 3 Stunden getrocknet.



#### 14. Autoradiographie

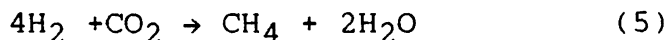
Die mit Verstärker behandelten, getrockneten Gele wurden über Zeiträume von 2 Tagen bis 6 Wochen auf 13 x 18 X-ray Film (Kodak Blue Base) bei  $-84^{\circ}$  aufgelegt. Das Entwickeln erfolgte nach folgendem Schema:

Entwickler	(Rodinal 1:25)	8 min
Stoppen	(1% Essigsäure)	30 sec
Fixieren	( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 100g/L)	4 min
Wässern		>15 min

### III. Ergebnisse und Diskussion

#### 1. Wahl der Organismen

Um die von Baross und Deming aufgestellte Hypothese, die besagt, daß Leben vorrangig an die Verfügbarkeit von Wasser im flüssigen Aggregatzustand gebunden ist, zu überprüfen, galt es zunächst einen geeigneten thermophilen Microorganismus mit hinreichend kurzer Generationszeit zu finden, der in der Lage ist sich unter hyperbaren Bedingungen zu vermehren. Der kritische Punkt des Wassers liegt bei 374,2°C und 221 bar (Tödheide et al., 1966). Besonders geeignet erschienen in diesem Zusammenhang thermophile methanogene Bakterien, da sie ihren gesamten Energiebedarf gemäß der Gleichung



decken. Bei einer Wasserstoffkonzentration von 1 µM, wie sie in natürlichen Habitaten vorliegt, beträgt  $\Delta G^{\circ'}$  - 31.3 kcal/mol (Thauer et al., 1977). Wegen des negativen Reaktionsvolumens bestand aufgrund des Braun Le-Chatelier'schen Prinzips die theoretische Möglichkeit zur Erhöhung der Zellmasse bzw. zu einer etwaigen Ausweitung des Lebensbereichs in Richtung auf höhere Temperaturen durch hohe Drücke. Von der extrem hohen Wachstumstemperatur von 105°C bot sich *Pyrodictium occultum* an, der seine Stoffwechselenergie aus der Reaktion



bezieht; das Reaktionsvolumen ist bei diesem Stoffwechselweg ebenfalls negativ, wenn auch hinsichtlich des Betrags ungünstiger (im Hinblick auf Hochdruck) als bei autotrophen Methanogenen.

#### 2. Screening in Stahlbehältern

Sowohl Rollrand-Röhrchen als auch Serumflaschen sind nur bis zu Drücken von maximal 3 bar gefahrlos zu handhaben; die Versuche zur Auswahl der geeigneten Microorganismen für die beabsichtigten Hochtemperatur -Hochdruckversuche wurden in Edelstahlzylindern aus V4A durchgeführt. Das Fassungsvermögen war 1 L, die Wandstärke betrug ca. 2 cm. Das Einbringen des

Mediums, sowie die Beimpfung, erfolgten über eine Öffnung an der Unterseite. Der Behälter wurde mit einem Edelstahlkonus abgedichtet, der mit einer Schraube in die Öffnung gepresst wurde. Der Gasaustausch erfolgte über ein Nadelventil an der Bombenoberseite an einer Gasstation. Der Gasinnendruck wurde über ein Manometer (Maximalausschlag 5 bar) kontrolliert. Über das Ventil war eine diskontinuierliche Probenentnahme gewährleistet. Die Stahlbehälter wurden mit 500 ml des jeweiligen Mediums unter anaeroben Bedingungen beschickt und zur Sterilisation über Nacht bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlung auf ca 30°C wurde mit in Serumflaschen gezogenen Stammkulturen 5%ig beimpft und der Gasaustausch durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei der gewünschten Temperatur, ohne Schütteln (liegend).

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Kulturversuche in Stahlbomben

Organismus	Medium	P (H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ) [bar]	T [°C]	P <sub>(T)</sub> <sup>a</sup> [bar]	t [h]	Wachstum
<i>Mt. fervidus</i> V 24 S	MM	1	85	1.9	16	-
		2	83	3.2	36	-*
		4	85	5.8	45	-*
	MS	1	80	1.8	20	-*
		2	85	3.3	48	-
		4	83	5.7	40	-
<i>Mc. thermo-</i> <i>litho-</i> <i>trophicus</i> S N 1	MGG	1	65	1.5	16	+
		2	63	2.7	15	+
		4	65	5.2	26	+
	MG	1	64	1.5	18	++
		2	63	2.7	16	++
		4	65	5.2	17	++
<i>Pyrodictium</i> <i>occultum</i> P L 19	SME	1	100	2.4	48	- <sup>b</sup>
		2	105	3.8	50	- <sup>b</sup>
		4	102	6.5	52	- <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Der Innendruck bei der jeweiligen Temperatur wurde aus der idealen Gasgleichung und aus dem Dampfdruck des Wassers abgeschätzt.

<sup>b</sup> Das schwarzgefärbte (Schwermetallsulfide) Medium wies nach der Inkubationszeit starken H<sub>2</sub>S-Geruch auf.

- Bei 1200facher Vergrößerung keine Zellen mikroskopisch nachweisbar (sowohl Phasenkontrast als auch Fluoreszenz).

+ OD<sub>578</sub> = 0.52 ± 0.1

++ OD<sub>578</sub> = 0.78 ± 0.09

\* Bei 1200facher Vergrößerung wurden pro Gesichtsfeld 5 ± 3 fluoreszierende Zellen nachgewiesen (die Animpfdichte betrug 7 ± 3 Zellen pro Gesichtsfeld).

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, eignete sich lediglich *Mc. thermolithotrophicus* für weitere Versuche unter erhöhtem Druck. *Mt. fervidus* ist nur in Serumflaschen, nicht Rollrandröhrchen kultivierbar; abgesehen von den Volumenoberflächen-Verhältnissen, lag der Verdacht nahe, daß bestimmte Substanzen aus dem Glas für das Wachstum essentiell sind. Trotz Zusatz von pulverisierten Serumflaschen (10 g/L) zu MM bzw. MS konnte *Mt. fervidus* in den Stahlbomben nicht angezogen werden.

### 3. Anzucht von *Mc. thermolithotrophicus* auf Formiat

Die Handhabung von elementarem Wasserstoff in Stahlbehältern unter erhöhtem Druck und bei hohen Temperaturen stellt ein Sicherheitsproblem dar. Die beträchtliche Löslichkeit von  $H_2$  in Stählen und dessen Einlagerung in das Metallgitter führt zu einer Veränderung von Materialeigenschaften. Die Versprödung der Gefäßwände birgt bei erhöhten Innendruck (60 bar bei  $270^{\circ}C$ ) das Risiko der Explosion des Stahlbehälters. Aus diesem Grunde erschien es wünschenswert, molekularen Wasserstoff durch den Wasserstoffdonor Formiat zu ersetzen. Die Anzuchtversuche von *Mc. thermolithotrophicus* in MGF mit  $N_2/CO_2$  (80:20, 2 bar) als Gasphase in Stahlbehältern verliefen sowohl mit, als auch ohne Zusatz von Wolfram und Selen (10  $\mu M$ ) durchwegs negativ. Es wurden in beimpften Medien (MGF) nach Ablauf der Inkubationszeit bei  $65^{\circ}C$  erhebliche pH Änderungen gemessen. Die pH Messung erfolgte bei Raumtemperatur in Abwesenheit der Gasphase.

**Tabelle 5:** pH-Verschiebung im MGF bei Anzuchtversuchen von *Mc. thermolithotrophicus* in Stahlbomben (500 ml MGF, 500 ml N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 2 bar, 5%ig beimpft, 65°C)

Inkubationszeit [h]	pH <sub>Anfang</sub>	pH <sub>Ende</sub>	ΔpH
16	6.90	7.99	+ 1.09
20	6.90	8.57	+ 1.67
40	6.90	8.61	+ 1.71

Der starke pH Anstieg bei den Anzuchtversuchen auf Formiat als Wasserstoffdonor resultiert gemäß der Gleichung



aus der Bildung von Natronlauge während der Initialphase des Wachstums und führt aufgrund der äusserst beschränkten Pufferkapazität von MGF zur Lysis der Zellen. Anzuchten in Serumflaschen bei denen die experimentelle Möglichkeit zum Nachstellen des pH Wertes gegeben war (0.1 N Ameisensäure im Abstand von 2 h) unterstützen obigen Befund. Sofern es gelang den pH Wert hinreichend konstant zu halten, wurde mäßiges Wachstum (OD 0.25 - 0.35 bei einer Animpfdichte von 0.05 OD) mit relativ langen Verdopplungszeiten von 2.5 bis 3 h erzielt. Voraussetzung war die sofortige vollständige Mischung der zugetropften Ameisensäure mit der Bakteriensuspension; bei unzureichender Durchmischung setzte an der Eintropfstelle Lyse ein. Wegen der extremen technischen Schwierigkeiten bei der Konstanterhaltung des pH Wertes unter Hochdruck wurde auf weitere Experimente zur Optimierung der Anzuchtbedingungen auf Formiat verzichtet, zumal sich aus der obigen Gleichung ein Reaktionsvolumen mit positivem Vorzeichen ableiten läßt.

#### 4. Thermostabilität der Kulturmedien unter erhöhtem Druck

300 ml Medium (MM, MGG, SME, MS und MG) wurden mit 700 ml Gasgemisch ( $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , 4 bar) bei  $270^\circ\text{C}$  in 1 L Stahlbomben inkubiert; die Abschätzung des resultierenden Innendruckes aus der idealen Gasgleichung und dem Dampfdruck des Wassers ergibt ca. 60 bar.

Da Druck- und Temperaturmessungen im Inneren der Bomben aus technischen Gründen nicht vorgenommen werden konnten, ist für die tatsächlichen Temperatur- und Druckverhältnisse, wegen des schlechten termischen Übergangs Luft/Metall während des gesamten Versuchsverlaufs von niedrigeren Durchschnittswerten auszugehen. Sämtliche Medien wiesen nach Abkühlung (Wasserbad) bei Luftzutritt Schwarzfärbung auf; SME roch zusätzlich stark nach  $\text{H}_2\text{S}$  (spontane  $\text{H}_2\text{S}$ -Bildung aus Schwefel). Nach Absetzen des dunklen, flockigen Niederschlags erschien der Überstand milchig trüb. Die typische Reaktion mit Sauerstoff blieb wegen der Zersetzung des Resazurins aus. Die qualitative Analyse nach den üblichen Methoden (Jander & Blasius, 1977) lieferte im Sediment der anorganischen Medien (MGG, MM, SME) die Hauptbestandteile  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  und  $\text{S}^0$  bei SME. Die nachgewiesenen Ionen stammten teils aus den Medien, teils aus dem Stahl der Reaktionsgefäße. Die organisch supplementierten Medien (MG, MS) enthielten zusätzlich verschmortes Material mit der Konsistenz und dem Geruch von Bratensatz.

#### 5. Entwicklung der Kulturgefäße

##### 5.1 Orientierende Vorversuche

Zum Verschluß der von Schmid (1977) verwendeten Microzellen wurden an Stelle von Teflonstopfen, Stopfen aus Chlorbutylkautschuk verwendet um den Gasaustausch über eine Kanüle zu gewährleisten. Diese Gefäße erwiesen sich jedoch als stark gasdurchlässig ( $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ). Da aber Wasserstoff-Dichtigkeit bei hohen Drücken und Temperaturen für die Anzucht der zu untersuchenden Microorganismen unbedingte Voraussetzung ist, wurde Nickelblech als idealer Werkstoff gewählt. Wegen seiner

Sprödigkeit erwies sich Macor (Muschelbrüche) für Abdichtungszwecke als ungeeignet; es wurde auf Nickel-Vollmaterial übergegangen.

## 5.2 Nickel-Tuben

12.5 cm lange Stücke aus elastischem Hydraweld Nickelrohr (Werkstoff Nr. 2.468) der Firma Witzenmann GmbH (Pforzheim) mit einem Aussendurchmesser von 12.1 mm und einer Wandstärke von 0.15 bis 0.16 mm wurden am unteren Ende flachgequetscht, umgebörtelt und hart verlötet. Am oberen Ende wurde ein ca. 3 cm langer Zylinder aus Nickelvollmaterial passend abgedreht und in das Rohr eingelötet. In eine Bohrung mit 1.5 mm Durchmesser, die als Einfüllkanal diente, wurde ein 60° Kupferkonus, mittels einer 5 mm Madenschraube mit Innensechskant zur Abdichtung gepresst. Um völlige Gasdichtigkeit zu gewährleisten, wurden die Kupferkonen jedesmal vor der Verwendung ausgeglüht und in Ethanol abgeschreckt. Sofern die Wandstärke ca. 0.15 mm betrug, war die Lebensdauer der Nickeltuben auf ca. 10 Druckzyklen begrenzt. Nach vorherigem Tempern bei 600°C bzw. bei der Verwendung von Nickelblech mit einem Durchmesser von  $\approx 0.2$  mm ermüdete das Material bereits nach einmaligem Bedrücken.

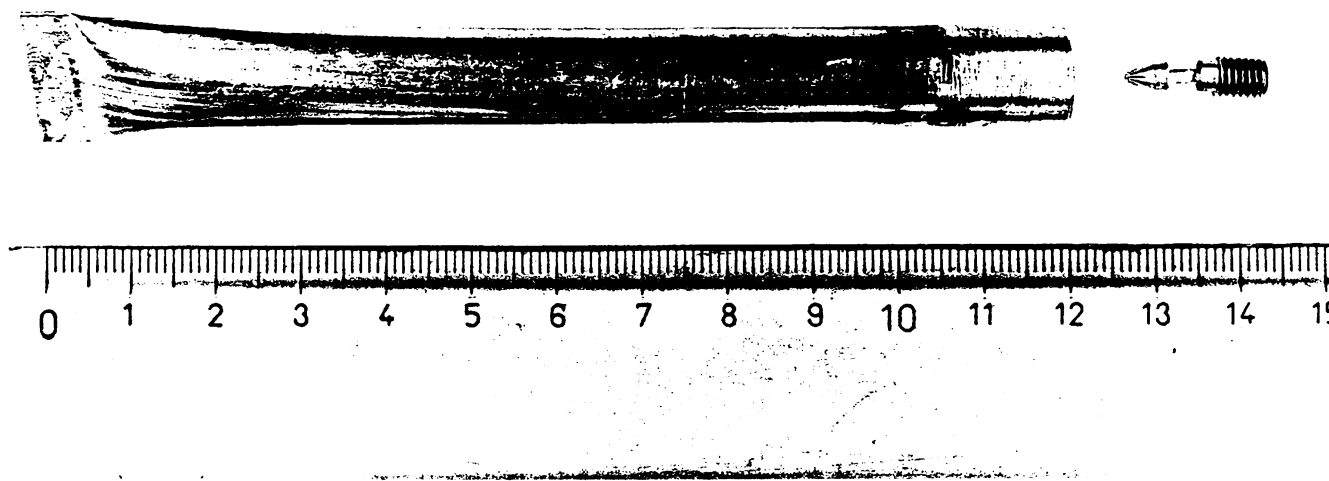


Abb. 5: Nickeltube mit Kupferkonus und Madenschraube mit Innensechskant.



### 5.3 Prüfung auf H<sub>2</sub>-Dichtigkeit

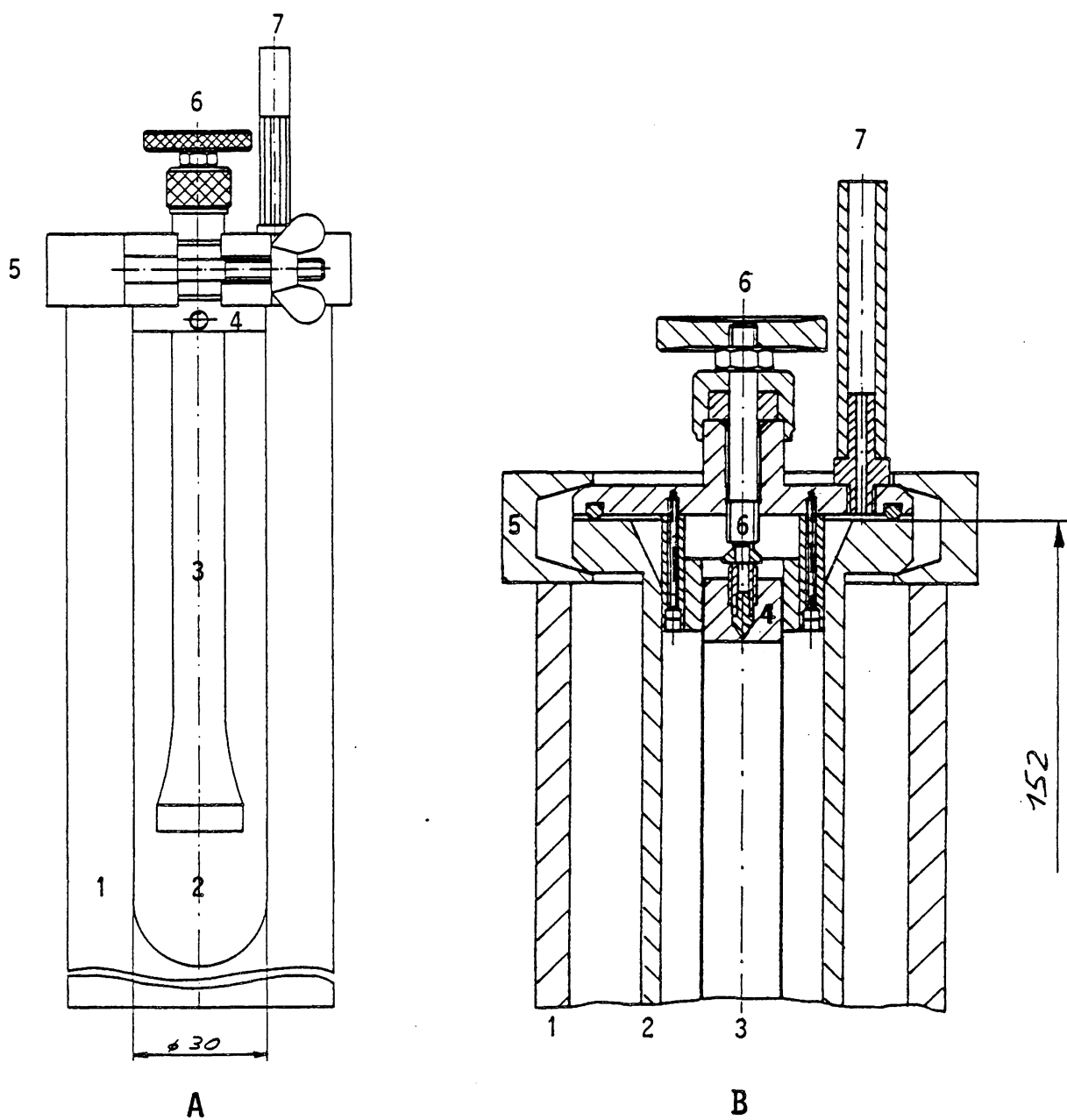
Fünf Ni-Tuben wurden mit H<sub>2</sub> (5 - 6 bar) gefüllt und verschlossen. Die Inkubation erfolgte in einer 500 ml Pyrex-Flasche mit Silicon-Stopfen, der mit einer Schraubkappe gesichert war, unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre 24 h bei 100°C. Der H<sub>2</sub>-Nachweis wurde mittels der Molybdänblau-Reaktion (Fleissner, 1920) durchgeführt; das Reagenz wurde durch den Stopfen in die Flasche eingespritzt. Die Reaktion verlief in Gegenwart von Wasserstoff nur dann positiv, wenn dem Reagenz Paladiumschwarz zugesetzt worden war (im Gegensatz zu Jander & Blasius, 1977). "Protalbinsäure", ein Schutzkolloid für Gold- und Silberpräparate, wurde nach einer Vorschrift von Paal (1902) dargestellt.

### 5.4 Prüfung auf Druck-Dichtigkeit

Als Parameter zur Überprüfung auf Druckdichtigkeit diente die Eigenfluoreszenz von Dialla-Öl (Schmid, 1977), bzw. die Fluoreszenz von Farbstoffen, welche dem Drucküberträger-Medium Ethylenglycol zugesetzt wurden.

### 5.5 Gasaustausch in den Nickeltuben

Im Gegensatz zum Beschicken mit Medium unter anaeroben Bedingungen, stellte der Gasaustausch ein Problem dar. Zum Zweck des Gaswechsels wurde die in Abb. 6 dargestellte Vorrichtung entwickelt.



**Abb. 6:** Apparatur zum Gasaustausch

A: Seitenansicht (Maßstab 1:1.5)

B: Längsschnitt (Maßstab 1:1)

1: Splitterschutz aus Plexiglas; 2: Planschliff Reaktionsgefäß; 3: Nickeltube; 4: Halterung für Nickeltube; 5: Spannungring; 6: Schraube mit angesetztem Imbusschlüssel; 7: Anschlußstutzen zur Gasstation.

Auf einem Planschliff-Reaktionsgefäß mit angesetztem Flansch wurde eine runde Messingplatte mit einem Spannring befestigt. Die Nickeltube wurde im Gefäß von unten in einer an der Messingplatte angebrachten Halterung mittels einer Senkkopfschraube so fixiert, daß der Imbusschlüssel, der von aussen her manipulierbar war, im Innensechskant der Madenschraube steckte. Über einen Messingstutzen, der an eine Bohrung in der Messingplatte angesetzt war, stand das Gefäß direkt mit der Gasstation in Verbindung. Die Gasdichtigkeit der gesamten Apparatur wurde durch O-Ringe aus Gummi und durch Schliff-Fett garantiert. Nach Evakuieren des Behälters, wurde die Nickeltube über den Imbusschlüssel von aussen geöffnet und das Gefäß mehrmals mit der benötigten Gasmischung gespült. In der Regel wurde die Nickeltube in einer  $H_2/CO_2$  Atmosphäre (80:20) bei 4 bar Druck verschlossen. Nach erfolgtem Druckausgleich wurde die Tube aus dem Gefäß entnommen und entweder im Autoklaven bebrütet oder als Kontrolle ohne externen Druck inkubiert.

#### 6. Stabilität von Aminosäuren, Polyglycin und extrem thermophilen Bakterien unter "Black smoker"-Bedingungen.

Während der Entwicklung der Nickeltuben-Technik ging die Sensationsmeldung vom Wachstum von "Black smoker"-Bakterien bei Temperaturen bis wenigstens  $250^{\circ}C$  (Baross & Deming, 1983) durch die Weltpresse. Der "Black smoker" der in einer Tiefe von 2600 m  $21^{\circ}N$  auf dem ostpazifischen Rücken entdeckt worden war, entläßt  $350^{\circ}C$  heiße Wässer in den Ozean (East Pacific Rise Study Group, 1981). Aufgrund des hohen hydrostatischen Druckes von 265 bar bleibt das Wasser trotz der hohen Temperaturen flüssig. Früher wurde bereits angenommen (Brock, 1967; Baross et al., 1983), daß nicht die extrem hohen Temperaturen an sich, sondern die Nichtverfügbarkeit von flüssigem Wasser für Bakterienwachstum limitierend wäre. Diese Vorstellung wurde logischerweise dahingehend erweitert, daß extrem thermophile Mikroorganismen-Gruppen in der Lage sein müssten, die ökologische Nische der hydrothermalen Quellen auf dem Meeresgrund zu besetzen (Baross et al., 1982). Die Ergebnisse von Baross & Deming stellen für unsere vorgefaßte

Meinung über die Temperaturobergrenze des Lebens eine Herausforderung dar, geben zu Spekulationen über die Existenz von Bakterien innerhalb der Erdkruste Anlaß und unterstützen bestehende Vorstellungen auf dem Gebiet der Exobiologie (Walsbey, 1983).

#### 6.1 Versuche zur Anzucht von MSB 8 (*Thermotoga maritima*) bei 250°C, 300°C und 265 bar über 6 h (Bedingungen von Baross & Deming) und 16 h

In Ermangelung der Baross'schen "Organismen" wurde das extrem thermophile Eubakterium *Thermotoga maritima* wegen der morphologischen Ähnlichkeit mit dem von Baross auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgebildeten Objekten ausgewählt.

##### 6.1.1 Temperierung des Autoklaven

Da bis zu diesem Zeitpunkt am Lehrstuhl unter hohen Drücken ausschließlich Enzymologie betrieben worden war, waren die bestehenden Einrichtungen nicht auf hohe Temperaturen ausgelegt. Zur Erzeugung von Temperaturen < 400°C wurde der von Müller verwendete Autoklav mit einer 2.5 kW Heizung spiralgewickelt und mit mehreren Lagen Asbest (Gesamtdicke ca. 1.5 cm) isoliert. Heizung und Isolierschicht wurden mit einem seitlich verschraubten Blechmantel an den Autoklaven gepresst. Um die Wärmeableitung so gering wie möglich zu halten, wurde auch die Autoklavenaufhängung isoliert.

Das Konstanthalten der Temperatur erfolgte über ein zu diesem Zweck konstruiertes Temperatur-Meß-und Regelgerät. Der Temperaturfühler (Thermocoax) befand sich in unmittelbarem Kontakt mit der Stahlwandung des Autoklaven (Wärmeleitpaste) in der Mitte zwischen zwei Heizungswindungen. Die Innentemperatur wurde in unmittelbarer Nachbarschaft der Nickeltube ebenfalls mit einem Thermoelement gemessen und über den gesamten Versuchsverlauf registriert. Die Temperatur wurde auf  $\pm 1^\circ\text{C}$  genau konstant gehalten.

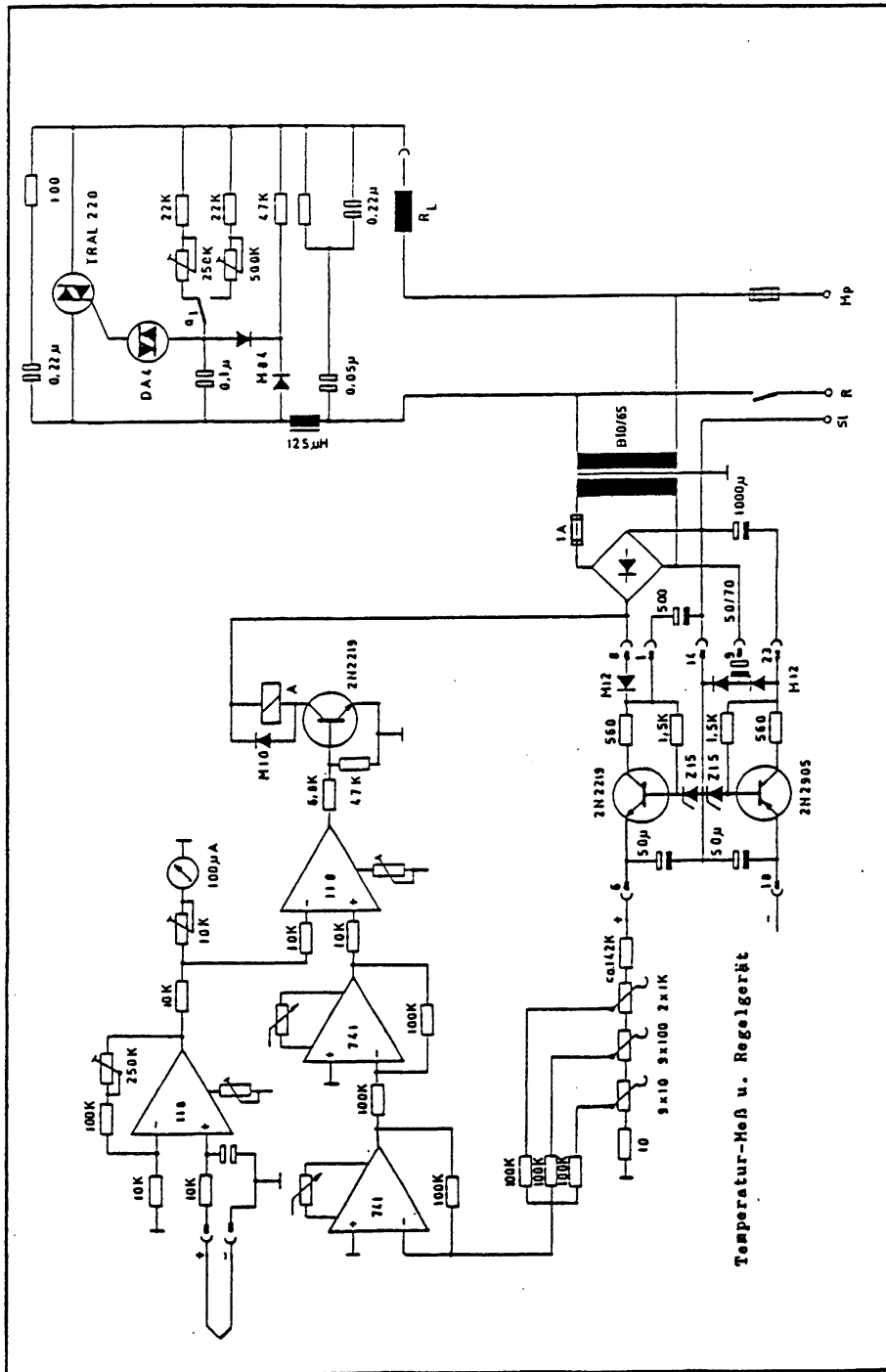
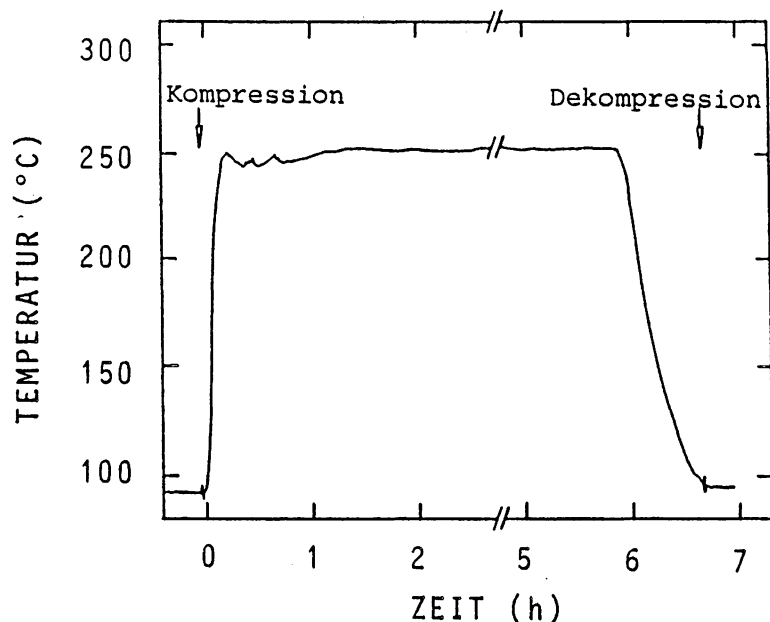


Abb. 7: Schaltplan des Temperatur Meß- und Regelgeräts



**Abb. 8:** Typisches Temperaturprofil während eines Hochdruck-Hochtemperaturversuchs. Der Autoklav war auf ca. 95°C vorgeheizt; als Drucküberträgermedium wurde Ethylenglykol verwendet. Die Abdichtung des Autoklaven erfolgte mit O-Ringen aus Kupfer, die vor jedem Experiment ausgeglüht und in Ethanol abgeschreckt wurden. Das Abkühlen erfolgte mit Pressluft. Während der Aufheiz- und Abkühlphase wurde der Druck über eine Spindelpresse manuell konstant gehalten.

#### 6.1.2 Geringfügige Wachstumshemmung von MSB 8 bei 82°C durch erhöhten hydrostatischen Druck

Kontrollen: Je 4 ml mit 0.001% Hefeextrakt (Difco), 1% HEPES und 0.5% NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.0, aus 0.2% Hefemedium heraus beimpftes MMS-Medium wurde mit 4 bar N<sub>2</sub> in Nickeltuben 24 h bei 85°C unter Atmosphärendruck inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde lichtmikroskopisch auf Wachstum kontrolliert. Alle Kontrollen waren mäßig bewachsen, sowohl mit Kurzstäbchen als auch mit kokkoiden Zellen; die Mehrzahl der Kurzstäbchen befand sich im Teilungsstadium.

Proben bei 82°C und 136 bar:

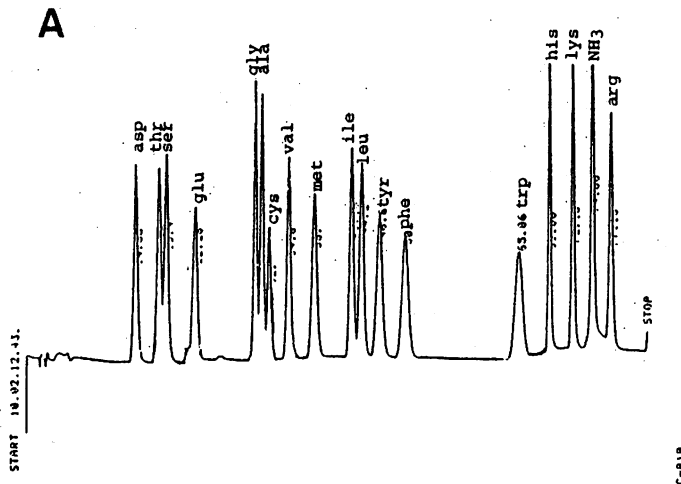
Applikation von Druck über 24 h führt zu signifikanter Wachstumshemmung gegenüber den Kontrollen, obwohl auch in den bedrückten Proben Kurzstäbchen im Teilungsstadium beobachtet wurden. Der pH-Wert des Mediums war auf 7.5 angestiegen (Messung bei Raumtemperatur); die Reaktion von Resazurin mit Sauerstoff war normal.

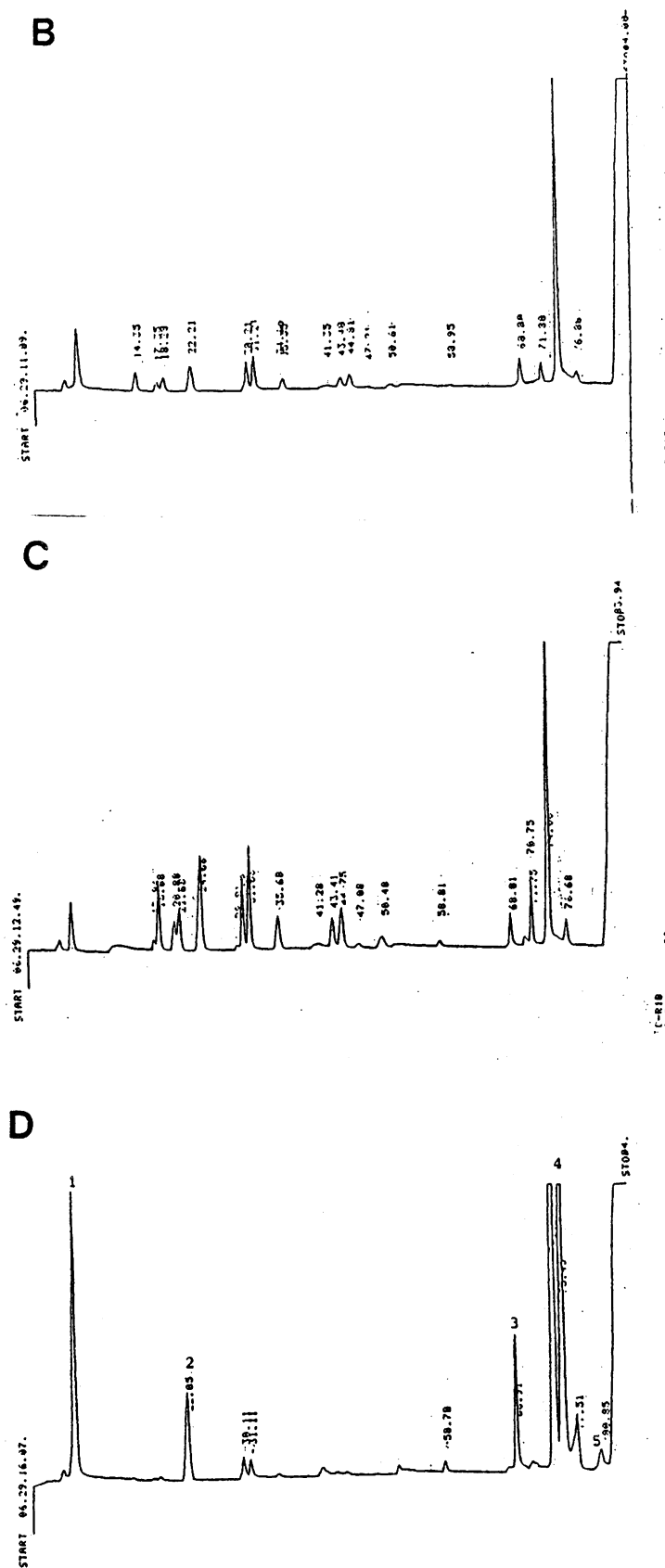
### 6.1.3 Inkubation von MSB 8 unter hydrothermalen Bedingungen

Je 4 ml beimpftes, supplementiertes Medium wurden mit 6 ml N<sub>2</sub> (4 bar) bei 251°C (bzw. 255°C), 260 bar (bzw. 290 bar), 6 h (bzw. 16 h) druckinkubiert. Nach der Dekompression wies das Medium eine gelblich grüne Farbe bei pH 6.5 auf, die an der Luft rasch in braun umschlug (keine Resazurin-Reaktion). Die mikroskopische Untersuchung ergab keinerlei Anhaltspunkte für das Vorhandensein irgendwelcher zellulärer Bestandteile bzw. Zellfragmente; das Medium enthielt eine Vielzahl kristalliner Partikel die sich nach kurzer Zeit als dunkler Bodensatz absetzten. Zur Sicherung des obigen Befundes wurden als Kontrollen beimpftes Medium und die bedrückten Proben mit und ohne saure Hydrolyse (4 N HCl, 100°C, 16 h) einer Aminosäureanalyse unterzogen.

### 6.1.4 Aminosäureanalyse von MSB 8 Suspensionen

66 µl Hydrolysat wurden auf einem Biotronik Aminosäureanalysator LC 5000, der an einen Shimadzu CR 1B Chromatopac





**Abb. 9:** Aminosäuremuster von *Thermotoga maritima* vor und nach hydrothermaler Behandlung.

- A: 5.5 nM Aminosäurestandard
- B: 66 µl Hydrolysat des beimpften MMS-Mediums
- C: 66 µl der bewachsenen Kultur, nach 6 h Inkubation bei 85°C und Atmosphärendruck
- D: 66 µl Hydrolysat nach 6 h Inkubation bei 251°C und 260 bar

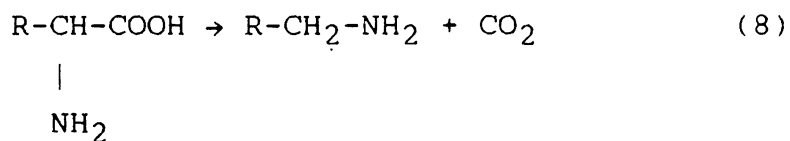


Wie aus den obigen Chromatogrammen zu ersehen ist, nimmt der Gehalt an Aminosäuren in den bewachsenen Kontrollen gegenüber dem beimpften Medium nach 6 h Bebrütungszeit bei 85°C und 1 bar zu; dieser Anstieg bestätigt den lichtmikroskopischen Befund des Wachstums. Dagegen sind bei den Proben, die hydrothermalen Bedingungen unterworfen worden waren nur noch Glycin und NH<sub>3</sub> eindeutig zuzuordnen. Besonders signifikant ist der drastische Anstieg des Ammoniakpeaks. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß sich unhydrolysierte hydrothermale Proben von den salzsauren Hydrolysaten weder qualitativ noch quantitativ unterscheiden. Aus den mikroskopischen Befunden, zusammen mit dem Ergebnis der Aminosäureanalyse muß zwingend geschlossen werden, daß unter den Baross'schen Bedingungen keinerlei Wachstum erfolgt; vielmehr werden die im Inokulum befindlichen Zellen von *Thermotoga maritima* vollständig zerstört. Es erhebt sich zudem der Verdacht, daß unter "Black smoker"-Bedingungen, die im Gegensatz zu anderen Biomolekülen sehr stabilen Aminosäuren einschneidenden chemischen Veränderungen unterliegen. Analoge Versuche mit *Pyrodictium occultum* blieben erfolglos. Die Bildung von NiS und Ni<sub>2</sub>S<sub>3</sub> aus dem Schwefel im Medium stellte selbst in mit Teflon ausgekleideten Nickeltuben ein unüberwindliches Problem dar.

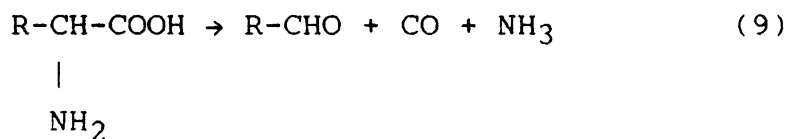
## 6.2 Stabilität von Aminosäuren bei 250°C und 260 bar

Im kristallinen Zustand liegt der Stabilitätsbereich für die biogenen Aminosäuren zwischen den Zersetzungspunkten von Glutamin (180 - 185°C) und Tyrosin (342 - 344 °C) (Beilstein). Aus den meisten Aminosäuren entstehen bei ca 250°C eine Vielzahl von thermischen Umwandlungsprodukten (Heyns & Pawel, 1957). Zur thermischen Stabilität von Aminosäuren in wässrigen Lösungen liegen bislang eine Reihe von Untersuchungen vor (Valentyne, 1964, 1968; Povoledo & Valentyne, 1964). In Lösung laufen am intakten Aminosäuremolekül drei Primärreaktionen ab.

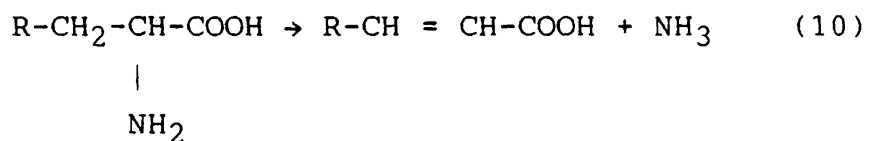
- Decarboxylierung



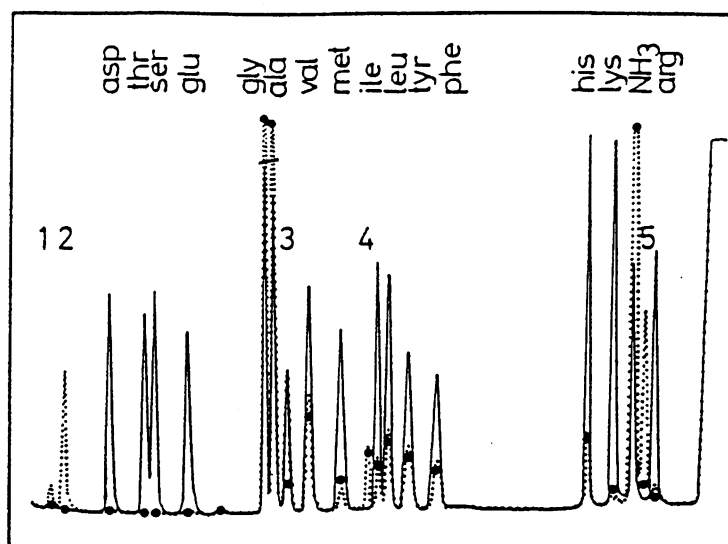
- Abspaltung von Kohlenmonoxid



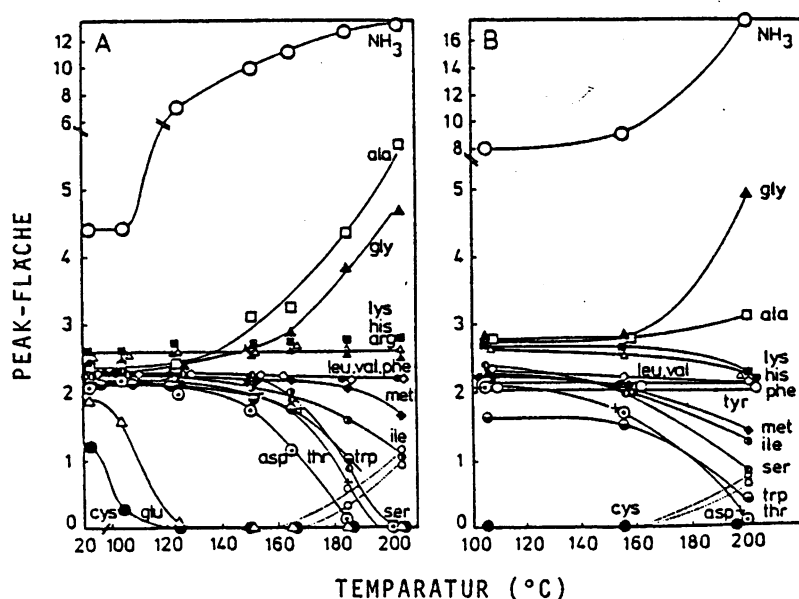
- Desaminierung (unter Erhaltung des Kohlenstoffgerüsts)



Um den postulierten stabilisierenden Einfluß hoher Drücke auf obige Zersetzungsreaktionen zu überprüfen, wurden die folgenden Versuche unter hydrothermalen Bedingungen in Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt. Technische Einzelheiten sind an anderer Stelle beschrieben (Bernhardt et al., 1984).



**Abb. 10:** Hydrothermale Zersetzung natürlicher  $\alpha$ -L-Aminosäuren bei 250°C und 260 bar. 3 ml Aminosäuremix ("calibration standard" + L-Tryptophan, 550 nM/As.ml in H<sub>2</sub>O pH 2.0 (pH nach Behandlung 4.7) (●) bzw. in Minimalmedium + 0.3% HEPES + 0.5% NaHCO<sub>3</sub>, Anfangs pH 7.5 (---)) wurden bei 250°C und 260 bar 6 h inkubiert. Zur Aminosäureanalyse wurden 50  $\mu$ l Proben mit einem Gehalt von 5.5 nM pro Aminosäure verwendet. (—) Aminosäurestandard ohne hydrothermale Behandlung. Die Peaks 1 - 5 stellen unidentifizierte Abbauprodukte dar. Bei 303°C und 260 bar werden alle Aminosäuren zerstört. Unter diesen Bedingungen ist Ammoniak das einzig nachweisbare Produkt.



**Abb. 11:** Temperaturabhängige Zersetzung natürlicher  $\alpha$ -L-Aminosäuren nach 6 h Inkubation bei 260 bar. Bedingungen wie in Abb. 10. Die Peakfläche ist angegeben in  $\mu$ V.s. $10^{-4}$ .

A: Aminosäuremix in H<sub>2</sub>O, pH 2.0 (End pH 4.7)

B: Aminosäuremix in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0 (End pH 7.0). (....) unbekannte Abbauprodukte.

Aus Abb. 10 ist deutlich zu ersehen, daß die Stabilität von Aminosäuren durch hohe Temperatur und hohen Druck dramatisch beeinflußt wird. Bei 250°C und 260 bar wird eine Reihe von Aminosäuren bereits innerhalb von 6 Stunden beinahe vollständig zerstört bzw. ineinander umgewandelt (Asp, Glu, Ser, Thr, Cys und Trp). Die unpolaren Aminosäuren sowie His, Lys, Arg und Phe werden partiell abgebaut. Andererseits nehmen Gly, Ala und NH<sub>3</sub> drastisch zu; diese Zunahme kompensiert (zumindest teilweise) die Abnahme der übrigen Aminosäuren. Die Zunahme von Ammoniak läßt sich aus Gleichung ( 9 ) und Gleichung (10 ) direkt verstehen; obiger Befund legt die Vermutung nahe, daß die Decarboxylierung eine untergeordnete Rolle spielt.

Nach Valentyne (1964) wird im Temperaturbereich um 250°C und dem resultierenden Dampfdruck des Wassers Gly aus Ala, Val, Ser, Thr, Met und Tyr als Abbauprodukt detektiert. Met und Ser wandeln sich zusätzlich in Ala um (siehe Abb .11 ). Das Defizit in der Nettobilanz erklärt sich aus der Vielzahl der organischen Verbindung, die z. T. nur in Spuren als Ninhydrin-negative Produkte entstehen (Walter et al., 1967). Gly und Ala stellen stabile Endprodukte des Aminosäureabbaus dar. Untersuchungen zur Stabilität gegenüber Decarboxylierung im relevanten Temperaturbereich ergaben Halbwertszeiten in der Größenordnung von 30 Tagen (Conway & Libby, 1958). Aus Abbildung (11 ) geht zusätzlich hervor, daß der pH Wert (pH 2 resultiert aus der Verdünnung des Aminosäurestandards mit H<sub>2</sub>O, pH 7.6 aus der Verdünnung mit Phosphatpuffer) keinen merklichen Einfluß hat.

Im Minimalmedium, das HEPES enthält, treten zusätzlich die von Baross & Deming beobachteten fünf Zusatzpeaks auf. Bei Peak 1 und 2 scheint es sich um Ninhydrin-positive Abbauprodukte von HEPES zu handeln, die bereits nach salzsaurer Hydrolyse (4 N HCl, 100°C, 16 h; vgl. Abb.9 ) in der Aminosäureanalyse detektiert werden. In Abbildung 11 ist die Temperaturabhängigkeit des Zerfalls (250°C, 260 bar, 6 h) in H<sub>2</sub>O (pH 2.0) und Natriumphosphat Puffer (pH 7.6) dargestellt. Während eine Anzahl von Aminosäuren bis 200°C beträchtliche Stabilität aufweist, erfährt der Großteil chemische Modifikationen, was obige Ergebnisse bestätigt. Hoher Druck stellt demnach keinen Schutz vor Degradation dar. Lediglich Arg

scheint bis zu 200°C durch Druck gegenüber Hydrolyse stabilisiert zu werden. Nach Valentyne (1964) liegt die Halbwertszeit von Arg.HCl im Minutenbereich. Möglicherweise erklärt sich diese Diskrepanz aus einem Zuordnungsproblem des Arg Peaks mit einem durch die Umwandlung entstandenen Ninhydrin-positiven Produktpeak. Murray et al. (1965) geben die Halbwertszeit der Hydrolyse von Arg bei 176°C mit ca. 25 h an.

Die Auswertung der Kinetik des Abbaus bei 250°C und 260 bar ist durch die unzureichend definierte Inkubationszeit (vgl. Abb. 8), bedingt durch die langen Aufheiz- und Abkühlperioden erschwert (150°C → 250°C → 150°C ≈ 25 - 30 min). Innerhalb dieser Zeit hat der Abbau von Arg, Cys, Asp und Glu bereits vollständig stattgefunden. Die Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ) für die übrigen Aminosäuren liegt im Bereich von 50 min. Die Zunahme der hydrothermalen Stabilität wird durch die Reihenfolge Trp ( $\tau_{1/2} \approx 30$  min) < Ser < Thr < Met < His < Lys, Tyr < Ile < Leu < Val ( $\tau_{1/2} \approx 80$  min) gekennzeichnet. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Halbwertszeit der Aminosäuren unter "Black smoker" Bedingungen kürzer ist, als die maximale Verdopplungszeit (40 min) extrem thermophiler Bakterien.

**Tabelle 6** : Hydrothermaler Abbau von Polyglycin und isolierte Zellen von *Pyrodictium occultum* (Stamm PL 19)  
Die Zahlen geben die Peakflächen ( $\mu\text{V} \cdot \text{sec} \cdot 10^{-2}$ ) aus der Aminosäureanalyse (nach 6 h Inkubation bei 250°C und 260 bar, vgl. mit unbehandelten Kontrollen bei 20°C, 1 bar) wieder.

Verbindung	Polyglycin in 0.1 M NaPP pH 7.0		<i>Pyrodictium occultum</i> in Minimalmedium plus 0.3% HEPES und 0.5% NaHCO <sub>3</sub> pH 7.5			
			hydro- lysiert <sup>a</sup>		nicht hydro- lysiert <sup>b</sup>	
	20°C 1 bar	250°C 260 bar	20°C 1 bar	250°C 260 bar <sup>c</sup>	20°C 1 bar	250°C 260 bar <sup>c</sup>
Asp			766	7	6	0
Thr			440	2	8	0
Ser			576	9	9	0
Glu			1127	705	69	0
Gly	0 <sup>d</sup>	336	924	877	46	988
Ala			1023	740	45	786
Val			499	310	12	291
Met			67	0	0	0
DAP			25	16	22	15
Ile			393	78	6	69
Leu			804	263	10	235
Tyr			10	0	0	94
Phe			191	65	0	59
GlcNH <sub>2</sub>			137	0	0	0
GalNH <sub>2</sub>			55	0	0	0
Arg			282	105	55	74
Orn			16	54	0	22
Lys			616	73	50	72
NH <sub>3</sub>			1541	5238	170	5759
His			527	0	18	0

<sup>a</sup> Die Zellsuspensionen wurden einer Säurehydrolyse, 4 N HCl, 110°C, 16 h unterzogen; nach Zentrifugation erfolgte die Aminosäureanalyse des Überstands.

<sup>b</sup> 20°C, 1 bar (Kontrollen): Die Aminosäurezusammensetzung des Mediums nach Abtrennung der zellulären Bestandteile durch Zentrifugation. 250°C, 260 bar: Aminosäurezusammensetzung im Überstand nach hydrothermalen Behandlung der Zellsuspension und anschließender Zentrifugation.

<sup>c</sup> In Gegenwart von Glukose weist der Abbau der Aminosäuren höhere Komplexität auf als im Falle der reinen Aminosäuregemische (Valentyne, 1964).

<sup>d</sup> Polyglycin lag unter der detektierbaren Grenzkonzentration bei Verwendung der Standard Ninhydrinreaktion.

### 6.3 Hydrothermale Stabilität von Polyglycin und Zellen von *Pyrodictium occultum*

#### 6.3.1 Polyglycin

Um die Auswirkungen hoher Temperaturen und hoher Drücke auf die Stabilität der Peptidbindung zu untersuchen wurde wegen der maximalen Stabilität des Glycins bei 250°C und 260 bar, Polyglycin verwendet. Der Polymerisationsgrad betrug  $\approx 80$ . Inkubiert wurde in 0.1 M Natriumphosphat Puffer pH 7.0 bei 253°C und 260 bar. Wie aus Tabelle 6 zu entnehmen ist, war Polyglycin nach 6 h bereits vollständig hydrolysiert. Wie für Dialanin und Alanylaspartat gezeigt wurde, betragen die Halbwertszeiten ungefähr 6 min bzw. 1 min (White, 1984). Somit reicht Temperaturerhöhung aus, um die Aktivierungsbarriere zu überwinden, die der Peptidbindung bei Raumtemperatur und Normaldruck Stabilität verleiht. Die vollständige Depolymerisation erfolgt im Minutenbereich.

#### 6.3.2 Zellen von *Pyrodictium occultum*

Das Archaeobakterium *Pyrodictium occultum* wächst bei 105°C optimal; in diesem Temperaturbereich ist die Hydrolyseanfälligkeit von Zellbestandteilen aus mesophilen Organismen (ATP und NADH) bereits merklich ausgeprägt. Die Tatsache, daß *Pyrodictium* noch in der Lage ist, sich bei 110°C zu vermehren, verleitet zu der Annahme, daß seine Zellbestandteile in besonderem Maße speziell an hohe Temperaturen angepaßt sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt.

- Unter Normalbedingungen gezogene Zellen wurden hydrolysiert, um gegebenenfalls Zellbestandteile (modifizierte Aminosäuren) zu finden, die in der Lage sind, "Black smoker" Bedingungen unbeschadet zu überstehen; derartige Verbindungen wurden nicht gefunden (Tabelle 6).

- Intakte, unter Normalbedingungen gezogene Zellen, wurden direkt bei 250°C und 260 bar inkubiert. Das Ergebnis war die ausgeprägte Hydrolyse von Proteinen und der Abbau mit den resultierenden Veränderungen, wie sie für Aminosäuren unter

hydrothermalen Bedingungen charakteristisch sind (Abb.10). Aus diesen Experimenten muß gefolgert werden, daß selbst das bisher bekannte "extremst" thermophile Bakterium über keinerlei besondere Schutzmechanismen verfügt, die das Überleben unter "Black smoker" Bedingungen gestatten. Wie auch im Falle anderer Thermophiler (Abb.9 C) (Amelunxen & Murdock, 1978; Zuber, 1979; Jaenicke, 1981) weist das Aminosäurerepertoire von *Pyrodictium occultum* keinerlei Besonderheiten auf; entsprechend sind die natürlichen  $\alpha$ -L-Aminosäuren dem hydrothermalen Abbau unterworfen. Aufgrund der kurzen hydrothermalen Zersetzungszeiten von Proteinen und Aminosäuren, gibt es keine plausible Erklärung für die Existenz und das Überleben von "Black smoker Bakterien".

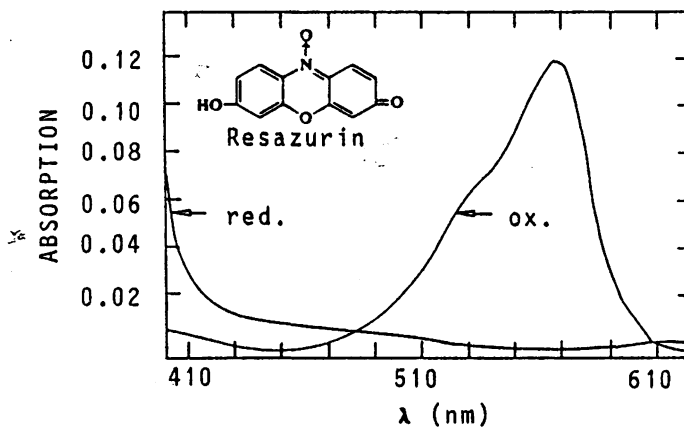


## 7. Optimierung der Anzuchtbedingungen für *Mc. thermolithotrophicus* unter Hochdruck

### 7.1. Quantifizierung des Wachstums

#### 7.1.1. Bei Anzucht unter Atmosphärendruck

In vielen mikrobiologischen Laboratorien stehen keine Spektralphotometer mit variabler Wellenlänge zur Verfügung; es hat sich aus diesem Grund eingebürgert in Gegenwart des Redoxindikators Resazurin die scheinbare Extinktion bei 578 nm zu bestimmen. Bei dieser Wellenlänge weist die oxidierte Form des Sauerstoffindikators beträchtliche Eigenabsorptionen auf; daher ist der Zusatz von Reduktionsmittel (z.B. Natriumdithionit) erforderlich.



**Abb. 12:** Absorptionsspektrum von  $MG^{-}H$  vor und nach der Reduktion mit Natriumdithionit;  $d = 1$  cm.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, kann zur Vereinfachung und zur Vermeidung von Verfälschungen durch Schlieren- bzw. Fusselbildung bei Zusatz von  $Na_2S_2O_4$  die Absorption im oxidierten Zustand bei 450 nm bestimmt werden.

Bei dieser Wellenlänge spielt es keine Rolle, ob das Medium oxidiert, bzw. durch gelöstes Methan und Wasserstoff noch partiell reduziert vorliegt.

Wurden die Proben nicht bedrückt, stellt die Messung sowohl bei 578 nm als bei 450 nm eine hinreichend genaue Methode zur Quantifizierung dar und korreliert sehr gut mit der direkten Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer.

#### 7.1.2 Nach der Hochdruckbehandlung

Nach Druckinkubation ist die Extinktionsmessung bei 578 nm und 450 nm zur Quantifizierung des Wachstums in allen verwendeten Medien nicht geeignet, da sich die Medien während des Bedrückens verändern (Farbänderung, Kristallbildung).

Tabelle 7 gibt einen Vergleich zwischen der Zellzahl und der OD<sub>578</sub> von unter verschiedenen Drücken inkubierten Kulturen wieder (*Mc. thermolithotrophicus*, Stamm SM 1).

**Tabelle 7:**

Zelle/ml	OD <sub>578</sub>
$6.0 \cdot 10^6$	0.482
$6.1 \cdot 10^6$	0.300
$8.2 \cdot 10^6$	0.289
$2.2 \cdot 10^7$	0.042
$5.2 \cdot 10^7$	0.132
$7.0 \cdot 10^7$	0.202
$1.6 \cdot 10^8$	0.446
$2.3 \cdot 10^8$	0.483

Vergleich der Zellzahl- und der OD<sub>578</sub>-Bestimmung von bedrückten SM 1 Kulturen. In den angegebenen Werten ist der jeweilige Verdünnungsfaktor einbezogen.

Zur Überprüfung der Wachstumsquantifizierung durch Auszählen (Labilität der Zellen von *Mc. thermolithotrophicus*) wurde der Gesamtaminosäuregehalt (ohne Pro, Cys und Trp) einer wachsenden Kultur mit der Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt auf der Wachstumskurve verglichen.

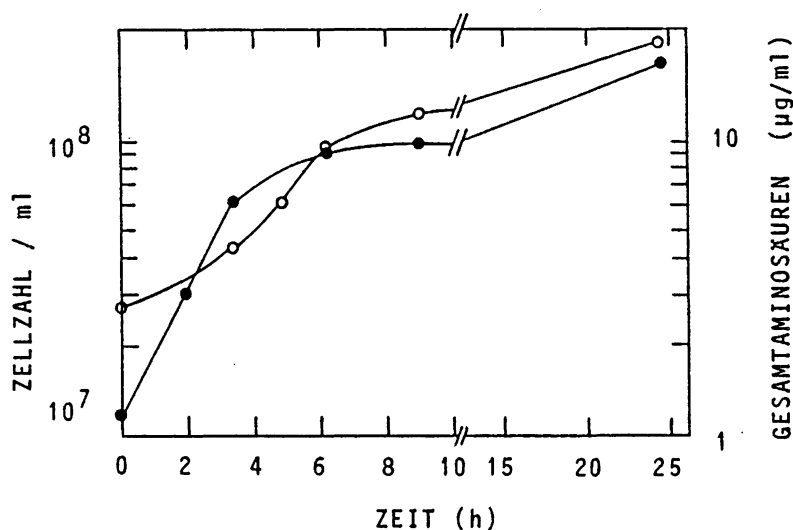


Abb. 13: Vergleich von Gesamtaminosäuregehalt (ohne Pro, Cys und Trp) (●) und der Zellzahl (○) von *Mc. thermolithotrophicus* in einer wachsenden Kultur (MG<sup>-</sup>H, 65°C 2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, Schüttelkultur). Zur Aminosäureanalyse wurde je 1 ml Bakteriensuspension 15 min bei 12 000 upm zentrifugiert und das Sediment mit 50 µl 6 N HCl 20 h bei 110°C unter vermindertem Druck hydrolysiert; nach Evaporieren der HCl wurde der Rückstand in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. In das HPLC System wurden jeweils 10 µl OPA-Derivat injiziert.

Mit dem Erreichen der stationären Phase verlaufen Aminosäuregehalt und Zellzahl parallel. Daß die Aminosäurekurve unter der Zellzahlkurve liegt, ist darauf zurückzuführen, daß bei der Derivatisierung mit Orthophthaldialdehyd (OPA), Cys und Pro prinzipiell nicht erfaßt werden. Die SH-Gruppe des Cysteins muß vor der Reaktion zur Sulfonsäure oxidiert werden.

(Teschner, persönliche Mitteilung). Trp wird während der Hydrolyse zersetzt. Das Überschießen der Aminosäuren während der Lag- und Log-Phase hat unter anderem zwei Gründe:

- Neben dem Gesamtprotein wird auch der Aminosäuremetabolismus mit erfaßt (Umstellen der Zellen auf die neuen Bedingungen).
- Starke Variabilität der Zellgröße von *Mc. thermolithotrophicus* während der Initial-Phase des Wachstums (Faktor 2).

Vergleiche von Aminosäuregehalt und Zellzahl von druckinkubierten Kulturen liefern qualitativ sehr ähnliche Ergebnisse. Die Auszählung der Zellen von *Mc. thermolithotrophicus* stellt, trotz der beträchtlichen Neigung der Zellen zur Lyse in Gegenwart von Sauerstoff während der Zählprozedur, ein hinreichend genaues Kriterium zur Quantifizierung des Wachstums dar; signifikante Verfälschungen durch spontan ly sierende Zellen treten nicht auf.

## 7.2 Die Druckabhängigkeit des Wachstums in verschiedenen Kulturmedien

Bei den meisten chemischen Reaktionen ist die Summe der partiellen molaren Volumina der Edukte ungleich der Summe der partiellen molaren Volumina der Produkte. Bietet man einem Organismus unterschiedliche Energiequellen an, so muß man, in Abhängigkeit vom beschrifteten Stoffwechselweg -je nach dem Vorzeichen von  $\Delta V$  bzw.  $\Delta V^*$ - unterschiedliches Verhalten gegenüber hohen hydrostatischen Drücken erwarten. Da *Mc. thermolithotrophicus* bei allen Druckexperimenten seine Stoffwechselenergie gemäß Gleichung 5 gewinnt, sollte, bei einer gegebenen Temperatur in unterschiedlich supplementierten Medien, immer das selbe Verhalten gegenüber Druck auftreten. In Abbildung 14 ist das Verhalten von *Mc. thermolithotrophicus* gegenüber Druck in verschiedenen Medien nach 20 h bei 65°C wiedergegeben.

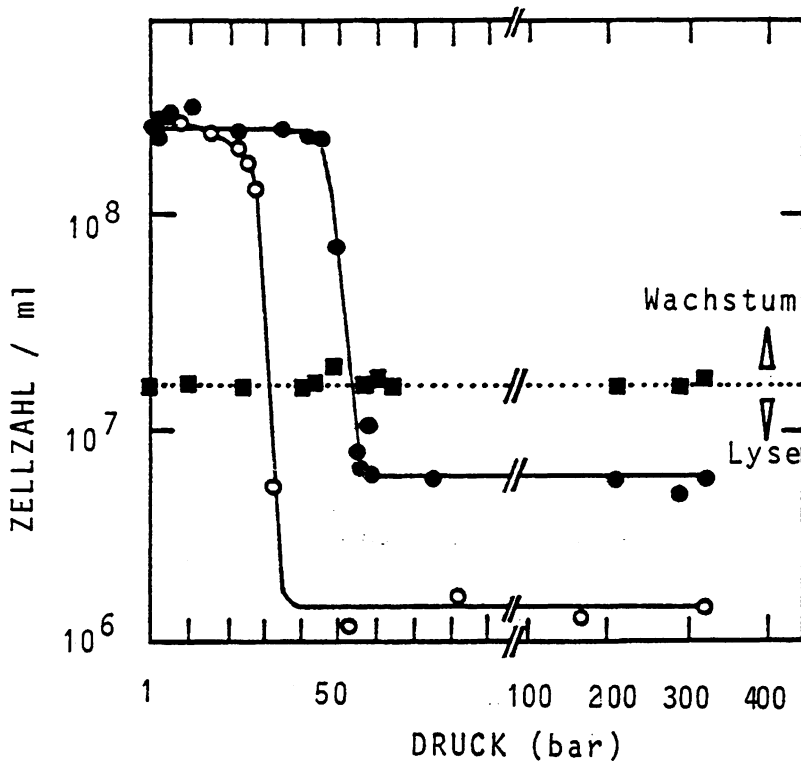


Abb. 14: Druckabhängigkeit der Zellausbeute vom verwendeten Kulturmedium. 4 ml beimpftes Medium, pH 6.9 (pH Messung erfolgte vor dem Begasen und Autoklavieren bei Raumtemperatur) + 6 ml H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (4 bar) wurden im Autoklaven im Trockenschrank bei 65°C ± 3°C 20 h inkubiert. Da zum Zeitpunkt der Versuche nur ein Autoklav verfügbar war, wurden die Proben jedesmal aus unterschiedlichen Vorkulturen beimpft. MG (●), MGG (o), Animpfdichte (■).

Im Gegensatz zum oben Gesagten, zeigt sich (trotz des identischen Substrates 80% H<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub> und NaHCO<sub>3</sub> (5g/L)), ein signifikanter Unterschied im Verhalten gegenüber Hochdruck, je nachdem welches Kulturmedium zur Anzucht verwendet wurde. Am ausgeprägtesten macht sich der Einfluß steigenden Druckes auf das mineralische Minimalmedium MGG bemerkbar; bereits bei relativ niedrigen Drücken ≥ 20 bar, nimmt die Zellzahl gegenüber unbedrückten Proben rapide ab; bei P ≥ 30 bar lysieren die Zellen. An dieser Stelle sei bemerkt, daß die bestimmten Zellzahlen wesentlich zu hoch erscheinen, da die Unterscheidung von Zellfragmenten als Folge der Lysis im Lichtmikroskop von intakten Zellen nur schwer gelingt (die Auszählung im Fluoreszenzmikroskop war wegen des nichtfluoreszierenden Rasters unmöglich). Vernünftigerweise muß davon ausgegangen

werden, daß unterhalb der Animpfdichte de facto keine intakten, lebenden Zellen mehr vorhanden sind. Werden dem mineralischen Medium Hefeextrakt, Pepton, Vitamine, Natriumacetat und Cysteinhydrochlorid zugesetzt, so wird der Überlebensbereich bis zu Drücken  $\leq 50$  bar erweitert. Diese zugesetzten Substanzen besitzen in geringem Maße Pufferwirkung; die Überlegungen gingen dahin, etwaige unter Hochdruck auftretende pH Effekte durch Wahl eines geeigneten Puffers abzufangen.

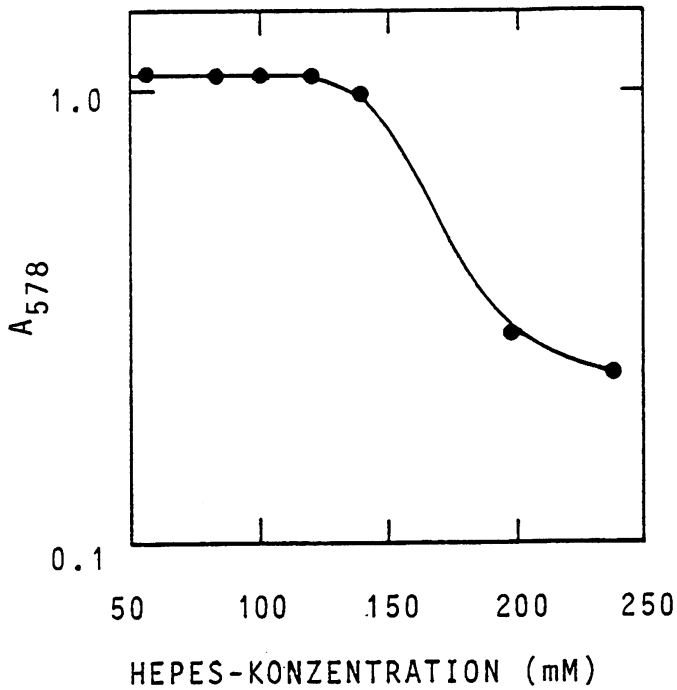
### 7.3. Einfluß von verschiedenen Puffersubstanzen auf das Wachstum von *Mc. thermolithotrophicus* in Schüttelkulturen (65°C, 2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>)

Bei der Wahl der geeigneten Puffersubstanz ist zu berücksichtigen, daß organische Verbindungen relativ große Temperaturkoeffizienten besitzen (diese Tatsache schränkt das Angebot der in biochemischen Experimenten einsetzbaren Puffer bei 65°C erheblich ein). Das Wachstum in 25mM Imidazol/HCl (pH 6.9 vor dem Begasen) ist gegenüber MG<sup>-</sup> stark verlangsamt. Nachdem Imidazol/HCl bereits bei geringen Konzentrationen toxisch war, kamen

		pK <sub>a</sub> , 20°C	*pK <sub>a</sub> /°C
PIPES	$\text{NaO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{Hexagon} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.80	-0.0085
HEPES	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{Hexagon} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	7.55	-0.014

in die engere Wahl; \* Nach Westcott (1978).

Mit PIPES konnte wegen der begrenzten Löslichkeit keine ausreichende Pufferkapazität erzielt werden.



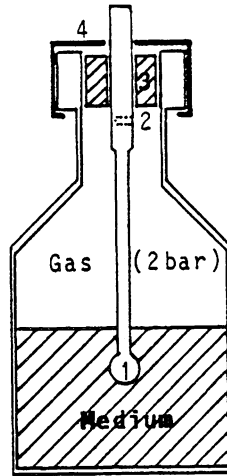
**Abb. 15:** Abhängigkeit der Zellausbeute von der HEPESkonzentration in Schüttelkultur. 20 ml beimpftes Medium ( $MG^-$ , 0,042 - 0,049 OD) wurden in Serumflaschen (2 bar  $H_2/CO_2$ ) mit steigenden Konzentrationen HEPES bei 65°C geschüttelt. Nach 8 h wurde die Absorption bei 578 nm gemessen. Es erwiesen sich 120 mM HEPES als optimal.

#### 7.4 pH-Abhängigkeit des Wachstums in $MG^-H$ (= $MG^-$ mit 120 mM HEPES) bei 65°C und 2 bar $H_2/CO_2$

Bei einer routinemäßigen Herstellung der Medien wird der pH-Wert vor dem Autoklavieren und vor dem Begasen mit  $H_2/CO_2$  bei Raumtemperatur gemessen. Wegen der Abhängigkeit des pH-Wertes von der Temperatur und vom  $CO_2$ -Druck wurde das in situ pH-Profil für *Mc. thermolithotrophicus* bei 65°C ermittelt.

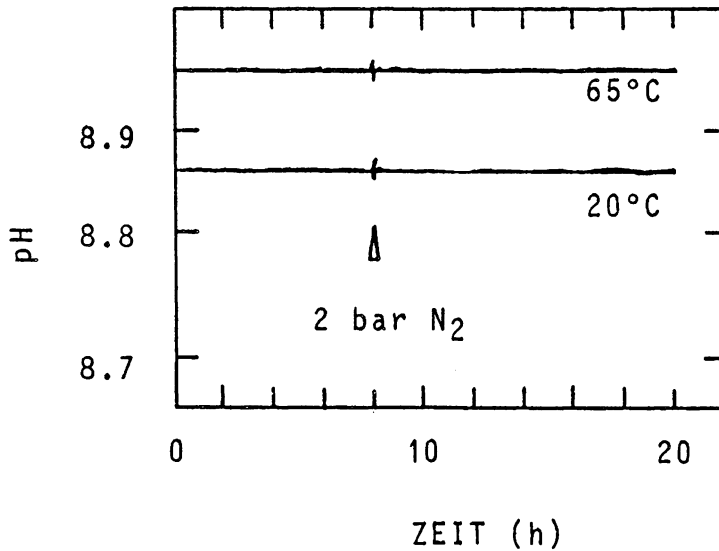
##### 7.4.1 Meßanordnung

Eine Mikroelektrode war, wie Abb. 16 zeigt in eine Serumflasche gasdicht eingepaßt, so daß sich die Ausgleichsbohrung oben am Schaft mit in der Flasche befand; dadurch war der Druckausgleich gewährleistet.



**Abb. 16:** Meßanordnung zur Bestimmung des pH-Optimums unter in situ-Bedingungen ( $65^{\circ}\text{C}$ , 2 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ).

1: Einstabmeßkette; 2: Ausgleichsbohrung; 3: Stopfen aus Chlorbutyl-Kautschuk; 4: Alukappe.



**Abb. 17:** Unabhängigkeit des pH-Wertes vom  $\text{N}_2$ -Gasdruck.

Die Änderung des pH-Wertes von 0,1 N NaPP, pH 8,82 (zufällig zur Hand) wurde in obiger Meßanordnung 20 h bei  $20^{\circ}\text{C}$  und  $65^{\circ}\text{C}$  aufgezeichnet. Anfänglich befand sich in der Flasche Luft unter Atmosphärendruck; Nach 10 h wurde die Luft gegen 2 bar  $\text{N}_2$  ausgetauscht. Dies führte zu kurzzeitigen Potentialschwankungen. Das Potential pendelte sich nach ca. 5 min. wieder auf den Anfangswert ein und blieb dann weitere 10 h konstant. Der veränderte Potentialverlauf bei  $65^{\circ}$  spiegelt den Temperaturkoeffizienten wieder. Die Abbildung zeigt, daß 2 bar Druck auf die EMK der Kette keinerlei Einfluß ausüben.



#### 7.4.2 Kalibrierung der Meßkette bei 20°C und 65°C

Der Temperaturkompensationsknopf an den pH-Meßverstärkern erwies sich als Atrappe. Die Kalibrierung wurde daher mit Eichpuffern unter Berücksichtigung der  $pK_a$ -Werte pro °C der jeweiligen Puffer vorgenommen. Zuvor wurde sichergestellt, daß 2 bar  $N_2$  bzw.  $H_2$  auf die Potentiale der beiden Eichpuffer keinen Einfluß ausübten.

**Tabelle 8:** Kalibrierung der Meßkette

Eichpuffer bei 2 bar  $N_2$  bzw.  $H_2$  bei 20°C und 65°C

---

Puffer	pH, 20°C	EMK, 20°C [mV]	pH, 65°C	EMK, 65°C [mV]
Acetat	4.66	+150	4.79	+154
Phosphat	6.88	- 12	6.97	- 8

---

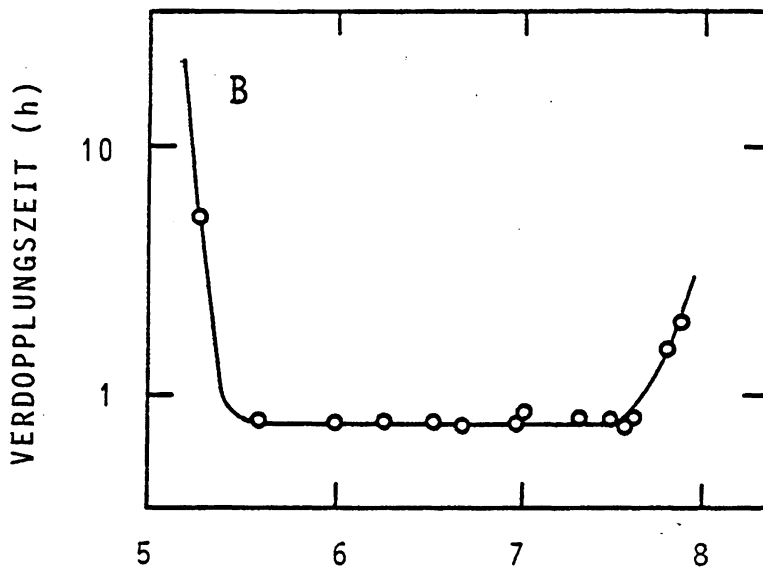
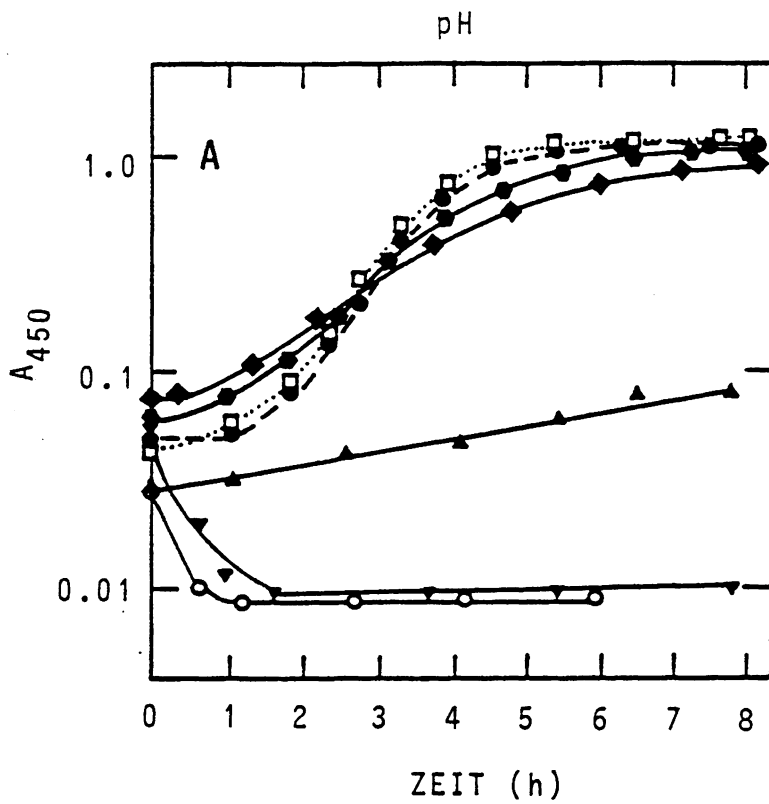
Da alle Medien  $Na_2S$  enthalten, bildet sich im Verlauf der Messungen nach ca. 3 bis 6 h ein schwarzer Niederschlag an den Ableit-Elektroden; die Meßergebnisse werden bis zu 6 h dadurch jedoch minimal verfälscht. Diesen Befund bestätigt die erneute Vermessung der Eichpuffer bei 65°C und 2 bar  $N_2$  bzw.  $H_2$  am Schluß einer Versuchsserie.

Acetat: pH = 4.73; Phosphat: pH = 6.86.

Die Ableitelektroden konnten mit 1 N HCl wieder regeneriert werden.

#### 7.4.3 pH-Abhängigkeit des Wachstums

Ausgehend von  $\text{MG}^-$ -H (pH auf 6.9 vor dem Begasen und Autoklavieren bei Raumtemperatur eingestellt) wurden jeweils 40 ml Medium in einer Serumflasche mit  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20), 2 bar mit 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bzw. halbkonzentrierter NaOH auf verschiedene pH-Werte titriert. Es wurde konzentrierte Säure bzw. Base verwendet um Effekte auf die Osmolarität so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurden die Medien auf zwei Serumflaschen aufgeteilt. Eine Hälfte jeder Probe wurde beimpft und bei  $65^\circ\text{C}$  im Schüttler inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben gezogen und bei 450 nm vermessen. Die restlichen 20 ml  $\text{MG}^-$ -H wurden anaerob in die Meßanordnung überführt, mit 2 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  beschickt und bei  $65^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Potentiale wurden ca. 20 min über das Erreichen der Plateaus hinaus registriert (stabile Endwerte). Das vor dem Begasen und Autoklavieren auf pH 6.9 eingestellte  $\text{MG}^-$ -H ergab bei  $65^\circ\text{C}$  und 2 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  die Werte 6.60, 6.63, 6.62, 6.64, mit einem Mittelwert von 6.62 (in Lüttich 6.52 in mit  $\text{CO}_2$ -gesättigtem Zustand).



**Abb. 18:** Abhängigkeit des Wachstums vom pH-Wert. 20 ml MG<sup>-</sup>H (2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) wurden in Schüttelkultur bei 65°C inkubiert.

A : Wachstumskurven bei verschiedenen pH-Werten; zu verschiedenen Zeiten wurden Proben gezogen und bei 450 nm vermessen.  
 B : Auftragung der Verdopplungszeiten gegen den pH-Wert.

#### 7.4.4 Bestimmung von Ni und Cu im Medium unter hydrothermalen Bedingungen

Es ist hinreichend bekannt, daß höhere Konzentrationen von Schwermetallen, wie z. B. Kupfer, auf Microorganismen hemmend wirken. Nickel ist als Bestandteil des Faktors F<sub>430</sub> (Whitman & Wolfe, 1980; Diekert et al., 1980), einem Chromophor im Methylreduktase-System (Ellefson et al., 1982; Moura et al., 1983) für Methanogene essentiell.

Um ausschließen zu können, daß für die Wachstumshemmung von *Mc. thermolithotrophicus* in MGG und MG bei 65°C unter moderaten Drücken hemmende Nickel- und Kupferkonzentrationen verantwortlich sind, wurde in MM 8 nach 5 h 30 min Inkubation unter hydrothermalen Bedingungen mittels Atomabsorptions-Spektrometrie Ni und Cu bestimmt.

**Table** :Ni und Cu-Bestimmung in MM 8 nach 5 h 30 min Inkubation in Nickeltuben bei 250°C und 260 bar bzw. in unbehandelten Kontrollen

Schwermetall	250°C, 260 bar	Kontrolle
Cu	0.088 µg/ml	0.017 µg/ml
Ni	7.80 µg/ml	0.23 µg/ml

Die Werte zeigen, daß selbst unter hydrothermalen Bedingungen lediglich Konzentrationen erreicht werden, die um Größenordnungen unter der Hemmkonzentration liegen. Somit kann bei 65°C und 50 bar eine Wachstumshemmung durch Ni<sup>2+</sup> bzw. Cu<sup>+</sup> und Cu<sup>2+</sup> ausgeschlossen werden.

7.4.5 Einfluß von CO<sub>2</sub> auf das Wachstum unter Druck

Die Verwendung von Bicarbonat und gasförmigem CO<sub>2</sub> als einziger C-Quelle legt die Vermutung nahe, daß beim Eindrücken von CO<sub>2</sub> in das Medium -je nach dessen Puffer-Kapazität- pH Verschiebungen provoziert werden.

7.4.5.1 Löslichkeit von CO<sub>2</sub>

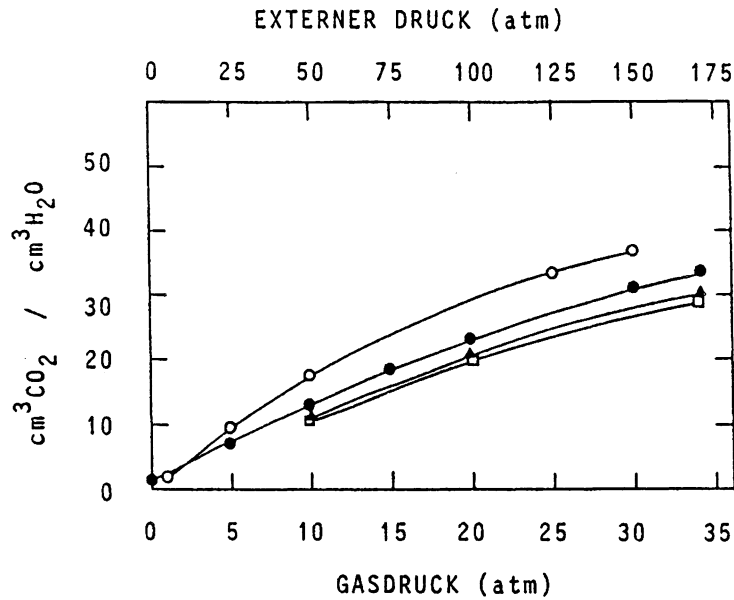
Bei den Hochdruckversuchen stehen maximal 1.87 cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> pro ml Medium zur Verfügung. Das Henry'sche Gesetz gilt für CO<sub>2</sub> bis zu Drücken ≤ 5 bar. Das Gasgemisch aus 80% H<sub>2</sub> und 20% CO<sub>2</sub> verhält sich bei 20°C bzw. 30°C bis zu 30 bar nahezu ideal (Landoldt & Börnstein,1962; Kritschewski 1935, 1936). Die Druckabhängigkeit des Lösungsverhaltens von CO<sub>2</sub> in reinem Wasser ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Die erste Spalte repräsentiert die externen Drücke, bei denen die in der zweiten Spalte aufgelisteten CO<sub>2</sub> Partialdrücke unter den Versuchsbedingungen (80% H<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>, 4 bar) erreicht werden.

**Tabelle 10** : Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in reinem Wasser bei 60°C

Externer Druck	P (CO <sub>2</sub> )	L* (CO <sub>2</sub> )
1	0.8	0.268
10	2.0	0.672
20	4.0	1.340
25	5.0	1.680

$$* L (CO_2) = \frac{N \text{ cm}^3 (CO_2)}{\text{cm}^3 (H_2O)}$$

Die Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  wird bei  $65^\circ\text{C}$  in den verwendeten Medien, die alle beträchtliche Mengen Salz enthalten ( $\text{MG}^-$ -H ca. 60 g/L) wegen der erniedrigten Wasseraktivität zusätzlich, wie aus Abbildung 19 hervorgeht erheblich herabgesetzt.



**Abb. 19:** Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  bei  $0^\circ\text{C}$ . Auf der oberen Abszisse ist derjenige Druck angegeben, der benötigt wird um unter den üblichen Versuchsbedingungen (2bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ ) den jeweiligen Partialdruck auf der unteren Abszisse zu erreichen. ( o ) :  $\text{H}_2\text{O}$ ; ( ● ) : Synthetisches Meerwasser; ( ▲ ) : Meerwasserkonzentrat (103,26 g Salz/kg) ( ■ ) :  $\text{H}_2\text{O}$  + 172,1 g Salz/kg

#### 7.4.5.2 pH Messungen unter Hochdruck bei 65°C

Hochdruck verengt den Bereich der pH-Toleranz (Heefner, 1982; Campbell et al., 1985) von Mikroorganismen signifikant. Durch Druck wird die Dissoziation schwacher Säuren in  $H_2O$  begünstigt, in dem die freie Energie der Solvation herabgesetzt wird; dies hat Verschiebungen des pH Wertes zur Folge. Die bisher vorliegenden Daten beziehen sich entweder auf Modellsysteme oder auf Meerwasser bei relativ niedrigen Temperaturen (Distèche & Distèche, 1967; Whitfield, 1972).

Die pH Messungen in den komplex zusammengesetzten Medien sind nur zustande gekommen, weil Professor Dr. A. Distèche seine Einrichtungen am Institut für Ozeanologie an der Universität Lüttich freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

##### 7.4.5.2.1 Typ und Charakteristik der verwendeten elektrochemischen Kette

Verwendet wurde die von Distèche entwickelte elektrochemische Zelle, die besonders zu pH-Messungen unter hohen Drücken geeignet ist (Distèche, 1959, 1962, 1964, 1974). Die Konzeption der Elektrode mit zu vernachlässigender Diffusions-Spannung, gestattet die Bestimmung von pH-Werten auf  $\pm 0.001$  pH genau. Die Verwendung der elektrochemischen Kette des Typs  $Ag/AgCl/HCl (m_1)/Glas/Lösung/NaCl (m_2)/AgCl/Ag$  mit  $Ag/AgCl$ -Elektroden auf beiden Seiten der Zelle -sowohl als Meßelektrode, als auch als Vergleichselektrode- hat den großen Vorteil, daß sich ihre Standardpotentiale aufheben (Harned & Owen, 1958). Berücksichtigt werden müssen nur die Assymmetriepotentiale der verwendeten Elektroden. Wie Abbildung 20 (Einschub) zeigt, sind die Assymmetriepotentiale sehr klein und als druckunabhängig zu betrachten. Da der  $NaCl$ -Gehalt der Medien 0.41 N beträgt, wurden in der Glaselektrode und in der Referenzelektrode die Chlorid-Konzentrationen korrigiert. Glaselektrode: 0.01 N  $HCl$  mit 0.41 N Gesamt-Konzentration  $[Cl^-]$ ; Referenzelektrode: 0.41 N  $NaCl$ . Die Kalibrierung der Elektrode beruht auf  $Na_3PO_4$ , das bei der Ionenstärke von Meerwasser mit 0.1 N  $HCl$  titriert wird (Frankignoulle et al., 1985).

Die verwendete elektrochemische Kette kann wie eine Konzentrationskette behandelt werden, deren EMK lautet

$$E = \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{a_1}{a_2} \quad (11)$$

R = allgemeine Gaskonstante ( $8.3143 \text{ J} \cdot \text{Grad}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

F = Faradaykonstante ( $96\,4887 \text{ C}$ )

T = Temperatur [ $^{\circ}\text{K}$ ]

$a_1, a_2$  = Konzentration der Komponenten  $a_1, a_2$ .

Im Allgemeinen wird angenommen, daß die sog. Elektrodensteilheit (S) unabhängig vom Druck ist (Distèche, 1959; Culberson & Pytkovitz, 1967; Whitfield, 1969).

Der pH errechnet sich nach

$$\text{pH} = - \frac{\text{EMK}_c}{S} + 2 \quad (12)$$

S = Elektrodensteilheit (mV/pH)

EMK<sub>c</sub> = korrigierte elektromotorische Kraft (EMK<sub>gemessen</sub> - Asymmetriepotential)

Bei der verwendeten Elektrode betrug S bei  $298.15^{\circ}\text{K}$ :

$S_1 = 57.93 \text{ mV/pH}$ , im pH-Bereich von 2.0 - 7.2

$S_2 = 57.25 \text{ mV/pH}$ , im pH-Bereich von 7.2 - 8.5

$S_1/^{\circ}\text{K} = 0.1942982$ ,  $S_2/^{\circ}\text{K} = 0.1920174$ .

Die Temperaturmessung erfolgte mit einem "Two-terminal IC temperature transducer AD 590" (Analog Devices).



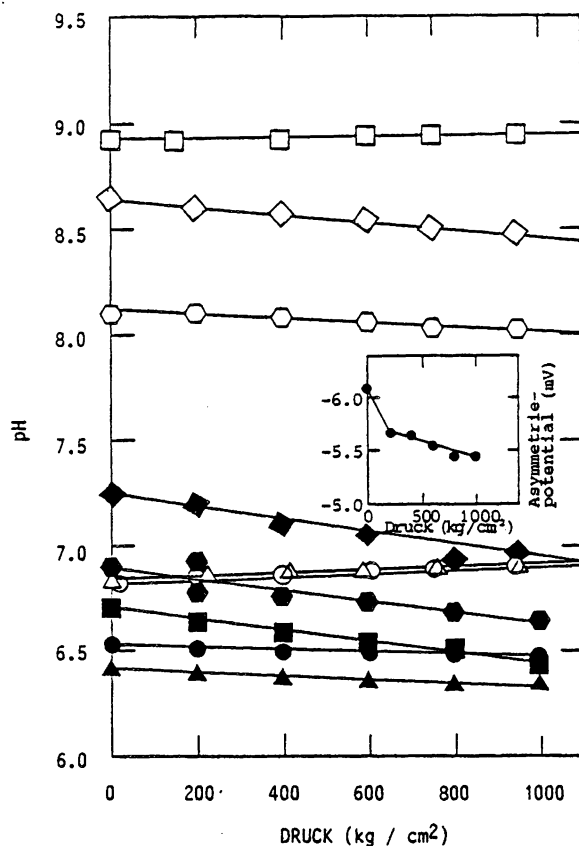
#### 7.4.5.2.2 Druckabhängigkeit der pH-Werte in verschiedenen Medien in Gegenwart und in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> bei 65°C

Die mit CO<sub>2</sub> gesättigten Medien wurden bei Raumtemperatur entnommen und sofort in die elektrochemische Zelle überführt; die Elektrode wurde in den auf 65°C vortemperierten Autoklaven eingesetzt. Um ein Entweichen von CO<sub>2</sub> zu verhindern, wurde nach dem Verschrauben des Autoklaven sofort ein Druck von 5 - 10 bar angelegt. Die Konzentration an gelöstem CO<sub>2</sub> betrug maximal 14.7 µM/ml Lösung.

Durch 15 min Kochen wurde das CO<sub>2</sub> ausgetrieben und die heißen Lösungen anschließend ca. 15 min im Exsikator entgast, anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren. In Abb. 22 ist die Druckabhängigkeit des pH-Wertes von mit CO<sub>2</sub>-gesättigten Medien (ausgefüllte Symbole) und den CO<sub>2</sub>-freien Medien dargestellt (offene Symbole). Der Einschub zeigt die äußerst geringe Änderung des Asymmetriepotentials (gemessen gegen 0.01 N HCl mit 0.41 N Gesamt [Cl<sup>-</sup>]) mit dem Druck; dennoch wurden die gemessenen Werte mit dem Asymmetriepotential beim jeweiligen Druck korrigiert.

**Tabelle 11** : Änderung des pH Wertes bei Entfernen des gelösten CO<sub>2</sub> bei 65°C

Medium	pH		ΔpH
	CO <sub>2</sub> (gesättigt)	entgast	
MGG	7.25	8.65	1.40
MG <sup>-</sup>	6.70	8.80	2.10
MG	6.87	8.12	1.25
MG <sup>-</sup> H	6.41	6.82	0.41
MG <sup>-</sup> P	6.52	6.84	0.32



**Abb. 20:** Druckabhängigkeit des pH-Wertes der Kulturmedien vom Druck bei 65°C mit (ausgefüllte Symbole) und ohne (offene Symbole) CO<sub>2</sub>. Die Medien enthielten maximal 14,3 μM gelöstes CO<sub>2</sub>; die NaHCO<sub>3</sub>-Einwaage betrug 60 μM. (◇) : MGG; (○) : MG; (□) : MG; (Δ) : MG-P; (●) : MG-H. Der Einschub zeigt die Druckabhängigkeit des Asymmetriepotentials der verwendeten Elektrode.

Tabelle 12 : Druckabhängigkeit des pH Wertes pro 1000 bar im  
CO<sub>2</sub>-gesättigten oder CO<sub>2</sub>-freien Zustand, bei 65°C

Medium	$\Delta\text{pH}/1000 \text{ bar}$	
	+CO <sub>2</sub>	-CO <sub>2</sub>
MGG	- 0.31	- 0.13
MG <sup>-</sup>	- 0.26	+ 0.04
MG	- 0.23	- 0.09
MG <sup>-</sup> H	- 0.07	+ 0.06
MG <sup>-</sup> P	- 0.07	+ 0.05

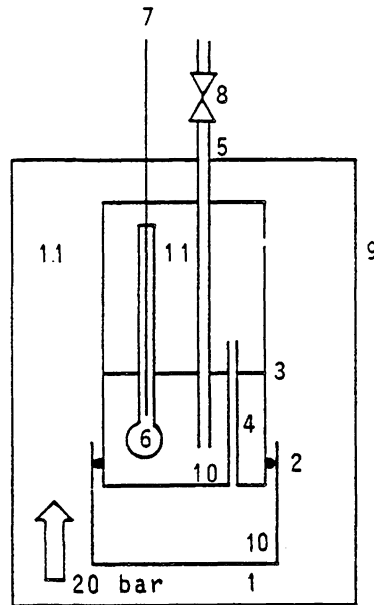
Die CO<sub>2</sub> Konzentration in den Medien betrug maximal 14.3  $\mu\text{M}/\text{ml}$ . In den Ni-Tuben stehen maximal 81.7  $\mu\text{M}$  CO<sub>2</sub> zur Verfügung. Wenn berücksichtigt wird, daß bei den Wachstumsversuchen je nach dem angelegten Druck, 81.7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Medium in Lösung gehen, so ist die in Abb. 14 und 23 dargestellte, abrupte Wachstumshemmung in den Medien mit minimaler Pufferkapazität, aller Wahrscheinlichkeit nach kein Druck, sondern ein pH-Effekt.

Bei Drücken um 50 bar geht das gesamte CO<sub>2</sub> in Lösung und verschiebt den pH Wert der Medien MG und MGG ins Saure unter die Toleranzgrenze von pH 5.5; dies hat die spontane Lyse von *Mc. thermolithotrophicus* zur Folge.

#### 7.4.5.3 Einfluß hoher CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf den pH Wert von MG<sup>-</sup>H bei 65°C unter erhöhtem Druck

Um die Pufferkapazität und die Druckabhängigkeit des Mediums MG<sup>-</sup>H beim Einleiten von gasförmigem CO<sub>2</sub> in hohen Konzentra-

tionen bei 65<sup>o</sup>, bestimmen zu können, wurde die verwendete Zelle modifiziert.

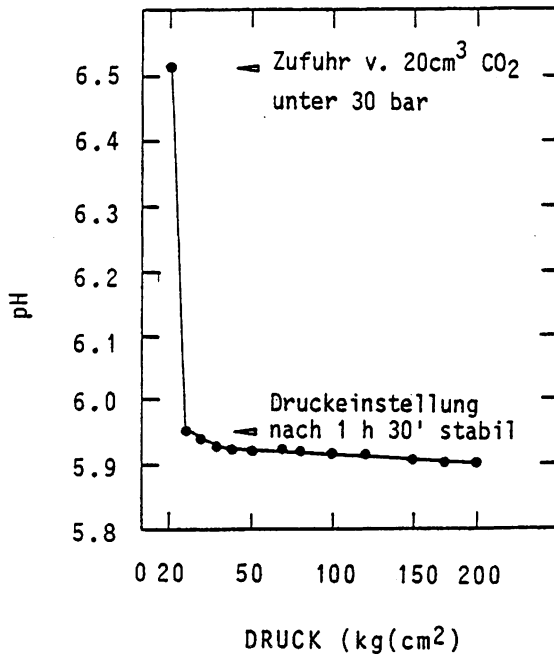


**Abb. 21:** Elektrode zur pH-Meßung unter Hochdruck in Gegenwart von Gasen.

1: Kunststoffbecher; 2: Gummi-O-Ring; 3: Meßzelle; 4: Verbindungsrohr; 5: Gaszuführung; 6: Elektrode; 7: Elektrische Durchföhrung; 8: Ventil; 9: Autoklav; 10: Probe; 11: Silikonöl.

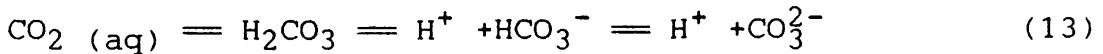
Der Meßzelle wurde unten ein Kunststoffbecher beweglich aufgesetzt, die Zelle mit einer Gaszuföhrung ausgestattet und zwischen Meßkompartiment und Kunststoffbecher wurde durch zwei Eisenröhrchen eine Verbindung geschaffen. Der Kunststoffbecher und das Meßkompartiment wurden mit je 20 ml  $Mg^+H$  gefüllt, nachdem die Zelle zuvor mit  $CO_2$  gespölt worden war. Die Elektrode wurde in den vortemperierten Autoklaven eingesetzt; durch Anlegen eines Druckes von 20 bar wurde die Lösung aus dem Kunststoffbecher in die Meßzelle gepreßt. Nach Erreichen einer stabilen EMK wurde unter einem Druck von 30 bar  $CO_2$  in die Meßzelle eingeleitet. Die Elektrode wurde durch Schließen eines Ventils von der  $CO_2$ -Bombe getrennt. Nach ca. 80 min stellte sich bei einem Druck von 10 bar ein stabiler pH Wert von 5.95 ein. Die Erhöhung des hydrostatischen Druckes auf 25 bar föhrte zu einer weiteren pH-Ernied-

rigung, wie die Abbildung 22 zeigt. Eine Erhöhung des Druckes, nachdem die gesamte Gasmenge gelöst war, bewirkte bis 200 bar keine pH Änderung.



**Abb. 22:** Druckabhängigkeit des pH-Wertes von  $\text{MG}^-\text{H}$  bei  $65^\circ\text{C}$  nach Einleiten von  $\text{CO}_2$ . 40 ml Medium wurden unter 20 bar Vordruck bei  $65^\circ\text{C}$  inkubiert; nach Erreichen einer stabilen EMK wurden ca.  $20 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2$  unter einem Druck von 30 bar eingeleitet.

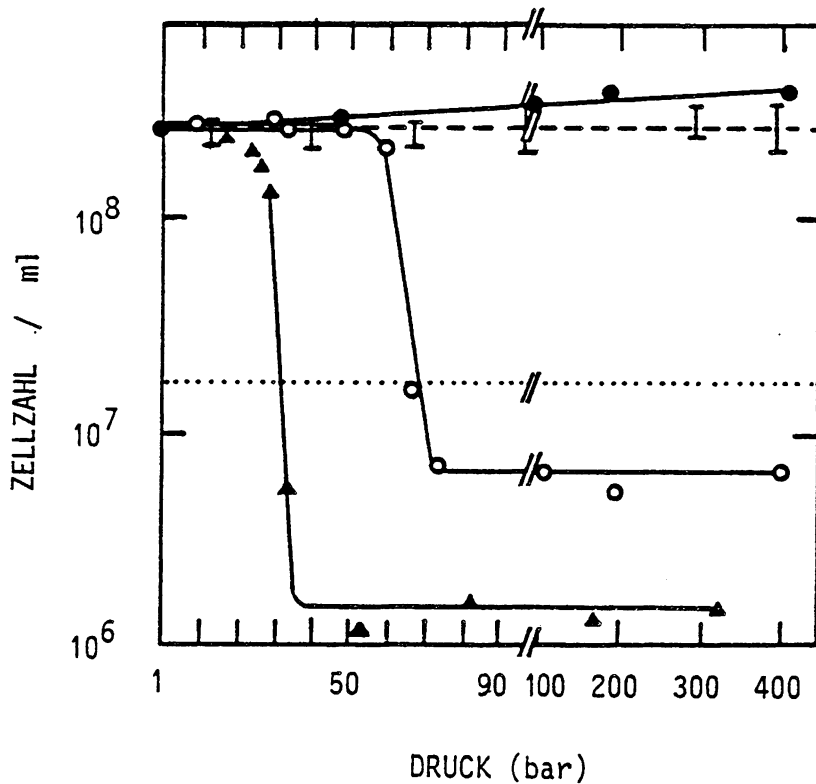
Vom gelösten  $\text{CO}_2$  liegen etwa 0.1% als  $\text{H}_2\text{CO}_3$  vor.



Die Lösungsgeschwindigkeit von  $\text{CO}_2$  in basischen Waschflüssigkeiten ist vorwiegend durch Diffusion bestimmt (Roughton, 1941; Edsall & Wyman, 1958); die Nachlieferung von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  aus dem gelösten  $\text{CO}_2$  verläuft schnell. Der pH von wässrigen  $\text{CO}_2$ -Lösungen bei einem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck von 1 bar beträgt 3.7, bei  $25^\circ\text{C}$ ; eine Druckerhöhung auf 5.6 bar P ( $\text{CO}_2$ ) führt zu einer pH-Erniedrigung auf 3.3; weiteres Einleiten von  $\text{CO}_2$  hat keine pH Änderung mehr zur Folge. Im obigen Experiment wurden mindestens  $15 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2/\text{ml} \text{ MG}^-\text{H}$  gelöst, wohingegen die maximal

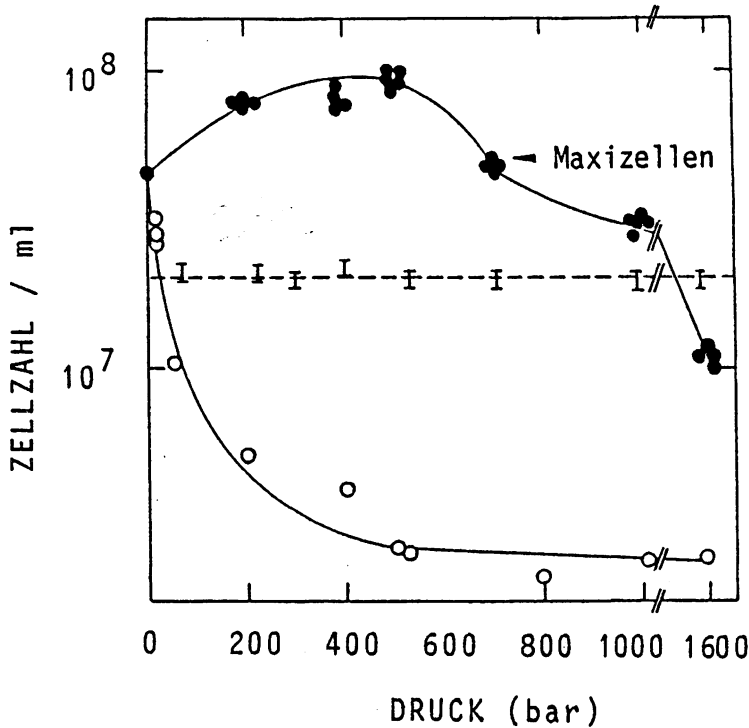
zur Verfügung stehende  $\text{CO}_2$ -Menge in den Nickeltuben  $1.87 \text{ cm}^3/\text{Medium}$  beträgt. Bei 25.8 bar lösen sich bei  $50^\circ\text{C}$   $9.67 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2/\text{g H}_2\text{O}$ ; bei  $75^\circ\text{C}$   $6.91 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2/\text{g H}_2\text{O}$  (Landoldt, Börnstein). In anderen Worten:  $\text{MG}^- \text{H}$  besitzt eine ausreichende Pufferkapazität bei  $65^\circ\text{C}$ , so daß der das Wachstum von *Mc. thermolithothrophicus* limitierende pH Wert von 5.50 bei keiner  $\text{CO}_2$ -Konzentration erreicht wird. Aus diesem Grunde wurde ab diesem Zeitpunkt ausschließlich  $\text{MG}^- \text{H}$ -Medium verwendet.

#### 7.4.5.4 Druckabhängigkeit der Zellausbeute in Gegenwart und in Abwesenheit der Puffersubstanzen HEPES und PIPES.



**Abb. 23:** Druckabhängigkeit der Zellausbeute in Gegenwart und in Abwesenheit der Puffersubstanzen PIPES und HEPES. Die Bedingungen sind identisch mit Abb. 14. (▲):  $\text{MG}^-$ ; (○):  $\text{MG}^- \text{P} = \text{MG}^- + 54 \text{ mM PIPES}$ ; (●):  $\text{MG}^- \text{H} = \text{MG}^- + 120 \text{ mM HEPES}$ ; (□): Kontrollen ohne externen Druck.

Die Abb. 23 zeigt eine Zunahme der Drucktoleranz mit steigender Pufferkapazität des Mediums. Bei Verwendung von 120 mM HEPES deutet sich eine lineare Steigerung der Zellausbeute bis zu Drücken von 400 bar an. Die Werte für Animpfdichte und für die unbedrückten Kontrollen sind der Abb.14 zu entnehmen.



**Abb. 24:** Druckabhängigkeit der Zellausbeute in gepuffertem und ungepuffertem Medium (3 ml beimpftes Medium, 4 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 65°C, 5 h); (o): MG<sup>-</sup>; (●): MG<sup>-</sup>H; (---): Animpfdichte.

In Gegenwart von 120 mM HEPES im Medium nimmt die Zellausbeute mit steigendem Druck bei 600 bar gegenüber den unbedrückten Proben zu. Bei weiterer Druckerhöhung treten bei Drücken  $\geq$  700 bar Zelldeformationen (s. Abb.31) auf, die mit einer Abnahme der Zelldichte bis  $\approx$  1 kbar parallel verlaufen; bei Drücken von 1.6 kbar tritt Lyse in den Vordergrund. Im Gegensatz hierzu lysieren die Zellen in Abwesenheit von HEPES in MG<sup>-</sup>-Medium wegen der beschränkten Pufferkapazität bereits im Druckbereich um 100 bar.

## 8. Hochtemperatur- Hochdruck- Apparatur zur Aufnahme von Wachstumskurven

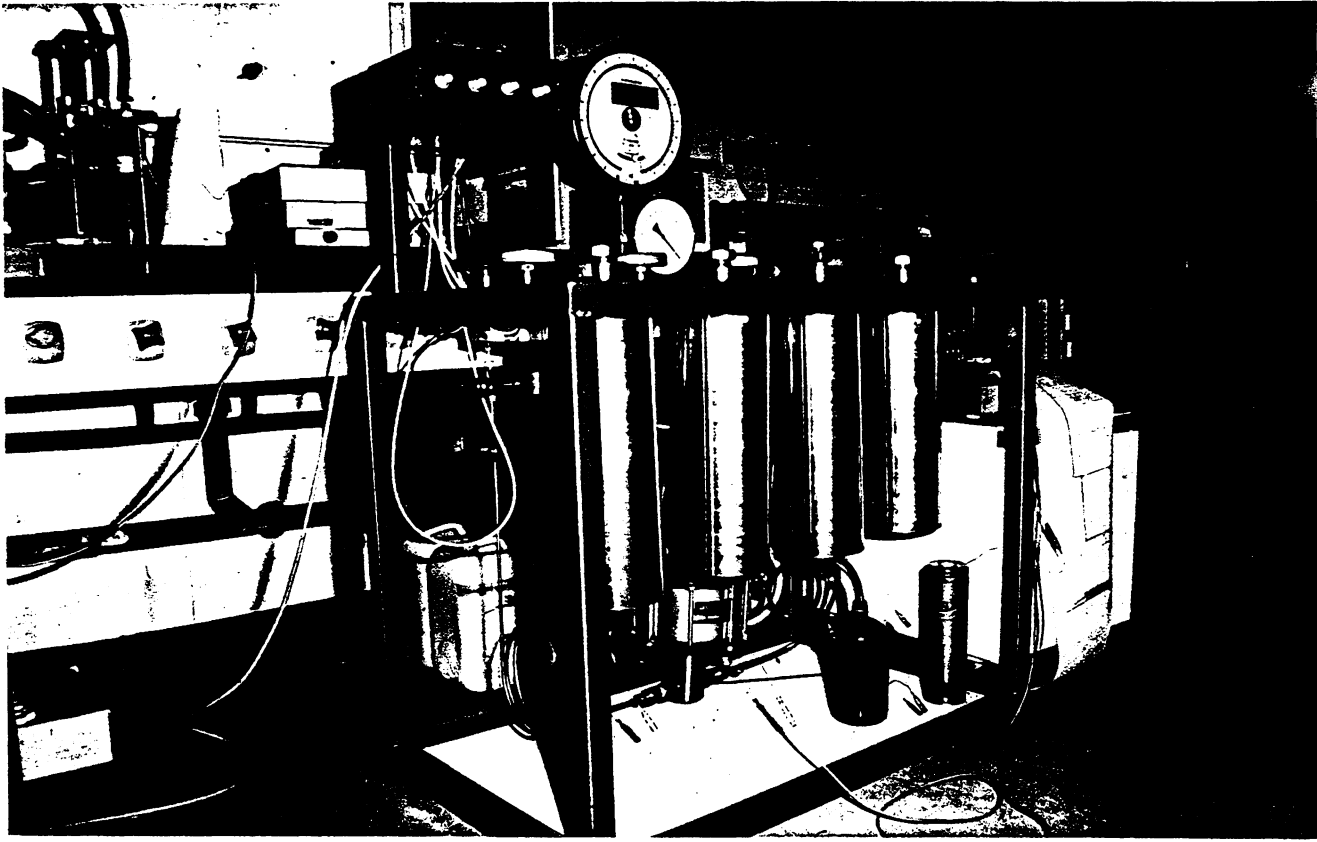


Abb. 25: Hochdruckapparatur.

In den zwei vorhandenen Autoklaven konnten nur punktuelle Messungen (d.h. insgesamt nur zwei Ni-Tuben) durchgeführt werden; Deshalb war es notwendig, eine Apparatur zu bauen (Abb. 25), die eine Aufnahme Wachstumskurven unter konstanten, streng definierten Bedingungen gestattete.

Zu diesem Zwecke wurden 4 Hochdruckautoklaven (Abb. 26) in Serie geschaltet. Wegen der großen Volumina wurde das Drucküberträgermedium (Dialla/Petrolether, 1:1) mittels einer Druckluftpumpe bewegt. Jeder Autoklav (Fassungsvermögen zwei Ni-Tuben) wurde über zwei Mantelheizelemente temperiert; die 220 V/ 400 W-Heizungen waren so angebracht, daß in den Autoklaven kein Temperaturgradient aufgebaut wurde. Die Temperaturregelung erfolgte über die in der Abb. 27 dargestellten Elektronik auf  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  genau.





[illegible]

88

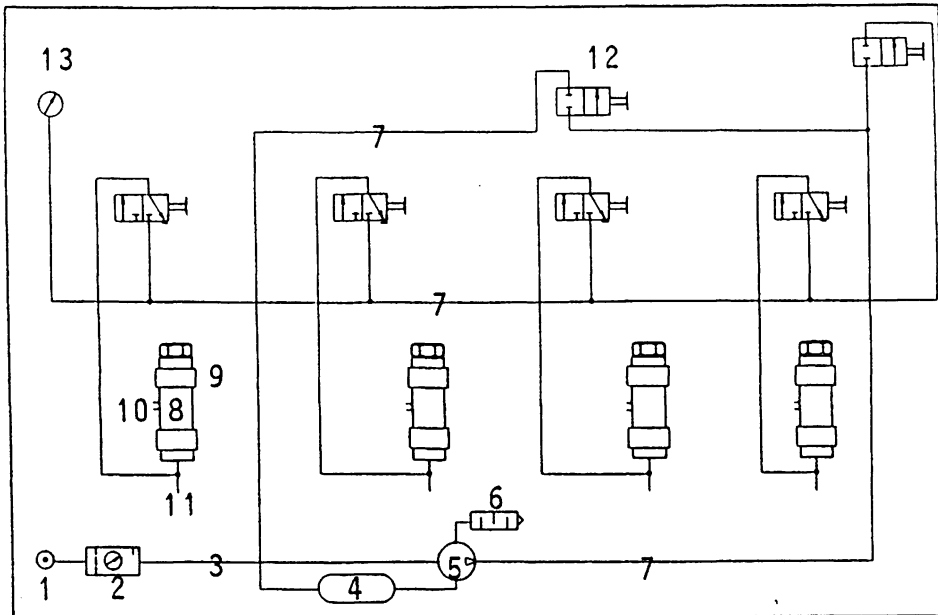


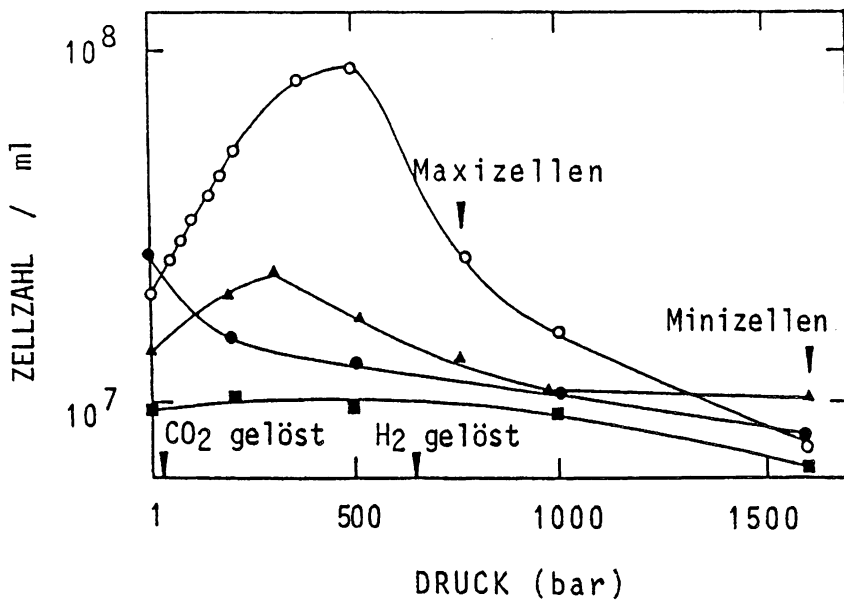
Abb. 28: Prinzipskizze der Hochdruck-Hochtemperaturapparatur.

1: Druckluftanschluß mit Einlaßventil; 2: Wartungseinheit, Typ FRC-1/2-S-B (Festo); 3: Druckluftzuführung; 4: Reservoir für Drucküberträger - Medium; 5: Druckluftpumpe, Typ 66 D-40 (Dunze); 6: Schalldämpfer; 7: Hochdruckleitung (Dunze); 8: Autoklav; 9: Mantelheizelement, 400 W/220 V (Eichen); 10: Thermistor für Temperaturregelung; 11: Thermoelement zur Temperaturmessung im Inneren des Autoklaven; 12: Hochdruckventil (Dunze); 13: Manometer mit Maximalausschlag 4000 bar, Kl. 0,1 (Wika).

Die Autoklaven wurden bei jedem Experiment auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt.

#### 9. Druckeinflüsse auf das Temperaturoptimum von *Mc. thermolithotrophicus*

Mit der Fertigstellung der beschriebenen Apparatur waren alle Voraussetzungen geschaffen, die Hypothese zu überprüfen, ob Hochdruck in der Lage ist, den Temperaturbereich in dem ein Organismus überlebt, zu verbreitern, bzw. das Temperaturoptimum in Richtung auf höhere Werte hin zu verschieben.



**Abb. 29:** Einfluß von Druck und Temperatur auf die Zellausbeute nach 5 h 12 min. (3 ml  $\text{MG}^{-}\text{H} + 7 \text{ ml } \text{H}_2/\text{CO}_2$ , 4 bar). (●): 56°C; (○): 65°C; (▲): 70°C; (■): 75°C.

Bei 65°C und 70°C durchlaufen die Kurven ein Optimum bei 500 bzw. 380 bar. Bei diesen Temperaturen übertrifft die Zellzahl nach 5.2 h unter Hochdruck die Zellausbeute bei Atmosphärendruck. Eine Erhöhung der Temperatur auf 75°C erlaubt keinerlei Wachstum mehr; mit einer Erhöhung des Druckes tritt Lyse ein. Bei 65°C nimmt bei Drucksteigerung die Zellausbeute gegenüber der Zellzahl bei Atmosphärendruck kontinuierlich ab. Bei 65°C folgt nach Durchlaufen eines Optimums bei 500 bar eine kontinuierliche Abnahme der Zelldichte; bei 1400 bar sinkt die Zellzahl unter die Animpfdichte. Die Interpretation dieser Befunde wird dadurch erschwert, daß die Messungen punktuell durchgeführt wurden, und somit jeder Meßpunkt einer gesonderten Vorkultur entstammt. Dadurch könnte möglicherweise eine Genauigkeit vorgetäuscht werden, wie sie der Realität nicht entspricht.

Der Steigerung der Zellausbeute auf das  $\approx$  achtfache bei 65°C und 500 bar liegt möglicherweise eine bessere Versorgung mit Substrat zugrunde. Hinsichtlich der  $\text{CO}_2$ -Löslichkeiten stimmen die Angaben in der Literatur überein, wohingegen die Werte für die Löslichkeiten von  $\text{H}_2$  widersprüchlich sind (Ullmann, Kritschewski, 1936). Im Folgenden wird auf  $\text{CO}_2$ -Löslichkeitsdaten aus renommierten Tabellenwerken, wie Landoldt-Börnstein 4. Aufl. und Stephen & Stephen, 1963, Bezug genommen.

Unter Berücksichtigung des  $H_2$ -Partialdrucks stehen in den Experimenten  $7.47 \text{ cm}^3 H_2/\text{ml MG}^-H$  zur Verfügung. In reinem Wasser lösen sich bei  $50^\circ\text{C}$   $7.61$ , bei  $60^\circ\text{C}$   $7.62$  und bei  $70^\circ\text{C}$   $7.71 \text{ cm}^3 H_2/\text{g } H_2O$ . Zwar könnte der Einwand erhoben werden, daß die zur Verfügung stehende  $H_2$ -Menge von  $7.47 \text{ cm}^3/\text{ml}$  Medium erst bei Drücken um  $500 \text{ bar}$  vollständig in Lösung geht; die  $H_2$ -Konzentration im Medium ist bei niedrigen Drücken weitaus höher als in natürlichen Biotopen ( $1 \mu\text{M}$ , Thauer et al., 1977). Die  $H_2$ -Konzentration bei  $70^\circ\text{C}$  und  $25 \text{ bar}$  unter den experimentellen Bedingungen beträgt  $17 \text{ mM}$  und liegt damit um mehr als vier Größenordnungen über dem von Thauer ermittelten Wert. Die Frage, ob Hochdruck auf die Zellausbeute aktivierend wirkt, kann also aus obigen Experimenten bejaht werden. Das Barotoleranz-Verhalten geht aus Abb. 29 klar hervor. Der *Mc. thermolitotrophicus* zeigt am Temperaturoptimum bei  $65^\circ\text{C}$  sowohl unter Atmosphärendruck, als auch unter Hochdruck optimales Wachstum; Variation der Temperatur vom Optimum weg, hat in beiden Richtungen eine Abnahme der Drucktoleranz zur Folge, mit anderen Worten: Sowohl unter Hochdruck, als auch bei Atmosphärendruck liegt das Temperaturoptimum bei  $65^\circ\text{C}$ . Starke Indizien für eine Hochdruckaktivierung sind von Loveley (1985) geliefert worden. Bestimmungen der minimalen Schwellkonzentrationen für  $H_2$  bei verschiedenen methanogenen Bakterien ergaben einen Wachstumsstillstand erst bei  $H_2$ -Partialdrücken von  $\leq 100 \mu\text{bar}$ , d.h. drei Zehnerpotenzen niedriger, als in den Hochdruckexperimenten.

## 10. Hochdruckeinflüsse auf die Zellmorphologie

Bezüglich der Zellgröße sind Archaeobakterien relativ variabel. Dennoch treten unter Hochdruck Veränderungen in der Zellgröße und insbesondere morphologische Deformationen auf, die eindeutig außerhalb der normalen Variationsbreite liegen. Abb. 30 zeigt die durchschnittliche Größe und Morphologie von *Mc. thermolitotrophicus*, wie sie für die Zellen, unter Standardbedingungen ( $3 \text{ mg MG}^-H$ ,  $7 \text{ ml } H_2/\text{Co}_2$ ,  $4 \text{ bar}$  und  $65^\circ\text{C}$ ) oder bei  $65^\circ\text{C}$  bis  $P \leq 700 \text{ bar}$ , typisch sind.

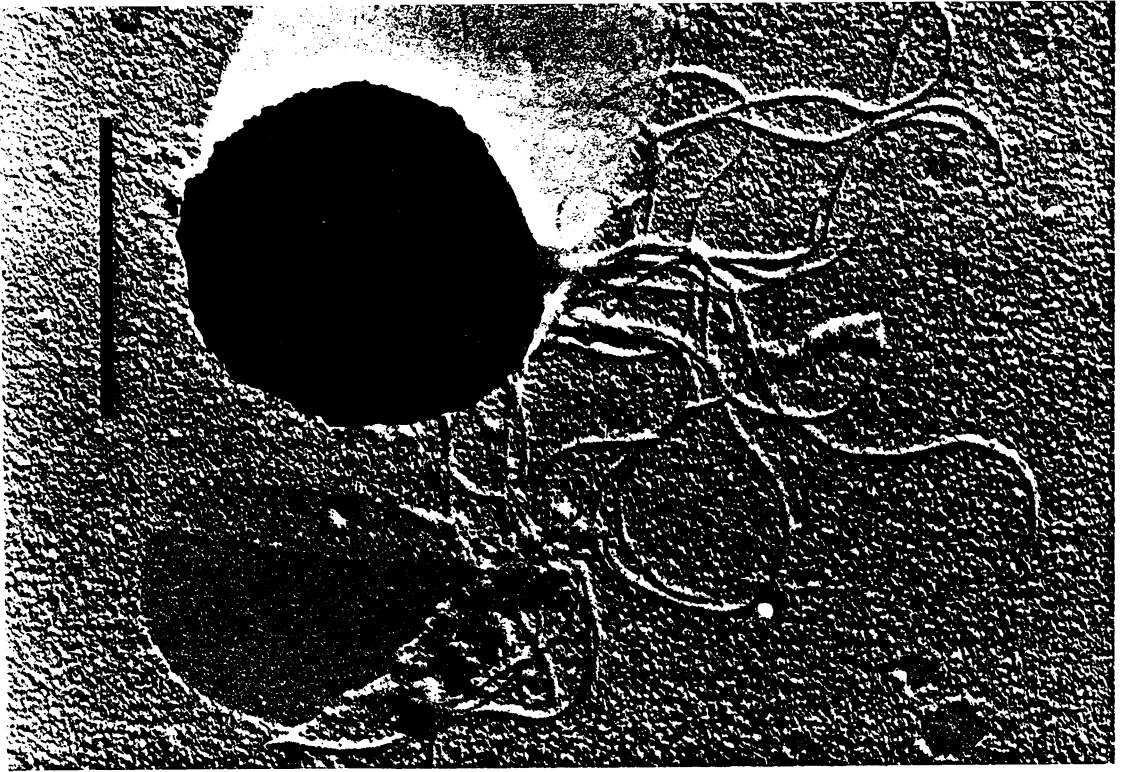


Abb. 30: Morphologie von *Mc. thermolithotrophicus* unter Standardbedingungen (Balken = 1  $\mu\text{m}$ ).

Bei 65°C und Drücken  $\geq 700$  bar findet man große, verlängerte Zellen, bei denen offensichtlich das Einziehen der Septen nach der Teilung durch Hochdruck behindert ist ("Maxizellen").

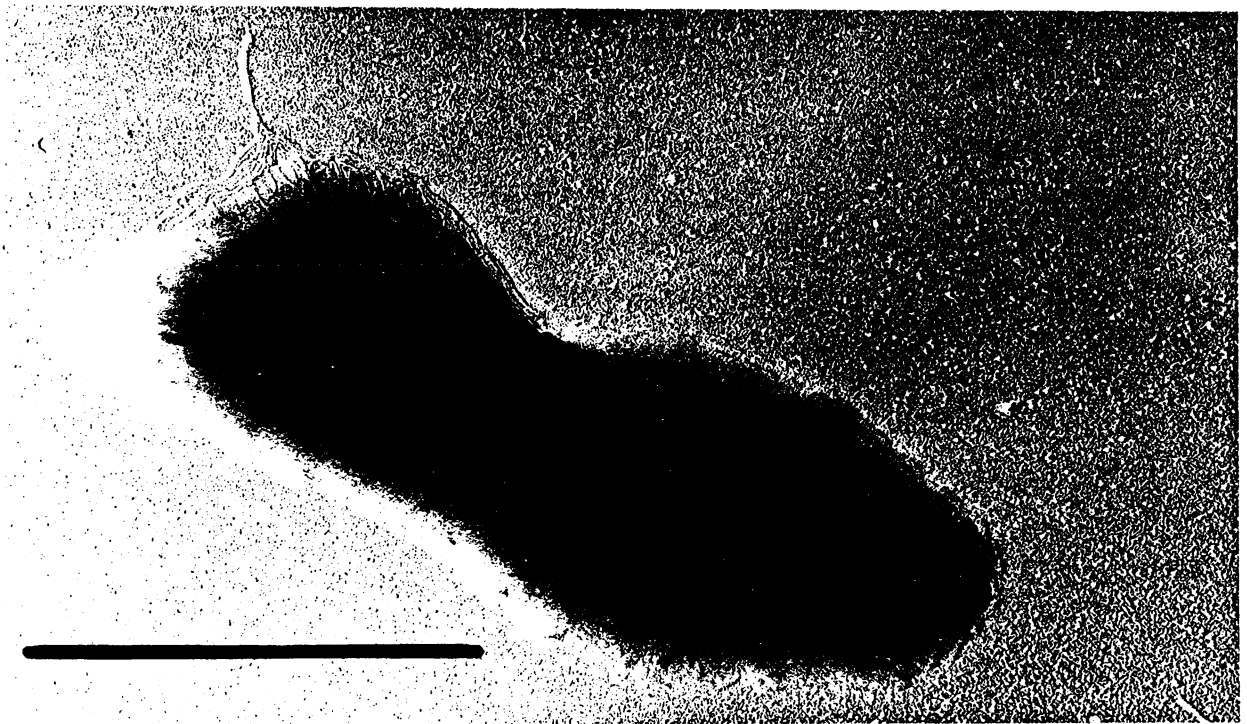


Abb. 31: "Maxizellen": *Mc. thermolithotrophicus* in MG-H bei 65°C und 1000 bar, 8 h.

Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von ZoBell und Cobet (1964) überein; *E. coli* bildet bei 450 bar -einem Druck der das Wachstum gerade noch gestattet- lange Filamente; in diese Fäden sind -falls überhaupt- Septen nur noch teilweise eingezogen. Bei 70°C und Drücken  $\geq 1400$  bar, sowie bei 56°C und 220 bar nach 6 h werden "Minizellen" beobachtet, die in ihrer Morphologie an Fragmentierungsprodukte erinnern. Ob es sich bei diesen Gebilden um echte Zellen (die Partikel fluoreszieren) oder um membranumschlossene Vesikel handelte, ließ sich nicht zweifelsfrei nachweisen.



Abb. 32: "Minizellen": *Mc. thermolithotrophicus* in MG<sup>-</sup>H bei 70°C und 1500 bar, 10 h.

#### 11. Druckabhängigkeit der Wachstumskurven bei verschiedenen Temperaturen

Um die Zeitabhängigkeit des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen und Drücken zu untersuchen, wurde folgendermaßen verfahren: 30 ml MG<sup>-</sup>H Medium wurden aus einer Stammkultur heraus 5%ig beimpft und zu je 3 ml auf Ni-Tuben aufgeteilt; die Gasphase bestand aus 7 ml H<sub>2</sub>/Co<sub>2</sub> unter einem Druck von 4 bar. Die Ni-Tuben wurden alle auf die vorgeheizten Autoklaven verteilt; der Druck wurde zum gleichen Zeitpunkt angelegt; danach wurden die Autoklaven durch Absperren voneinander getrennt. Nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils ein Autoklav druckentlastet und die Proben ausgezählt. Die restlichen Autoklaven verblieben weiterhin unter Druck.

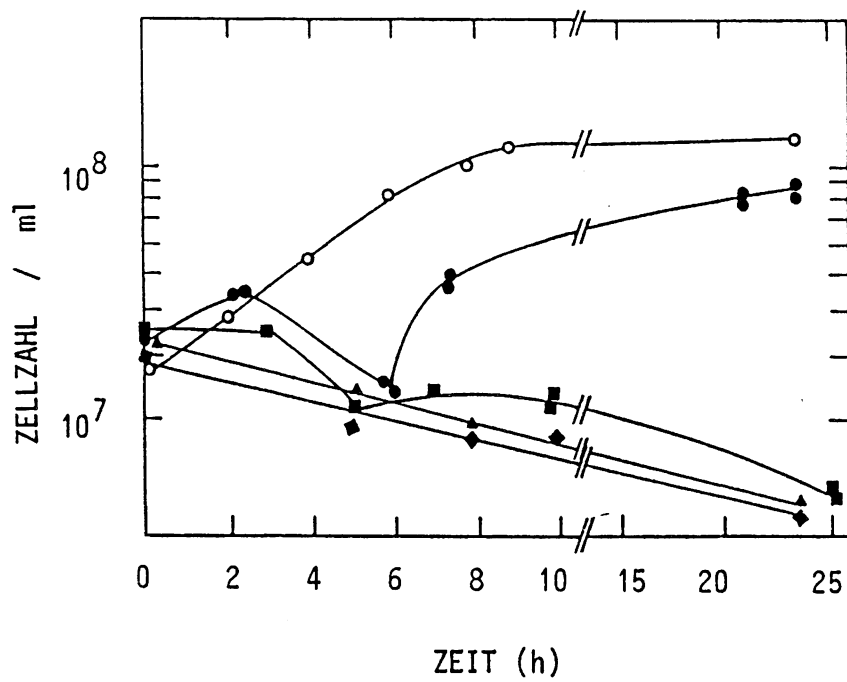


Abb. 33: Druckabhängigkeit des Wachstums bei 56°C. ( o ): 1 bar; ( ● ): 220 bar; ( ■ ): 500 bar; ( ▲ ): 750 bar; ( ◆ ): 1000 bar.

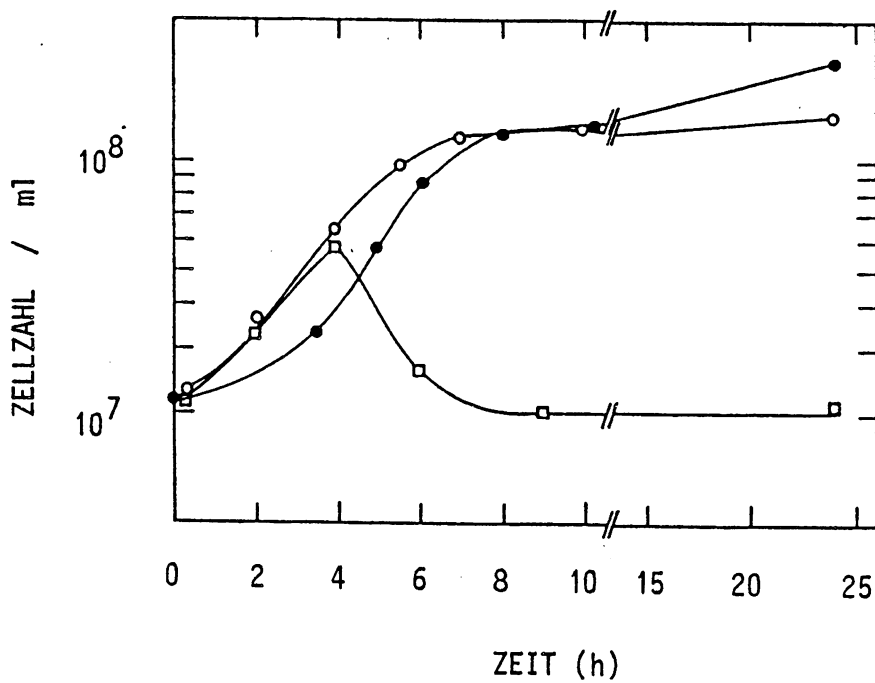


Abb. 34: Wachstumskurven bei 65°C in Abhängigkeit vom Druck. ( ● ): 1 bar; ( o ): 500 bar; ( □ ): 1000 bar.



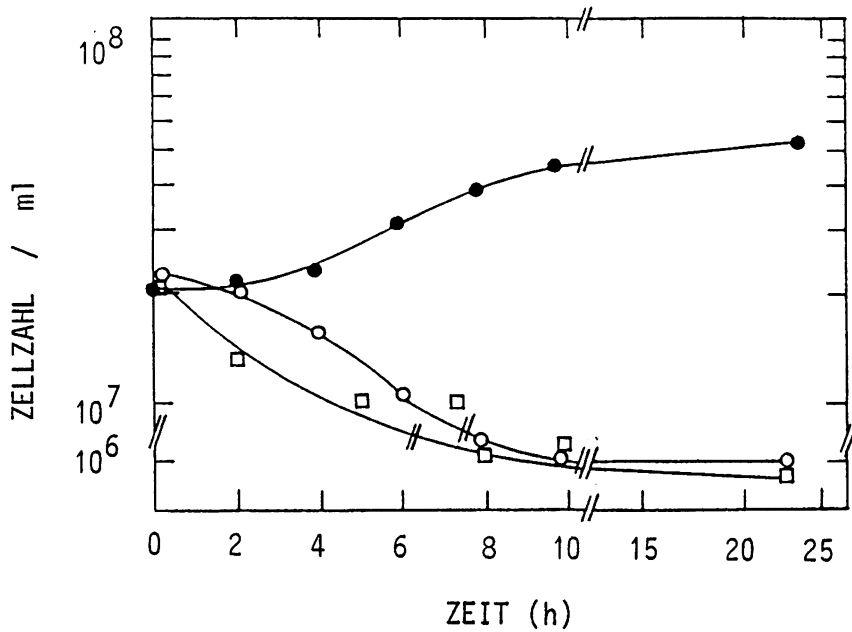


Abb. 35: Druck- und Temperaturabhängigkeit der Wachstumskurven. (●): 70 °C, 200 bar; (○): 75 °C, 200 bar, (□): 75 °C, 1000 bar.

Wie aus dem negativen Reaktionsvolumen nach Gl. 5 zu erwarten war, ist die Wachstumsgeschwindigkeit bei der optimalen Temperatur von 65 °C bei 500 bar gegenüber der Kontrolle unter Normaldruck beschleunigt. Die Zelldichte von  $\approx 10^8$  / ml wird bei 500 bar bereits nach 4 h, bei Atmosphärendruck erst nach 5 h erreicht (Abb. 34); die Zellzahlen bleiben über  $\approx 4$  h sowohl bei Atmosphärendruck, als auch bei 500 bar auf gleicher Höhe. Nach 24 h wird die Zelldichte bei 500 bar unter Normaldruck und 65 °C geringfügig übertroffen. Dies ist wahrscheinlich auf die Begrenztheit der Substratmenge bei 500 bar zurückzuführen, da zu Beginn der Wachstumskurve mehr  $H_2/CO_2$  verbraucht wird. Bei 1000 bar konkurriert die Hemmung mit einer anfänglichen Beschleunigung des Wachstums; dies äußert sich in einer zweiphasigen "Overshoot"-Kinetik.

Wird die Temperatur auf 70°C bzw. 75°C erhöht, so findet während 23 h bei 70°C bis 200 bar lediglich eine Zellteilung statt (Abb. 35). Bei 75°C tritt sowohl bei 200 bar als auch bei 1 kbar Lyse auf. Zusammenfassend ist aus Abb. 29, 33 bis 35 zu ersehen, daß keinerlei Verbreiterung des Temperaturbereichs von *Mc. thermolittotrophicus* durch Hochdruck erzwungen werden kann. Bei der optimalen Temperatur von 65°C ist die Wachstumsgeschwindigkeit bei 500 bar gegenüber Atmosphärendruck lediglich etwas beschleunigt.

## 12. Druck-Adaptation von *Mc. thermolittotrophicus* bei nicht-optimalen Bedingungen (56°C und 220 bar)

Bei 56°C und 220 bar zeigt *Mc. thermolittotrophicus* eine reversible Druckanpassung nachdem die Zellen bei 56°C und 220 bar 22 h vorinkubiert worden sind. Werden die unter diesen Bedingungen vorinkubierten Zellen anschließend bei 5°C 48 h im Kühlschrank anaerob aufbewahrt, danach in frisches MG<sup>-</sup>H-Medium überimpft, so ist der Kurvenverlauf wieder mit dem Kurvenverlauf ohne vorherige Druckinkubation identisch.

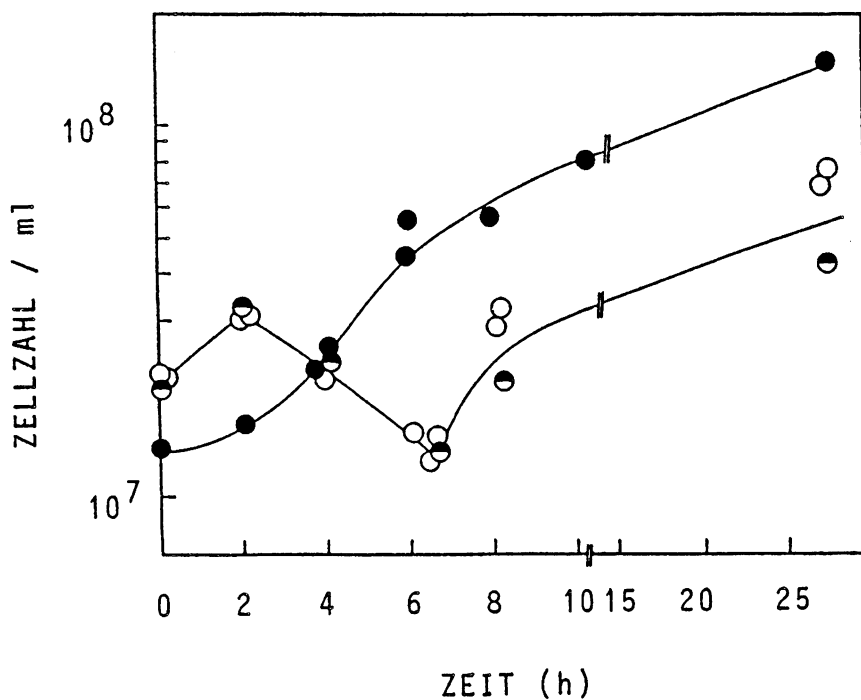
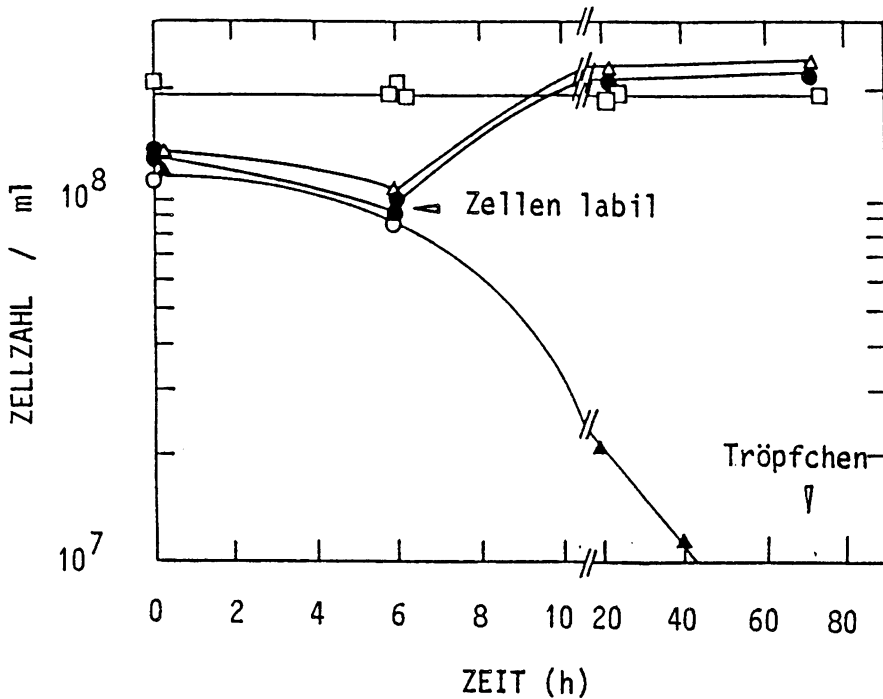


Abb. 36: Reversible Druckanpassung bei 56°C und 220 bar; ( o ): Die Zellen wurden in MG<sup>-</sup>H unter Atmosphärendruck 10 h angezogen; nach Überimpfung in frisches Medium wurde bei 56°C mit 220 bar bedrückt. ( o ): Die Zellen wurden bei 56°C, 220 bar, 22 h angezogen, in frisches Medium überimpft und anschließend wieder bei 56°C und 220 bar inkubiert. ( ● ): Die Zellen wurden wie unter ( ● ) vorbehandelt, dann 48 h im Kühlschrank aufbewahrt; anschließend wurde in neues Medium überimpft; erneut wurden bei 56°C und 220 bar Proben gezogen.

Eine Erklärung für die komplizierten Kurvenverläufe könnte im gleichzeitigen Vorkommen verschiedener barotoleranter Varianten von *Mc. thermolithotrophicus* nebeneinander bestehen. Campbell et al., 1985 haben die barotoleranten Varianten APR 11 von *Streptococcus faecalis* und ATCC 9790 untersucht und fanden eine herabgesetzte Sensibilität von APR 11 bzgl. der Glukose-Katabolit-Repression. Dies führt zu Veränderungen der Wachstumsregulation unter Druck.

13. Stabilität und Morphologie von *Mc. thermolothotropicus* in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration



**Abb 37:** Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei 56°C und 220 bar. (□): 10 ml MG⁻H ohne Gasphase; (●): 3 ml MG⁻H + 7 ml H₂/CO₂, 4 bar; (Δ): 1 ml MG⁻H + 9 ml H₂/CO₂, 4 bar; (○): 1 ml MG⁻H + 9 ml H₂/CO₂, 1 bar; (▲) 3 ml MH⁻H + 7 ml H₂/CO₂, 1 bar. Unter den Bedingungen (▲) überwiegen nach >70 h "Tröpfchen"; es sind keine zellulären Bestandteile mehr nachweisbar.

Abbildung 37 zeigt, daß bei Inkubation in Abwesenheit von Substrat (H₂) die ursprüngliche Zellzahl über mindestens 70 h konstant erhalten bleibt. Die Zellen sind morphologisch völlig normal und vermehren sich nach Überimpfen in frisches Medium in Serumflaschen unter optimalen Bedingungen genauso wie unbehandelte Inoculate aus Stammkulturen. Bei allen Substratkonzentrationen wird nach 6 h eine Abnahme der Zelldichte analog der Abb.33 und 36 beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen äußerst labil gegenüber Sauerstoff und mechanischer Beanspruchung, was sich lichtmikroskopisch im Auftreten von Zellfragmenten bzw. optisch leeren Tröpfchen darstellt. Fluoreszenzmikroskopisch äußert sich die spontan auftretende Lyse in einem sehr raschen Erlöschen der Fluoreszenz.

In Abb. 38 - 42 ist die Zellmorphologie nach 6 h Inkubation bei 56°C und 220 bar wiedergegeben; der Balken entspricht 1  $\mu\text{m}$ ; die Symbole in Klammern beziehen sich auf die Bedingungen aus Abb. 37.

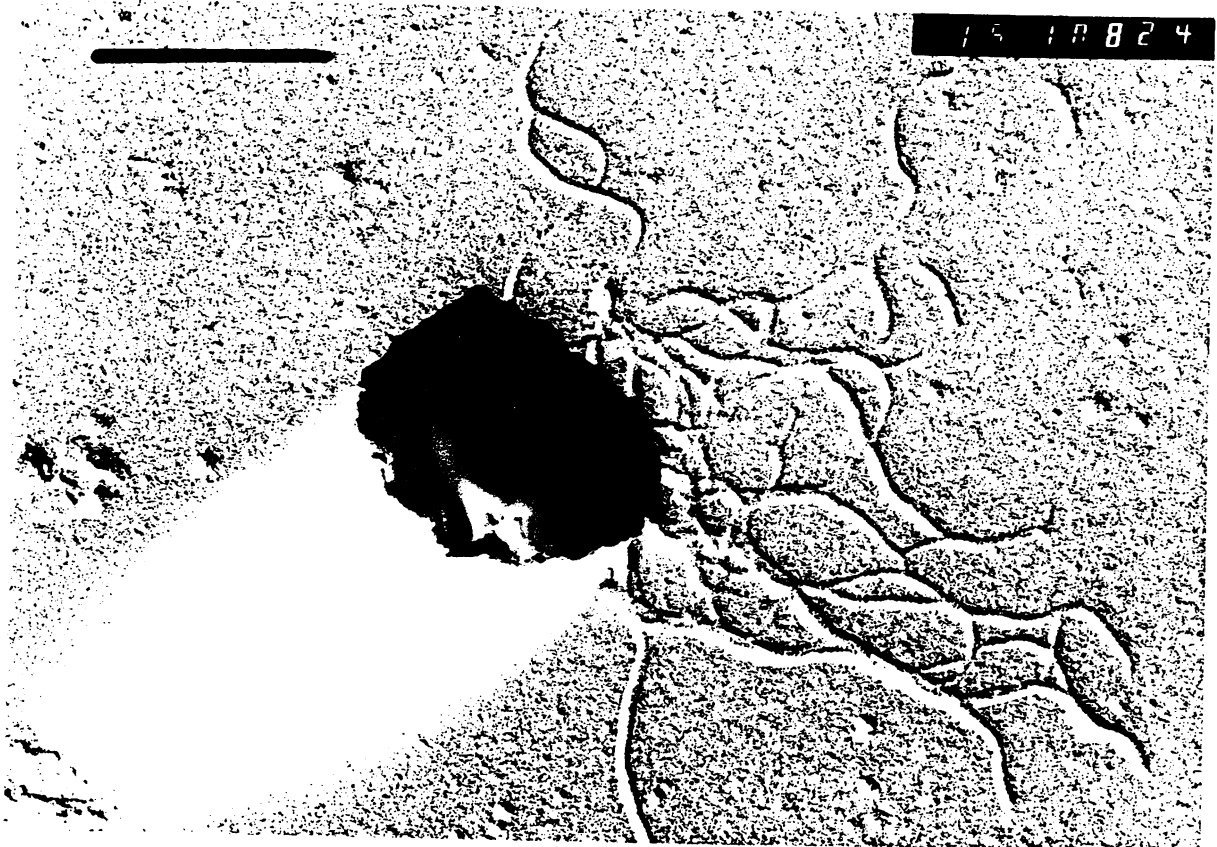


Abb. 38: *Mc. thermolithotrophicus* in 1 ml  $\text{MG}^{-}\text{H}$  nach 6 h Inkubation bei 56°C, 220 bar, in Gegenwart von 9 ml  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , 4 bar (  $\square$  ).

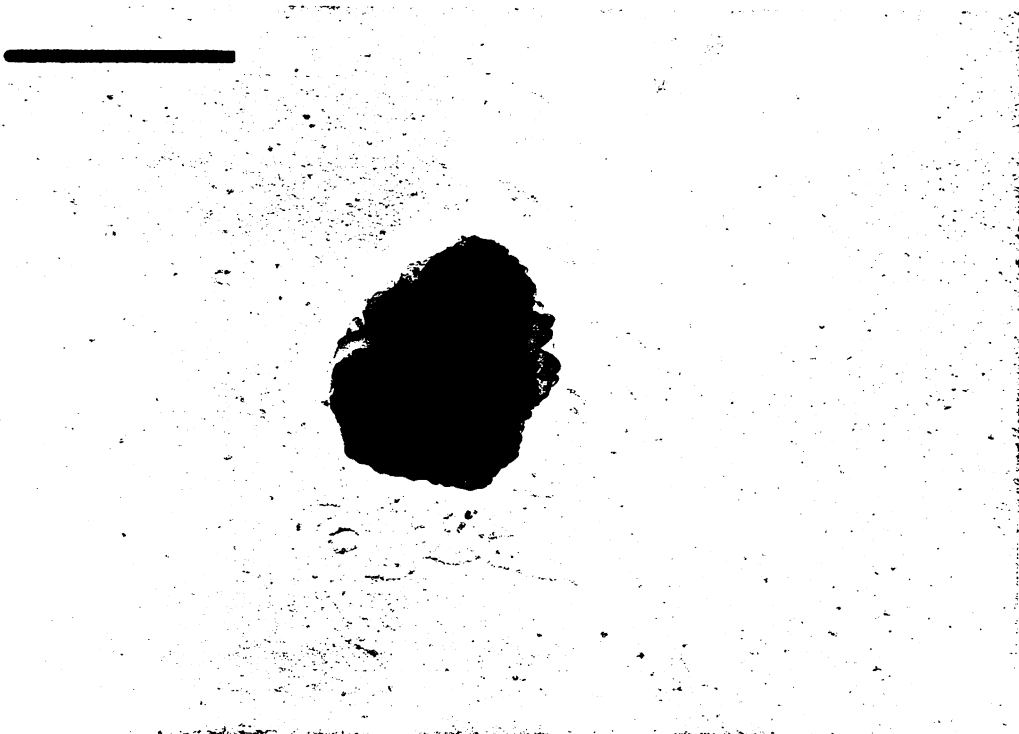


Abb. 39: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach 6 h unter den Bedingungen (  $\bullet$  ).

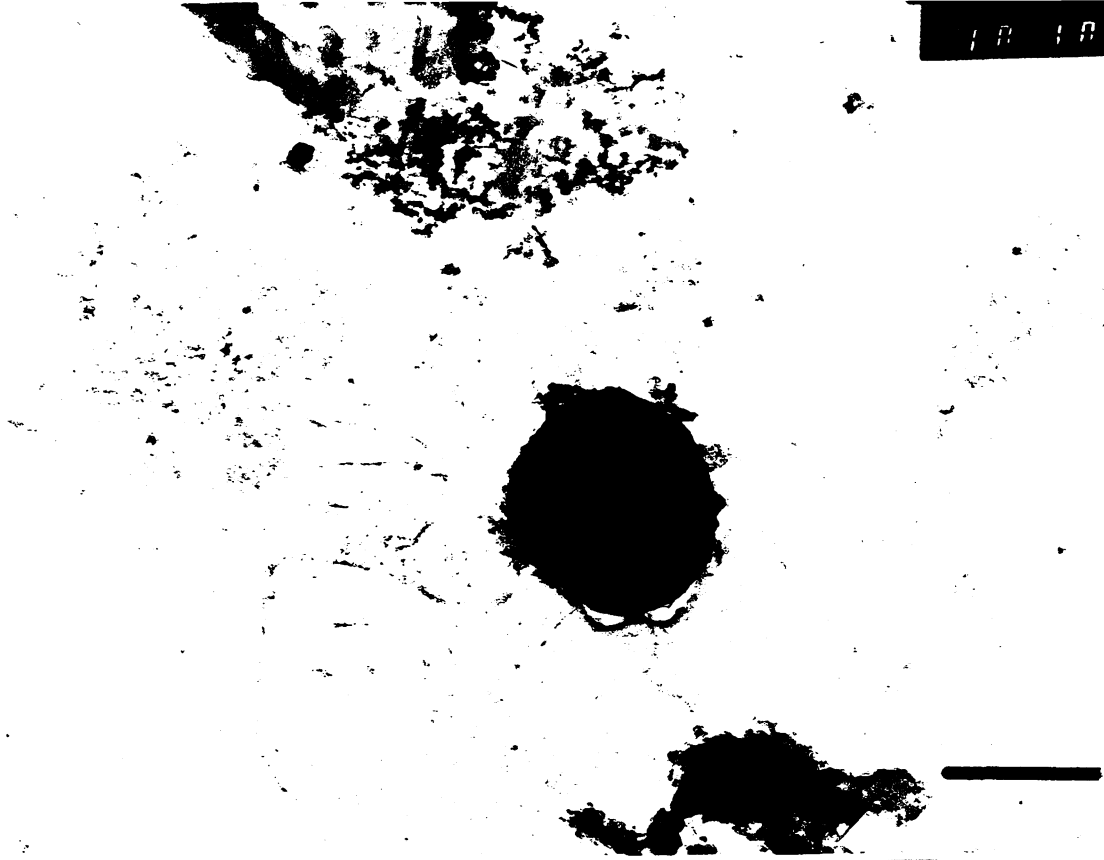


Abb. 40: EM-Aufnahme nach 6 h wie ( o ).

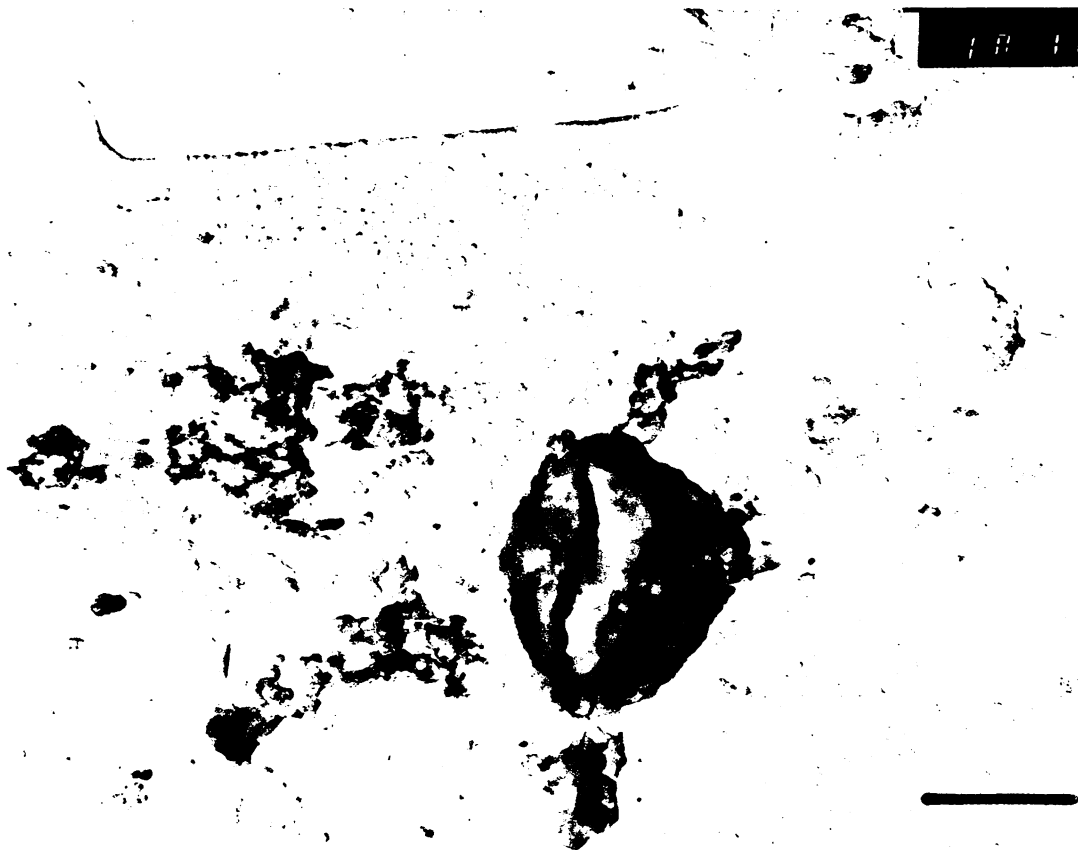


Abb. 41: Nach 6 h Inkubation unter (  $\Delta$  )-Bedingungen.

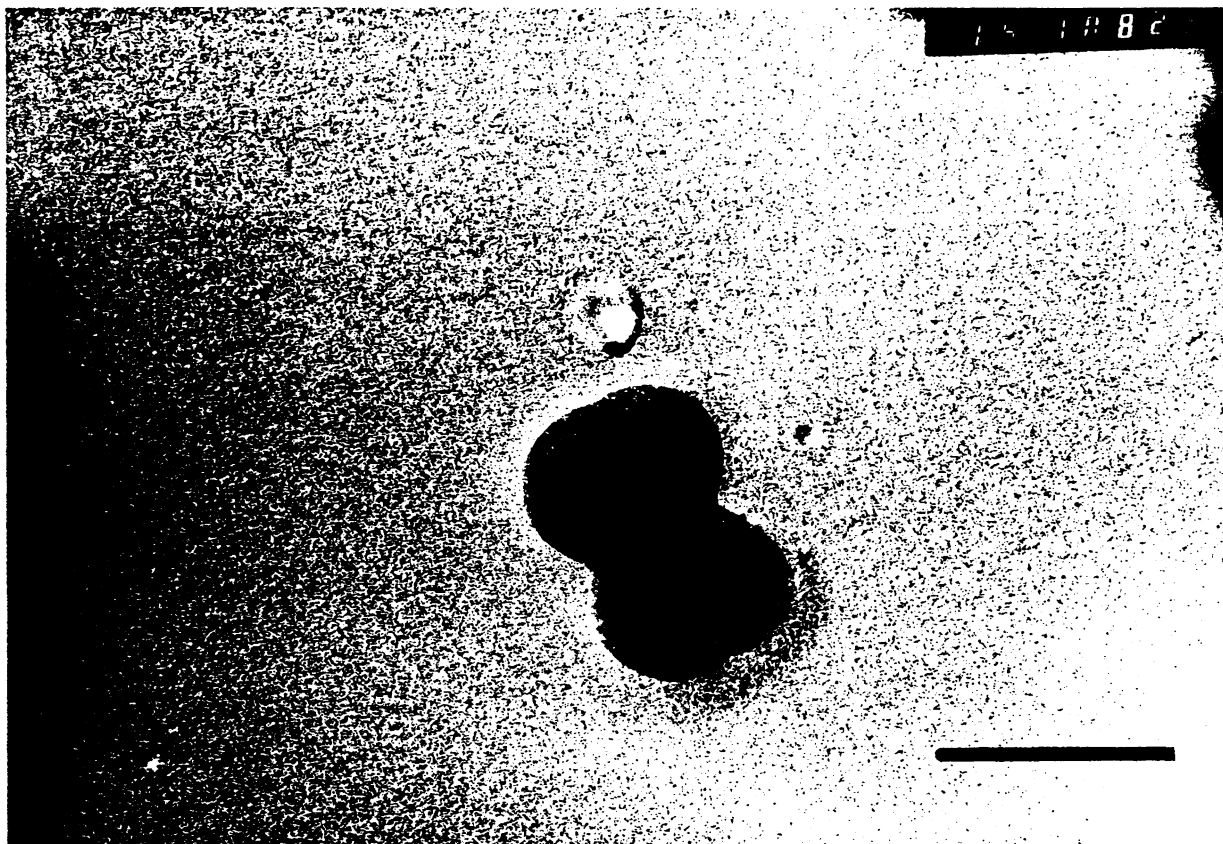


Abb. 42: Teilungsstadium ( o ).

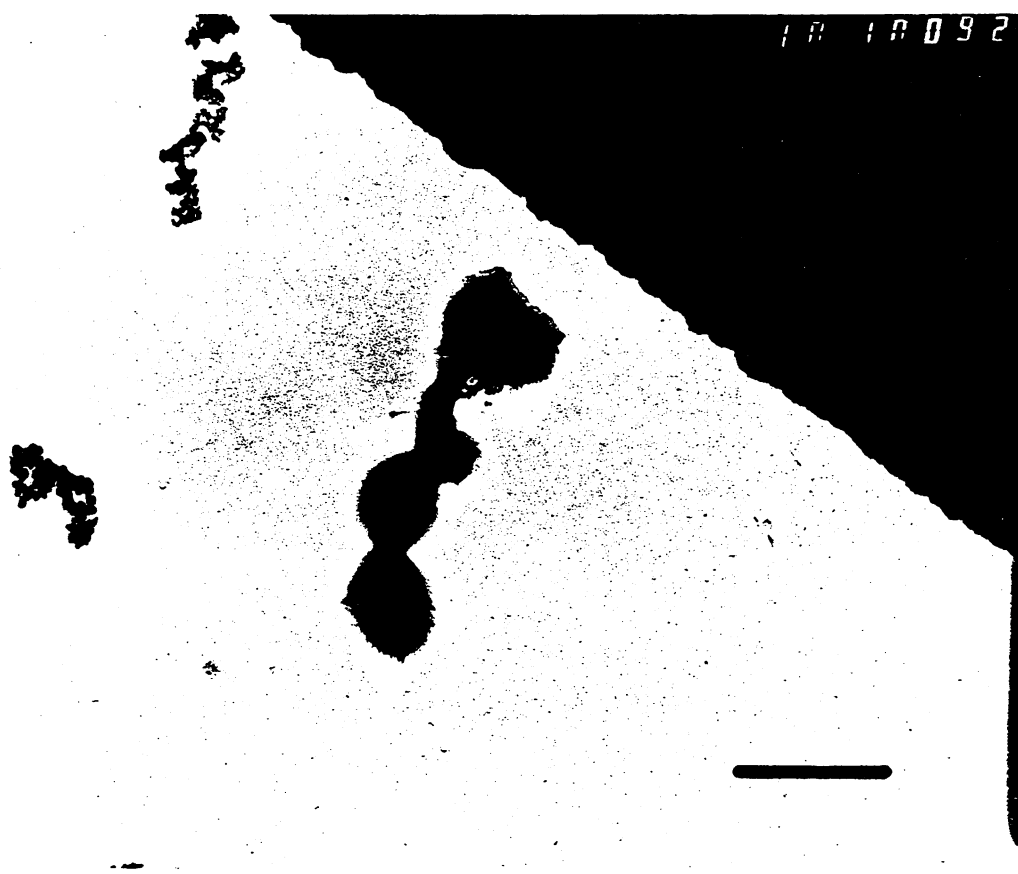


Abb. 43: EM-Aufnahme nach 70 h bei 56°C unter Substratmangel ( ▲ ).

Wie aus den elektronenmikroskopischen Bildern (Abb.38 - 41) zu ersehen ist, weisen alle Zellen nach 6 h Inkubation bei 56° und 220 bar, sofern Substrat in minimaler Konzentration vorhanden ist, mehr oder weniger ausgeprägte Deformationen, die sich als leichte "Eindellungen" bis zum Auftreten von Zellfragmen bzw. leeren Zellhüllen äussern, auf. Die scheinbare Zunahme des Schweregrades der Zelldemformation mit der Abnahme der Substratkonzentration ist nach 6 h Inkubation rein zufällig. Zu diesem Zeitpunkt im Wachstum treten bei jeder Substratkonzentration alle oben dargestellten Stadien nebeneinander auf. Daneben findet man selbstverständlich auch Zellen mit normaler Morphologie (Abb.30 und 38) und Zellen, die gerade im Begriff sind sich zu teilen (Abb, 42). Sofern hinreichend Substrat vorhanden ist, kommt es im weiteren Verlauf des Experiments zu Zellteilungen. Die Zellen zeichnen sich nach Ablauf der Inkubationszeit durch normale Morphologie aus (Abb. 30, 38). Ist hingegen die Substratkonzentration begrenzt, so findet man bei der Zählung lichtmikroskopisch nur noch Zellfragmente, die z.T. schwer von Kristallen und intakten Zellen zu unterscheiden sind. Besonders charakteristisch ist das Auftreten von "Tröpfchen" nach 70 h, wenn unter Substrat-Mangel (3 ml/MG<sup>-1</sup>H, 7 ml H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 1 bar) inkubiert wurde. Abb. 43 zeigt das typische elektronenmikroskopische Bild zu diesem Zeitpunkt.



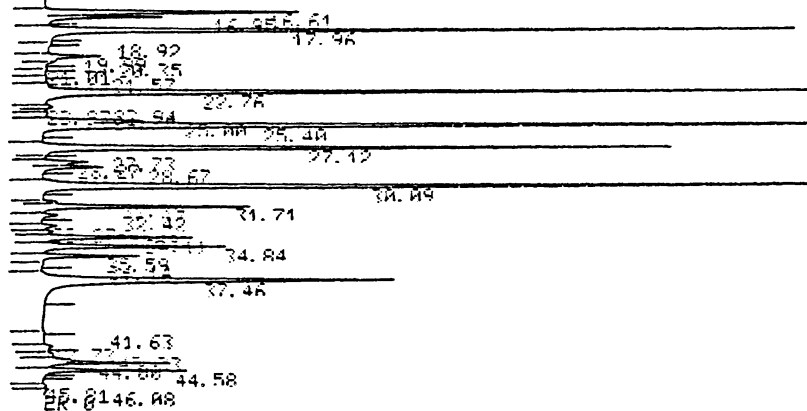
Von *Methanobacterium bryantii*, einem Methanogenen mit einer Zellwand aus Pseudomurein, wurde von einer spontanen Protoplastenbildung berichtet; es wurde gezeigt, daß bei diesem Archaeobacterium die spontane Lyse dann eintritt, wenn  $\text{NH}_4^+$ - und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen im Medium verbraucht sind. Der Mechanismus, der hierfür verantwortlich ist, ist bislang nicht aufgeklärt (Jarrel et al., 1982). Als Ursache wird Zusammenbruch der Zellwand-Biosynthese diskutiert, bedingt durch den Verbrauch der hierfür notwendigen Substrate; enzymatische Vorgänge als Grund für die Protoplastenbildung scheiden in diesem Zusammenhang aus. Ein Verarmen von  $\text{MG}^-\text{H}$  an  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$  in den obigen Versuchen ist höchst unwahrscheinlich, sowohl bei Inkubation von 1 ml, als auch 3 ml Medium mit ausreichend Substrat (9 bzw. 7 ml  $\text{H}_2\text{CO}_2$ , 4 bar) treten bis 30 h Zellteilungen auf; im Verlauf von weiteren 40 h wird keinerlei Lyse beobachtet. Vielmehr scheint die spontane Lyse nach 6 h durch die Knappheit der gasförmigen Substrate, insbesondere  $\text{H}_2$  bedingt zu sein. König et al. (1985) fanden für *Methanobacterium wolfei*, auf Minimalmedium gezogen, regelmäßig spontane Lyse 20 bis 30 h nachdem der  $\text{H}_2$ -Vorrat erschöpft war. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise für das Einwirken lytischer Enzyme. Das Auftreten lytischer Enzyme ist zwangsläufig an das Ablaufen der Stoffwechselvorgänge gebunden. Besteht die Möglichkeit zur Energiegewinnung (durch Ausschluß von Substrat) nicht, so zeigen sich auch nach Inkubation über 70 h bei  $56^\circ\text{C}$  und 220 bar bei *Mc. thermolithotrophicus* keinerlei Anzeichen von Lyse. Wird jedoch die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung des Metabolismus durch die Verfügbarkeit geringer Substratmengen ( $\text{H}_2$ ) für einige Zeit aufrechterhalten, so treten nach Erschöpfung der Energiequelle lytische Prozesse in den Vordergrund.

#### 14. Veränderungen des Aminosäuremusters unter Hochdruck

In Abb. 44 ist das Aminosäuremuster von *Mc. thermolithotrophicus* bei  $65^\circ\text{C}$  ohne Druckinkubation bzw. nach Inkubation bei 500 bar vergleichend gegenübergestellt. Die Proben wurden nach gleichen Inkubationszeiten gezogen und der Hydrolyse unterworfen.

CHANNEL A INJECT 21.04.85 01:06:42

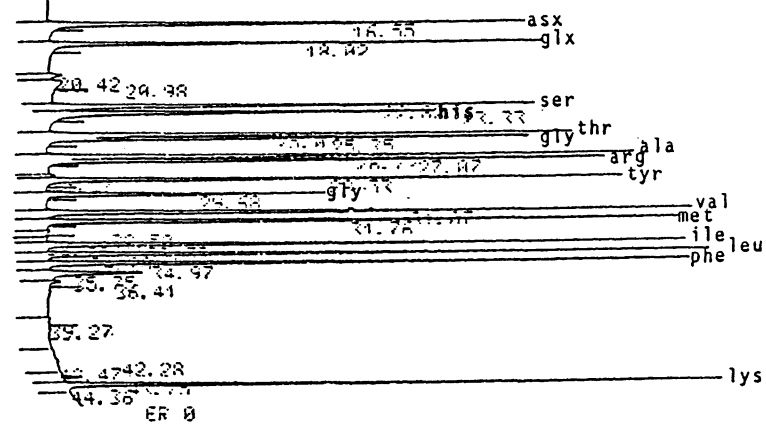
RT 1024  
CS .25



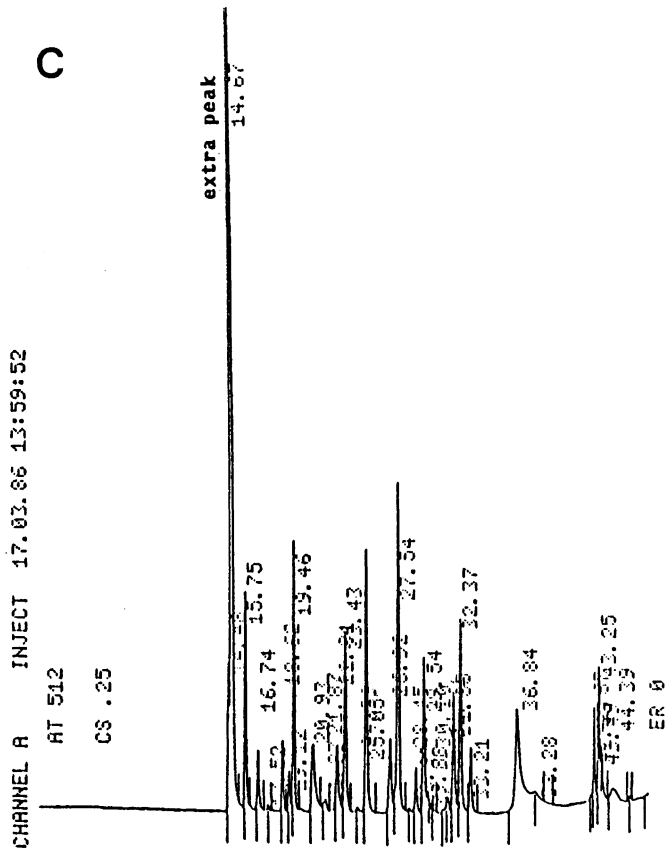
B

CHANNEL A INJECT 10. .84 10:29:32

RT 1024  
CS .25



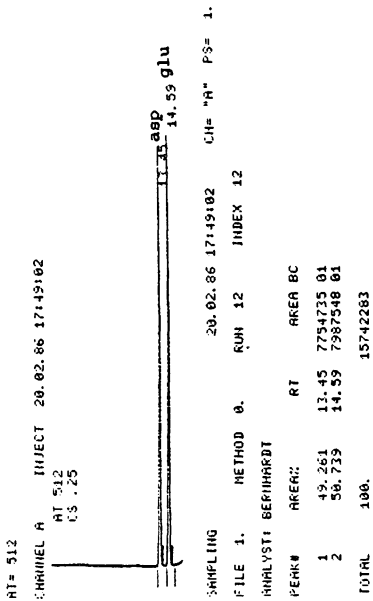
A



**Abb. 44:** HPLC-Läufe bedrückter und unbedrückter Zellhydrolysate. A: Sigma Aminosäure-Standard AA-S-18, 833 p mol/Aminosäure; B: *Mc. thermolithotrophicus* unter Standardbedingungen (65°C, 1 bar, 8 h); C: *Mc. thermolithotrophicus* nach Hochdruckinkubation (65°C, 500 bar, 8 h).

Auf den ersten Blick fallen dramatische Unterschiede im Verteilungsmuster der Aminosäuren in der unbedrückten im Vergleich zu der druckbehandelten Probe auf, insbesondere, wenn man berücksichtigt, daß Chromatogramm C (500 bar, 65°C) bei der doppelten Verstärkung aufgenommen wurde. Am auffälligsten ist die Zunahme eines Peaks (in C als "Extrapeak" bezeichnet) in der bedrückten Probe um 756% gegenüber der unbedrückten Probe. In Abb. 45 ist dieser Peak im Vergleich mit den Aminosäuren Asp und Glu separat dargestellt.

A



B

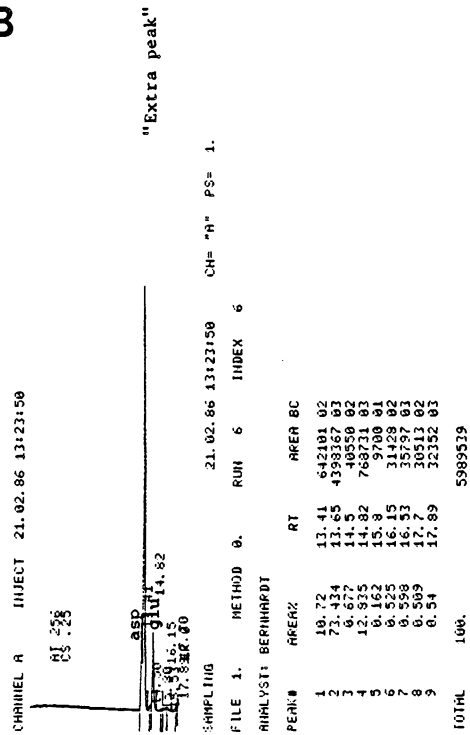


Abb. 45: Vergleich der Retentionszeiten von Asp und Glu mit dem "Extra-Peak".  
A: 833 p mol Asp und Glu;  
B: "Extra-Peak" im Zellhydrolysat von *Mc. thermolithotrophicus* nach Anzucht bei 65°C und 500 bar. Nach einer Latenzzeit von > 6 h nimmt die Fläche um 750% zu.

In der Aminosäureanalyse kann dem äusserst hydrophilen Peak keine bekannte Referenzsubstanz zugeordnet werden; die OPA-Methode schließt aber alle Verbindungen, die keine primäre Aminogruppe besitzen aus (Simons & Johnson, 1978), es sei denn die Substanz weist bei den gegebenen Voraussetzungen Eigenfluoreszenz auf. Dies wurde durch die Chromatographie von nicht-derivatisierten Hydrolysaten ausgeschlossen. Somit kommt nur eine nicht-proteinogene Aminosäure oder ein biogenes Amin in betracht. Daß es sich um ein Artefakt handeln könnte, einerseits bedingt durch die Hydrolyse, andererseits durch den hohen Druck, kann dadurch ausgeschlossen werden, daß der Peak auch in den nichtbedrückten Proben andeutungsweise auftritt. In HPLC-Läufen von Proben, die hydrothermalen Bedingungen unterworfen wurden, läßt sich keine Substanz mit vergleichbarer Retentionszeit nachweisen. Die Konzentrationserhöhung der "Extrapeaks" wird bei Druckinkubation erst nach Zeiten  $\geq 6$  h signifikant. Dies könnte auf eine allmähliche Umstellung des Stoffwechsels hindeuten, bei der Reaktionen mit positivem  $\Delta V$  ins Spiel kommen. Sind die Wachstumsbedingungen nicht optimal -sprich die Temperatur zu niedrig ( $56^{\circ}\text{C}$ ) oder zu hoch ( $75^{\circ}\text{C}$ )- so könnte sich Streß in Form von Hochdruck während der Umstellungsphase besonders gravierend bemerkbar machen (Durchgang der Kurve in Abb.33 und 36 durch ein Minimum). In diesem Zusammenhang könnte man an die Neusynthese von Polyaminen denken, von denen bekannt ist, daß sie, wie auch die "Heat shock"-Proteine gegenüber verschiedenen Arten von Stress, Schutzfunktionen ausüben (Tabor & Tabor, 1985; Li, 1983; Velazquez und Lindquist, 1984). Algranati et al. (1975, 1981, 1982) haben gezeigt, daß in Abwesenheit von Polyaminen die 30 S - Untereinheit der Ribosomen defekt ist und somit die Initiation gestört und die gesamte Proteinsynthese verringert ist. In diesem Zusammenhang wäre eine Stabilisierung der Ribosomen durch Polyamine durchaus sinnvoll, da der hemmende Einfluß von Hochdruck auf die Assoziation der ribosomalen Untereinheiten (Schulz et al. 1976) wegen der Größe der daran beteiligten Volumenänderungen einen kritischen Faktor darstellt.

**Tabelle13:** Aminosäure-Zusammensetzung bezogen auf den gesamten Aminosäure-Gehalt in % nach 10 h Inkubation bei 65°C bei 0 bar\* und bei 500 bar.

Aminosäure	Aminosäure [% , 1 bar]	Aminosäure [% , 500 bar]
Asp	6.0	4.7
Glu	17.4	8.5
Ser	17.6	8.7
His	0.1	0.0
Thr	1.8	3.2
Gly	26.0	8.5
Ala	15.3	9.7
Arg	1.2	37.4
Tyr	1.2	0.3
Val	0.5	0.4
Met	1.9	0.7
Ile	2.8	4.5
Leu	3.6	7.0
Phe	1.7	2.3
Lys	2.9	4.1

\* *Mc. thermolithotrophicus* wurde unter Standardbedingungen ohne externen Druck angezogen.

In Tabelle 13 ist die Aminosäurezusammensetzung von unbehandelten und bedrückten Proben quantitativ an einem Beispiel illustriert. Die Tabelle ist repräsentativ für die Verhältnisse bzgl. verschiedener Temperaturen und Drücke im Vergleich zu unbedrückten Kulturen bei derselben Temperatur. Besonders bemerkenswert ist der sehr hohe Gehalt an basischen Aminosäuren (37.4% Arg und 4.1% Lys) in der hochdruckbehandelten Probe; zudem ist der prozentuale Anteil der hydrophoben Aminosäuren Ile, Leu und Phe bei 500 bar, 65°C-inkubierten Kulturen gegenüber den Kulturen bei 65°C unter Atmosphärendruck erhöht. Dieser Befund deutet auf die Neusynthese stark basischer Proteine hin; derartige stark basische, histonähnliche Proteine sind sowohl bei Archaeobakterien als auch bei Eubakterien beschrieben worden. (Thomm et al., 1981). Aus theoretischen Erwägungen erscheint die Notwendigkeit zur Stabilisierung der DNA durch basische Proteine nicht erforderlich, denn das  $\Delta V$  der Denaturierung der DNA besitzt positives Vorzeichen; Hochdruck stabilisiert demnach die native DNA-Struktur (Chapman & Sturtevant, 1969).

#### 15. Massenspektrometrie

Eine Strukturaufklärung des "Extrapeaks" wurde mit Hilfe der GC-MS-Kopplung versucht. Über HPLC wurde der Peak (zwischen Asp und Glu) nach Hydrolyse der 10 h bei 65°C und 500 bar gewachsenen Zellen nach der OPA-Derivatisierung gesammelt und sofort in Methylenchlorid (Reinheitsgrad für Spektroskopie) eingeleitet. Aus Unkenntnis der relativen Fluoreszenzintensität wurde (analog den übrigen Intensitäten der OPA-Aminosäure-Derivate) die Gesamtmenge an OPA "Extrapeak"-Derivat auf 1 - 10 µg geschätzt. Bereits während des Sammelns wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und die wässrige Phase verworfen. Prof. Dr. Lothar Jaenicke hat sich freundlicherweise bereit erklärt, die GC-MS-Kopplungsanalyse durchzuführen, da kein mit einem Gaschromatographen gekoppeltes Massenspektrometer zur Verfügung stand; dazu mussten die Proben nach Köln geschickt werden. Die Proben wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und 1:10 konzentriert.

GC-Bedingungen:

Säule: OV 101, 30 m (fused silica)

1 min bei 100°C  $\xrightarrow{10^{\circ}\text{C/min}}$  250°C  $\xrightarrow{20^{\circ}\text{C/min}}$  320°C

3  $\mu\text{l}$  wurden splitless injiziert (Spalt nach 30 sec geöffnet).

Silylierung:

Nach Trocknen über  $\text{MgSO}_4$  wurde das  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  evaporiert und der Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  MSTFA/TMSCN (10:1) gelöst. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden 3  $\mu\text{l}$  splitless injiziert.

Die gaschromatographischen Bedingungen für silylierte und nichtsilylierte Proben waren identisch. Die Massenspektren ergaben neben Verunreinigungen wie Phtalat (Weichmacher) eine große Anzahl verschiedener gesättigter bzw. ungesättigter Fettsäuren ( $\text{C}_{12}$  -  $\text{C}_{18}$ ); daneben wurden m/e-Verhältnisse gefunden, die aller Wahrscheinlichkeit nach verzweigten Fettsäure-Estern zugeordnet werden müssen. Die Fettsäuren stammen entweder aus den Zellhydrolysaten oder vom Säulenmaterial der Reversed Phase HPLC-Säule. In Abb.47 ist das für Isoindolderivate typische Spektrum (m/e-Verhältnis: 146) dargestellt. Damit sind in Übereinstimmung mit Simons & Johnson (1978) die als Abbauprodukt aus allen möglichen OPA-Addukten entstehenden Isoindolderivate zwar detektierbar; eine Zuordnung des Restes R, auf dem das eigentliche Interesse lag, gelang jedoch nicht. Der Zerfallsweg der OPA-Derivate (mit Aminen und Aminosäuren) ist äußerst komplex (Simons & Johnson, 1978; Stolaugh et al., 1983). Eine Arbeit von Jucols et al. (1986), die soeben erschienen ist, zeigt die Ursachen des Mißerfolgs auf. Die Halbwertszeiten des Zerfalls der OPA-Verbindungen mit Aminen und Aminosäuren sind extrem kurz.  $\tau/2$  bei Raumtemperatur beträgt für R:  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  8 min; das stabilste Derivat R:  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  hat eine Halbwertszeit von 410 min. Berücksichtigt man neben dem Transport noch die drastischen GC-Bedingungen so ist eine Strukturaufklärung mittels der GC-MS-Technik prinzipiell nicht möglich. Voraussetzung für eine Strukturaufklärung (sowohl für NMR, wie für MS) ist eine Derivatisierung mit OPA nach der Säule um die Retentionszeit bei der HPLC-Trennung bestimmen zu können.



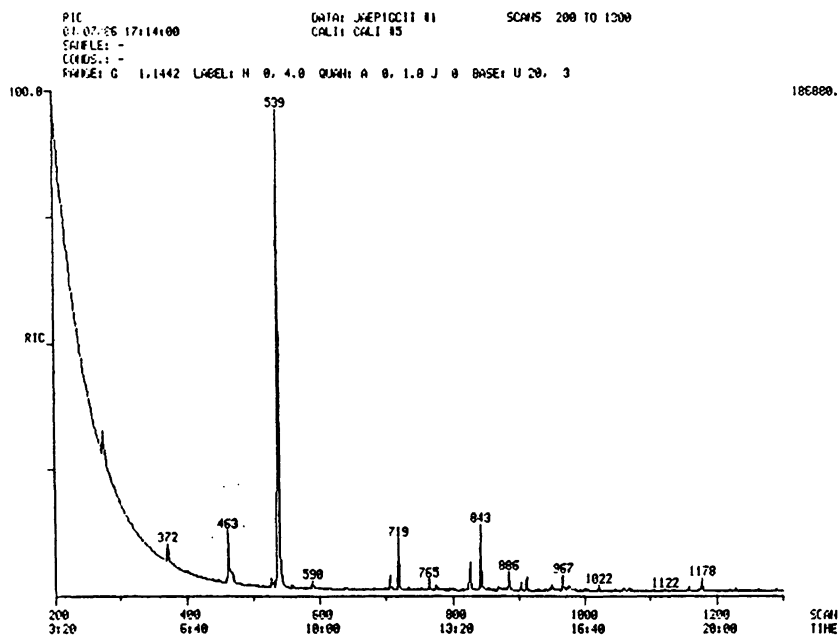


Abb. 46: Gaschromatogramm des gesammelten "Extra-Peak"-OPA-Derivats in Methylenchlorid (463).

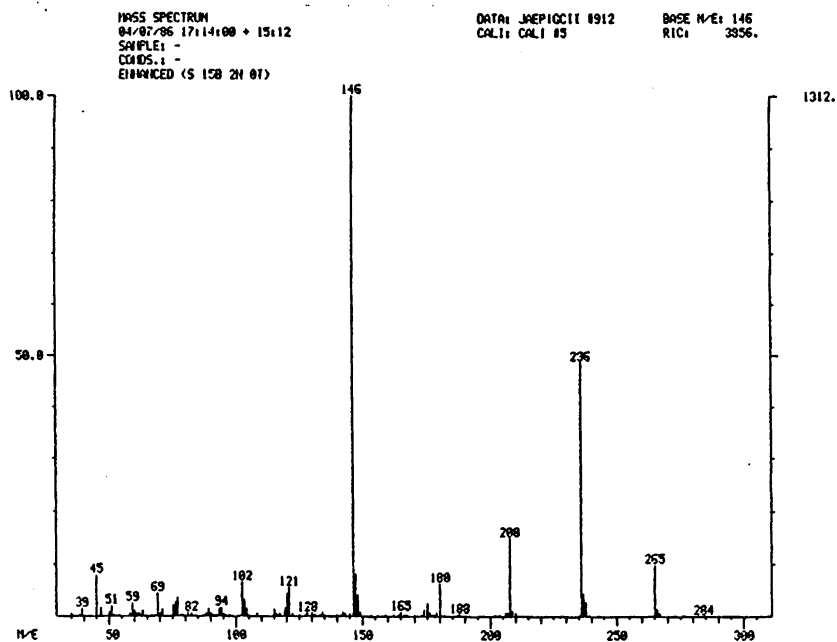


Abb 47: Massenspektrum der Fraktion 463 mit den für Isoindol-verbindungen charakteristischen m/e = 146 bzw. 148.

Die so identifizierte Substanz kann dann gesammelt und in stabilem Zustand (das die Analyse verkomplizierende Isoindolgerüst fällt weg) vermessen werden.

#### 16. Fluoreszenzspektren der Säurehydrolysate von *Mc. thermolithotrophicus*-Zellen

Einen Hinweis, daß unter Hochdruck Prozesse induziert werden, die zu einer Veränderung in der Netto-Zusammensetzung der Zellen führen, (Tab.13) geben auch die Fluoreszenzspektren von Zellhydrolysaten (Abb.48) Das wässrige Hydrolysat der 24 h bei 65°C und 500 bar gezogenen Bakterien ist hellgelb; die Kontrolle bei Atmosphärendruck zeigt wesentlich dunklere Färbung.

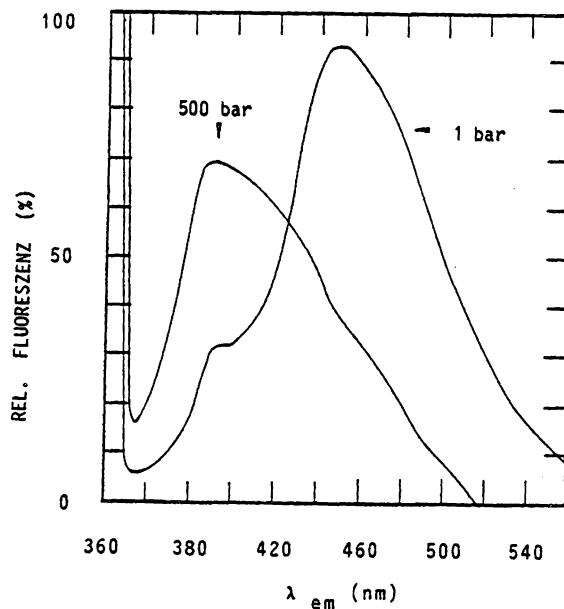


Abb. 48: Emissionsspektren wässrigern Säurehydrolysate von *Mc. thermolithotrophicus* nach 24 h Anzucht unter Hochdruck bzw. ohne externen Druck bei 65°C. Anregung: 360 nm, Spalt: 10/4; Sens.: 3/2; Raumtemperatur. Die fluoreszierende Verbindung ist mit dem Faktor F<sub>420</sub> nicht identisch.

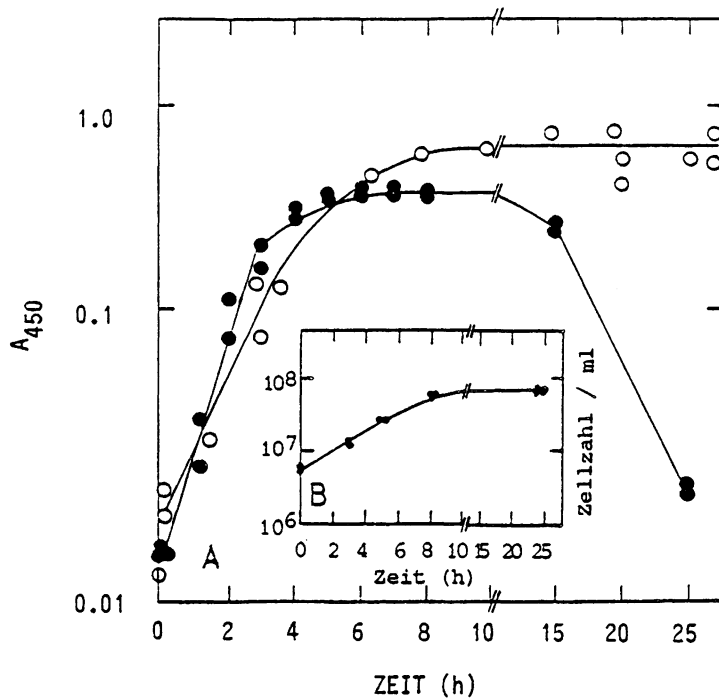
17. Proteinmuster von *Mc. thermolithotrophicus* bei Atmosphärendruck und bei 500 bar, 65°C.

#### 17.1 Bedingungen für die radioaktive Markierung

*Mc. thermolithotrophicus* kann Acetat nicht verwerten; die Anzucht auf Formiat scheidet für Hochdruckexperimente, wie weiter vorne dargelegt wurde, aus. Zur radioaktiven Markierung, sofern man nicht mit gasförmiger Radioaktivität in Form von  $^3\text{H}_2$  bzw.  $^{14}\text{CO}_2$  hantieren möchte, bietet sich  $^{14}\text{C-NaHCO}_3$  an, da über S-Aufnahmemechanismen (z.B. in Form von Sulfat bzw. Cystein) sehr wenig bekannt ist (Stetter, persönliche Mitteilung). Bei optimalen Kulturbedingungen steht insgesamt 147 mM Kohlenstoff (60 mM als  $\text{HCO}_3^-$  und 87 mM  $\text{CO}_2$  zur Verfügung. Will man angesichts dieser Verhältnisse optimale Einbaubedingungen schaffen, so muß die C-Quelle so eingeschränkt werden, daß gerade noch ausreichende Zelldichten zur Bestimmung des Proteinmusters erhalten werden.

##### 17.1.1 Anzucht in $\text{HCO}_3^-$ -Mangelmedium in reiner $\text{H}_2$ -Atmosphäre

*Mc. thermolithotrophicus* wurde in Serumflaschen ohne gasförmiges  $\text{CO}_2$  in einer reinen Wasserstoff-Atmosphäre angezogen ( $\text{H}_2\text{CO}_3 = \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  Gleichgewichtseinstellung wurde vernachlässigt).



**Abb 49:** Abhängigkeit des Wachstums in MG<sup>-</sup>H von der C-Konzentration.

A: ( o ): 5 g NaHCO<sub>3</sub>/L; ( ● ): 2 g NaHCO<sub>3</sub>/L (Schüttelkulturen, 65°C in reiner Wasserstoffatmosphäre, 2 bar).  
 B: 3 ml MG<sup>-</sup>H mit 2 g/L NaHCO<sub>3</sub> + 7 ml H<sub>2</sub> bei 65°C und 500 bar. Die osmotischen Verhältnisse wurden durch NaCl-Zusatz aufrechterhalten.

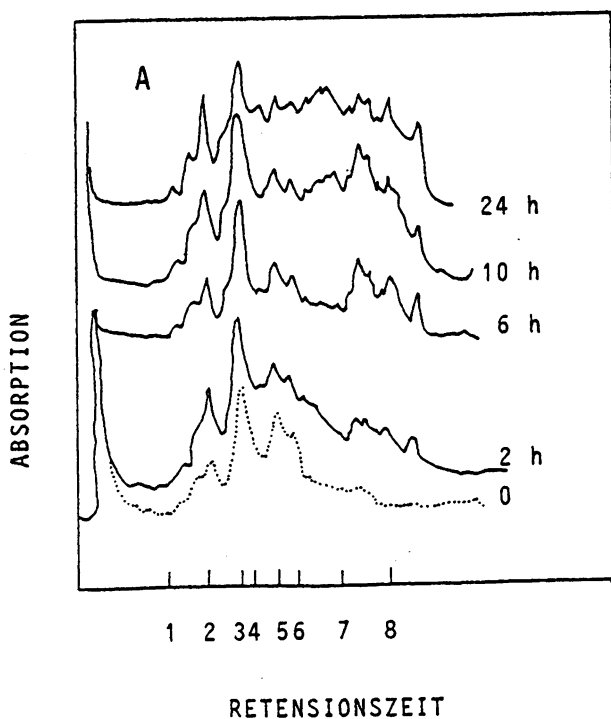
Wie Aus Abb.49 zu ersehen ist, ist die Anzucht von *Mc. thermolithotrophicus* prinzipiell ohne gasförmiges CO<sub>2</sub> möglich. Eine Begrenzung der C-Konzentration auf 2 g NaCO<sub>3</sub>/L lieferte noch Zelldichten, sowohl bei Atmosphärendruck als auch bei 500 bar, die für O'Farrell-Gele ausreichen. An dieser Stelle könnte die Frage gestellt werden, warum nicht bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein Ersatz von CO<sub>2</sub> gegen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durchgeführt worden ist. Um optimale Wachstumsbedingungen zu garantieren, muß eine hinreichend hohe C-Konzentration aufrecht erhalten werden. Die erforderliche Konzentration der C-Quelle kann durch einen Ersatz von CO<sub>2</sub> gegen NaHCO<sub>3</sub> nicht erreicht werden, da Hydrogencarbonat in reiner H<sub>2</sub>-Atmosphäre bereits beim Autoklavieren der Medien bzw. bei der Inkubation der Inoculate (selbst bei niedrigeren NaCO<sub>3</sub>-Konzentrationen)

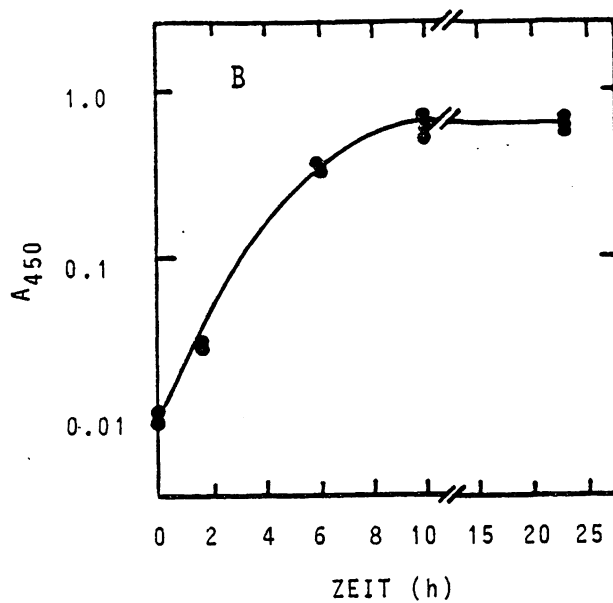
ausfällt. Dies zieht einen Anstieg des pH-Wertes auf 8.5 nach sich, was zwangsläufig zur Lyse führt.

Während der log-Phase nimmt die  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration linear mit der Zunahme der Zelldichte ( $A_{450}$ ) ab. Das Einlaufen der Werte für das Säurebindungsvermögen in ein Plateau, zu einem Zeitpunkt an dem noch Wachstum stattfindet, beruht auf der Eigenpufferkapazität der Zellen wegen der erhöhten Zelldichte. Dieses Experiment ergibt für  $^{14}\text{C}$ -Markierungsversuche eine optimale Substratkonzentration von 80 mM  $\text{NaHCO}_3$  (2 g/L) um maximale Einbauraten bei niedriger Animpfdichte zu gewährleisten.

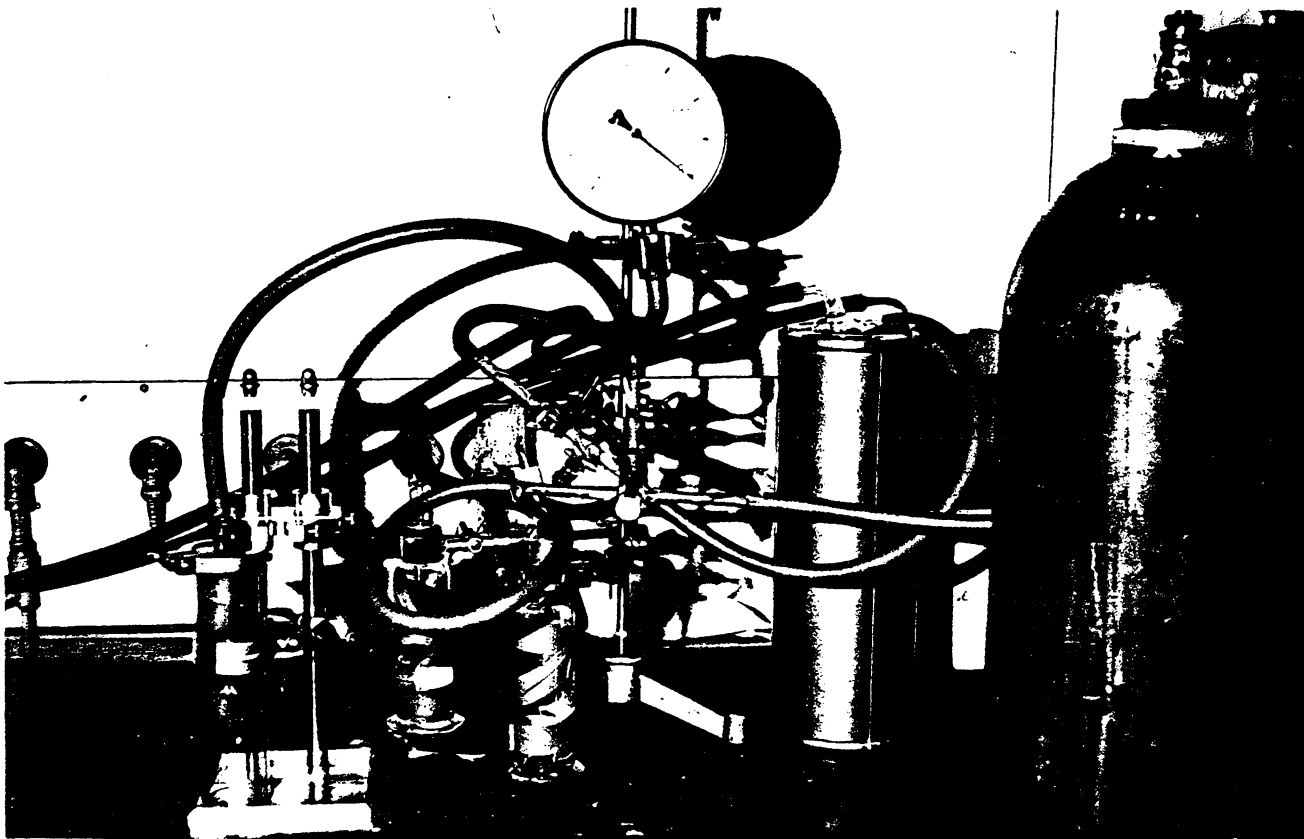
#### 17.2 SDS-PAGE von *Mc. thermolithotrophicus* Gesamtprotein

Alle Versuche mit den üblichen Gel-Systemen lieferte unbrauchbare Ergebnisse, wenn die Zellextrakte nicht nach der O'Farrell-Methode präpariert wurden. Alle Zellextrakte, die im Folgenden benutzt wurden, wurden nach der Technik wie unter dem Punkt Probenvorbereitung 12.2.1 beschrieben, hergestellt. In Abb. 50 ist die Zeitabhängigkeit des Proteinmusters zu verschiedenen Zeiten (B) auf der Wachstumskurve dargestellt.





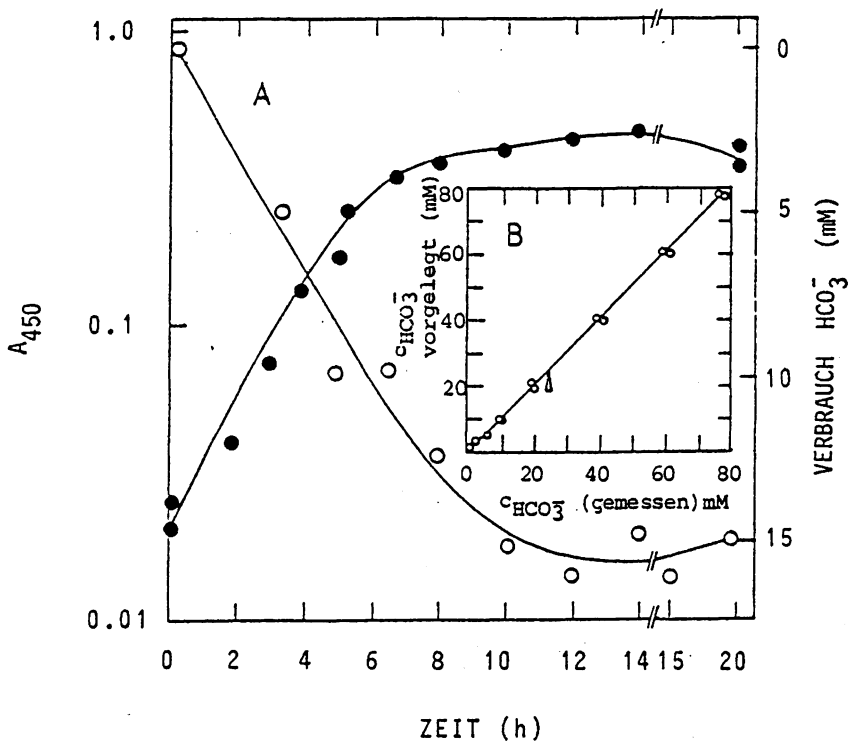
**Abb. 50:** Zeitabhängige Analyse des Proteinmusters einer wachsenden Schüttelkultur bei 65°C. A: Densitogramme von Zellextrakten nach SDS-PAGE und Silberfärbung. Molekulargewichtsstandards: 1: 97500; 2: 66000; 3: 45000; 4: 36000; 5: 29000; 6: 24000; 7: 20000; 8: 14500. B: Die zugehörige Wachstumskurve; die Punkte entsprechen dem Zeitpunkt der Probenentnahme.



**Abb. 51:** Vorrichtung zum Gasaustausch in den Ni-Tuben bei der radioaktiven Markierung. Um das Entweichen von radioaktivem CO<sub>2</sub> zu verhindern, wurden zwischen Wasserstrahlpumpe und Manometer Waschflaschen mit KOH und eine Kühlfalle geschaltet.

### 17.3 Radioaktive Markierung und Einbau von $^{14}\text{C}$ $\text{NaHCO}_3$

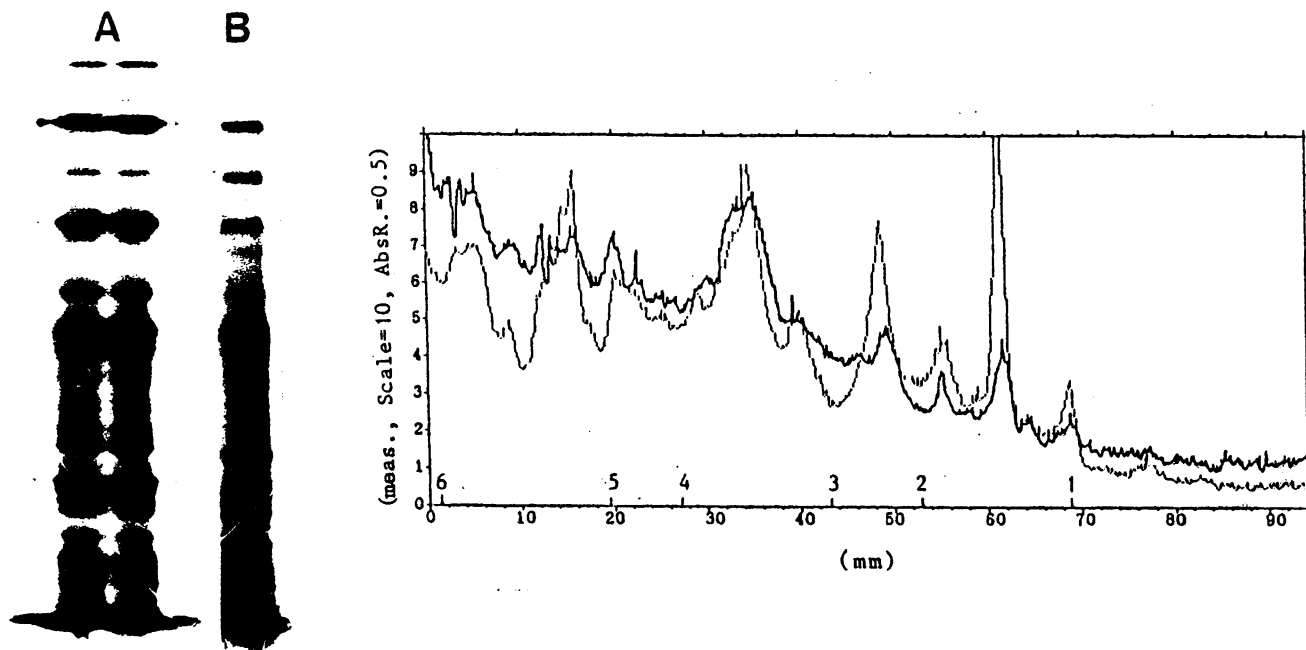
Den beimpften  $\text{MG}^-\text{H}$ -Medien wurde jeweils eine spezifische Radioaktivität von 278 kBq/ml - 370 kBq/ml Kulturmedium zugesetzt. Die Einbauraten in die Zellsubstanz lagen zwischen 15 und 20%. Zum Gasaustausch in den Ni-Tuben wurde die in Abb. 52 gezeigte Apparatur benutzt, um das Entweichen von radioaktivem  $\text{CO}_2$  in die Atmosphäre zu verhindern.



**Abb. 52:** Korrelation von Wachstum und  $\text{HCO}_3^-$ -Verbrauch. Die Bestimmung der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration erfolgte über das Gesamtsäurebindungsvermögen in  $\text{MG}^-\text{H}$  mit Aquamerck 8048 titrimetrisch. Die enzymatische Methode mit Phosphoenolpyruvat-Carboxylase war für das vorliegende System ungeeignet.  
 ( ● ): Schüttelkultur in  $\text{MG}^-\text{H}$  (5g/L  $\text{NaHCO}_3$ ) bei  $65^\circ\text{C}$  und 2 bar Wasserstoff. ( o ): Abnahme des Gesamtsäurebindungsvermögens während des Wachstums.  
 Einschub: Eichkurve zur Bestimmung der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration in Wasser. Die Eichlösungen wurden durch Verdünnung einer 80 mM Stammlösung mit  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser in  $\text{N}_2$  Atmosphäre hergestellt. Der Pfeil gibt den Blindwert für 120 mM HEPES ( $24 \pm 1$  m val) in  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser an.

## 17.4 Autoradiographische Analyse von SDS-Gelen

Wegen der extremen Materialknappheit unter Hochdruckbedingungen und nicht zuletzt, weil mit Silberfärbung nicht alle Proteine erfaßt werden (Negativbanden bei PAS-positiven Proteinen) wurden druckbehandelte und nichtbedrückte Zellextrakte auf SDS-Gelen verglichen, wie in Abb.53 dargestellt.



**Abb 53:** Autoradiographische Auswertung der SDS-PAGE. 35  $\mu$ l  $^{14}$ C-markierter Zellextrakt wurde 15 h gegen 5 ml SDS-Sample-Buffer äquilibriert; A (—): Standardbedingungen (65°C, 1 bar, 10 h); die Autoradiographiezeit war 8 Tage. B (—): Unter Hochdruck (65°C, 500 bar, 10 h); die Autoradiographiezeit betrug 14 Tage. Eichproteine im Densitogramm: 1: Phosphorylase B (92600); 2: BSA (66200); 3: Ovalbumin (45000); 4: Carboanhydrase (31000); Trypsininhibitor aus Soyabohnen (21000); 6: Lysozym (14500):

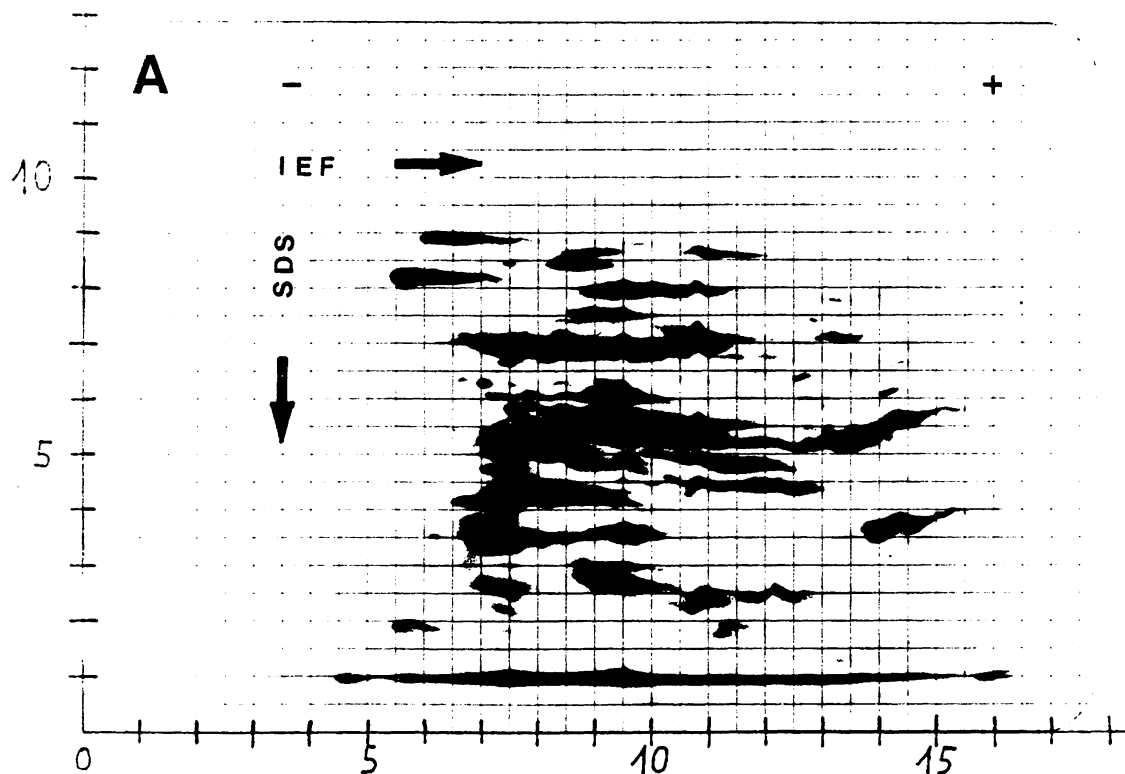
Die Auswertung ergibt eine einschneidende Veränderung im Proteinmuster von bedrückten im Vergleich zu unbehandelten Proben. Generell konzentriert sich das Gros der Proteine unter

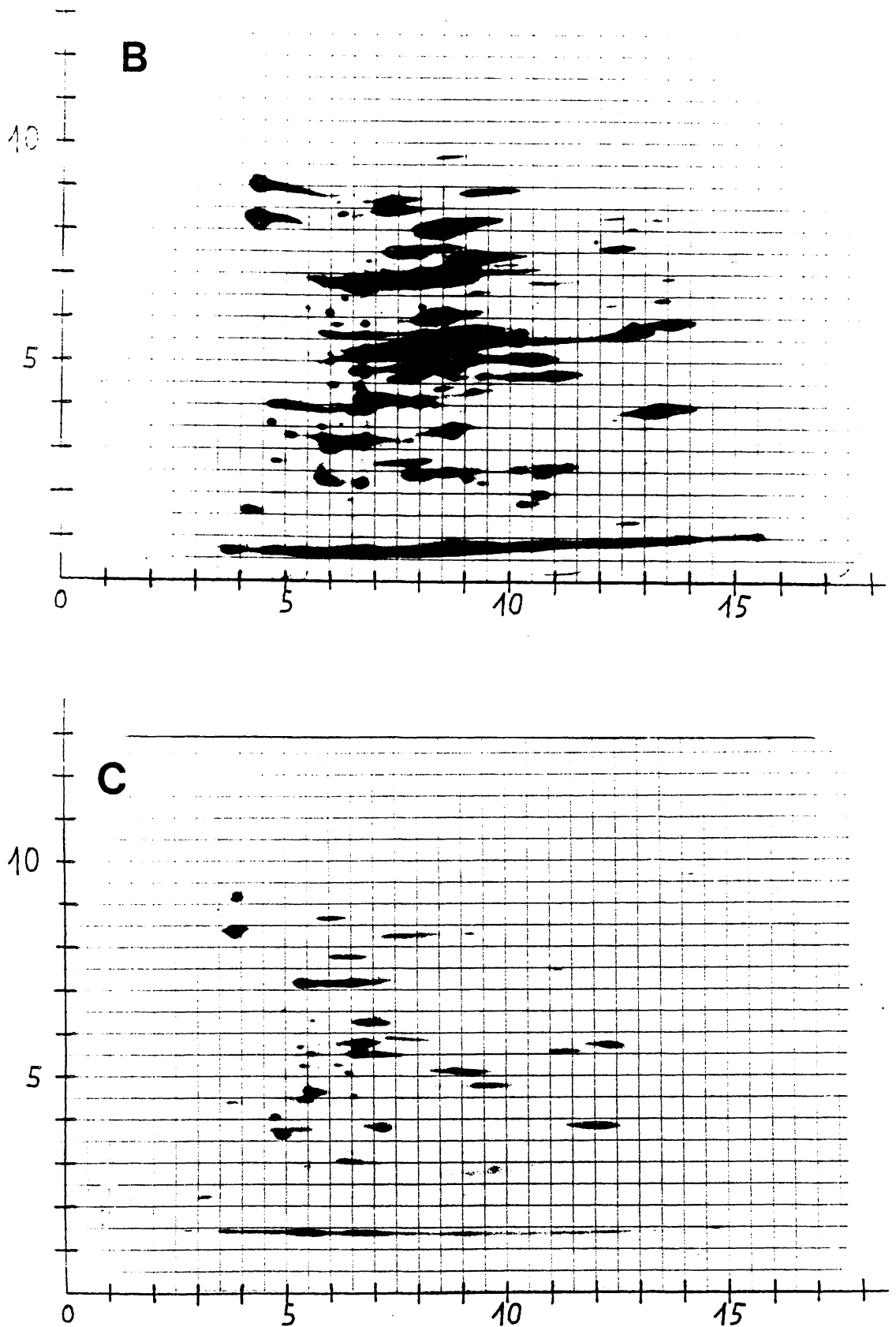


Hochdruck im Bereich niedriger Molekulargewichte; besonders auffällig ist die Häufung von Peaks hoher Intensität beim Molekulargewicht um 38000. Der Einwand, es könnte sich um Artefakte, sprich Spaltprodukte höhermolekularer Proteine handeln, wird aus zweierlei Gründen entkräftet: Erstens sind die Zellen unter Hochdruck vollkommen intakt -es tritt sogar bei 65°C und 500 bar optimales Wachstum auf- im Vergleich mit Kontrollen bei allen übrigen Temperaturen sowohl bei Atmosphärendruck, als auch bei allen beliebigen Drücken. Zweitens sind die quantitativen Diskrepanzen zwischen der Gesamtkonzentration an Protein und der Verteilung der einzelnen Peaks offensichtlich.

### 17.5 Optimierung der IEF-Bedingungen

Für das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei O'Farrell-Gelen sind die Auftrennungsbedingungen während der ersten Dimension von entscheidender Wichtigkeit (O'Farrell et al, 1977; Duncan & Hershey, 1984).



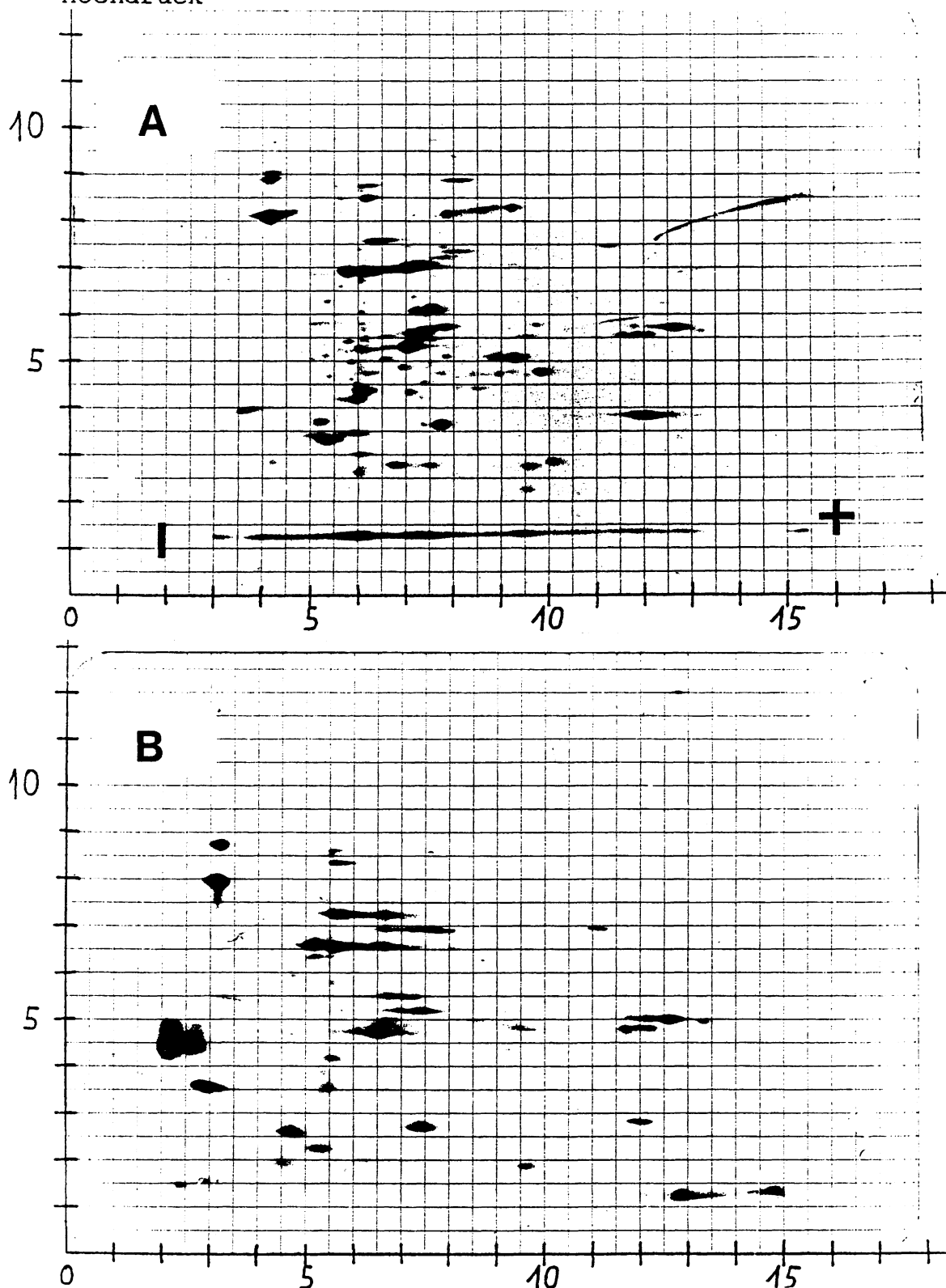


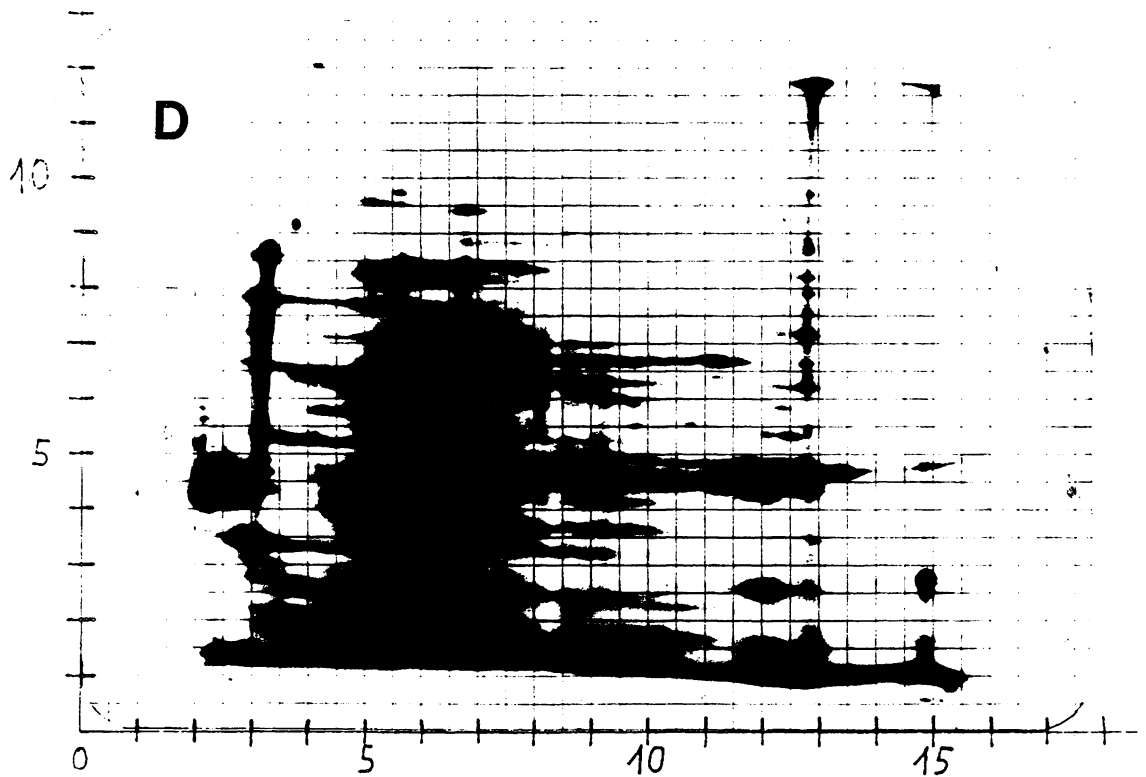
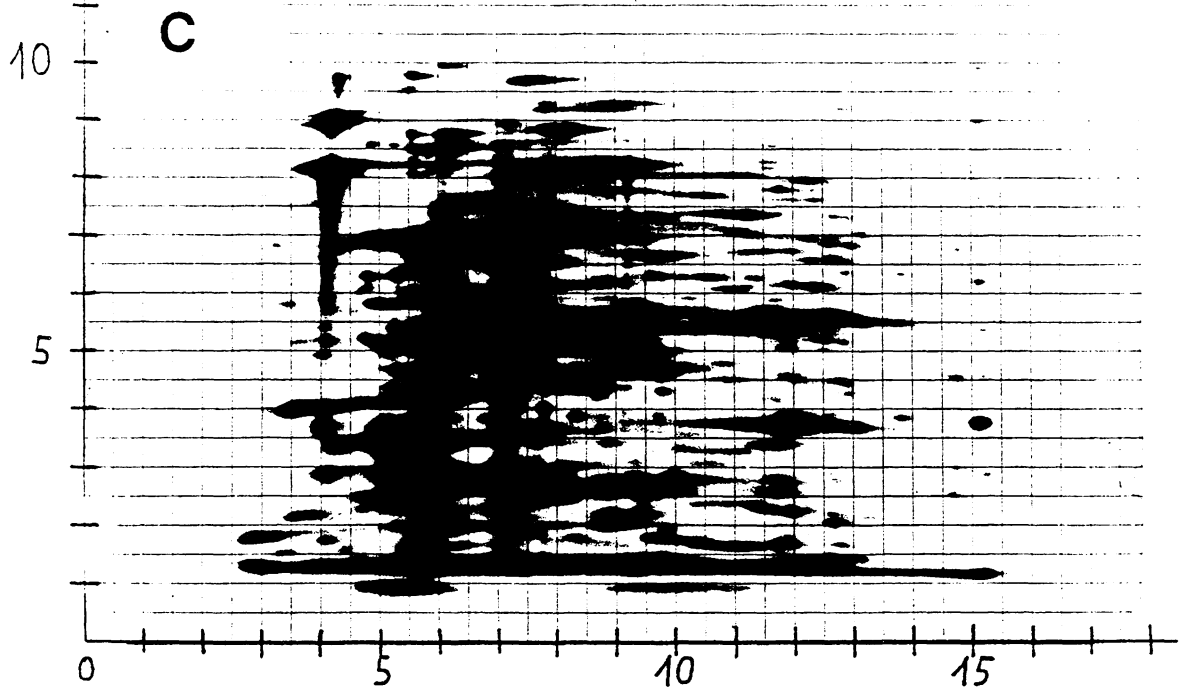
**Abb. 54:** 2-D-Elektropherogramme von Zellextrakten aus Schüttelkulturen von *Mc. thermolithotrophicus* (65°C) in Abhängigkeit von der angelegten Spannung während der isoelektrischen Fokussierung.

A: 1,9 kBq wurden auf die erste Dimension aufgetragen; 15 h 400 V, 1h 1200 V; Autoradiographiezeit, 8 Tage.  
 B: 1,8 kBq; 15 h 400V, 1h 1000V; 7 Tage Exposition.  
 C: 2,0 kBq; 15 h 400V, 1h 800V; 3 Tage.

Die optimalen Bedingungen für die IEF sind 800 Vh, wobei 15 h 400 V und dann zur Anschärfung der Banden 1 h 800 V angelegt werden. Das Verschmieren der Flecken bei zu hohen Spannungen ist auf die Konstruktionseigentümlichkeiten der verwendeten Apparatur zurückzuführen: Die entstehende Wärme wird nur unzureichend abgeführt.

#### 17.6 2-D-Gele von Proben unter Standardbedingungen und unter Hochdruck





**Abb. 55:** Autoradiogramme von O'Farrell-Gelen bedrückter und unbedrückter Kulturen von *Mc. thermolithotrophicus*. IEF: 6800 Vh (15 h 400V, 1 h 8000 V); SDS-PAGE: 30 min 300V, 6h 200V.  
A: 1,86 kBq Extrakt einer Kultur die 10 h unter Standardbedingungen (65°C, 1 bar) angezogen wurde; Exposition: 4 Tage.  
B: 0,68 kBq Extrakt; Zellen bei 65°C und 500 bar, 10 h gezogen.  
C: Wie A, jedoch 14 Tage aufgelegt.  
D: Wie B, aber 30 Tage exponiert.

Beim Vergleich der Autoradiogramme der Proben, die bei 65°C und Atmosphärendruck und bei 500 bar und 65°C aus der stationären Phase gewonnen wurden, fallen dramatische Veränderungen im Proteinemuster auf. Man findet bei den druckinkubierten Proben u.a. einen "Proteinkomplex" mit einem Molekulargewicht um 70 000, der in dieser Form unter Standardbedingungen nicht auftritt (Ni-Tuben 65°C 1 bar). Am augenfälligsten ist jedoch ein durch Hochdruck induzierter Komplex aus mindestens vier Proteinen mit einem ungefähren Molekulargewicht  $\approx$  38 000, wie es sich bereits in Abb. 54 andeutete.

Diese Proteine sind hochbasisch; dieser Befund korreliert ausgezeichnet mit dem Vergleich des prozentualen Anteils an Aminosäuren unter Hochdruck bzw. unter Normaldruck. Aus der Tabelle 13 ist zu entnehmen, daß nach Inkubation von *Mc. thermolithitrophicus* bei 500 bar und 65°C der Arg und der Lys Gehalt bzgl. der Standardbedingungen drastisch erhöht ist (37.4% Arg gegenüber 1.2% und 4.1% Lys gegenüber 2.9%). Das Argument, es handle sich unter Hochdruck bzw. unter Normaldruck um verschiedene Organismen, ist hinfällig, da das Gesamtmuster der Proteinverteilung durchaus identisch ist, abgesehen von morphologischen (Lichtmikroskop bzw. Elektronenmikroskop) und den fluoreszenzmikroskopischen Übereinstimmungen (bzgl. der Kulturbedingungen  $H_2/NaHCO_3$  als einziges Substrat). Nimmt man die Befunde 1. aus dem Vergleich der Emissionsspektren der Extrakte, 2. die Ergebnisse der Aminosäureanalyse (qualitativ und quantitativ), 3. die Resultate aus der SDS PAGE und den O'Farrell-Gelen von Proben unter Hochdruck bzw. Normaldruck zusammen (Hinweise ergeben sich bereits aus den Wachstumskurven bei 56°C), so muß man daraus folgern, daß unter Hochdruck einschneidende Umstellungen im Zell-Stoffwechsel vonstatten gehen, die als Anpassungen an Hochdruck verstanden werden müssen. Werden Zellen oder höhere Organismen erhöhten Temperaturen ausgesetzt, so synthetisieren sie eine Anzahl von hochkonservierten Proteinen die sogenannten "Heat-shock-Proteine" (hsp). Diese Antwort ist universell, von den Archaeobakterien (Daniels et al., 1984) bis zum Menschen (Hunt & Marimoto, 1985). Neben diesen Proteinen, die ubiquitär vorkommen, sind kleine "Heat shock-Proteine" beschrieben worden, über die aber so gut wie nichts bekannt ist (Anderson et al., 1982; Reiter & Penman, 1983;

Maytin et al., 1985); wenn es sich im Falle von *Mc. thermophilus* um ähnliche Phänomene handelt, so wären die stark basischen Proteine wohl mit dieser Gruppe von "Heat-shock-Proteinen" in Beziehung zu setzen, da z.B. hsp 70 einen Isoelektrischen Punkt im Sauren aufweist und die Komponente in den 2-D-Gelen mit vergleichbarem Molekulargewicht im Neutralen bzw. leicht Sauren liegt.

### III. Zusammenfassende Diskussion

Betrachtet man die Wasser-Landverteilung, so zeigt sich, daß der weitaus größte Teil der natürlichen Habitate durch Temperaturen im Bereich des Gefrierpunkts (ca.  $2^{\circ}\text{C}$ ) oder sogar darunter, im Zusammenwirken mit hohen hydrostatischen Drücken bis 1200 bar gekennzeichnet ist. Aus der Tatsache, daß über 75% der Erdoberfläche von Ozeanen mit einer durchschnittlichen Tiefe von 3800 m bedeckt sind, folgt, daß hoher hydrostatischer Druck, vereint mit niedriger Temperatur, hoher Salinität, extremer Knappheit an organischen Nährstoffen und absoluter Dunkelheit einen biologisch bedeutsamen, ökologischen Faktor darstellt. Biologisch-chemische Untersuchungen konzentrierten sich von Anfang an sowohl auf die Ebene des Organismus als auf die des Moleküls. Neben Laboratoriumsversuchen an Bakterien (mesophile und psychrophile), Protozoen, Hefen, niederen Organismen, aber auch Fischen konzentrierten sich die biologischen Studien auf Probleme der Differenzierung, Entwicklungsphysiologie, Stoffwechselphysiologie und Ökologie niederer und höher entwickelter Organismen in situ, d.h. im natürlichen oder simulierten Tiefseebioptop ( $\approx 2^{\circ}\text{C}$ , Drücke bis 1200 bar). Physikalisch-biochemische Experimente waren zunächst auf die Aufklärung der Hochdruck-Denaturierung bzw. -Desaktivierung von Proteinen und Enzymen beschränkt.

Physikalisch-chemisch betrachtet, setzen Druckeffekte endliche Reaktionsvolumina ( $\Delta V$ ) oder Aktivierungsvolumina ( $\Delta V^*$ ) voraus. Für Gleichgewichts- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten gelten die Gleichungen 1 und 2; in beiden Definitionen wird das Gesamtsystem, einschließlich des Lösungsmittels betrachtet. Die Druckabhängigkeit isolierter biochemischer Reaktionen erweist sich dabei als ähnlich komplex wie die Druckabhängigkeit der physikalischen Charakteristika des wässrigen Lösungsmittels wie Fluidität, Viskosität (Hills, 1972), Ionenleitfähigkeit (Hills, 1972) und der thermische Ausdehnungskoeffizient (Frank, 1970). Da alle drei Parameter bzgl. ihrer T/P-Profile, Optimumskurven aufweisen, kann hoher hydrostatischer Druck sowohl stabilisierend, wie destabilisierend auf biochemische Systeme wirken; der Hochdruckeffekt

scheint dann -je nach Temperatur- eher von der Solvation, als von den intrinsischen Eigenschaften der verschiedenen Zellkomponenten abzuhängen. Biochemische Prozesse können anomale Druckprofile mit Denaturierungs-Desaktivierungs-Reaktionen bei hohen Drücken oder aber mit Schutzfunktion, ja sogar Aktivierung aufweisen (Jaenicke, 1981). Darin spiegelt sich die feinregulierte Ausgewogenheit der schwachen intermolekularen Wechselwirkungen, die jeglicher Art von biochemischer Struktur in wässriger Lösung Stabilität verleihen, wieder. Druck bewirkt strukturelle Änderungen in Proteinen, die allgemein gesprochen, durch Verschiebung des Gleichgewichts (Allosterie) und Volumenänderungen, durch Binden bzw. Entlassen von Liganden verursacht werden. Desaktivierung von Enzymen entsteht aus Strukturänderungen, also Denaturierung und Dissoziation in Untereinheiten, oder als Einfluß auf den Reaktionsmechanismus der enzymatisch katalysierten Reaktion (Jaenicke, 1983). Bisher lag der Schwerpunkt der durchgeführten Hochdruckuntersuchungen auf der Fragestellung, welchen Einfluß hohe Drücke auf Ligandenbindung bzw. Dissoziations- und Assoziationsreaktionen ausüben.

An Enzymreaktionen sind sowohl Protonierungen und Deprotonierungen bzw. die Bindung oder Dissoziation von Koenzym beteiligt. Beide Reaktionstypen sind mit beträchtlichen Volumenänderungen verknüpft. Die Katalyse wird je nach Vorzeichen und Betrag der Werte für  $\Delta V$  und  $\Delta V^*$  durch Hochdruck beeinflusst.

Es ist eine Reihe von Beispielen bekannt, bei denen bei der Bildung von Holoenzym aus Apoenzym und Koenzym  $\Delta V$  signifikant abnimmt, d.h. die Bildung des binären Komplexes wird durch Druckerhöhung begünstigt. Im Gegensatz dazu weist LDH in vergleichbaren Druckbereichen unveränderte Aktivität auf; dies stimmt mit dem Befund, daß LDH zu jedem Zeitpunkt mit Substrat gesättigt ist, überein. Erst bei weiterer Druckerhöhung auf 1200 bar, fällt die Aktivität auf 0 ab. Der Grund für diesen Aktivitätsverlust ist die Dissoziation des Tetrameren in die Untereinheiten (Schmid et al., 1975). Auf der anderen Seite ist für eine Reihe monomerer Enzyme Druckaktivierung beschrieben worden. Die Beobachtung, daß Hochdruck monomere Enzyme aktiviert, oligomere jedoch hemmt, ist aber keineswegs von allgemeiner Gültigkeit (Penniston, 1971).

Ebenso stellt die Dissoziation keinen universellen Mecha-



nismus für Enzymdesaktivierungen unter den Bedingungen, wie sie in der Tiefsee herrschen, dar (Schmid et al., 1975, 1978, 1979). Stabilisierende Ionen, wie z. B. Phosphat verhindern durch Ausbildung von Ionenpaaren oder die Verbrückung des dreidimensionalen C-Gerüsts in Proteinen die desaktivierenden Auswirkungen von Hochdruck. In diesem Zusammenhang kommt stabilisierenden Effekten in Form von  $\text{NAD}^+$ , Pyridoxalphosphat oder (geladenem) Substrat Bedeutung zu, da bei der Diskussion von druckinduzierten Effekten auf Wachstum und Zellteilung (Hemmung) ubiquitär in der Zelle vorhandene Komponenten, wie Coenzyme und Metaboliten mit berücksichtigt werden müssen. Effekte dieser Art, wie sie an isolierten, hochgereinigten Enzymsystemen beobachtet werden, treten jedoch bei Ligandenkonzentrationen, wie sie in der intakten Zelle vorliegen, nicht auf (Schade et al., 1980; Müller et al., 1981; Seifert et al., 1985).

Die Entropie-getriebene endotherme Polymerisation von TMV-Protein kommt durch Wasseraustritt zustande (Jaenicke & Lauffer, 1969). Dieser Prozess wird wegen der Zunahme des partiellen spezifischen Volumen bei der Assemblierung des TMV-Kapsomers durch hohe Drücke gehemmt. Der intakte Nukleoprotein-Komplex weist gegenüber Hochdruck höhere Stabilität auf. Im oben Gesagten wurde die Komplexität der zugrundeliegenden Mechanismen und deren gegenseitige Abhängigkeit, die die Stabilität von Proteinen bewirken, hinreichend dargestellt.

Hemmende Einflüsse von Hochdruck auf zellulärer Ebene hängen wohl auch mit der Desaktivierung von Schlüsselenzymen zusammen (ZoBell & Kim, 1972). Daneben existieren eine Vielzahl zusätzlicher Mechanismen, über die Hochdruck Wachstum und Vermehrung, wie auch die Geschwindigkeiten physiologischer Abläufe beeinflusst, beispielsweise: Änderungen im Ionisationsgrad von Puffersubstanzen, mit dadurch bedingter Verschiebung des pH-Wertes (Distèche, 1972), Änderungen in der Cytoplasma-Viskosität bzw. Effekte auf den Sol-Gel-Zustand (Sleigh & Macdonald, 1972; Zimmermann, 1970; Macdonald, 1984); Störungen der Ultrastruktur ganzer Zellen oder von Zellbestandteilen (Organellen), wie z. B. Flagellin, oder Auswirkungen auf Zellteilung oder Zellwandbildung (Schreiber & Vidaver, 1973); Einflüsse auf Membranpermeabilitäten und

Transportsysteme (Macdonald, 1984); Beeinflussung von DNA, Replikation, Transkription und Protein-Biosynthese (Landau & Pope, 1980). Die uns bekannten Druck- und Temperaturkoeffizienten biochemisch relevanter Prozesse deuten darauf hin, daß die ökologische Verteilung der Organismen auf unseren Planeten vorwiegend durch die Temperatur bestimmt ist. Der Grund hierfür wird klar, wenn man typische Werte für Aktivierungsvolumina, wie sie für Oberflächenwässer und die Tiefsee charakteristisch sind vergleicht. Der Übergang von 1 bar und 20°C auf 200 bar und 2°C führt bei einem Temperaturunterschied von nur 18°C zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit um 400%; hingegen bewirkt der Druckanstieg lediglich eine Verlangsamung um 12% (Low & Somero, 1975). Hochdruck gewinnt in extremen Biotopen wie z. B. hydrothermalen Quellen an Bedeutung, da das Leben an die Verfügbarkeit von Wasser gebunden ist. Um Wasser im flüssigen Aggregatzustand zu halten ist bei den extremen Temperaturen hoher Druck erforderlich. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß an extreme Bedingungen adaptierte Enzyme gegenüber Hochdruck erhöhte Stabilität aufweisen, so z. B. LDH aus *B. stearothermophilus*, die bei 2.8 kbar noch nicht denaturiert (Müller et al., 1984). Angesichts dieser Befunde stellt sich die Frage, ob nicht umgekehrt, mit Hochdruck höhere Thermostabilität verknüpft ist.

Wie bereits erwähnt, werden eine beträchtliche Zahl von enzymatischen Reaktionen durch Hochdruck beschleunigt, während ebenso eine Vielzahl gehemmt werden. In vivo kooperieren beide Effekte und führen daher in unterschiedlichem Ausmaß zu Stoffwechsel-Entgleisungen. All diese Effekte werden durch die Dauer der Kompression, die Temperatur, chemische Zusammensetzung des Mediums, den pH, die Salinität und die Konzentration der Substrate mit beeinflußt. Sicherlich können all diese Einflüsse von Hochdruck durch eine einfache Erhöhung der Temperatur oder die Veränderung eines anderen Parameters nicht aufgehoben oder sogar umgekehrt werden, da alle Parameter an den nichtkovalenten, schwachen Wechselwirkungen in unterschiedlicher Art und Weise angreifen, z.B. erfordert die Druckdenaturierung ein Aufbrechen dieser Wechselwirkungen in einer anderen Reihenfolge, als sie bei der Hitzedenaturierung beobachtet wurde.

Andererseits ist eine Stabilisierung von MDH gegenüber hoher Temperatur durch das Einwirken hoher Drücke beschrieben worden. Ebenso gibt es Hinweise, daß durch Hochdruck der Überlebensbereich von Mikroorganismen in Richtung auf höhere Temperaturen verschoben wird (Marquis, & Matsumura, 1978).

1983 berichteten Baross und Deming von "Black smoker"-Bakterien, die aus hydrothermalen Quellen der Tiefsee isoliert worden waren und bei 250°C und einem Druck von 265 bar wachsen sollten; die Voraussetzung für das Wachstum sei lediglich die Verfügbarkeit von flüssigem Wasser. In diesem Zusammenhang stellen sich zwei Fragen: 1. Werden Biomoleküle durch hohe Drücke bei extrem hohen Temperaturen stabilisiert und wird dadurch der hydrolytische Abbau durch die relativ niedrigen Drücke (265 bar) verzögert, bzw. vollkommen unterdrückt? 2. Kann durch Hochdruck der Überlebensbereich thermophiler Mikroorganismen erweitert werden, bzw. wird das Temperaturoptimum ( $T_{\text{Maximum}}$ ) zu höheren Temperaturen verschoben? Die Überprüfung der Hypothese, ob die Verfügbarkeit flüssigen Wassers (ungeachtet der extremen Temperatur von 300°C) die einzige Voraussetzung für Leben darstellt, erfolgte in zweierlei Richtung. Die obere Temperaturgrenze, an der lebende Systeme gerade noch existieren können, wird durch den hydrolytischen Abbau ihrer molekularen Bestandteile festgesetzt. Die Peptidbindung in Proteinen, die Phosphodiester-Bindung und die N-Glycosylbindung in DNA und RNA und Pyrophosphat-N-Glycosylbindung in Nukleotiden wie ATP und NAD sind die wichtigsten, die der hydrolytischen Spaltung unterworfen sind. Der Abbau von Biomolekülen auf nicht hydrolytischen Wege, wie Decarboxylierung und Dehydrierung, stellt ebenfalls einen kritischen Faktor dar, der die obere Temperaturgrenze für Leben definiert. Sind Biomoleküle unter "Black smoker"-Bedingungen stabil?

Kulturversuche von *Thermotoga maritima* unter "Black smoker"-Bedingungen führten zu negativen Ergebnissen, lieferten aber interessante Hinweise. Nach der hydrothermalen Behandlung der mit *Thermotoga maritima* beimpften Medien waren keine Aminosäuren mehr nachweisbar. Die im Chromatogramm nachweisbaren Peaks konnten keiner der proteinogenen Aminosäuren zugeordnet werden. Die Inkubation von Aminosäuren, Polyglycin und intakten Zellen von *Pyrodictium occultum* (dem bisher extremst

thermophilen Organismus) unter "Black smoker"-Bedingungen führten zu dramatischen Modifikationen und zum Abbau der einzelnen Aminosäuren, sowie zur hydrolytischen Spaltung von Polyglycins. Pyrodictium, das bzgl. seines Aminosäurerepertoires keinerlei Besonderheiten aufweist, liefert unter diesen Extrembedingungen exakt dieselben Resultate. Die von Baross und Deming beschriebenen zusätzlichen Peaks in der Aminosäureanalyse sind zweifelsfrei Ninhydrin-positive Spaltprodukte von HEPES. Bei 250°C ist der hydrothermale Abbau natürlicher Aminosäuren bei pH 7 (pH 2) bereits bei 150°C (120°C) signifikant. Einen indirekten Hinweis, daß die Thermostabilität kritischer Zellbestandteile für das Wachstum thermophiler Organismen bei hohen Temperaturen verantwortlich ist und nicht die erhöhte Resynthese (turnover) liefern die Aktivierungsenergien des Wachstums, die im Übrigen sowohl bei psychrophilen, mesophilen und thermophilen Bakterien sehr ähnlich sind (Amelunxen & Murdock, 1978). Kinetische Untersuchungen zur hydrothermalen Zersetzung von Aminosäuren, Polyglycin und ganzer Pyrodictium-Zellen zeigen eindeutig, daß die Halbwertszeiten der Hydrolyse für das Wachstum von Mikroorganismen unter "Black smoker"-Bedingungen wesentlich kürzer sind als die Generationszeit der "Baross-Bakterien". Zu denselben Resultaten kommt White (1984) bzgl. der Hydrolysestabilitäten von Nukleotiden, Zuckerbestandteilen und Phosphordiesterbindungen, die die Struktur von DNA und RNA ausmachen. Zusammengekommen zeigen diese Ergebnisse eindeutig, daß, derartige Organismen bei 300°C, unabhängig vom hohen Druck, keinesfalls existieren können, sofern sie aus Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren aufgebaut sind. In der Zwischenzeit ist auch von Trent et al. (1984) gezeigt worden, daß Baross und Deming Artefakten aufgesessen sind. Extrem Thermophile scheinen keine besonderen stabilisierenden Schutzmechanismen zu besitzen um ihre Zellbestandteile gegen Hydrolyse bei hohen Temperaturen zu schützen; es muß demnach davon ausgegangen werden, daß die derzeit bekannte oberste Temperaturgrenze von 110°C äußerst nahe an der maximalen Temperatur, an der Leben noch existieren kann, liegt, da sie durch die chemische Natur der Biomoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren definiert ist. Wenn schon Leben unter solch exotischen äußeren Umständen wie hohen Temperaturen bis 300°C selbst

durch das Anlegen hoher Drücke, nicht möglich ist, besteht nicht dennoch die Möglichkeit, daß hoher hydrostatischer Druck in der Lage ist den Temperaturtoleranzbereich thermophiler Mikroorganismen auszuweiten?

Die zentrale Rolle des Wassers bei allen zellulären Prozessen schließt die Tatsache ein, daß das Hydronium-Ion bzgl. der Wachstums- und Vermehrungsgrenzen bei allen Mikroorganismen (außer Acido- und Alkaliphilen) den wichtigsten Faktor darstellt. Die Effekte der  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration auf die Struktur und Funktion von Makromolekülen ist hinreichend bekannt. Stärkere Schwankungen des pH sind normalerweise toxisch, da der pH-Wert zu Ladungsveränderungen an Zelloberflächen bzw. Veränderungen des Ionisationsgrads von Metaboliten und anorganischen Ionen führt.

Wie weiter vorne bereits diskutiert, beeinflusst hoher Druck direkt Protonierungs- und Deprotonierungs-Gleichgewichte, bewirkt dadurch in unzureichend gepufferten Medien pH-Verschiebungen und schränkt den pH-Bereich von Mikroorganismen (sekundärer Druckeffekt auf das Wachstum) ein.

Um primäre Druckeffekte von Sekundäreffekten (wie z. B. Gaslöslichkeit und pH) separieren zu können, mußten zunächst die Anzuchtbedingungen von *Mc. thermolithotrophicus* im Hinblick auf die Probleme bei Hochdruckuntersuchungen optimiert werden. Dies war nicht unproblematisch, da *Mc. thermolithotrophicus* die gasförmigen Substrate  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  als einzige Energiequelle nützt, die Gaslöslichkeiten aber bekanntlich durch die (antagonistischen) Parameter Temperatur und Druck entscheidend beeinflusst werden. Mit dem Ansteigen der gelösten  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium sinkt der pH-Wert. Zusätzlich übt Hochdruck auf die Dissoziationskonstanten schwacher Säuren einen direkten Einfluß gemäß

$$\Delta\text{pH} = 0.4343 \frac{\Delta V}{R \cdot T} \cdot \Delta P$$

aus. Die Bestimmung der in situ ( $65^\circ\text{C}$ , 2 bar  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ , 80:20) pH Toleranz von *Mc. thermolithotrophicus* ergibt eine breites Optimum um pH 6.5 mit pH 5.5 als unterer und pH 7.5 bis 8.0 als oberer Grenze. pH-Messungen unter Hochdruck bei  $65^\circ\text{C}$  in

Gegenwart bzw. in Abwesenheit von gasförmigem  $\text{CO}_2$  in Medien mit verschiedenen Puffersubstanzen lieferten folgendes Ergebnis: Dem mit Acetat, Cystein.HCl und Vitaminen supplementierten Minimalmedium muß HEPES in einer Konzentration von 120 mM als Puffersubstanz zugesetzt werden. Das jetzt als  $\text{MG}^-$ -H bezeichnete Medium fängt dann alle erdenklichen pH-Verschiebungen, seien sie durch die Temperatur ( $65^\circ\text{C}$ ), die  $\text{CO}_2$ -Konzentration oder durch Hochdruck hervorgerufen, vollständig ab; damit ist für *Mc. thermolithotrophicus* ein ideales pH-Milieu geschaffen. Dies spiegelt sich in den Erträgen nach Druckinkubation in verschiedenen Medien wieder. Während in unzureichend gepufferten Medien bereits bei Drücken  $< 50$  bar Wachstum und Vermehrung vollständig zum Erliegen kommen, werden in  $\text{MG}^-$ -H bei  $65^\circ\text{C}$  und 500 bar optimale Erträge erzielt. Daß es sich bei diesen Ertragsteigerungen (500 bar gegenüber 1 bar) um druckbedingte Sekundäreffekte, hervorgerufen durch die verbesserte Substratversorgung ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) handeln könnte, wird durch Löslichkeitsdaten ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) bzw. durch Analyse der für Wachstum erforderlichen Schwellkonzentrationen von Wasserstoff ausgeschlossen. *Mc. thermolithotrophicus* erfährt bei  $65^\circ\text{C}$  bei 500 bar eine Druckaktivierung um Faktor  $6 \pm 2$  gegenüber Atmosphärendruck. Die optimalen Wachstumsbedingungen sind: 3 ml beimpftes  $\text{MG}^-$ -H + 7 ml  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20) unter einem Gasdruck von 4 bar,  $65^\circ\text{C}$  und 500 bar. Dieses Ergebnis wird durch die Erstellung von Wachstumskurven in Abhängigkeit von Druck und Temperatur bestätigt. Das Wachstum bei  $65^\circ\text{C}$  und 500 bar gegenüber  $65^\circ\text{C}$  und Atmosphärendruck ist beschleunigt, während bei nicht-optimalen Temperaturen ( $56^\circ\text{C}$  bzw  $75^\circ\text{C}$ ) Druckhemmung in den Vordergrund tritt. Diese Hemmeffekte werden durch morphologische Veränderungen, d.h. Zelldeformationen unterstrichen; z.B. findet man bei  $65^\circ\text{C}$  und 700 bar anomal große Zellen, die keine Querwände eingezogen haben, bei  $65^\circ\text{C}$  und Drücken  $> 1000$  bar herrschen "Minizellen" vor.

Zusammenfassend lassen diese Experimente die Aussage zu, daß zumindest im Falle von *Mc. thermolithotrophicus* Hochdruck den Temperaturtoleranzbereich nicht signifikant verbreitert, d.h. *Mc. thermolithotrophicus* hat sein Temperaturoptimum sowohl unter Hochdruck als auch bei Atmosphärendruck an der selben Stelle, nämlich bei der Temperatur von  $65^\circ\text{C}$ ; ebenso liegen

$T_{\max}$  unter Hochdruck und Atmosphärendruck bei denselben Werten. Weiterhin geht aus den Daten klar hervor, daß *Mc. thermolithotrophicus* am Temperaturoptimum bei 65°C gegenüber Hochdruck am widerstandsfähigsten ist. Ertrag und Wachstumsgeschwindigkeit werden bei 65°C und 500 bar sogar erhöht. Je weiter die Temperaturen vom T-Optimum entfernt sind (in beide Richtungen 56°C ← 65°C → 75°C) um so stärker wirkt sich der hemmende Einfluß von Hochdruck auf Wachstum und Vermehrung aus. Bis zu diesem Punkt weist *Mc. thermolithotrophicus* gegenüber den von anderen Arbeitsgruppen untersuchten Bakterien, trotz des günstigen Reaktionsvolumens der Netto-stoffwechsel-Bilanz bzgl. des Druck/Temperaturverhaltens wenig Besonderheiten auf.

Einen Hinweis, daß bei Inkubation unter Hochdruck Veränderungen und Umstellungen in der Zelle vorsichgehen, lieferten Experimente bei 56°C und 220 bar (nichtoptimale Bedingungen) sofern Substrat ( $H_2/CO_2$ , in unterschiedlichen Konzentrationen) zur Verfügung stand. Werden die Zellen 70 h bei 56°C in Abwesenheit von Substrat inkubiert, so weisen sie weder licht-, noch fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch Abnormalitäten auf. Wird jedoch Substrat angeboten, also die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung von Stoffwechselvorgängen gewährleistet, dann zeichnen sich die Zellen nach 6 h durch erhöhte Labilität gegenüber mechanischer Beanspruchung bzw.  $O_2$  aus. Parallel zu diesen morphologischen Veränderungen verläuft die Wachstumskurve; sie sinkt bei 56°C und 220 bar nach 6 h unter die Animpfdichte ab, führt aber dann, sofern ausreichend Substrat zur Verfügung steht, zu Zelldichten von  $5 \cdot 10^7$  Zellen pro ml. Werden die Zellen 24 h bei 56°C und 220 bar vorinkubiert, anschließend in frisches Medium überimpft und dann wieder bei 56°C und 220 bar gehalten, so erhält man Wachstumskurven mit Zelldichten von  $1 \cdot 10^8$  Zellen pro ml, ohne daß der Kurvenverlauf einen Knick nach 6 h aufweist. Werden die 24 h bei 56°C und 220 bar vorinkubierten Suspensionen von *Mc. thermolithotrophicus* hingegen 48 h im Kühlschrank aufbewahrt, dann nach Überimpfen wieder 56°C bei 220 bar ausgesetzt, so findet man den "ursprünglichen" Kurvenverlauf mit einem Knick nach 6 h. Dieses Verhalten könnte auf zweierlei Art erklärt werden:

- Durch Inhomogenität der Kultur (Mischpopulation) d.h. es werden während des Experiments barotolerante Varianten herausselektioniert.

- Durch Umstellung des Zell-Stoffwechsels, wie z.B. Enzyminduktionen, um *Mc. thermolithotrophicus* in die Lage zu versetzen, hohe Drücke unbeschadet tolerieren zu können; daß sich die Zellen während dieser Umstellungsphase durch besondere Labilität auszeichnen erscheint nicht unwahrscheinlich. Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurde das Aminosäuremuster von Proben, die bei 65°C und 500 bar gezogen wurden mit Kontrollen bei 65°C und Atmosphärendruck verglichen. Neben dem extrem hohen Gehalt an Arg (37.4%) in den druckbehandelten Proben tritt nach 6 h Inkubation bei 500 bar ein zusätzlicher Peak, der bei druckunbehandelten Kontrollen nur ansatzweise angedeutet ist, mit einer Flächenzunahme um  $\approx 500\%$  in den Vordergrund. Obwohl die Struktur dieser Verbindung durch GC/MS-Kopplung nicht aufgeklärt werden konnte, steht fest, daß es sich um ein primäres Amin handelt, das äußerst hydrophile Eigenschaften aufweist (evtl. ein Hydrolyseprodukt aus Polyaminen). Die prozentualen Anteile von Thr, Lys und Ile in den druckbehandelten Proben sind ebenfalls erhöht. Die besondere Wichtigkeit von Arg, Thr und Ala wurden im Zusammenhang mit der Thermostabilität von Enzymen aus mesophilen im Vergleich mit thermophilen Organismen von Jaenicke (1981) ausführlich diskutiert. Möglicherweise liegen die Verhältnisse bzgl. der Druckanpassung ähnlich; die Abnahme von Ala in den druckinkubierten Proben mag im Antagonismus von Druck und Temperatur liegen. So könnte durch Hochdruck im Zusammenwirken mit hoher Temperatur bei thermophilen Organismen Ala gegen Ile ausgetauscht werden. Das Auftreten der Aminkomponente könnte auf die Existenz von stabilisierenden Faktoren (die keine Proteinnatur besitzen) unter Hochdruck hindeuten. Derlei konnte im Fall thermophiler Organismen nicht nachgewiesen werden. Einen weiteren Hinweis könnte der Unterschied in den Fluoreszenzspektren der bedrückten und nicht bedrückten Zellhydrolysate liefern.

Nachdem durch SDS PAGE abgeklärt worden war, daß sich bei wachsenden *Mc. thermolithotrophicus* Kulturen unter Normalbedingungen das Proteinmuster im Verlauf der Wachstumskurve nicht verändert, wurden radioaktiv markierte Zellextrakte



nach Inkubation bei 65°C und 500 bar mit Kontrollen (unter Standardbedingungen) auf SDS-Gelen verglichen. Unter Hochdruck tritt ein Komplex von Proteinen mit einem Molekulargewicht um 38 000 auf, der unter Normalbedingungen vollständig fehlt. Die Auswertung von O'Farrell-Gelen zeigt, daß sich die Proteinmuster unter Hochdruck und Atmosphärendruck bzgl. einer Reihe von Proteinen drastisch unterscheiden. Diejenigen Proteine, die unter Hochdruck neu synthetisiert werden, zeichnen sich durch einen isoelektrischen Punkt von 9 - 10 aus und sind folglich stark basisch. Zwar wurden von Thomm (1981) und Chartier et al. (1985) basische, Histon-ähnliche Proteine auch bei Archaeobakterien beschrieben; jedoch fügt sich eine Neusynthese derartiger, die DNA stabilisierender Proteine, nicht in das Bild der bisher bekannten Hochdruckeffekte auf die Nukleinsäurestruktur. Wegen des positiven Vorzeichens des Reaktionsvolumens der Denaturierung wird die native Struktur der DNA durch hohe Drücke stabilisiert; eine Zusatzstabilisierung durch Histone erscheint in diesem Zusammenhang überflüssig. Es ist denkbar, daß Strukturen während der Transkription (Ligasen) bzw. Translation unter Hochdruck stabilisiert werden müssen. E.-coli Ribosomen dissoziieren bereits bei Drücken um 100 bar in ihre Untereinheiten (Schulz et al., 1975, 1976). Angesichts dieser Befunde könnte eine Stabilisierung des Ribosomen (Protein-RNA)-m-RNA-t-RNA-Komplexes (negative Ladungen) durch basische, in der Zelle als Kationen vorliegende Proteine gegenüber Hochdruck erforderlich erscheinen. Entsprechend der anfangs erwähnten Tatsache, daß der Druck als Parameter auf die Zelle als Ganze wirkt, betreffen Hochdruckeffekte das äußere komplexe Gesamtgefüge der Zelle. Überlegungen, die Aufklärung allgemeiner Strukturprinzipien der Barophilie betreffend (sie dürften wie im Falle der Thermophilie wegen der Kleinheit der zusätzlichen Stabilisierungsenergien ebenso wenig aufzuzeigen sein), sollten sich künftig wieder, von der Komplexität des Gesamtorganismus weg, auf die molekulare Ebene zurückverlagern. So ist bis heute der spezifische Anpassungsmechanismus, die beiden variablen Druck und Temperatur betreffend, nach wie vor vollkommen unklar. Ein Schritt zu weiterem Verständnis der gegenseitigen Abhängigkeit von Temperatur und Druck auf das Wachstum von Mikroorganismen und

der evtl. dazu nötigen Schutzmechanismen wäre z. B. die Isolierung und die Sequenzanalyse der bei *Mc. thermolithotrophicus* durch Hochdruck induzierten Proteine. *Mc. Jannaschii*, ein mit *Mc. thermolithotrophicus* auf engeste verwandtes Archaeobakterium wurde aus der Tiefsee isoliert; es wächst bei 85°C optimal. Die Tatsache, daß *Mc. Jannaschii* aus einem Hochdruck-Hochtemperatur-Biotop stammt, gibt zur Vermutung Anlaß, daß die oben beschriebenen basischen Proteine als Folge einer langdauernden Anpassung an das Leben bei 85°C und hohen hydrostatischen Drücken, in großer Menge aus Kulturen, bei Atmosphärendruck isoliert werden können. Ebenso sollte der Versuch, einen extrem thermophilen Gärer, wie z. B. *Thermotoga maritima* auf die Proteinverteilung unter Hochdruck und unter Atmosphärendruck zu untersuchen lohnen; die Probleme, die mit der Handhabung gasförmiger Substrate auftreten, fallen hierbei weg. Die Anzucht ließe sich in großvolumigen Autoklaven als Kulturgefäßen im Litermaßstab direkt durchführen. Die Strukturaufklärung des zusätzlich auftretenden Aminpeaks mittels NMR und GCMS sollte gelingen, wenn zur Detektion eine andere Derivatisierungstechnik, die stabile Produkte liefert, herangezogen wird; oder die Derivatisierung mit OPA zur Peakzuordnung nach der Säule erfolgt. Die chemische Struktur dieser Verbindung könnte die Hypothese unterstützen, daß unter Hochdruck zur Stabilisierung von Zellbestandteilen, im Gegensatz zur Thermophilie, Moleküle, die nicht der Substanzklasse der Proteine angehören, stabilisierenden Einfluß ausüben.

#### IV. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Hochdruckuntersuchungen an thermophilen Bakterien" ist in drei Abschnitte gegliedert: 1. die Optimierung und Entwicklung von Kulturtechniken bei extrem hohen Temperaturen und Hochdruck unter Verwendung von gasförmigen Substraten.

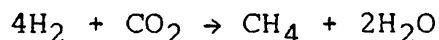
2. die Frage nach der oberen Temperaturgrenze für Leben.

3. die Frage, ob Hochdruck den Temperaturtoleranzbereich thermophiler Archaeobakterien ausweitet.

Nachdem die Hochdruckapparaturen auf Temperaturen bis 400°C ausgelegt waren, wurde eine Kulturtechnik für Methanogene auf den gasförmigen Substraten H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> unter Hochdruck entwickelt. Als Kulturgefäße wurden gasdichte, flexible Nickeltuben verwendet.

In solchen Gefäßen wurden dann die Experimente zur hydrothermalen Stabilität ("Black smoker" Bedingungen) von Biomolekülen durchgeführt. Aminosäuregemische, Polyglycin und ganze Zellen des "pyrophilen" Archaeobakteriums *Pyrodictium occultum* wurden bei 250°C und 260 bar anaerob inkubiert. Das Ergebnis dieser Versuche ist: Biomoleküle überstehen "Black smoker" Bedingungen keinesfalls unbeschadet. Die Hypothese von Baross & Deming, daß die Verfügbarkeit von flüssigem Wasser, ungeachtet der extrem hohen Temperaturen (300°, 265 bar) die alleinige Voraussetzung für Leben darstellt, ist nach diesen Experimenten unhaltbar. Die obere Temperaturgrenze ist wahrscheinlich sehr nahe am Temperaturmaximum von *Pyrodictium occultum* bei 110°C anzusiedeln.

Zur Klärung der Frage ob Hochdruck den Überlebensbereich von Mikroorganismen bzgl. der Temperatur auszuweiten vermag, wurde das thermophile Archaeobakterium, *Mc. thermolithotrophicus*, das seine Stoffwechselenergie aus der Reaktion



(negatives  $\Delta V$ ) verwendet. Die optimale Wachstumstemperatur unter Normalbedingungen (2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ohne externen Druck) beträgt 65°C. Da die CO<sub>2</sub> Konzentration und Hochdruck den pH Wert des Mediums erheblich verschieben können, wurde nach pH Messungen unter in situ Bedingungen (65°C, 2 bar H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> und unter Hochdruck bis 1000 bar) ein supplementiertes Minimalmedium unter Zusatz von 120 mM HEPES (MG<sup>-</sup>H) für die folgenden

Hochdruckuntersuchungen verwendet.

Die Bestimmung des Ertrags und die Auswertung von Wachstumskurven erbrachten folgende Ergebnisse: Hochdruck weitet den Temperaturtoleranzbereich nicht aus. Das Temperatur-optimum von 65°C verschiebt sich unter Hochdruck nicht. Bei dieser Temperatur ist die Toleranz von *Mc. thermolithotrophicus* gegenüber Hochdruck am größten. Bei 500 bar und 65°C wurden sogar Ertragssteigerungen und Beschleunigung des Wachstums (gegenüber Standardbedingungen) beobachtet (3ml MG<sup>-</sup>H + 7 ml H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 4 bar, ohne externen Druck); bei nicht-optimalen Temperaturen (56°, 70° und 75°C) sowie bei 65° (P > 700 bar) treten druck- und zeit-abhängig Zelldeformationen auf. Bei Hochdruckinkubation (65°, 500 bar) werden gegenüber Standardbedingungen auffällige Veränderungen beobachtet:

Emissionsspektren von bedrückten und nicht-bedrückten Zellhydrolysaten zeigen Verschiebungen des Maximums; der prozentuale Anteil basischer Aminosäuren ist bei den bedrückten Proben stark erhöht. Im Aminosäuremuster bei 500 bar und 65°C tritt nach Inkubation > 6 h ein primäres Amin (bei Orthophthalaldehyd-Derivatisierung auf "reversed phase" zwischen Asp und Glu) in den Vordergrund. Unter Hochdruck treten gravierende Veränderungen im Proteinmuster auf. SDS PAGE und O'Farrel Gele zeigen die Induktion einer Reihe stark basischer Proteine (Isoelektrischer Punkt bei 9.5 - 10) mit einer Häufung um 38 kDa unter Hochdruck (65°C, 500 bar). Die chemische Natur dieser Verbindungen und deren Rolle im Zellstoffwechsel müssen durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

## V. Literaturverzeichnis

Algranati, I. D. & Goldemberg, S. H: (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. **103**, 8-15

Algranati, I. D. , Echandi, G. , Goldemberg, S.H. , Cunningham-Rundles & Maas, W. K. (1975) J. Bakterirol. **124**, 1122-1127

Amelunxen, R. E. & Murdock, A. C. (1978) Crit. Rev. Microbiol. **6**, 343-393

Amelunxen, R. E. & Murdock, A. L. (1978) in Kushner, D. J. , Ed. , " Life in Extreme Environments", Academic Press, New York

Anderson, N. L. , Giomettim, C. S. , Gemmell, M. A. Nance, S. L. & Anderson, N. G. (1982) Clin. Chem. **28**, 1084-1092

Aragno, M. (1981) in Lange, O. L. , Nobel, P. S. , Osmond, C. B., Ziegler, H. , Ed. , "Encyclopedia of Plant Physiology" , New Series, **Vol. 12 A**; Physiological Plant Ecology I, Springer Verlag, New York

Asano, T. & Le Noble, W. J. (1978) Chemical Reviews **78**, 419-489

Balch, W. E. , Fox, G. E. Magrum, L. J. Woese, C. R. Wolfe, R. S. (1979) Microbiol. Rev. **43**, 260-296

Baross, J. A. , Deming, J. W. (1983) Nature **303**, 423-426

Baross, J. A. , Lilley, M. D. & Gorman, L. I. (1982) Nature **298**, 366-368

Bernhardt, G. , Lüdemann, H.-D. , Jaenicke, R. , König, H. & Stetter, K. O. (1984) Naturwiss. **71**, 583-585

Brock, T. D. (1967) Science **158**, 1012-1019

- Brock, T. D. (1978) "Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures", Springer Verlag, New York
- Brock, T. D. (1986) Ed. , "Thermophiles, General, Molecular, and Applied Microbiology", Wiley & Sons, New York
- Bruun, A. (1956) *Nature* **177**, 1105-1108
- Bubela, B. (1978) *APEA Journal* 161-166
- CamBbell, J. , Bender, G. R. & Marquis, R. E. (1985) *Can. J. Microbiol.* **31**, 644-650
- Chartier, F. , Laine, B. , Saut re, J.-P. T. & Abagnac, G. (1985) *FEBS Lett.* **183**, 119-123
- Chapman, R. E. & Sturtevant, J. M. (1969) *Biopolymers* **7**, 527-537
- Colwell, R. R. , Tabor, P. S. (1982) in Fanning, K. S. & Manheim, F. T. , Ed. , *The Dynamic Environment of the Ocean Floor*, D. C. Heath, Lexington
- Conway, D. & Libby, W. F. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1077-1084
- Culberson, C. & Pytkovicz, P.M. (1967) *Limnol. Oceanogr.* **13**, 403-417
- Daniels, C. J. , McKee, A. H. Z. , Doolittle, W.F. , Hunt, C. & Marimoto, R. (1985) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 6455-6459
- Deming, J. W. & Colwell, R. R. (1982a), *Bio Science* **31**, 507-511
- Deming, J. W. , Colwell, R. R. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1222-1230
- Deming, J. W. , Tabor, P. S. & Colwell, R. R. (1981) *Microb. Ecol.* **7**, 85-94

Diekert, G. Jaenchen, R. , Thauer, R. K. (1980) FEBS Lett **119**, 118-120

Dietz, A. S. & Yayanos, A. A. (1978) Appl. Environ. Microbiol. **36**, 966-971

Distèche, A. (1959) Rev. scient. Instrum. **30**, 474-478

Distèche, A. & Distèche, S. (1967) J. elektrochem. Soc. **114**, 330-340

Distèche, A. (1959) Rev. scient. Instrum. **30**, 474-478

Distèche, A. (1962) J. electrochem. Soc. **109**, 1084-1092

Distèche, A. (1964) Bull. Inst. Océanogr. Monaco **64** (1320) 1-10

Distèche, A. (1972) Symp. Soc, Exp. Biol. **26**, 27-60

Distèche, A. (1974) in Goldberg, E. Ed. , "The Sea, Vol. 5, Ideas and Observations", Wiley & Sons, New York

Drost- Hansen, W. (1972) Symp. Soc. Exp. Biol. **26**, 61-101

Duncan, R. & Hershey, W. B. (1984) Anal. Biochem. **138**, 144-155

East Pacific Rise Study Group (1981) Science **213**, 31-40

Edmond, J. M. , von Damm, K. L. , McDuff, R. E. , Measures, C. I. (1982) Nature **297**, 187-191

Edsall, J. T. & Wyman, J. (1958) "Biophysical Chemistry", Academic Press, New York

Eirich, L. D. , Vogels, G. D. & Wolfe, R. S. (1978) Biochemistry **17**, 4583-4593

- Eirich, L. D. , Vogels, G. D. , & Wolfe, R. S. (1979) J. Bacteriol. **140**, 20-27
- Ellefson, W. L. , Whitman, W. B. & Wolfe, R. S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 3707-3710
- Fleissner, H. (1920) Gas-u. Wasserfach **91**
- Frank, H.S. (1970) Science **169**, 635-641
- Frankignoulle, M., Wehren, J.C. , Koch, B. & Distèche, A. (1986) in Vorbereitung
- Goldemberg, S. H. , Fernandez, V. & Algranati, I. D. (1982) FEBS Lett **142**, 275-279
- Harned, H.S. & Owen, B. B. (1958) "The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions", 3. Aufl. , Reinhold, New York
- Heefner, H. (1982) Mol. Cell. Biochem. **44**, 81-106
- Heinen, U. J. & Heinen, W. (1972) Archiv für Microbiologie **82**, 1- 23
- Heinen, W. & Lauwers, A. M. (1981) Arch. Microbiol. **129**, 127-128
- Herbert, B. N. & Gilbert, P. O. (1984) Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. **19** (Microbiol. Methods Environ. Biotechnol.) 235-257
- Heyns, K. & Pavel, K. (1957) Z. Naturforschg. 12 b, **97**, 97-115
- Hills, G. J. (1972) Symp. Soc. Exp. Biol. **26**, 1- 26
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. (1980) "Strategien Biochemischer Anpassung", Thieme Verlag, Stuttgart
- Huber, H. , Thomm, M. König, H. Thies, G. & Stetter K. O. (1982) Arch. Microbiol. **132**, 47-50



Huber, R. , Langworthy, T. A. , König, H. , Thomm, M. , Woese, C. , Sleytr, U. B. & Stetter, K. O. (1986) Arch. Microbiol. **144**, 324-333

Jaenicke, R & Lauffer, M.A. (1969) Biochemistry **8**, 3083-3092

Jaenicke, R (1981) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **10**, 1-67

Jaenicke, R. & Koberstein, R. FEBS Lett. **17**, 351-354

Jaenicke, R. (1983) Naturwiss. **70**, 332-341

Jacobs, W. A. , Leburg, M. W. & Maday, E. J. (1986) Anal. Biochemistry **156**, 334-340

Jander, G. & Blasius, E. (1977) "Einführung in das anorganisch- chemische Praktikum", Hirzel Verlag, Stuttgart

Jannasch, H. W. & Taylor, C. D. (1984) Ann. Rev: Microbiol. **38**, 487-514

Jannasch, H. W. (1984) in Rona, P. A. , Bostrom, K. , Laubier, L. & Smith, K. L. Jr. , Ed. , "Hydrothermal Processes at Sea Floor Spreading Centres", Plenum, New York

Jannasch, H. W. (1984) in Kelly, D. P. & Carr, N. G. , Ed. , "The Microbe, Part III, Prokaryotes and Eukaryotes", Soc. Gen: Microbiol. Symp. , Univ Press, Cambridge

Jannasch, H. W. (1985) Proc. R. Soc. Lond. **B 225**, 277-297

Jarrell, K. F. , Colvin, J. R. & Sprott, G. D. (1982) J. Bakterirol. **149**, 346-353

Johnson, F. H. U Eyring, H. (1970) in Zimmerman, A. M. , Ed. "High Pressure Effects on Cellular Processes", Academic Press, New York

Jones, W. J. , Leigh, J. A., Mayer, F. , Woese, C. R. ,

- Wolfe, R. S. (1983) Arch. Microbiol. **136**, 254-261
- König, H. & Stetter, K. O. (1986) System. Appl. Microbiol. **7**, 300-309
- König, H. , Semmler, R. , Lerp, C. & Winter, J. (1985) Arch. Microbiol. **141**, 177-180
- Kriss, A. E. (1962) "Marine Microbiology: Deep Sea", Wiley, New York
- Kritschewski, I.R. (1936) Chem. Ind. **13**, 975-980
- Kritschewsri, I. R. (1935) Z. Phys. Chem. A **175**, 232-238
- Laemmli, U. K. (1970) Nature **227**, 680-685
- Landau, J. V. & Pope, D. H. (1980) Adv. Aquat. Microbiol. **2**, 49-76
- Landoldt-Börnstein, 6. Aufl.(1962) Springer Verlag, Berlin
- Lang, E. W. & Lüdemann, H.-D. (1982) Angew. Chem. **94**, 351-365
- Larsen, B. R. & West, G. (1981) J. Chromatogr. Sci. **19**, 259-265
- Le Noble, W. J. (1967) Prog. Phys. Org. Chem. **5**, 207-230
- Li, G. C. (1983) J. Cell Physiol. **115**, 116-122
- Lister, C. R. B. (1977) Tectonophysics **37**, 203-218
- Loveley, D. R. (1985) Appl. Environ. Microbiol. **49**, 1530-1531
- Low, P. S. & Somero, G. N. (1975) Comp. Biochem. Physiol. B **52**, 67-74
- Müller, K. (1981) Dissertation, Regensburg

Müller, K. , Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R (1981) Biochemistry 20, 5411-5416

Müller, K. , Seifert, T. & Jaenicke, R. (1984) Eur. Biophys. J. 11, 87-94

Macdonald, A. G. (1975) "Physiological Aspects of Deep-Sea Biology", Cambridge Univ. Press, Cambridge

Macdonald, A. G. (1984) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 304, 47-88

Macdonald, K. G. , Luyendyk, B. P. (1981) Spektrum der Wiss. 7, 72-87

Marquis, R. E. & Matsumura, P. (1978) in Kushner, D. J. , Ed. "Microbiol Life in Extreme Environments", Academic Press, New York

Marquis, R. E. (1976). Adv. Microbial Physiol. 14, 158-241

Marshall, N. B. (1954) "Aspects of Deep-Sea Biology", Hutchinson, London

Marshall, N. B. (1979) "Developments in Deep-Sea Biology", Blandford Press Ltd., Poole, Dorset

Maytin, E. V. , Colbert, R. A. & Young, D.A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 2384- 2392

Morita, R. Y. & Mathemeier, P. F. (1964) J. Bacteriol. 88, 1667-1671

Morita, R. Y. (1972) in Kinne, O. , Ed. , "Marine Ecology" Vol 1, part 3, Wiley-Interscience, New York

Moura, I. , Moura, J. J. G. , Santos, H. , Xavier, A. V. , Burch, G. , Peck, H. D. Jr. & Le Gall, J. (1983) Biochim. Biophys. Acta 742, 84-90

- Murray, p. , Rasmussen, S. , Neustaedter, J. & Luck, J. M. (1965) J. Biol. Chem. **240**, 705-709
- O'Farrell, P. H. (1975) J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021
- O'Farrell, P. Z. , Goodman, H. M. W. & O'Farrell, P. H. (1977) Cell **12**, 1133-1142
- Paal, C. (1902) Ber. deutsch. chem Ges. **35**, 2195-2206
- Penniston, J. T. (1971) Arch Biochem. Biophys. **142**, 322- 332
- Povoledo, D. & Vallentyne, J. R. (1964) Geochimica et Cosmochimica Acta **28**, 731-734
- Regnard, P. (1891) "Recherches Expérimentales sur les Conditions Physiques de la Vie dans les Eaux", Masson et Cie, Paris
- Reiter, T. & Penman, S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4737-4741
- Rona, P. , Bostrom, K. Laubier, L. Smith, K. L. , Ed. , (1984) "Hydrothermal Processes at Sea Floor Spreading Centers", Plenum, New York
- Roughton, F. J. W. (1941) J. Am. Chem Soc. **63**, 3930-2934
- Schade, B. C. (1979) Dissertation, Regensburg
- Schade, B. C. , Rudolph, R. Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1980) Biophys. Chem. **11**, 257-263
- Schmid, G. (1977) Dissertation, Regensburg
- Schmid, G. , Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1979) Eur. J. Biochem. **97**, 407-413
- Schmid, G. , Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1975) Biophys.-Chem. **3**, 90-98

Schmid, G. Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1978) Eur. J. Biochem. **86**, 219-224

Schmidt-Nielsen, K. (1975) "Animal Physiology", Cambridge Univ. Press, London

Schreiber, U. & Vidaver, W. (1973) Photochem. Photobiol. **18**, 205-208

Schulz, E. , Jaenicke, R & Knoche, W. (1976) Biophysical Chemistry **4**, 253-257

Schulz, E. , Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1976) FEBS Lett. **64**, 40-43

Schulz, E. , Lüdemann, H.-D. & Jaenicke, R. (1976) FEBS Lett. **64**, 40-43

Seifert, T. (1984) Dissertation, Regensburg

Seifert, T. , Bartholmes, P & Jaenicke, R. (1985) Biochemistry **24**, 339-345

Simons, S. S. Jr. & Johnson, D. F. (1978) J. Org. Chem. **43**, 2886-2891

Sleigh, M.A. & Macdonald, A. G. , Ed. (1972) "Effects of Pressure on Organisms", Symp. Soc. Exp. Biol. **Vol. 26**, Univ. Press, Cambridge

Sonnleitner, B. (1983) in Fiechter, A. , Ed. , "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology" Springer Verlag, New York

Stephen, H. & Stephen, T. (1963) , Ed. , "Solubilities of Inorganic and Organic Compounds", Pergomon Press, Oxford

Stetter, K. O. & König, H. (1983) Spektrum der Wiss. **10**, 26-40

Stetter, K. O. (1982) Nature 300, 228-230

Stetter, K. O. (1985) Naturwiss. 72, 291-301

Stetter, K. O. , König, H. , & Stackebrandt, E. (1983) System. Appl. Microbiol. 4, 535-551

Stetter, K. O. , Thomm, M. , Winter, J, Wildgruber, G. , Huber, H. Zillig, W. Janécovic, D. , König, H. Palm, P. , & Wunderl, S. (1981) Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C2, 166-178

Suzuki, K. Taniguchi, Y. (1972) Bull. Soc. Exp. Biol. 26, 103-124

Tödheide, K. (1966) Berichte der Bunsengesellschaft 70 (9/10), 1022-1030

Tabor, C. W. & Tabor, H. (1985) Microbiol. Rev. 49, 81-99

Tabor, P. S. , Deming, J. W. , Ohwada, K. , Davis, H. , Waxman, M. , et al. (1981) Microb. Ecol. 7, 51-65 .

Thauer, R. K. , Jungermann, K. & Decker, K. (1977) Bacteriol. Rev. 41, 100-180

Thomas, L. (1983) "Late Night Thoughts on Listening to Mahlers Ninth Symphony", The Viking Press, New York

Thomm, M. , Stetter, K. O. & Zillig, W: (1982) Zbl. Bakt. Hyg. , I. Abt. Orig. C3, 128-139

Trent, J. D. , Chastain, R. A. & Yayanos, A. A. (1984) Nature 307, 737-740

Ullmann "Encyklopedie der Technischen Chemie", 4. Aufl. , Verlag Chemie, Weinheim

Vallentyne, J. R. (1964) Geochemica et Cosmochimica Acta 28, 157-188

- Vallentyne, J. R. (1968) *Geochimica et Cosmochimica Acta* **32**, 1353-1356
- Velazquez, J. M. & Lindquist, S. (1984) *Cell* **36**, 655-662
- Walsby, A. E. (1983) *Nature* **303**, 381-
- Walter, W. Harke, H.-P. & Polchow, R. (1967) *Z. Naturforsschg.* **22b**, 931-937
- Weale, K. E. (1967) "Chemical Reactions at High Pressure", Spon Ltd. , London
- Westcott, C. C. (1978) "pH Measurements ", Academic Press, New York
- White, R. H. (1984) *Nature* **310**, 430-432
- Whitfield, M. (1969) *J. electrochem. Soc.* **116**, 1042-1046
- Whitfield, M. (1970) *Electrochim. Acta* **15**, 83-96
- Whitfield, M. (1972) *J. Chem. Eng. Data* **17**, 124-128
- Williams, D. L. , von Herzen, R. P., Sclater, J. G. , Anderson, R. N. (1974) *Geophys. J. R. Astron. Soc.* **38**, 587-608
- Witman, W. B. & Wolfe, R. S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1196-1201
- Yayanos, A. A. , Dietz, A. S. van Boxtel, R. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1356-1361
- Yayanos, A. A. , Dietz, A. S. & van Boxtel, R. (1979) *Science*, **205** 808-810
- Zeikus, J. G. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **I**, 243-252
- Zeikus, J. G. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* **1**, 243-252

Zeikus, J. G. , Ben Bassat, A. , Hegge, P. W. (1980) J. Bakteiol. **143**, 432-440

ZoBell, C. E. & Johnson, F. H. (1949) J. Bacteriol. **57**, 179-189

ZoBell, C. E. & Kim; J. (1972) Symp. Soc. Exp. Biol. **26**, 125-146

ZoBell, C. E. & Morita, R. Y. (1957) J. Bacteriol. **73**, 563-568

ZoBell, C. E. (1970) in Zimmerman, A. M. , Ed. , "High Pressure Effects on Cellular Processes", Academic Press, New York

Zuber, H. (1979) in Shilo, M. Ed. , "Strategies of Life in Extreme Environments", Verlag Chemie, Weinheim



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1982 bis November 1986 am Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie der Universität Regensburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Jaenicke angefertigt.

Herrn Professor Jaenicke möchte ich für die Anleitung, aktive Unterstützung und Motivation besonders herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Dietrich Lüdemann bin ich für seinen fachmännischen Rat bei der Konstruktion des Hochdruck-Instrumentariums und für wertvolle Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

Herr Prof. Dr. Karl-Otto Stetter, der die Mikroorganismen und die mikrobiologischen Laboratorien dankenswerterweise zur Verfügung stellte, hat die Durchführung dieser Arbeit damit erst ermöglicht.

Für das Interesse am Zustandekommen und für die Förderung der Arbeit danke ich den Herren: Prof. Dr. August Böck, Prof. Dr. Aristide Distèche, Prof. Dr. Lothar Jaenicke, Dr. Helmut König und Benoit Koch.

Die feinmechanische Werkstatt und die elektronische Werkstatt haben alle handwerklichen Arbeiten mit großer Sorgfalt ausgeführt.

Bei Frau E. Gregori bedanke ich mich für ihre Geduld bei der Reinschrift des Manuskripts.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die freundschaftliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

