

**Mechanismen der Schwefelwasserstofferzeugung
durch *Saccharomyces cerevisiae* für die
biotechnologische Immobilisierung von Schwermetallen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Roland Krahn
aus Hilden

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss
2. Referent: Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2000

*„Es ist etwas Faszinierendes mit der Wissenschaft.
Man erhält eine Riesenauswahl von Vermutungen
bei niedrigster Investition von Tatsachen.“*

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Geochemie und die Bodenmikrobiologie sorgen für eine Anreicherung der Schwermetalle im Boden	3
2.2	Bakterien bestimmen das Reaktionsverhalten von Metallverbindungen in der Oxidations- und Reduktionszone	5
2.2.1	Die Oxidationszone	5
2.2.2	Die Reduktionszone	7
2.3	Verfahren zur Sanierung schwermetallbelasteter Böden	11
2.3.1	Klassische Verfahren	11
2.3.2	Biotechnologische Verfahren	12
2.4	Der Schwefelstoffwechsel der Hefe <i>S. cerevisiae</i> bildet die Grundlage für die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Immobilisierung von Schwermetallen	14
2.4.1	Die Sulfidbildung im Rahmen des Schwefelstoffwechsels	16
2.4.2	Die Sulfidbildung ist streng reguliert	18
2.4.3	Die Sulfidbildung als Teil einer Entgiftungsstrategie	20
2.5	Thema der Arbeit	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Medien und Puffer	25
3.2	Mikroorganismen	26
3.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	26
3.4	Molekularbiologische Methoden	28
3.5	Hefezellaufschluß und Fraktionierung der Zellbestandteile	29
3.6	Präparation des hydrophilen, kolloiden Schwefels	30
3.7	Messung der Schwefelreduktion mit verschiedenen Hefezellfraktionen	31
3.8	Spektroskopische Bestimmung der NADPH-Oxidation während der Reduktion des hydrophilen Schwefels durch die cytosolische Hefezellfraktion	32

3.9	Bestimmung der NADPH-abhängigen Umsetzung des Schwefels durch isolierte Glutathionreduktase	32
3.10	Verschiedene analytische Methoden	33
4	Ergebnisse	37
4.1	Der Einfluß von Thiosulfat und hydrophilem Schwefel auf das Hefewachstum und die H ₂ S-Bildung	37
4.2	Verstärkung der H ₂ S-Bildung durch toxische Schwermetalle im Medium	39
4.3	Die Immobilisierung von Schwermetallen am Beispiel von Blei	43
4.4	Online-Messung der H ₂ S-Entwicklung im Rahmen von Batch-Fermentationen	45
4.5	Reduktion von hydrophilem Schwefel durch verschiedene Hefezellfraktionen	50
4.6	Nachweis einer NADPH-abhängigen, enzymatischen Schwefelreduktion in der cytosolischen Zellfraktion der Hefe	52
4.7	Reduktion des hydrophilen Schwefels mit NADPH durch isolierte Glutathionreduktase aus <i>S. cerevisiae</i>	55
4.8	Verstärkung der Reduktion des hydrophilen Schwefels zu Sulfid durch Hefe bei Überexpression des <i>GSH1</i> -Gens	62
5	Diskussion	65
5.1	Der Einsatz von Schwefel ermöglicht unter Umgehung der streng regulierten Sulfatreduktion eine Erzeugung von Schwefelwasserstoff mit <i>S. cerevisiae</i>	65
5.2	In Anwesenheit von Schwefel wird die verstärkte Bildung von H ₂ S durch Schwermetalle induziert	66
5.3	Wie wird der hydrophile Schwefel von der Hefe zu H ₂ S umgesetzt ?	68
5.4	Erst mit dem zusätzlichen Einsatz von Hefe erreicht man die nötige Flexibilität bei der biologischen Erzeugung von H ₂ S	71
6	Literatur	73

1 Zusammenfassung

Böden stellen sehr komplexe dynamische Systeme dar. Mit ihren Eigenschaften als Filter, Puffer, Speicher und Reaktionszone übernehmen sie essentielle Funktionen für Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere und Menschen. Metalle werden im Boden sowohl durch Kationenaustausch als auch in Chelatkomplexen von organischem Material gebunden oder spezifisch in Bodenmineralien eingebaut. Unter ungünstigen Umständen, zum Beispiel bei einer zunehmenden Versauerung, können die Metalle wieder mobilisiert werden, so daß Böden mit Schwermetallen in leicht mobilisierbarer Form ein erhebliches Gefahrenpotential darstellen. Steigt die Konzentration an gelösten toxischen Schwermetallen, wird durch eine Vergiftung der Bodenbiologie der Boden in seiner Funktion beeinträchtigt und das Grundwasser belastet. Ein Ziel heutiger Verfahren zur Behandlung belasteter Böden ist deshalb die langfristige Immobilisierung der Schwermetalle. Ein neuer Ansatz um Schwermetalle als Sulfide zu fixieren ist die in-situ Erzeugung von Schwefelwasserstoff durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit der Hefe zur Bildung von Schwefelwasserstoff untersucht und die zu Grunde liegenden zellulären Reaktionen identifiziert.

Als geeignete Schwefelquelle, mit der die Hefe in der Lage ist unter Umgehung der streng regulierten Sulfatreduktion eine erhöhte Menge H_2S zu erzeugen, erwies sich elementarer Schwefel. In Reihenversuchen zeigte sich, daß eine Hefekultur mit Schwefel bei einer leicht verringerten Zelldichte mehr H_2S bildet als mit Sulfat oder Thiosulfat. Aus wässrigen Lösungen wurde mit Hefe und Schwefel insbesondere die Ausfällung von Quecksilber, Kupfer und Blei als schwerlösliche Sulfide erreicht.

Während der Kultivierung der Hefe in einem belüfteten Laborfermenter setzte nach der Zugabe von Schwefel zunächst eine kurzfristige, verstärkte H_2S -Bildung ein, die nach wenigen Minuten in eine schwächere, langfristige H_2S -Bildung überging. Die H_2S -Bildung wurde dabei durch die Verfügbarkeit des Schwefels limitiert. Die intrazelluläre Reduktion des Schwefels erfolgt NADPH-abhängig durch cytosolische Enzyme. Die Reduktaseaktivität wurde *in vitro* durch Glutathion verstärkt. Maßgeblich beteiligt ist vermutlich die Glutathionreduktase, die in der Lage ist mit Hilfe von

Glutathion und unter NADPH-Verbrauch die Reduktion des hydrophilen Schwefels zu katalysieren. Der positive Einfluß des Glutathions bei der Schwefelreduktion bestätigte sich auch *in vivo* bei einer Überexpression der γ -Glutamylcysteinsynthetase, des limitierenden Enzyms der Glutathionsynthese.

2 Einleitung

2.1 Die Geochemie und die Bodenmikrobiologie sorgen für eine Anreicherung der Schwermetalle im Boden

Böden stellen sehr komplexe, dynamische Systeme dar. Sie übernehmen mit ihren Eigenschaften als Filter, Puffer, Speicher und Reaktionszone eine entscheidende, regulierende Rolle in den Stoffkreisläufen. Mit ihren oberflächennahen, porösen Strukturen bieten sie Lebensräume für Mikroorganismen und bilden so eine Lebensgrundlage für Pflanzen, Tiere und Menschen.

In einer Definition von Miehlich zum Begriff Boden wird verdeutlicht, daß Böden ständigen Veränderungen unterworfen sind:

Boden ist der oberste Bereich der festen Erdrinde, der durch Klima, Organismen und den wirtschaftenden Menschen umgestaltet wird (Miehlich, 1989).

Von der mittleren Zusammensetzung der Erdkruste her, dominieren die Elemente O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K und Mg. Diese acht Elemente sind im Mittel mit 98,4 Masseprozent beteiligt (Scheffer & Schachtschabel, 1998). Die restlichen Elemente, darunter auch die toxikologisch relevanten Schwermetalle, sind oft in Spuren in weit verbreiteten Mineralien enthalten, weil sie häufigere Elemente in den Kristallgittern dieser Mineralien ersetzen können. In konzentrierter Form treten diese "Spurenelemente" erst nach Anreicherung in Minerallagerstätten in Erscheinung.

Dies kann auf verschiedene Art und Weise im Zyklus der Gesteins- und Bodenbildung geschehen. Die Metallsulfide, die nur 0,3 Masseprozent der in der Erdkruste vorhandenen Mineralien ausmachen und meist wirtschaftlich wichtige Schwermetallerze darstellen, können eine Lagerstätte bilden, indem sie sich aufgrund ihrer höheren Dichte am Grund einer Silikatschmelze anreichern, wie beispielsweise der Kupferkies (Chalkopyrit, CuFeS_2) (Seim, 1981). Wenn aufgrund abweichender Ionenradien ein Einbau von Schwermetallionen in das umliegende Erstarrungsgestein nicht möglich ist und sich die Schwermetallionen in der Schmelze anreichern, können diese mit in der Schmelze gelösten Gasen, wie Schwefelwasserstoff, reagieren und

in Spalten des Umgebungsgesteins zu abbauwürdigen Erzgängen auskristallisieren (Seim, 1981). Außerdem können in solchen Spalten auch aus heißen wässrigen Lösungen, je nach ihrer Löslichkeit, Mineralien hydrothermalen Ursprungs in einer charakteristischen Abfolge kristallisieren. Beispiele für Sulfide hydrothermalen Ursprungs in magmatischem Gestein sind der metallisch glänzende Bleiglanz (Galenit, PbS) und die Zinkblende (Sphalerit, ZnS). Wenn sich die Erzgänge bis zur Erdoberfläche erstrecken, unterliegen sie der natürlichen Verwitterung. Diese Verwitterung und allgemein die Auflösung von Mineralien und Wiederausfällung an anderer Stelle führt zur Entstehung von Minerallagerstätten der sedimentären Art (Seim, 1981).

Bei Untersuchungen zur Anreicherung von bestimmten Metallen und Metallerzen in Lagerstätten wurde auch die Beteiligung von Bakterien nachgewiesen. Ein aufseherregendes Beispiel ist das Entstehen von Goldseifen, eine Anreicherung von Gold in Sanden und Kiesen von Gewässern aufgrund vorausgehender bakterieller Aktivitäten (Watterson, 1992). Aufgrund des erhöhten Anteils leichter Schwefelisotope in Pyritproben wird dieses am meisten verbreitete Sulfidmineral als ein Produkt bakterieller Sulfatreduktion angesehen (Wedepohl, 1984). Auf den Oberflächen von Kupferglanz (Cu_2S) wurden nach rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zahllose bakterienartig geformte Gebilde gefunden. Diese könnten an der Aufkonzentrierung des Kupfers aus dem Primärmineral Chalkopyrit (CuFeS_2) zum Kupferglanz (Cu_2S) beteiligt gewesen sein (Sillitoe, 1996).

Wenn die ursprünglichen Minerale der Verwitterung ausgesetzt sind, wird die Teilchengröße kleiner und die in ihnen enthaltenen Metalle sind zugänglicher für Reaktionen, die zu ihrer Freisetzung in die Biosphäre führen. Der damit verbundene Wechsel von einer lithogenen (silikatisch, oxidisch, sulfidisch, carbonatisch) zu einer pedogenen Bindung (sorptiv, austauschbar, oxidisch) führt zu einer zunehmenden Mobilität und zu einer charakteristischen Verteilung der Metalle im Boden.

Die Mobilisierung von Schwermetallen aus Lagerstätten und Abraumhalden oder aus den oberen Bodenschichten, inklusive der Humusaufgabe, stellt aufgrund der Toxizität vieler Schwermetalle eine große Gefahr dar. Bei einem Transfer in die Nahrungskette findet dabei in den Organismen wieder eine für jedes Metall charakteristische Anreicherung statt. Lebewesen haben daher vielfältige Strategien entwickelt, um toxischen Metalle, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit essentiellen Elementen aufgenommen wurden, zu entgiften. Bei sehr hohen Metallkonzentrationen reicht die

Kapazität der Entgiftungssysteme allerdings oft nicht aus und es kommt zu toxischen Effekten.

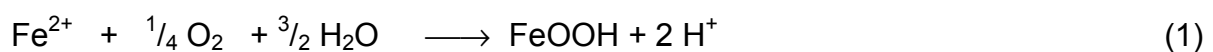
2.2 Bakterien bestimmen das Reaktionsverhalten von Metallverbindungen in der Oxidations- und Reduktionszone

Im Grenzbereich zwischen der oberflächennahen Oxidationszone und der grundwassergesättigten Reduktionszone ändert sich häufig die Metallspezies und damit auch deren Mobilität. Neben mikrobiologisch beeinflussten Änderungen des pH-Wertes sind in erster Linie Änderungen des Redoxpotentials in Abhängigkeit von den Grundwasserständen dafür verantwortlich. Wassergesättigte Böden haben eher reduzierende Eigenschaften (Reardon & Moddle, 1985), da der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in der wassergesättigten Zone um den Faktor 10.000 niedriger ist (Ohio State Univ. Res. Found., 1971).

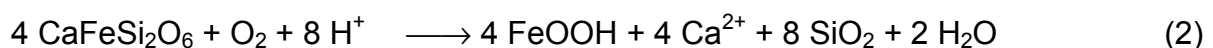
2.2.1 Die Oxidationszone

Die Oxidationszone ist vielfach durch eine braune, gelbe oder rote Farbe, die durch Fe(III) und Mn(IV) Oxide hervorgerufen wird, gekennzeichnet. Eisen und Mangan liegen in primären Mineralien meist als Fe(II) und Mn(II) vor. Ihre Oxidation führt in Böden zu einem Säureschub.

So hydrolysiert durch Sauerstoff oxidiertes Eisen unter Bildung von Goethit nach folgender Gleichung:



In den häufig vorkommenden Silikaten wird die bei der Oxidation von gebundenem Fe(II) freigesetzte Säure durch das Silikat abgepuffert, wie z.B. beim Augit in Gleichung (2):



(Scheffer & Schachtschabel, 1998).

Ganz anders sieht es bei der Oxidation von Pyrit (FeS_2), dem Hauptbegleitmineral von Erzen und Kohle, aus. Sowohl die Oxidation mit Sauerstoff, als auch die nachfolgend beschriebene Oxidation mit Fe(III) führt zur Freisetzung einer großen Säuremenge (Singer & Stumm, 1970). Die Oxidation des Pyrits durch direkte Reaktion mit Sauerstoff verläuft über einen breiten pH-Bereich allerdings ziemlich langsam (Nordstrom, 1982) und das aus anderen Mineralien gebildete Fe(III) dominiert entsprechend der nachfolgenden Gleichung als Oxidationsmittel (Evangelou & Zhang, 1995):



Das so produzierte Fe(II) kann mit Hilfe von Sauerstoff wie schon in Gleichung (1) beschrieben weiter zu Fe(III) oxidiert und zu Goethit hydrolysiert werden. Bei genügender Pufferkapazität des Bodens kann diese Eisenoxid/hydroxidschicht und eventuell ausgefallener elementarer Schwefel den weiteren oxidativen Angriff auf die Pyritoberfläche erschweren.

Die stark saure Oxidationszone von pyritreichem Material in alten Erzgängen und in Abraumhalden von Erz- und Kohleminen ist der Lebensraum von acidophilen, chemolithoautotrophen Bakterien. Zur Gruppe dieser CO_2 fixierenden Bakterien gehören *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *T. caldus* und *Leptospirillum ferrooxidans*. Ihre Eigenschaften, den niedrigen pH-Wert ihrer Umgebung zu ihrem Vorteil zu nutzen und ihre Spezialisierung auf anorganische Elektronendonatoren gehören zu den ungewöhnlichsten bioenergetischen Phänomenen in der Natur. Diese langsam wachsenden Bakterien können die im Säuren langsam verlaufende abiotische Eisenoxidation bis zu 10^6 fach beschleunigen (Singer & Stumm, 1970). Außerdem sorgen die Bakterien aufgrund eines Protonenverbrauchs oder möglicherweise aufgrund der Ablagerung von puffernden Exopolysacchariden für einen geringen lokalen Anstieg des pH-Werts an der Pyritoberfläche, der die Pyritoxidation durch Fe(III) begünstigt (Fowler et al., 1999).

Eine massive Eisenoxidation außerhalb der Zelle, die über eine spezielle Elektronentransportkette im Periplasma mit einer Cytochromoxidase-abhängigen Sauerstoffreduktion innerhalb der Zelle verbunden ist (Appia-Ayme et al., 1999) sorgt für einen ständigen Protonenverbrauch im Cytoplasma.

Die Eisenoxidation dient *T. ferrooxidans* demnach dazu, eine pH-Differenz zwischen dem Cytoplasma (pH 6,5) und der Zellumgebung (ca. pH 2) zur Erzeugung von ATP und zum Antrieb eines reversen Elektronentransports aufrechtzuerhalten. Die Elektronen durchlaufen dabei von Cytochrom c aus den üblichen Weg einer Atmungskette rückwärts, um NADH für die Fixierung von CO₂ im Rahmen des Calvin-Cyclus zu bilden. Dies führt nur zu einem geringen Zellertrag (Ingledew, 1982).

Dadurch, daß Bakterien wie *T. ferrooxidans* das bei der Pyritoxidation verbrauchte Fe(III) immer wieder nachliefern, entsteht ein effektiver kontinuierlicher Pyritoxidationszyklus, der zu einer immer stärkeren Versauerung führt. Diese bakterielle Säureproduktion führt zum bekannten "acid mine drainage"-Problem), bei dem stark saures Sickerwasser toxische Schwermetalle aus pyrithaltigen Abraumhalden des Erz- und Kohlebergbaus mobilisiert und somit eine Gefahr für die Umgebung und das Grundwasser darstellt. Dadurch, daß selbst Spuren von einfachen organischen Verbindungen ihr Wachstum hemmen (Tuovinen et al., 1971; Tuttle & Dugan, 1976), ergeben sich aber auch Möglichkeiten gegen die negativen Folgen vorzugehen, die der Stoffwechsel dieser ubiquitär vorkommenden Bakterien verursachen kann. Großtechnisch werden die bakteriellen Aktivitäten in dem als "bioleaching" bezeichneten Prozeß genutzt, um Metalle, vor allem Kupfer, aus erzhaltigem Gestein von niederer Qualität gewinnbringend herauszulösen (Bosecker, 1984; Holmes, 1999).

2.2.2 Die Reduktionszone

Die Reduktionszone besitzt ebenfalls eine dem Gehalt an Metallverbindungen entsprechende Farbe. Sie variiert von sehr hell ("ausgebleicht") durch das Auswaschen von löslichen Eisen(II) und Mn(IV) Verbindungen über blaugrün durch einen Überschuß von Eisen(II) Verbindungen bis hin zu schwarz durch vorhandene Metallsulfide. Die dissimilatorische Reduktion von Fe(III) und Mn(IV) durch Bakterien wie *Shewanella putrefaciens* wird als eine der wichtigsten geo-biochemischen Reaktionen in aquatischen Sedimenten, Böden und im Grundwasser angesehen (Wakatsuki, 1995). Die Aktivität der heterotrophen, dissimilatorisch metallreduzierenden Bakterien ist insofern problematisch, weil auf diese Weise toxische Schwermetalle, die an die verschiedenen Fe(III) und Mn(IV) Oxide adsorbiert oder mit ihnen copräzipitiert wurden, freigesetzt werden können (Lovley, 1991; Wielinga et al., 1999).

In der Reduktionszone tritt häufig noch eine andere wichtige Gruppe von Bakterien auf, die einen Einfluß auf die Mobilität von Metallen nehmen kann. Diese Bakterien nutzen entweder das von Bakterien wie *T. thiooxidans* aus sulfidischen Mineralien in der Oxidationszone freigesetzte Sulfat oder das in Böden vor allem in Meeresnähe natürlicherweise vorhandene Sulfat zur Energiegewinnung. Die sulfatreduzierenden Bakterien sind bezogen auf ihren Stoffwechsel, ihre Morphologie und ihre ökologischen Bedürfnisse extrem verschieden (Singleton, 1993). Sie besitzen aber alle die gemeinsame Fähigkeit im Rahmen eines anaeroben Elektronentransports Elektronen aus einfachen organischen Verbindungen oder aus Wasserstoff auf Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor zu übertragen. Das dabei entstehende Sulfid führt zu einer deutlichen Absenkung des Redoxpotentials des umgebenden Mediums. Außerdem entstehen durch die Reduktion von Sulfat und Eisen mittels organischer Substanzen (mit der allgemeinen Formel CH_2O) unter reduzierenden Bedingungen Hydrogencarbonate und Carbonate, die Protonen binden und auf diese Weise für eine Anhebung des pH-Wertes sorgen können:



Mit ihrer Aktivität leisten die sulfatreduzierenden Bakterien gleich in zweifacher Hinsicht einen Beitrag zur Immobilisierung von Metallen und damit auch einen Beitrag zum Schutz der Biosphäre vor toxischen Schwermetallen. Denn die Erhöhung des pH-Wertes und die Sulfidbildung ergänzen sich in optimaler Weise, um fast alle Metalle in nahezu unlöslicher Form auszufällen. Dabei dienen die Zelloberflächen der Bakterien als erste Nukleationsstellen für Metallsulfide, von denen dann weitere Ausfällungen und Mineralneubildungen ausgehen können (Beveridge & Fyfe, 1985).

Schwierig zu bestimmen ist die wirkliche Zahl, und die natürliche Verteilung sulfatreduzierender Bakterien im Tiefenprofil. Mikrobiologische Zählmethoden, die auf Ausplattieren beruhen, können aufgrund der schon erwähnten unterschiedlichen Ansprüche der Bakterien an bestimmte Kohlenstoffquellen nur einen Ausschnitt aus der wirklich vorhandenen Population liefern (Wielinga et al., 1999). Deshalb ist es schwierig allein mittels einfacher Laborexperimente abzuschätzen, ob das vorhandene Potential an sulfatreduzierenden Bakterien ausreicht, um Metalle in belasteten Böden zu immobilisieren, ob sich diese Bakterien durch Zufuhr von einfachen orga-

nischen Verbindungen in der Aktivität stimulieren lassen, oder ob eine zusätzliche Zufuhr von Mikroorganismen notwendig ist.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 2.1 die Profile einer typischen Bakteriengemeinschaft von *Thiobacillus* Arten und Sulfatreduzierern und die sich daraus ergebende Verteilung des pH-Wertes und des Eisen-Gehaltes in den oberen 50 cm einer Abraumhalde. Die Grenze zwischen Oxidationszone und Reduktionszone wird durch den Beginn des wassergesättigten Bereichs mit seinem niedrigeren Sauerstoffgehalt festgelegt.

Auffällig sind die starke Versauerung der obersten Bodenschicht aufgrund der Aktivität der *Thiobacillus* Bakterien, die zu einem Anstieg des löslichen Eisens in der Oxidationszone führt. Die Aktivität der sulfatreduzierenden Bakterien zusammen mit der Neutralisationskapazität des Bodens führen zu einer nahezu vollständigen Ausfällung des Eisens in der Reduktionszone (Fortin et al., 1995).

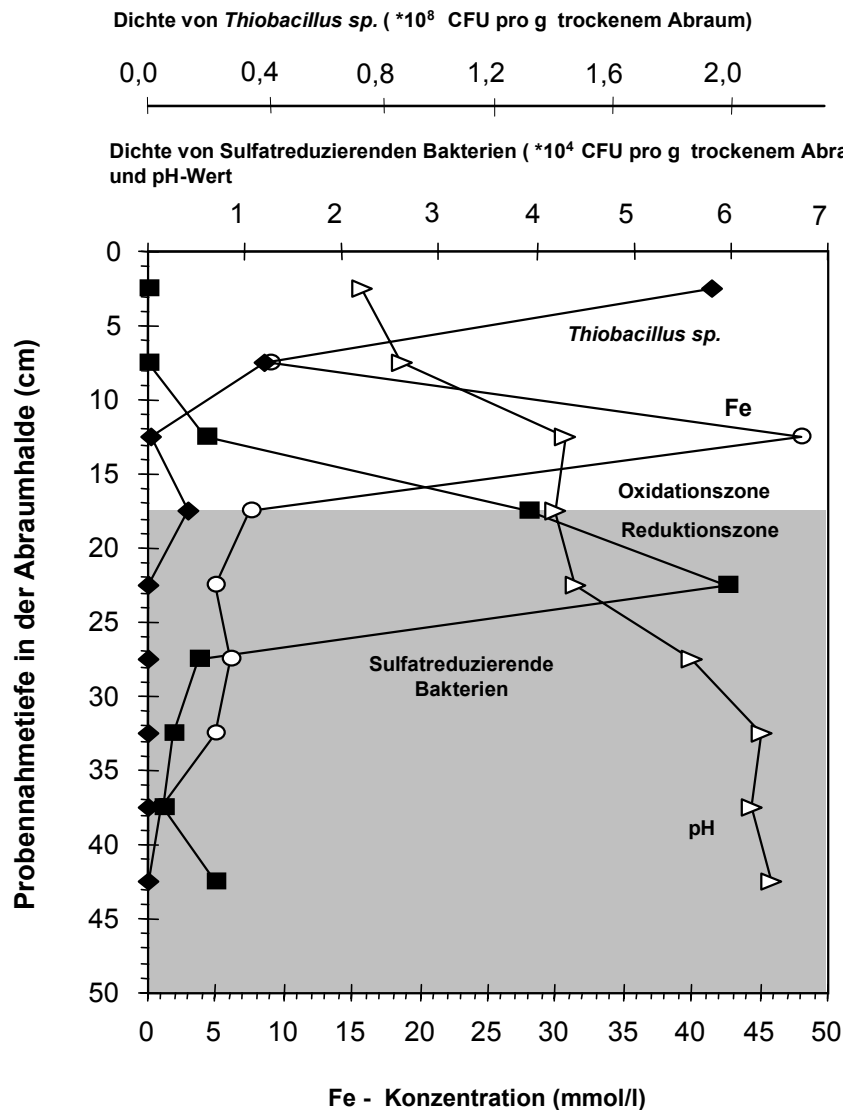


Abb. 2.1 Profil einer Bakteriengemeinschaft von *Thiobacillus* Arten und Sulfatreduzierern und die sich daraus ergebende Verteilung des pH-Wertes und des Gehaltes an löslichem Eisen in den oberen 50 cm einer Abraumhalde der Kidd Creek Mine (verändert aus Fortin et al., 1995). Fe-Konzentration (—○—), Dichte an *Thiobacillus sp.* (—◆—), Dichte an Sulfatreduzierenden Bakterien (—■—), pH-Wert (—▷—). CFU steht für colony forming units.

Die bestimmbare Dichte an Sulfatreduzierern ist gegenüber der an *Thiobacillus* Bakterien aus den oben aufgeführten labortechnischen Gründen deutlich geringer. Es fällt außerdem auf, daß die Verteilung der Sulfatreduzierer mit der Oxidationszone überlappt. Dieser erstaunliche Befund für die eigentlich anaeroben Sulfatreduzierer wird mit der Bildung von mikroaeroben bis anaeroben Nischen innerhalb der Oxidationszone und einer bevorzugten Nähe der Sulfatreduzierer zu der für sie verwertbare Nährstoffe produzierenden Bakterien in dieser Zone erklärt.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die sulfatreduzierenden Bakterien Metalle nur in der Reduktionszone effektiv als unlösliche Sulfide und aufgrund ihres alkalisierenden Potentials eventuell auch als Carbonate ausfällen können.

2.3 Verfahren zur Sanierung schwermetallbelasteter Böden

Bei der Behandlung von schwermetallbelasteten Böden lassen sich zwei Prinzipien der Sanierung unterscheiden. Entweder versucht man den Gehalt der Schwermetalle dem Sanierungsziel entsprechend zu verringern, oder die vorhandenen Metalle werden im Boden langfristig fixiert und damit ihr Gefahrenpotential deutlich vermindert.

2.3.1 Klassische Verfahren

Die Anwendung von physikalisch-chemischen Bodenbehandlungsverfahren führt meist nur zu unbefriedigenden Resultaten. Energieaufwendige thermische Behandlungen sind nur bei der Austreibung des flüchtigen Quecksilbers sinnvoll. Ansonsten führen sie bei den notwendigen Temperaturen meist zu Substraten, die sich nur schwer wiederbeleben lassen und aufgrund der Zersetzung von Carbonaten stark alkalisch reagieren (Neumaier, 1996). Bodenwaschverfahren benötigen zum Herauslösen der Schwermetalle meistens aggressive Hilfsmittel, wie Säuren und starke Komplexbildner. Dabei werden zum großen Teil auch essentielle Mineralstoffe ausgewaschen. Die Extraktion der Schwermetalle erfolgt in der Regel nur zu 80 - 90 %, so daß der Rest in Verbindung mit den Extraktionshilfsmitteln anschließend in einer mobileren Form vorliegen kann als vorher. Diese mobilisierten Schwermetalle können daher für die Biosphäre ein größeres Gefahrenpotential darstellen, als der höhere Gesamtgehalt vor der Extraktion. Die Nachteile der für eine Immobilisierung verwendeten anorganischen Komponenten wie Portlandzement, lösliche Silikate und

auf Calciumoxid basierende Mischungen sind das schlechte Abbindeverhalten in Anwesenheit von organischen Belastungen und die Erzeugung nur schwer zu rekultivierender Substrate (Mattheß & Weßling, 1996).

2.3.2 Biotechnologische Verfahren

Da Organismen einerseits in der Lage sein müssen Metalle durch Mobilisierung für sich zu nutzen, und sie andererseits toxische Metalle weitgehend entgiften müssen, läßt sich auf biotechnologischem Weg die Belastung von Böden mit Schwermetallen reduzieren (Gadd & White, 1993). Meist dienen dabei die im vorherigen Kapitel beschriebenen natürlichen Reaktionswege als Vorbild. Zur Schwermetallextraktion werden das autotrophe und heterotrophe Auslaugen auch in Verbindung mit Metallophoren oder das chemische Auslaugen gefolgt von einer mikrobiologischen Fällungsstufe eingesetzt. Doch auch die biotechnologische Laugung ist an die von der Geochemie vorgegebenen Grenzen gebunden. Wenn bei der autotrophen Laugung eines Bodens die Bakterien Sulfid und Schwefel zu Schwefelsäure oxidieren, werden das Blei aufgrund des schlecht löslichen Sulfats und auch die im Säuren sonst gut löslichen Metalle Chrom(III) und Zn aufgrund ihrer starken Bindung an Bodenpartikel kaum herausgelöst (White et al., 1998). Obwohl bei der Laugung von schwermetallbelastetem Hamburger Hafenschlick durch die im Schlick enthaltenen Mikroorganismen gute Ergebnisse bei Cadmium, Zink und Kupfer erzielt wurden, können Probleme in dieser Größenordnung wie die jährlich anfallenden 2 Milliarden Kubikmeter Schlamm nicht mit mikrobieller Laugung alleine gelöst werden, da die erprobte maximale Feststoffkonzentration unter 5 % liegt und die Laugungsdauer mindestens 20 Tage beträgt. In einem dem Laugungsreaktor angeschlossenen Reaktor mit einer Mischkultur sulfatreduzierender Bakterien können die extrahierten Metalle als Sulfide wieder ausgefällt werden. In diesem zweiten Schritt ist eine aufwendige Steuerung bei der Zufuhr des sauren Prozeßabwassers und der Sulfatkonzentration notwendig, da die sulfatreduzierenden Bakterien nur in einem engen Bereich zwischen pH 6 und pH 7 und einer Sulfatkonzentration < 50 mM einen optimalen Umsatz zeigen (Dvorak et al., 1992; White & Gadd, 1997). Da sich gezeigt hat, daß aus sulfidisch gefällten Schlämmen nur unwesentliche Mengen an Metallen in der Natur remobilisiert werden können (Calmano & Ahlf, 1988; Kunz, 1992), stellt die Immobilisierung der Schwermetalle im Boden einen Ausweg aus dem Dilemma dar. Denn

nach sorgfältiger Überprüfung der zukünftigen Nutzung reicht es nach heutiger Sicht in vielen Fällen aus, die Metalle langfristig im Boden zu fixieren. Nicht zu berücksichtigen braucht man dann das Kapazitäts- und Effektivitätsproblem bei herkömmlichen Verfahren und das Kapazitätsproblem von Sondermülldeponien. Dennoch erreicht man die gewünschte Verringerung des Gefährdungspotentials der vorhandenen Schwermetalle. Sehr erfolgreich ist der Ansatz der in-situ Fixierung der Schwermetalle als Sulfide unter reduzierenden Bedingungen. Dazu wird in der einfachsten Verfahrensform Schwefelwasserstoff in einer Konzentration von 0,3 bis 0,5 g/l direkt in den belasteten Bodenkörper eingeleitet. Ein großer Teil des Schwefelwasserstoffs wird aufgrund der großen Redoxpufferkapazität von Böden zunächst zu Schwefel und Sulfat oxidiert, bis ausreichend reduzierende Bedingungen geschaffen worden sind. Es muß aber auch darauf geachtet werden, daß keine exzessiven Mengen Schwefelwasserstoff zugeführt werden, da sonst das Grundwasser seinerseits belastet wird. Ein Praxisbeispiel aus Wyoming, USA, mit einer Arsen-, Vanadium-, Molybdän- und Uran-Belastung hat gezeigt, daß nach sechs Wochen Einleitungsdauer eine über Jahre stabile Fixierung der Schwermetalle auch bei leicht oxidierendem Grundwasser erreicht werden kann (Mattheß & Weßling, 1996). Nachteilig ist bei dieser einfachen Verfahrensweise, daß umfangreiche Sicherheitsmaßnahmen für den Umgang mit dem hochtoxischen Schwefelwasserstoff getroffen werden müssen. Sicherer läßt sich dieser auf mikrobiologischem Weg erzeugen. Bisher wird dafür auf die schon erwähnten sulfatreduzierenden Bakterien zurückgegriffen. Diese sind aber nur in einem anaeroben Milieu und um pH 6 - 7 genügend aktiv. Das "in-situ anaerobic reactive zones"-Verfahren zur Stimulierung der vorhandenen sulfatreduzierenden Bakterien durch Zufuhr sulfathaltiger Melasse (Suthersan, 1996) zielt hauptsächlich darauf ab, daß der Sauerstoff durch heterotrophe Mikroorganismen bei der Metabolisierung des Kohlenhydratanteils der Melasse verbraucht wird. Erst die dabei entstehenden Metabolite, wie z.B. Acetat, können von den sulfatreduzierenden Bakterien als verfügbare C-Quellen genutzt werden (Hansen, 1993). Problematisch wird es bei diesem Verfahren dann, wenn heterotrophe Mikroorganismen nach dem Verbrauch des Sauerstoffs Eisen- und Manganoxide reduzieren und damit die daran gebundenen Schwermetalle freisetzen, ohne daß gleichzeitig ausreichend Schwefelwasserstoff zum Abfangen der Schwermetalle gebildet wird.

An ein effektives Verfahren zur biotechnologischen Immobilisierung von Schwermetallen sind also folgende Anforderungen zu stellen:

- Die Mikroorganismen sollen flexibel eingesetzt werden können und insbesondere eine Immobilisierung unter meist aeroben und sauren Bedingungen ermöglichen.
- Für einen wirtschaftlichen Einsatz sollen die Mikroorganismen unter den Bedingungen im Boden genügend Aktivität vor allem nach Zufuhr preisgünstiger industrieller Nährstoffquellen zeigen.
- Mit dem Einsatz der Mikroorganismen dürfen keine gesundheitlichen Risiken verbunden sein. Es sollte sich möglichst nicht um Mikroorganismen handeln, die gentechnisch verändert wurden, damit ein einfacher Umgang mit ihnen gewährleistet ist, der nicht den umfangreichen Vorschriften des Gentechnikgesetzes unterliegt.

2.4 Der Schwefelstoffwechsel der Hefe *S. cerevisiae* bildet die Grundlage für die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Immobilisierung von Schwermetallen

Die sulfatreduzierenden Bakterien können aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften nur in einem begrenzten Umfang zur Immobilisierung von Schwermetallen in Anlehnung an die natürlichen Prozesse der Reduktionszone im Boden eingesetzt werden. Daraus ergibt sich die Frage, welche Organismen die im vorigen Kapitel aufgelisteten Anforderungen zur biologischen in-situ Erzeugung von Schwefelwasserstoff besser erfüllen. In einem neuen Konzept soll die Fähigkeit von *S. cerevisiae*, auf unterschiedlichem Wege Schwefelwasserstoff bilden zu können, zur Immobilisierung von Schwermetallen genutzt werden. Aufgrund von erfolgreichen Laborversuchen wurde der Einsatz von Hefe zur Sanierung von schwermetallhaltigen Böden und Wässern bereits patentiert (Krahn et al., 1999). Im Umgang mit *S. cerevisiae* besteht sowohl im Labor- als auch im großtechnischen Maßstab eine lange Erfahrung. Die Hefe wird zur Erzeugung von Lebensmitteln eingesetzt und ist sicher nicht pathogen. Daß sie unter bestimmten Bedingungen Schwefelwasserstoff freisetzt ist in der Lebensmittelindustrie ein bekanntes Problem. Beim Brauprozeß hat man in Kenntnis des Stoffwechselweges durch die Konstruktion neuer Stämme

die H_2S -Bildung verringern können (Hidetoshi et al., 1992; Omura et al., 1995). Auch bei der Weinherstellung zählen Qualitätsbeeinträchtigungen, die durch schwefelhaltige Substanzen hervorgerufen werden, die sogenannten Böckser, zu den am weitesten verbreiteten Fehlern (Rauhut & Kürbel, 1994). Die Ursache für die vermehrte H_2S -Bildung während der Gärung sind in diesem Fall Netzschwefelrückstände von der Mehлтаubekämpfung im Most (Würdig & Woller, 1989).

S. cerevisiae zählt nicht zu den typischen Bodenorganismen. Als primäre Standorte in der Natur gelten süße Früchte, Austrittsstellen zuckerhaltiger Säfte von Bäumen sowie die Nektarausscheidungen von Blüten. Von dort kann die Hefe mit dem Regen, dem Wind, den Insekten und durch den Abfall reifer Früchte in den Boden gelangen (Beck, 1968). Die Zahl der im Boden vorhandenen Hefen ist aber selten höher als 10^4 pro g Boden (Di Menna, 1957). Sehr wahrscheinlich ist, daß die Isolation von Hefen der Gattung *Saccharomyces* aus Böden (Di Menna, 1959), Flüssen, Seen und sogar aus einer Abwasserbehandlungsanlage (Hagler & Ahearn, 1987) ermöglicht wurde, weil das Umfeld menschlicher Aktivitäten zu einem höheren Eintrag dieser Hefen in die Umwelt geführt hat. Dies zeigt aber, daß die Hefe im Boden zumindest eine begrenzte Überlebensfähigkeit besitzt.

Neben der direkten H_2S -Bildung durch Hefe ist auch eine Stimulierung der H_2S -Bildung anderer Mikroorganismen bei ihrem Einsatz anzunehmen. Die fakultativ anaerobe Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage sich durch oxidative Phosphorylierung selbst eine anaerobe Umgebung zu schaffen, in der sie durch Bildung von Ethanol bei der Vergärung zuckerhaltiger Substrate einen Vorteil gegenüber anderen, weniger alkoholtoleranten Organismen besitzt. Vermutlich können die sulfatreduzierenden Bakterien von der sauerstoffarmen Umgebung und dem erzeugten Ethanol profitieren, da sie ein möglichst neutrales, anaerobes Bodenmilieu benötigen und Ethanol von ihnen als Energiequelle genutzt wird (Hansen, 1993).

Über die Umsetzung des Schwefels zu H_2S durch die Hefe ist wenig bekannt. Die Vermutung, daß der Schwefel chemisch mit von der Hefe gebildeten, reduzierenden Substanzen an ihrer Zelloberfläche reagiert (Schütz und Kunkee, 1977) hat keine Bestätigung gefunden. Obwohl die H_2S -Bildung vom Hefestamm abhängt (Rauhut & Kürbel, 1994), wurden bisher keine Angaben gemacht, welche Eigenschaften eines Stammes für die hohe H_2S -Bildung verantwortlich sein könnten.

Die folgenden Ausführungen sollen einen Überblick über den bisherigen Wissensstand zum Schwefelstoffwechsel der Hefe geben.

2.4.1 Die Sulfidbildung im Rahmen des Schwefelstoffwechsels

Sulfid entsteht in der Hefezelle, wie bei fast allen Archae- und Eubakterien, Pilzen und höheren Pflanzen im Rahmen der assimilatorischen Sulfatreduktion als zentrales Zwischenprodukt, aus dem die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein synthetisiert werden. Während das Wachstum von *S. cerevisiae* auf Sulfid stark verlangsamt und auf Sulfit nur bei geringen Konzentrationen möglich ist, kann *S. cerevisiae* sowohl auf den anorganischen Schwefelquellen Sulfat und Thiosulfat als auch auf den organischen Schwefelquellen Homocystein, Cystein, Methionin, S-Adenosylmethionin (Thomas et al., 1992) und Glutathion (Elskens et al., 1991) gut wachsen.

Abbildung 2.2 zeigt die Grundzüge des Schwefelstoffwechsels der Hefe. Beginnend bei der Sulfatreduktion wird der Reaktionsverlauf zur Bildung von Methionin, Cystein und Glutathion verdeutlicht und es werden zwei Möglichkeiten der Beeinflussung des Schwefelstoffwechsels vorgestellt.

Die in natürlichen Medien dominierende Schwefelquelle Sulfat wird von der Hefe über zwei sulfatspezifische Permeasen aufgenommen. Als unter physiologischen Bedingungen inertes Molekül muß Sulfat vor einer Reduktion erst mittels ATP zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und 3'-Phosphoryladenosen-5'-phosphosulfat (PAPS) aktiviert werden. Die Reduktion des Schwefelatoms erfolgt dann in zwei Schritten. Von PAPS, dem aktivierten Sulfat, wird im ersten Reduktionsschritt der Sulfonylrest auf eine Thiolgruppe des reduzierten Thioredoxins übertragen. Damit entsteht unter Freisetzung von 3'-Phosphoryladenosen-5'-phosphat ein thiolgebundenes Sulfit. Für den zweiten Reduktionsschritt übernimmt der Sulfitreduktasekomplex das gebundene Sulfit. Dabei wird oxidiertes Thioredoxin freigesetzt und durch eine Thioredoxinreduktase NADPH-abhängig regeneriert. Durch den Sulfitreduktasekomplex wird das enzymgebundene Sulfit NADPH-abhängig in einer sechs-Elektronen-Reduktion zum Sulfid reduziert. Dieses wird direkt auf O-Acetylhomoserin unter Bildung von Homocystein übertragen. Zur Synthese des Methionins wird das entstandene Homocystein weiter methyliert. Ausgehend vom Methionin kann eine

rasche Umwandlung zu S-Adenosylmethionin erfolgen, das sich über einen Zwischenschritt wieder in Homocystein umwandeln lässt.

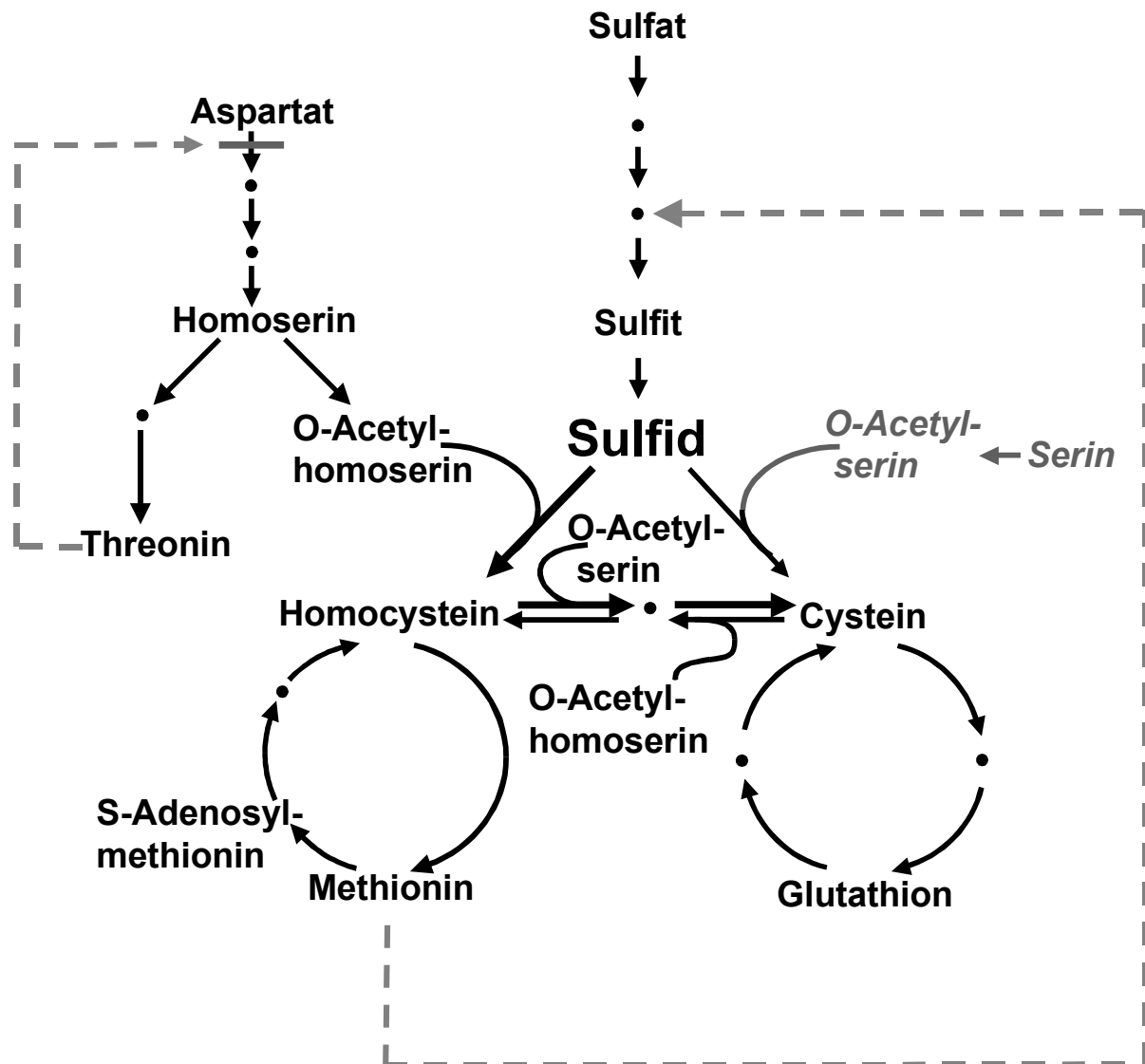


Abb. 2.2 Die Grundzüge des Schwefelstoffwechsel der Hefe mit Regulationsmöglichkeiten zur Beeinflussung der Sulfidbildung. Die Bildung von Cystein aus Serin über O-Acetylserin konnte bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden. Gestrichelte Linien weisen auf eine Rückkopplungsregulation hin.

Die Bildung von Cystein aus Homocystein läuft bei der Hefe über eine Transsulfierung, bei der das Schwefelatom des Homocysteins (C4-Gerüst) auf Serin (C3-Gerüst) übertragen wird. Mutationen in Genen des Transsulfierungswegs führen zur

Cysteinauxotrophie (Cherest & Surdin-Kerjan, 1992), obwohl ein Enzym mit *in vitro* Aktivität für die direkte Bildung von Cystein aus Sulfid und O-Acetylserin bzw. Serin identifiziert wurde (Yamagata, 1980). Die reverse Transsulfierung kann auch der Umwandlung von Cystein in Methionin dienen.

Aus Cystein und den zwei Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin wird in zwei Schritten das für die Hefe essentielle Tripeptid Glutathion synthetisiert. Die Menge an Glutathion in der Hefezelle entspricht etwa 1 % des Trockengewichts (Elskens et al., 1991). Die maximale *in vivo* Konzentration liegt in Eukaryonten bei etwa 10 mM (Meister, 1988a). Das Glutathion hat so viele wichtige Funktionen, daß die Hefe bei einer kompletten Blockade der Glutathionsynthese auf eine Supplementierung aus dem Medium angewiesen ist. Unter Glutathionlimitierung kommt es zu einer drastischen Verringerung der Wachstumsrate (Othake & Yabuuchi, 1991). Unter anderem hat Glutathion eine spezifische Funktion bei der Translation in Mitochondrien. So wird die Aktivität der Atmungskette bei einem niedrigen Glutathionspiegel besonders beeinträchtigt (Lisowsky, 1993). Glutathion oder andere Thiole scheinen auch an der enzymatischen Umsetzung der anorganischen Schwefelquelle Thiosulfat beteiligt zu sein (Chauncey & Westley, 1983).

2.4.2 Die Sulfidbildung ist streng reguliert

Die strenge Regulation des Schwefelstoffwechsels bei *S. cerevisiae* ist komplex und erst in Teilen verstanden. Sie orientiert sich an dem Bedarf an schwefelhaltigen Aminosäuren und verhindert normalerweise, daß sich toxische Konzentrationen an Sulfit und Sulfid in der Zelle bilden. Die Hauptregulation erfolgt auf der Ebene der Transkription. Dabei haben der positive Regulator Met4p und der Repressor Met30p eine Schlüsselfunktion (Thomas et al., 1992 und 1995). Wie in Abbildung 2.2 angedeutet ist, werden bei einem niedrigen Methionin bzw. S-Adenosylmethionin-Spiegel in der Zelle die MET-Gene der Sulfatassimilation aktiviert. Dies geschieht durch ein Zusammenwirken eines heteromeren Proteinkomplexes aus dem Met4p Aktivator mit anderen Faktoren an spezifischen Aktivatorodomänen. Vermittelt über den Repressor Met30p verhindert ein hoher Methionin bzw. S-Adenosylmethionin-Spiegel diese Aktivierung. Überraschenderweise reprimiert der Repressor Met30p auf die gleiche Weise auch die Expression des Gens der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, des ersten Enzyms des Pentosephosphatwegs (Thomas et

al., 1995). Dieses Beispiel für eine Koordination mit anderen Stoffwechselwegen zeigt, daß der Schwefelstoffwechsel eine integrierte Rolle im anabolen Stoffwechsel hat.

Unter bestimmten Bedingungen besteht die Möglichkeit einer begrenzten Steigerung der Sulfidbildung über den Weg der Sulfatreduktion. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn nur eine geringe Menge an Homoserin bzw. O-Acetylhomoserin zum Einbau des Sulfids zur Verfügung steht. So führt der einsetzende Stickstoffmangel während der exponentiellen Phase aufgrund eines generellen Mangels an Aminosäurevorläuferverbindungen zu einer Steigerung der Sulfidbildung (Jiranek et al., 1995). Andererseits führt ein Überangebot an Threonin im Medium (Abbildung 2.2) über eine Feedback-Hemmung der Aspartatkinase zu einer verringerten Umsetzung von Aspartat zum Homoserin und damit letztendlich zu einer Hemmung der Methioninsynthese. Der daraus resultierende niedrige Methionin- bzw. S-Adenosylmethionin-Spiegel führt zu einer Aktivierung der Expression sulfat- und sulfitreduzierender Enzyme und damit zu einer verstärkten Bildung von Sulfid und Schwefelwasserstoff (Gyllang et al., 1989, Korch et al., 1991). Auch mit einer Homoserin-Acyl-Transferase-Deletionsmutante erhält man den gleichen Effekt (Hansen & Kielland-Brandt, 1996). Je geringer die supplementierte Methioninmenge im Medium anfangs ist, desto früher und desto stärker kommt es nach einem Absinken des Methioninspiegels zu einer Akkumulation von Sulfid. Da aber Sulfid hemmend auf die Sulfitreduktase wirkt, ist nur eine begrenzte Steigerung der Sulfidbildung über die Sulfatreduktion zu erreichen (Hansen & Kielland-Brandt, 1996).

Die Hefe ist außerdem in der Lage, Thiosulfat zu Sulfid umzusetzen. Hierzu ist keine ATP-Aktivierung notwendig. Die Nutzung des "Sulfan"-Schwefelatoms von Thiosulfat erfolgt dabei unabhängig von Enzymen des Sulfatreduktionswegs, die Nutzung des "Sulfid"-Schwefelatoms setzt aber eine aktive Sulfitreduktase voraus. Hefen, bei denen der Sulfideinbau durch die O-Acetylhomoserinsulfhydrylase gestört ist, oder bei denen eine Mutation im Gen des oben erwähnten Transkriptionsaktivators Met4p vorliegt, sind nicht fähig auf einer anorganischen Schwefelquelle, wie Thiosulfat, zu wachsen (Thomas et al., 1992).

2.4.3 Die Sulfidbildung als Teil einer Entgiftungsstrategie

Die vermehrte Bildung von Schwefelwasserstoff aus anorganischen Schwefelverbindungen, die fatale Folgen für die Wein- und Bierproduktion haben kann, ist für die Hefe von Vorteil, wenn toxische Schwermetalle als Sulfide und sulfidhaltige Komplexe auszufällen sind. Die Bildung von Sulfiden, die unter physiologischen Bedingungen nahezu unlöslich sind, unterstützt die bei Eukaryonten übliche Strategie die Konzentration freier Metalle im Cytosol durch Abfangen in nicht toxischen Peptid- und Proteinkomplexen möglichst niedrig zu halten. An dem Abfangen von Metallen sind cysteinreiche Proteine wie Metallothioneine (Cup1p) (Brenes-Pomales, 1955; Fogel & Welch, 1982), Phytochelatine (Kneer et al., 1992) und das Peptid Glutathion beteiligt. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Cadmiumzugabe und verstärkter Bildung von säurelabilem Sulfid nachgewiesen (Murasugi et al., 1984, Reese & Winge, 1988, Mehra et al., 1988). Durch diese metallinduzierte H₂S-Bildung wird die Größe und die Stabilität der gemischten Sulfid-Peptid-Cadmium- oder Sulfid-Glutathion-Cadmium-Komplexe und damit auch die Cadmiumbindekapazität bestimmt (Dameron et al., 1989).

Von den unter aeroben Bedingungen lebenden Eukaryonten wird ferner die duale Eigenschaft vieler Thiolverbindungen genutzt, daß sie sowohl mit Metallen stabile Komplexe bilden als auch gute Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies sind. Dies spiegelt auch die sich zum Teil überlappende Transkriptionskontrolle durch das Yap1p- und das Skn7p-Regulon wieder (Lee et al., 1999). Die Induktion der Synthese von Proteinen, die vor reaktiven Sauerstoffspezies und auch vor hohen Cadmiumkonzentrationen schützen sollen, wie beispielsweise die Glutathion-reduktase, erfordert nur den Transkriptionsfaktor Yap1p. Die Induktion der Synthese von Proteinen, die nur der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies dienen, wie beispielsweise die Thioredoxin-Reduktase erfordert dagegen den Transkriptionsfaktor Yap1p und den Transkriptionsfaktor Skn7p. Eine *SKN7*-Deletionsmutante besitzt aus noch unbekannten Gründen einen eingeschränkten Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, aber eine doppelt so hohe Toleranz gegenüber Cadmium wie der Wildtyp (Lee et al., 1999).

Beispielhaft wird in Abbildung 2.3 sowohl ein spezifisches Regulationssystem für Kupfer, als auch ein generelles auf Glutathion basierendes Metallentgiftungssystem vorgestellt. Wie bei allen essentiellen Metallen liegt auch bei Kupfer eine geregelte

Homöostase vor. Bei Überschreitung einer kritischen Konzentration an freiem Kupfer in der Zelle bindet genügend Kupfer kooperativ an einen für Kupfer spezifischen, cysteinreichen Transkriptionsfaktor Ace1p (Thiele, 1988). Das führt dann über eine Änderung seiner Tertiärstruktur zur Expression von Genen kupferbindender, cysteinreicher Proteine, wie des Metallothioneins Cup1p. Ein anderes auf Glutathion basierendes Entgiftungssystem steht unter der Kontrolle des schon erwähnten Transkriptionsfaktors Yap1p. Da viele der an diesem System beteiligten Proteine, z.B. die Glutathionreduktase, und die durch sie erzeugten Produkte antioxidativ wirksam sind, ist es naheliegend, daß Yap1p aktiv wird, wenn organische Fremdstoffe oder Metalle oxidativen Streß erzeugen (Wemmie et al., 1994). Wie in Abbildung 2.3 dargestellt können Metalle direkt oder indirekt für oxidativen Streß sorgen. Zu einer Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies kann es beispielsweise durch Elektronentransfer von redoxaktiven Kupfer(I)ionen auf Sauerstoff, oder durch eine Verringerung der Konzentration an reduziertem Glutathion kommen, wenn es zur Bildung von Bis-Glutathionato-Metallkomplexen verbraucht wurde (Stohs & Bagchi, 1995). Die Bis-Glutathionato-Metallkomplexe werden dann zur weiteren Entgiftung in die Vakuole oder eventuell auch aus der Zelle transportiert (Żądziński et al., 1996). Dieser Transport von einer ganzen Reihe glutathionhaltiger Verbindungen wird von einem Protein mit der Bezeichnung *yeast cadmium factor* (Ycf1) übernommen. Parallel dazu findet sehr wahrscheinlich ein vesikulärer Transport von an Glutathion gekoppelten Fremdstoffen (GS-Xeno) zur Vakuole und zur Plasmamembran statt. Nach Fusion der Vesikel mit der Vakuolenmembran oder der Plasmamembran können die Glutathionkonjugate in die Vakuole oder in das umgebende Medium entlassen werden (Żądziński et al., 1996) (Abb. 2.3).

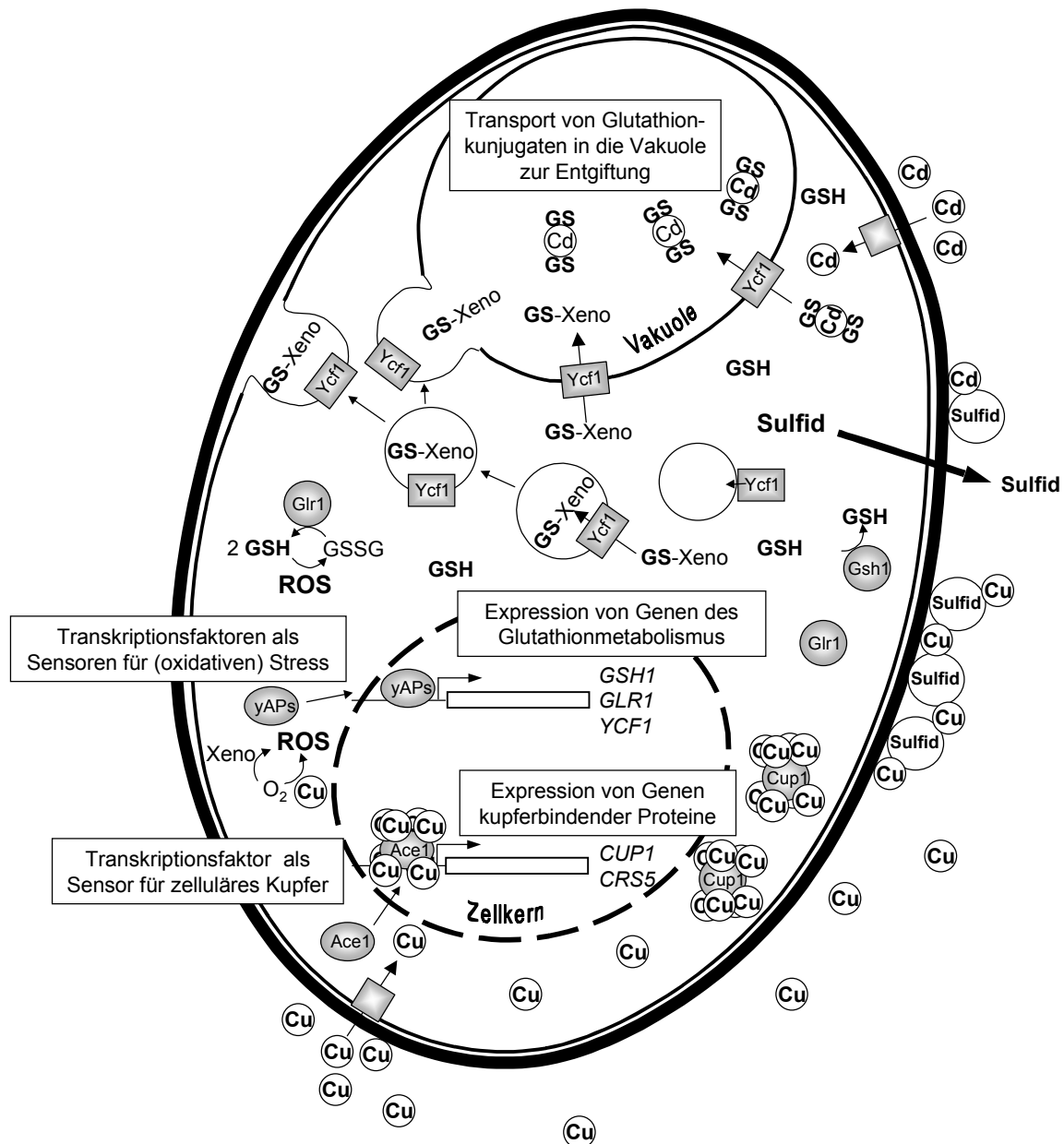


Abb. 2.3 Entgiftung toxischer Metalle in der Hefezelle am Beispiel der Metalle Kupfer und Cadmium. Es sind drei Systeme dargestellt. Das Metallothionein (Cup1p) verhindert einen zu hohen Kupferspiegel in der Zelle. Das auf Glutathion (GSH) basierende System wird von der Hefe zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und hoher Cadmiumkonzentrationen benötigt. Durch Sulfid können Kupfer, Cadmium und andere Metalle bereits außerhalb der Zelle abgefangen werden. Gsh1: γ -Glutamylcysteinsynthetase, Glr1: Glutathionreduktase, Ycf1: Transportprotein für glutathionhaltige Verbindungen, Xeno: Xenobiotika

Kürzlich wurde in Hefe das *SLF1*-Gen charakterisiert, das der Hefe die Fähigkeit zur Biomineralisation von Kupfersulfid außerhalb der Zelle verleiht (Yu et al., 1996). Dadurch werden die zellinternen Entgiftungssysteme, wie beispielsweise das *CUP1*-System, entlastet. Wenn das *SLF1*-Gen überexprimiert wird, wirkt es als Suppressor für den kupfersensitiven Phänotyp von *cup1* und *cup14* Zellen. Es sorgt bei hohen Kupferkonzentrationen über einen noch unverstandenen Mechanismus dafür, daß das Kupfer schon in der Zellwand als Sulfid abgefangen wird, ohne die Plasmamembran und zellinterne Bereiche zu schädigen. Die Möglichkeit zur Biomineralisation mit Slf1p ist spezifisch für Kupfer und unter dem Einfluß von Slf1p kommt es nicht zu einer verstärkten H₂S-Freisetzung in das Medium. Aus diesen Gründen wurden keine Ausfällungen von Zn(II)- oder Cd(II)-Ionen bei einer Überexpression des *SLF1*-Gens beobachtet. Somit ergibt sich kein genereller Schutz vor Schwermetallen. Wie experimentell gezeigt wurde, stammt ein großer Teil des benötigten Sulfids aus der streng regulierten Sulfatreduktion (Yu et al., 1996).

2.5 Thema der Arbeit

Die Entwicklung einer effektiven, kostengünstigen Sanierungsstrategie für schwermetallbelastete Böden zur Verringerung der Gefahr, die von der Mobilisierbarkeit der Schwermetalle ausgeht stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar.

Die H₂S-Bildung durch Hefe bietet einen neuen Ansatz zur Bodensanierung. Das in Böden zum Teil in ausreichendem Maß vorhandene Sulfat wird allerdings von der Hefe nur streng reguliert zur Deckung des zellinternen H₂S-Bedarfs reduziert. Für eine erhöhte H₂S-Bildung werden daher andere Schwefelquellen benötigt. Der Einsatz von Schwefel im Boden hätte den Vorteil, daß er nicht so leicht in das Grundwasser ausgewaschen wird und somit der Hefe länger als Schwefelquelle zur Verfügung stehen würde. Die H₂S-Bildung aus elementarem Schwefel wurde bereits nachgewiesen. Die dabei ablaufenden zellulären Vorgänge sind allerdings unbekannt. Elementarer Schwefel wurde bisher auch nicht als Zwischenprodukt des Schwefelstoffwechsels in der Hefe nachgewiesen. Deshalb konzentrierten sich die Untersuchungen in dieser Arbeit auf diese Schwefelquelle.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, einerseits unter Laborbedingungen also ohne den Einfluß des komplexen Systems Boden zu prüfen, ob mit dem Einsatz von Hefe und Schwefel eine biologische H_2S -Bildung auch unter Bedingungen möglich ist, unter denen sulfatreduzierende Bakterien nicht zur Immobilisierung von Schwermetallen eingesetzt werden können. Ein weiteres Ziel war es Einblicke in die Stoffwechselwege bei der Umsetzung des Schwefels zu gewinnen. Aufgrund der umfangreichen Thematik und der vielen noch offenen Fragen wurden für diese Arbeit einige Teilaspekte ausgewählt, um durch deren Klärung eine Grundlage für die Planung von Pilotversuchen zu schaffen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob der Schwefel auf einem von der Sulfatreduktion unabhängigen Weg reduziert wird, der nicht der strengen Regulation unterliegt.

Im Vergleich mit verschiedenen anorganischen Schwefelquellen sollte ermittelt werden, wie gut sich der Schwefel als Schwefelquelle für die Hefe eignet. Durch eine Kultivierung der Hefe in Gegenwart von verschiedenen Schwermetallen sollte geprüft werden, welche Auswirkungen diese Metalle auf Wachstum und H_2S -Bildung haben und ob die schwefelgestützte H_2S -Bildung zur Ausfällung der Schwermetalle genutzt werden kann. Um Informationen über den zeitlichen Verlauf der H_2S -Bildung nach einer Schwefelzugabe und über die Kulturparameter für den Einsatz von Hefe und Schwefel unter aeroben Bedingungen zu erhalten, waren kontinuierliche Messungen während der Kultivierung der Hefe in einem belüfteten Laborfermenter vorgesehen. Schließlich sollte die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten in Hefezellextrakten eine Lokalisierung der Schwefelreduktaseaktivität in der Zelle ermöglichen und gegebenenfalls Hinweise auf Enzyme geben, die am Umsatz des Schwefels beteiligt sind.

3 Material und Methoden

3.1 Medien und Puffer

YPD - Vollmedium	1 % (w/v) Hefe-Extrakt 2 % (w/v) Pepton 2 % (w/v) Glucose 2 % (w/v) Agar (optional)
SD - Minimalmedium	0,67 % (w/v) Yeast-Nitrogen-Base mit 2 % (w/v) Glucose (wenn nichts anderes angegeben) 2 % (w/v) Agar (optional)
LB (Luria-Bertani) - Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % NaCl pH 7,5 1,6 % (w/v) Agar (optional)
TE - Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1 mM EDTA
STET - Puffer	8 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 50 mM EDTA 5 % (w/v) Triton X-100

Nach Bedarf wurden dem SD-Minimalmedium L-Leucin bis zu einer Endkonzentration von 30 mg/l und Uracil, L-Tryptophan und Histidin-HCl bis zu einer Endkonzentration von 20 mg/l zugesetzt.

Ampicillin wurde dem LB-Medium gegebenenfalls in einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben.

3.2 Mikroorganismen

Saccharomyces cerevisiae

CEN.PK2-1D [Mat α , leu2-3,112 , ura3-52 , trp1-289 , his3 Δ 1, MAL2-8^c, SUC2]

entwickelt zur Genfunktionsanalyse im Rahmen des BMBF Functional Analysis Network (Entian & Kötter, 1998)

CEN.PK113-1A [Mat α , LEU⁺ , URA⁺ , TRP⁺ , HIS⁺ , MAL2-8^c , SUC2]

korrespondierender Wildtyp-Stamm

Escherichia coli

DH5 α (Hanahan, 1983)

3.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* im Schüttelkolbenmaßstab erfolgte bei 30 °C, für aerobe Kulturen auf einem Schüttler bei 180 - 220 rpm mit einem Kulturvolumen von 50 ml bis 250 ml und für anaerobe Kulturen im Brutschrank in Schott-Gefäßen mit autoklavierbarem Schraubdeckel (GL45) und Silikonseptum mit einem Kulturvolumen von 50 ml bis 100 ml.

Für die Online-Messungen der H₂S-Entwicklung erfolgte die Anzucht bei 30 °C in einem 1 l-Laborfermenter, der in der Glasbläserei der Universität angefertigt wurde. Der Aufbau ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.

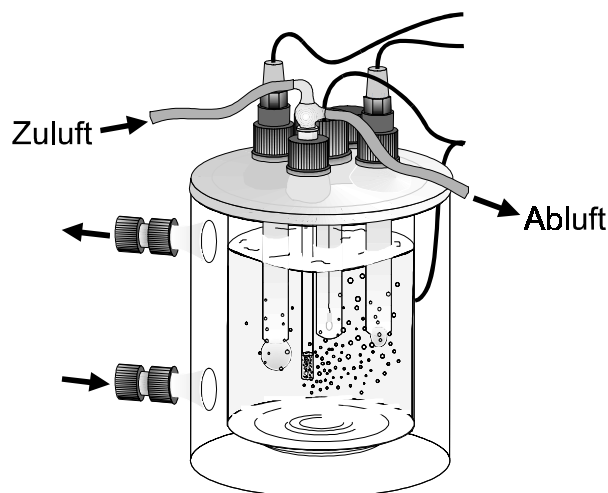


Abb. 3.1 Laborfermenter mit den zugehörigen Versorgungs- und Sensoranschlüssen

Ausgestattet war der Fermenter mit zwei autoklavierbaren Elektroden (Hamilton) zur pH-Wert- und Redoxpotentialmessung und außerdem zur Trübungsmessung mit einer Lichtquelle in Kombination mit einem Sensor, der gegen Umgebungslicht abgeschirmt war. Im Fermenterabluftstrom befanden sich zwei Gassensoren und ein Temperatursensor. Die Schwefelwasserstoffkonzentration wurde mit einem amperometrischen 3-Elektroden-Sensor mit einem organischem Anteil im Elektrolyten (Sensoric H₂S 3E 30) gemessen. Er bestand aus einer Meß-, einer Bezugs- und einer Gegenelektrode. Als Meßelektrode diente eine Ag/Ag₂S-Elektrode. Wird zwischen der Meß- und der Gegenelektrode eine Spannung angelegt, die über die Bezugselektrode und einen Potentiostaten konstant gehalten wird, fließt proportional zur Schwefelwasserstoffkonzentration ein Strom aufgrund einer Reaktion von Silber mit Schwefelwasserstoff zu Silbersulfid und einer Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die werksseitige Kalibrierung des Sensors wurde in einem abgeschlossenen Gefäß mit Schwefelwasserstoff, der aus einer bekannten Sulfidmenge erzeugt wurde, überprüft. Die Alkoholkonzentration im Medium wurde über den ausgeblasenen Alkoholanteil in der Gasphase bestimmt. Dazu diente ein Gassensor vom Typ eines SnO₂-Perlistors (Figaro TGS 800). Das an Luft auf eine bestimmte Temperatur aufgeheizte mikrokristalline SnO₂ adsorbiert Sauerstoff auf der Oberfläche. Dabei kommt es zu einem Transfer von Donorelektronen aus der Kristalloberfläche zum Sauerstoff und zur Ausbildung eines Oberflächenpotentials. Dieses Oberflächenpotential bildet mit seiner Potentialbarriere einen Widerstand für den freien Elektronenfluß zwischen zwei angrenzenden SnO₂-Körnchen. In Gegenwart eines reduzierenden Gases wird dieses durch den Sauerstoff oxidiert und somit die auf der Oberfläche adsorbierte Menge des Sauerstoffs herabgesetzt. Dadurch verringert sich das Oberflächenpotential und der Widerstand des SnO₂-Sensormaterials nimmt ab. Kalibriert wurde der Sensor, indem zum Medium definierte Alkoholmengen zugesetzt wurden, die in dem zu erwartenden Konzentrationsbereich lagen. In einigen Fällen wurde auch eine enzymatische Bestimmung zum Vergleich durchgeführt. Die Sensordaten wurden mittels einer von Herrn Fahrney (Universität Wuppertal) entwickelten und speziell angepaßten Elektronikschaltung aufbereitet. Die Aufzeichnung in einem Rechner erfolgte alle 30 Sekunden unter Verwendung einer 12 bit A/D-Wandlerkarte (Conrad Electronic).

3.4 Molekularbiologische Methoden

Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem Shuttle Vektor YEp351

1 ml einer Übernacht-Kultur wurde zu 50 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 angezogen, 5 Minuten bei 5.000 g abzentrifugiert und in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut 5 Minuten bei 5.000 x g abzentrifugiert und in 2,5 ml 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen mit 20 ng DNA in 20 µl Volumen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden auf 42 °C erwärmt, dann auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden kurz abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert.

Plasmid-DNA-Isolierung

Für die Plasmid-Isolierung wurde die "boiling-lysis"-Methode verwendet (Sambrook et al., 1986). 3 ml LB/Amp-Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml Bakterien wurden 2 Minuten bei 5.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert und das Sediment in 500 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozymlösung (40 mg/ml) wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 2 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt und dann auf Eis 5 Minuten abgekühlt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch 15 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) sedimentiert und mit 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA wurde das Sediment in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Transformation von *S. cerevisiae*

Es wurden intakte Zellen in Gegenwart von Lithium transformiert (Soni et al., 1993). Die Hefezellen einer 1,5 ml Übernachtskultur wurden für 3 Minuten bei 4.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die zu transformierende Plasmid-DNA (2,5 µg in 25 µl) wurde zusammen mit 10 µl (50 µg) Lachssperma-DNA zum Zellsediment gegeben und gut mit diesem vermischt. Anschließend wurden 500 µl 40 % PEG 3350 (Sigma), 0,1 M Lithiumacetat, 10 mM Tris-Cl pH 7,5 , 1 mM EDTA] und 60 µl DMSO dazugegeben und die Zellen 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten einer Hitzeschockbehandlung bei 42 °C unterzogen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit 500 µl TE-Puffer gewaschen. Zum Ausplattieren wurden die Zellen in TE-Puffer resuspendiert.

3.5 Hefezellaufschluß und Fraktionierung der Zellbestandteile

Das Vorgehen orientierte sich an einer Vorschrift zur Isolierung und Reinigung von Plasmamembranen aus *S. cerevisiae* (Serrano, 1988). Alle angegebenen Schritte wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt.

Zellaufschluß

Die in YPD-Medium über Nacht im 1l-Laborfermenter angezogenen Zellen wurden geerntet, mit eiskaltem bidest. Wasser gewaschen und erneut zur Feuchtgewichtsbestimmung sedimentiert. Für den Zellaufschluß wurden etwa 25 g Zellen mit eiskaltem bidest. Wasser auf ein Volumen von 84 ml gebracht und mit 5 ml 0,5 M Tris-Cl pH 8,5 , 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 und 0,5 ml 0,1 M PMSF gut gemischt. Anschließend wurden jeweils 22 ml dieser Mischung mit 43 ml Glasperlen (0,45 - 0,5 mm) versetzt und in einem Glasperlen-Homogenisator (Braun-Melsungen) viermal für 30 Sekunden aufgeschlossen. Zwischendurch wurde das Aufschlußgefäß kurz auf Eis gekühlt. Zum Schluß wurden die Glasperlen durch Vakuumfiltration über eine Glasfritte entfernt und mit wenig TED-Aufschlußpuffer (10 mM Tris-Cl pH 7,5 ,

0,2 mM EDTA, 0,2 mM DTE) nachgewaschen. Die Filtrate wurden gesammelt, das Gesamtvolumen bestimmt und vor der differentiellen Zentrifugation 5 ml Probe (Fraktion 1) abgenommen. Diese Probe wurde aliquotiert bei -70 °C eingefroren.

Differentielle Zentrifugation

Zum Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde das Zellhomogenat zunächst für 10 Minuten bei 700 x g (2400 rpm, Kontron Centrifuge H-401, Rotor A 8.24) zentrifugiert. Das Sediment, das hauptsächlich Zellkerne und Zellwände enthält, wurde in möglichst wenig Aufschlußpuffer aufgenommen, mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator suspendiert und ein zweites Mal bei 700 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt. Eine 10 ml Probe wurde abgenommen (Fraktion 3), das Volumen bestimmt, aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Das zähflüssige Sediment wurde ebenfalls eingefroren (Fraktion 2). Die gesammelten Überstände wurden weiter für 20 Minuten bei 20.000 x g (13.000 rpm, Kontron Centrifuge H-401, Rotor A 8.24) zentrifugiert. Der cytosolische Überstand (Fraktion 5) wurde aliquotiert bei -70 °C eingefroren. Das Sediment enthielt angereichert Plasmamembranen und Mitochondrien (Fraktion 4) und wurde in wenig Aufschlußpuffer mit 1,2 M Sorbitol aufgenommen, mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator suspendiert und anschließend nach Aliquotieren bei -70 °C eingefroren.

3.6 Präparation des hydrophilen, kolloiden Schwefels

In hydrophiler, kolloider und damit leicht mobilisierbarer Form wird Schwefel von einigen Bakterien temporär im Periplasma (Pattaragulwanit et al., 1998) oder extrazellulär (Steudel et al., 1987) gespeichert. Obwohl auch pulverförmiger Schwefel, das heißt präzipitierter Schwefel oder sogenannte Schwefelblume, von Mikroorganismen reduziert werden kann, wird für metabolische oder biochemische Untersuchungen hydrophiler, kolloider Schwefel benötigt (Fauque, 1994), weil es sonst aufgrund der notwendigen Aktivierung des grobkristallinen Schwefels vor der Umsetzung zu längeren Lag-Phasen kommen würde. Der in dieser Arbeit verwendete hydrophile, kolloide Schwefel wurde nach der Methode von Roy und

Trudinger hergestellt (Roy & Trudinger, 1970). Dazu wurden bei 0 °C unter konstantem Rühren 30 ml einer 3 M Thiosulfatlösung tropfenweise mit 10 ml konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Die zunächst entstandene weiße Schwefelmilch wandelte sich während der weiteren Schwefelsäurezugabe in eine hellgelbe Schwefelsuspension um. Da bei der Reaktion größere Mengen SO_2 freigesetzt wurden, wurden alle Schritte unter einem Abzug durchgeführt. Zur Entfernung von SO_2 , Thiosulfat und Polythionaten wurden die Schwefelkolloide mit 40 ml gesättigter NaCl-Lösung ausgefällt. Der ausgefällte Schwefel wurde durch 5 Minuten Zentrifugation bei 10.000 x g (9.000 rpm, Kontron Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Rotor A 8.24) von der überstehenden Flüssigkeit abgetrennt. Das gesammelte Präzipitat wurde zur weiteren Reinigung noch zweimal aufgenommen und wieder ausgefällt. Dafür wurden das Präzipitat jeweils mit 50 ml bidest. Wasser resuspendiert und durch Zusatz von 50 ml gesättigter NaCl-Lösung und 5 Minuten Zentrifugation bei 10.000 x g wieder präzipitiert. Zum Abschluß wurde der Schwefel in 50 ml bidest. Wasser resuspendiert und über Nacht gegen 3 l bidest. Wasser dialysiert. Das Wasser wurde zweimal gewechselt. Damit wurde überschüssiges Salz entfernt und es wurde eine hellgelbe Schwefelsuspension, die aus Schwefelkolloiden und sehr feinen Schwefelteilchen bestand, erhalten. Der Schwefelgehalt einer solchen Suspension schwankte zwischen 9 mg/ml und 16 mg/ml .

3.7 Messung der Schwefelreduktion mit verschiedenen Hefezellfraktionen

Zunächst wurden jeweils 200 µl einer Hefezellfraktion mit 100 µl Wasser in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß verdünnt und mit jeweils 20 µl hydrophilem Schwefel (300 mM bezogen auf atomarem Schwefel) gemischt. Anschließend wurde für einen Test auf Substanzen, die die Schwefelreduktion durch die Zellfraktionen unterstützen könnten, 200 µl dieser Mischung mit 40 µl NADH (5 mM), 40 µl NADPH (5 mM) oder 100 µl Glucose (1%) zusammenpipettiert und die Ansätze mit 50 mM Tris-Cl Puffer pH 7,5 auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Bei den Kontrollansätzen jeder Zellfraktion wurden die 200 µl obiger Mischung direkt auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden gut durchmischt und dann auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entnahme von zweimal 200 µl zur Bestimmung der Sulfidkonzentration erfolgte nach 45 Minuten, 90 Minuten und 4,5 Stunden. Für diese drei Probenahmezeitpunkte wurden jeweils unabhängige Testansätze angesetzt. Die 200 µl-Proben wurden auf

Eis gelagert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) wurden noch am selben Tag jeweils 100 µl des Überstandes zur Sulfidbestimmung eingesetzt. Zur Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode wurden jeweils 10 µl und 30 µl einer Hefezellfraktion eingesetzt.

3.8 Spektroskopische Bestimmung der NADPH-Oxidation während der Reduktion des hydrophilen Schwefels durch die cytosolische Hefezellfraktion

Die Bestimmung der NADPH-Oxidation in einer durch Schwefel und Zellbestandteile getrübbten Lösung erfolgte mit einem Diodenarray-Spektrometer der Firma Zeiss Jena (Spectrocord S10 UV-VIS). Für die Reaktionen wurde eine Quarzküvette (Hellma, Schichtdicke 1 cm) mit Rührer eingesetzt. In einem Meßzyklus von 2 Sekunden wurde ein Spektrum aufgenommen. Insgesamt wurden innerhalb einer 10-minütigen Messung 300 Meßzyklen registriert. Vorgelegt wurden in der Küvette 700 µl 0,25 M Tris-Cl pH 7,5, 100 µl 10 mM EDTA, 10 µl 50 mM GSH und eine entsprechende Menge an bidest. Wasser, so daß das Endvolumen nach der Schwefelzugabe 1500 µl betrug. Nach dem Nullabgleich wurden nach 50 Sekunden zunächst bei der Messung (a) 20 µl aktive Zellfraktion 5, bei der Messung (b) 20 µl inaktive, bei 80 °C denaturierte, Zellfraktion 5 und bei der Messung (c) 20 µl Wasser hinzupipettiert. Nach 90 Sekunden erfolgte bei allen Messungen eine NADPH-Zugabe von 20 µl (5 mM). Nach 2,5 Minuten wurde als letzte Komponente 10 µl hydrophiler Schwefel (35 mM) zugegeben.

3.9 Bestimmung der NADPH-abhängigen Umsetzung des Schwefels durch isolierte Glutathionreduktase

Die Messungen wurden unter den selben technischen Voraussetzungen wie in 3.8 beschrieben durchgeführt.

In einer Meßreihe wurden 1,2 ml 0,25 M Tris-Cl Puffer pH 7,5, 0,2 ml 10 mM EDTA und eine entsprechende Menge Wasser für ein Endvolumen von 3 ml vorgelegt. Nach dem Nullabgleich wurden die Messungen gestartet und nach 50 Sekunden zunächst 20 µl 33 mM hydrophiler Schwefel nach 1 Minute Meßzeit 30 µl 100 mM

Glutathion und nach 2 Minuten Meßzeit 160 µl 5 mM NADPH zugegeben. Gestartet wurde die enzymatische Umsetzung mit 12 µl Glutathionreduktase entsprechend 1,6 U/ml in der Küvette.

Für die Messungen zur Abhängigkeit der Enzymreaktion von der Schwefel- oder der Glutathionkonzentration wurden 600 µl 0,25 M Tris-Cl Puffer pH 7,5, 100 µl 10 mM EDTA und eine entsprechende Menge Wasser für ein Endvolumen von 1,5 ml vorgelegt. Nach dem Nullabgleich wurden die Messungen gestartet und nach 20 Sekunden zunächst variable Mengen Schwefel (0 µl, 20 µl, 40 µl und 60 µl/ 33 mM) nach 50 Sekunden 15 µl Glutathion (100 mM) und nach 120 Sekunden 40 µl NADPH (5 mM) hinzugefügt. Alternativ wurden 60 µl Schwefel (33 mM) vorgelegt und nach 50 Sekunden Meßzeit variable Mengen Glutathion (4 bzw. 15 µl/100 mM, oder 6 µl bzw. 7 µl/50 mM) und nach 120 Sekunden 40 µl NADPH (5 mM) hinzugegeben. Gestartet wurden die enzymatischen Umsetzungen mit 8 µl Glutathionreduktase, was 1,7 U/ml in der Küvette entsprach.

3.10 Verschiedene analytische Methoden

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Zellfraktionen wurde nach der Biuret-Methode ermittelt (Beisenherz et al., 1953). Dazu wurden 10 - 30 µl Probe mit bidest. Wasser auf 100 µl aufgefüllt, die Proteine mit 1 ml 6 % Trichloressigsäure durch 30 Minuten Inkubation auf Eis gefällt und durch 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment mit 1 ml Biuret-Reagenz [0,5 % Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat, 0,3 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 % KI in der angegebenen Reihenfolge gelöst und mit NaOH auf 0,2 N NaOH eingestellt] versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Extinktion der Überstände bei 546 nm gemessen. Nach Zerstörung des Farbkomplexes durch einige Körnchen Kaliumcyanid wurde die Extinktion bei 546 nm erneut gemessen und diese durch Trübung verursachte Extinktion vom ersten Meßwert abgezogen. Zur Aufstellung einer Standardgeraden wurde eine Stammlösung von 10 mg/ml Rinderserumalbumin verwendet.

Sulfidbestimmung

Zur Sulfidbestimmung wurde die Vorschrift von Rabinowitz (Rabinowitz, 1978) leicht abgeändert. 500 µl Probe wurden mit 500 µl 2,6 % Zinkacetat und 100 µl 6 % NaOH in einem verschließbaren Glasgefäß versetzt und für 1 Minute lang gut geschüttelt. Danach wurde 250 µl DMPD-Lösung (0,2 % N,N-Dimethyl-phenylendiamin-Hydrochlorid in 5 M HCl) zugegeben und kurz geschüttelt bis die Lösung klar war. Zuletzt wurde 100 µl 11,5 mM FeCl₃ in 0,6 M HCl hinzupipettiert und 1 Minute lang geschüttelt. Die Ansätze wurden dann mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) eventuelle Trübstoffe sedimentiert. Der Sulfidgehalt der Ansätze wurde photometrisch durch Messung der Extinktion des entstandenen Methylenblaus bei einer Wellenlänge von 670 nm ermittelt. Für eine Standardgerade wurde jeweils eine frische 0,1 mM Stammlösung aus vorsichtig auf einem Papiertuch gewaschenen Natriumsulfidkristallen (Na₂S · 9 H₂O) angesetzt.

Für die Bestimmung von gebundenem extra- und intrazellulärem Sulfid wurden die Sedimente der Proben aus den bleihaltigen Kulturen vorbehandelt. Die Sedimente aus 100 µl Probe wurden zunächst in 1 ml 50 mM Tris-Cl pH 7,5 resuspendiert und bei Raumtemperatur mit 20 µl Lyticase (SIGMA 3800 U/ml) bis zum vollständigen Zellaufschluß (Kontrolle am Mikroskop) inkubiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C) wurde der Überstand verworfen. Das Sediment, das die Zelltrümmer und das Bleisulfid enthielt, wurde in 100 µl 1 % SDS, 0,2 % NaOH resuspendiert, um die Zellbestandteile zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Überstand mit den gelösten Zellbestandteilen verworfen. Das Sediment, welches das Bleisulfid enthielt, wurde durch Suspension in 500 µl bidest. Wasser fünffach verdünnt und so zur obigen Sulfidbestimmung eingesetzt.

Glucosebestimmung

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration in den Kulturüberständen wurde ein Verfahren zur Detektion von Glucose und anderen Zuckern nach dünnschichtchromatographischer Trennung eingesetzt (Grösz & Braunsteiner, 1989). Von jeder Probe wurden je nach zu erwartender Konzentration 1-5 µl neben 1 µl Aliquots eines Standards (0,01; 0,05; 0,1; 0,25 und 0,5 % Glucose gelöst in einer 1:1-Mischung aus Wasser und Methanol auf eine Kieselgel 60 Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die DC-Platte wurde für 30 Minuten bei 55°C getrocknet. Für die Detektion wurde die getrocknete Platte für 3 Sekunden in eine Lösung von 0,5 g Thymol in 95 ml Ethanol (96%) und 5 ml konzentrierter H₂SO₄ getaucht. Anschließend wurde sie 10 Minuten bei 110°C erhitzt. Bei Anwesenheit von Glucose erscheinen rötlich gefärbte Auftragspunkte, die densitometrisch ausgewertet wurden.

Bleibestimmung

Das aus den Hefekulturen extrahierbare Blei wurde nach zwei verschiedenen Verfahren bestimmt.

Zum einen erfolgte die Extraktion und anschließende photometrische Bestimmung des nicht als Sulfid gefällten Bleis mit Dithizon (1,5-Diphenylthiocarbazon) (Iwantscheff, 1972; Merck-Firmen-broschüre). Die Methode eignet sich zur Bestimmung von 0,001 bis 0,1 mg Pb²⁺ absolut, beziehungsweise für Pb²⁺-Konzentrationen von 0,02 - 2,0 mg/l .

Andere in der Probe anwesende Metallionen wurden durch Zugabe von Kaliumcyanid maskiert und schwerlösliche Bleiverbindungen, wie Bleisulfat und Bleiphosphat, wurden durch Zugabe von Kaliumnatriumtartrat in Lösung gebracht. Bleisulfid wird auf diese Weise nicht erfaßt. Der Bleiionengehalt im Probenvolumen soll 100 µg nicht überschreiten. Zur Herstellung der benötigten Maskierungslösung wurden zunächst 20 g Kaliumhydrogencarbonat, 5 g Kaliumcyanid und 5 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat in 20 ml Ammoniaklösung (25%) und etwas bidest. Wasser gelöst. Diese Lösung wurde anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Eine Probe von 50 ml, eventuell verdünnt um in den vorgegebenen Konzentrationsbereich für die Extraktion zu kommen, wurde in einen Scheidetrichter überführt mit 5 ml Maskierungs-Lösung versetzt und 10 ml frisch angesetzte Dithizonlösung (3 mg Dithizon in 200 ml Chloroform) zugesetzt. Es wurde 5 Minuten geschüttelt, wobei sich je nach Bleimenge die ursprünglich durch Dithizon grün gefärbte Chloroformphase von blau über pink bis kirschrot verfärbte. Die abgesetzte Chloroformphase wurde über einen trockenen Papierfilter in ein mit Glasstopfen verschließbares Gefäß abgelassen. Das Ausschütteln wurde noch ein zweites Mal mit 15 ml Dithizonlösung wiederholt. Die gesammelten Chloroformextrakte wurden bei 515 nm gegen eine gleichbehandelte Blindprobe mit 50 ml bidest. Wasser anstelle der Probe gemessen. Eine Standardkurve wurde mittels Standardlösungen aus Bleiacetat aufgestellt.

Außerdem wurde das in den Kulturen gelöste oder in austauschbarer Form vorliegende Blei nach einem genormten Verfahren extrahiert und analysiert. Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der UVE GmbH in Neuss durchgeführt. Statt des im Standardverfahren (DIN 38 414-S4) zu verwendenden destillierten Wassers wurden die Hefekulturen mit 12,5 mM CaCl_2 bei pH 7 extrahiert, um auch das Blei aus der austauschbaren Fraktion zu erfassen. Das Feststoff-Flüssigkeitsverhältnis betrug etwa 1:10. Bei der 24stündigen Extraktion auf dem Schüttler wurde die Luft in den Extraktionsgefäßen durch Stickstoff ersetzt, um eine Oxidation des Bleisulfids zu vermeiden. Nach Zentrifugation wurde der Bleigehalt der Extrakte durch Optische-Emissions-Spektrometrie nach Anregung im induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES) bestimmt (DIN 38 406-E22).

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluß von Thiosulfat und hydrophilem Schwefel auf das Hefewachstum und die H₂S-Bildung

In Reihenversuchen wurde untersucht, wie gut sich hydrophiler Schwefel im Vergleich zu anderen anorganischen Schwefelquellen zur H₂S-Bildung durch Hefe eignet. Der hydrophile Schwefel war eine Mischung aus sehr feinen, in Wasser suspendierten Schwefelteilchen. Für den Vergleich zur H₂S-Bildung wurde die Hefe in sulfathaltigem SD-Minimalmedium kultiviert, dem entweder hydrophiler Schwefel, oder Thiosulfat zugesetzt wurde. Kulturen im sulfathaltigen SD-Minimalmedium ohne Zusatz dienten als Kontrolle. Außerdem wurde durch OD₆₀₀-Messungen der Einfluß der Schwefelquellen auf das Hefewachstum bestimmt.

Wie in Tabelle 4.1a dargestellt, führte die Zugabe von Thiosulfat zu einer leichten und die Zugabe von hydrophilem Schwefel zu einer stärkeren Reduktion der Zelldichte gegenüber den Kontrollkulturen mit Sulfat als Schwefelquelle. Beim Einsatz von Schwefel war die Zelldichte um 25 % unter aeroben und um 33 % unter anaeroben Bedingungen verringert.

Tab. 4.1a Sulfidbildung aerober und anaerober Hefekulturen mit verschiedenen Schwefelquellen. Die Zellen wurden entweder nur in SD-Minimalmedium, das Sulfat enthielt, oder in diesem Medium mit zusätzlich Na₂S₂O₃ * 5 H₂O (124 mg/l) bzw. hydrophilem Schwefel (16 mg/l) für 30 Stunden bei 30 °C gezogen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Kulturen. n.n.: nicht nachweisbar.

Schwefelquelle	Biomasse [OD ₆₀₀]		Sulfidgehalt der Kulturen [µM]	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Sulfat	2,4	1,8	n.n.	n.n.
Thiosulfat	2,1	1,6	8	22
Schwefel	1,8	1,2	13	27

In Anwesenheit von Thiosulfat und hydrophilem Schwefel ließ sich in aeroben und in anaeroben Kulturen H_2S im Kulturüberstand nachweisen. In den Kontrollkulturen mit Sulfat als Schwefelquelle war keine H_2S -Freisetzung zu beobachten. Gegenüber dem Einsatz von Thiosulfat wurde mit Schwefel bei aerober Inkubation etwa doppelt so viel und bei anaerober Inkubation etwa anderthalbmal so viel H_2S gebildet.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die wachstumshemmende Wirkung von Thiosulfat und Schwefel durch Abfangen des H_2S aufgehoben werden kann. Dazu wurde Kupfer(II)chlorid in der nichttoxischen Konzentration von 0,1 mM zugegeben. Wie man in Tabelle 4.1b erkennen kann, wurde der wachstumshemmende Effekt des Thiosulfats und des hydrophilen Schwefels etwas abgemildert.

Tab. 4.1b Die Beeinflussung des Wachstums aerober Hefekulturen in SD-Minimalmedium und mit Thiosulfat bzw. Schwefel versetztem SD-Minimalmedium durch die Zugabe von $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Bis auf die Konzentration an $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, die 0,1 mM betrug, waren alle Konzentrationen identisch zu denen in Tab. 4.1a.. Die Kulturen wurden jeweils zweifach angesetzt und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Schwefelquelle	Biomasse [OD_{600}]	
	ohne Cu^{2+}	0,1 mM Cu^{2+}
Sulfat	2,4	2,4
Thiosulfat	2,0	2,2
Schwefel	1,4	1,7

Insgesamt gesehen führte die Zugabe von hydrophilem Schwefel trotz seiner leicht wachstumshemmenden Wirkung zu einer deutlich bestimmbarer H_2S -Freisetzung. Alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren sich deshalb auf diese für die Hefe geeignete und in großen Mengen verfügbare Schwefelquelle.

4.2 Verstärkung der H₂S-Bildung durch toxische Schwermetalle im Medium

Sowohl toxische Schwermetallionen als auch essentielle Schwermetallionen in toxischer Konzentration aktivieren die in der Einleitung erwähnten zellulären Schutzmechanismen, die dann für ein Abfangen und Ausfällen der Schwermetallionen sorgen. Bisher gibt es in der Literatur nur sehr wenige Hinweise, daß es dabei zu einer Verstärkung der H₂S-Bildung kommt, um die zellulären Systeme bei der Entgiftung der Schwermetalle zu unterstützen. In *S. cerevisiae* sorgt beispielsweise das Protein Slf1p bei zu hoher Kupferionenkonzentration durch seine noch nicht konkret bekannte Funktion spezifisch für eine Biomineralisation von Kupfer als Kupfersulfid in der Zellwand. Da es aber unter seinem Einfluß nicht zu einer Freisetzung von Sulfid kommt, bietet es keinen Schutz vor zu hohen Konzentrationen anderer Schwermetalle (Yu et al., 1996).

Deshalb wurde mit verschiedenen Basismedien und Schwefelquellen geprüft, unter welchen Bedingungen die Freisetzung von Sulfid einen generellen Schutz vor Schwermetallionen bieten kann und ob sich diese Freisetzung durch bestimmte Schwermetallionen verstärken läßt. Abbildung 4.1 zeigt zwei Agarplatten aus diesen Testreihen. Als Basismedium wurde hier das klare und kaum gefärbte SD-Minimalmedium, dem zur zusätzlichen Sichtbarmachung der Sulfidbildung 0,1 % Ammoniumbismutcitrat zugesetzt worden war, und hydrophiler Schwefel eingesetzt. Auf die Agarschicht mit den Basismedien wurde jeweils eine Suspension von Hefezellen des WT-Stammes PK113-1A in niedrigschmelzender Agarose gegossen. Aus diesen Platten wurden dann vier zylinderförmige Stücke ausgestanzt und in die entstandenen Löcher jeweils 100 µl einer Metallsalzlösung eingefüllt. Anschließend wurden die Platten mindestens zwei Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Aufgrund der Bildung von Sulfid entwickelte sich je nach Metallsalzlösung eine mehr oder weniger stark gefärbte Zone mit Metallsulfidniederschlag, die durch die Ausfällung von braunem Bismutsulfid zusätzlich hervorgehoben wurde.

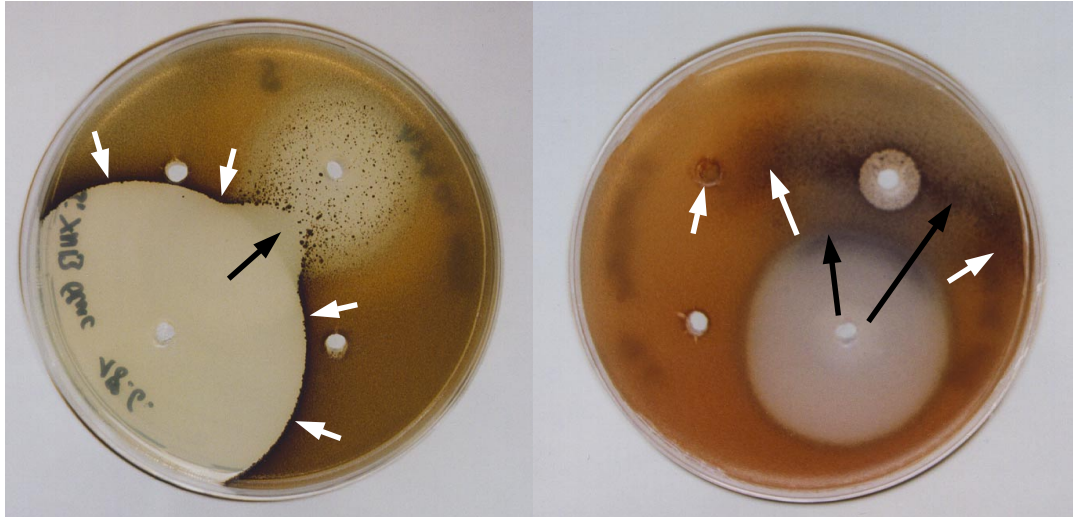


Abb. 4.1 Untersuchung der Schwermetalltoxizität und der Sulfidbildung bei *S. cerevisiae*. Die abgebildeten Platten bestehen aus einem Agarboden basierend auf SD-Minimalmedium mit hydrophilem Schwefel sowie 0,1 % Ammoniumbismutcitrat und einer darüberliegenden Agarschicht mit suspendierter Hefe. In die ausgestanzten Vertiefungen der Platten wurden jeweils 100 µl der angegebenen Metallsalzlösung (10 mM) pipettiert. Die schwarzbraunen Zonen mit starker Sulfidausfällung sind mit weißen Pfeilen markiert. Der schwarze Pfeil links markiert die Ausbuchtung des Hemmhofs um die Quecksilbersalzlösung und die beiden schwarzen Pfeile rechts markieren zwei Zonen mit dunklen Ausfällungen am Rand des Hemmhofs der Cadmiumsalzlösung. Ac = Acetat.

In Abbildung 4.1 sind in den Diffusionszonen des besonders toxischen Quecksilbers und Cadmiums deutliche Hemmhöfe im Heferasen zu erkennen, in denen kein Wachstum und keine Sulfidbildung stattgefunden hat. Um die Stellen, an denen die Kobalt- und die Kupfersalzlösung zugegeben wurden, sind die Hemmhöfe viel kleiner und aufgrund vereinzelter, resistenter Kolonien weniger ausgeprägt. Andere Metallionen, wie Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} , führten nicht zur Entstehung von Hemmhöfen. Am Rand des Hemmhofs der Quecksilbersalzlösung, wo durch Diffusion die Quecksilberionenkonzentration gerade soweit abgenommen hat, daß wieder ein Koloniewachstum möglich ist, befindet sich eine schwarzbraune Zone mit besonders starker Sulfidausfällung. Daß die Diffusion der Quecksilberionen ohne die Einwirkung von Sulfid zum Teil noch über diesen Bereich hinaus erfolgte, ist an einer Ausbuchtung dieses Hemmhofs in Richtung des Hemmhofs der Kobaltsalzlösung zu

erkennen (Abb. 4.1 links, schwarzer Pfeil). Innerhalb dieser Ausbuchtung ist aufgrund der gemeinsamen Wirkung beider Metallionen kein Wachstum möglich, obwohl die Konzentration an Quecksilber- und Kobaltionen in dieser Zone einzeln nicht wachstumshemmend gewirkt haben. Aufgrund der niedrigen Zellzahlen sind kaum Sulfidausfällungen in diesem Bereich vorhanden, die der Ausbreitung der Quecksilberionen entgegengewirkt haben. Auf der zweiten Agarplatte sind in und neben der Vertiefung für die Bleisalzlösung und in zwei Bereichen innerhalb der Diffusionszone der Kupferionen dunkelbraune Sulfidausfällungen zu erkennen. Weiterhin sind in der Diffusionszone der Cadmiumsalzlösung unter dem Einfluß der Kupferionen zwei kreisbogenförmige dunkle Zonen mit Ausfällungen zu erkennen. Eine dieser dunklen Zonen, am Rand des Hemmhofs der Cadmiumsalzlösung, ist bläulich gefärbt. Aufgrund der Färbungen handelt es sich hierbei nicht um reine Sulfidausfällungen. Das Experiment zeigt, daß insbesondere die Schwermetalle Quecksilber, Kupfer und Blei sich in Gegenwart von hydrophilem Schwefel als Sulfide und zusammen mit anderen Komponenten auch als schwerlösliche Sulfidkomplexe ausfällen lassen.

Zur Entgiftung von Blei in *S. cerevisiae* waren bisher keine speziellen Untersuchungen durchgeführt worden. Da die Bleiionen in den oben beschriebenen Versuchen kaum toxisch auf die Hefe wirkten und gleichzeitig innerhalb der Vertiefung für die Bleiacetatlösung deutlich braune Bleisulfidausfällungen zu sehen waren, wurde überprüft, ob bei der Hefe eine durch Bleiionen hervorgerufene Verstärkung der H_2S -Bildung aus Schwefel zur Entgiftung der Bleiionen beigetragen hat. Dazu wurden Kulturen des WT-Stammes PK113-1A in SD-Minimalmedium mit hydrophilem Schwefel und Bleiacetatkonzentrationen von 0, 0,5, 1 und 2 mM sowohl aerob als auch anaerob angezogen. Aus den Kulturen wurden jeweils nach 2, 5, 20 und 48 Stunden Proben entnommen und auf freies und gebundenes Sulfid untersucht. Die Bestimmung der Biomasse war in Gegenwart von Niederschlägen aus Bleiverbindungen durch Trübungsmessung oder Feuchtgewichtsbestimmung nicht möglich. Die mikroskopische Abschätzung der Zellzahlen ergab für alle Kulturen ähnliche Werte. Die Unterschiede waren in allen Fällen kleiner als der Faktor 2.

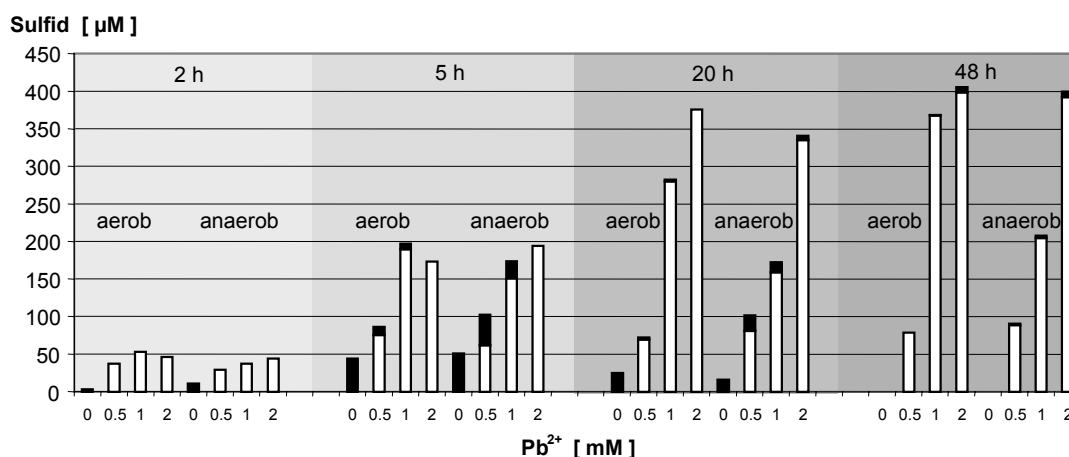


Abb. 4.2 Darstellung des Sulfidgehaltes in Kulturen mit 0 - 2 mM Bleiacetat im Medium. Er setzt sich zusammen aus dem freiem Sulfid (schwarzer Anteil der Säulen) und dem gebundenem Sulfid (weißer Anteil der Säulen). Kulturen des WT-Stammes PK113-1A wurden in schwefel- und harnstoffhaltigem, ammoniumsulfatfreien SD-Minimalmedium aerob und anaerob bei 30 °C gezogen.

In Abbildung 4.2 sind die Sulfidgehalte von Hefekulturen mit verschiedenen Bleiacetatkonzentrationen zu vier Zeitpunkten in einem gestapelten Säulendiagramm dargestellt. Die gestapelten Säulen der Sulfidgesamtgehalte setzen sich zusammen aus dem freien Sulfid (schwarzer Anteil) und dem gebundenen Sulfid (weißer Anteil). Während die Sulfidbildung der Hefe sowohl bei aerober als auch bei anaerober Inkubation ein Maximum durchlief, erkennbar an den höchsten Werten für freies Sulfid nach 5 h, wurde mit der Zeit immer mehr Sulfid in den intra- und extrazellulären Bleisulfidrückständen gebunden. Im Vergleich zu den am Ende erreichten Sulfidgesamtgehalten von bis zu 400 µM spielen die zwischenzeitlich erreichten Gehalte an freiem Sulfid von maximal 50 µM nur eine untergeordnete Rolle. Durch den Luftaustausch mit der Umgebung wurde bei den aeroben Kulturen ständig ein Teil des freien Sulfids ausgetragen. Doch solange die Sulfidbildungsrate überwog reicherte sich trotzdem Sulfid in den Kulturen an. Warum die Werte für das freie Sulfid auch in der anaeroben, bleifreien Kulturen am Ende absanken, ließ sich nicht klären. Die Steigerung der Gesamtsulfidwerte durch Zugabe von Bleiacetat läßt sich auf zwei Effekte zurückführen. Zum einen binden freie Bleiionen das von der Hefe gebildete Sulfid und führen so zu einer Gleichgewichtsverschiebung. Außerdem

zeigen die Sulfidwerte der aeroben Kulturen nach 5 h und 20 h Inkubation mit einer Bleiacetatkonzentration von 0,5 und 1 mM, daß die Zugabe von Bleiionen in das Medium zusätzlich zu einer Induktion der H_2S -Bildung führt. Trotz fast gleicher Werte für das freie Sulfid bei beiden Bleiacetatkonzentrationen wurde mit 1 mM Bleiacetat im Medium überproportional viel Bleisulfid gebildet.

4.3 Die Immobilisierung von Schwermetallen am Beispiel von Blei

Die bisher vorgestellten Experimente zeigten, daß bei der Kultivierung der Hefe in Medien mit hydrophilem Schwefel soviel H_2S gebildet wird, daß sich lösliche Schwermetallsalze als Schwermetallsulfide präzipitieren ließen. Die Effizienz dieser Immobilisierung wurde untersucht, indem mit zwei unterschiedlichen Analyseverfahren die Konzentration an extrahierbarem Blei bestimmt wurde. Um eine Adsorption des in Form von Bleiacetat zugesetzten Bleis an Bodenbestandteile auszuschließen, wurde für diesen Modellversuch inerter Quarzsand eingesetzt. Die Hefe wurde für diese Bestimmungen mit Schwefel und Harnstoff in einem ammoniumsulfatfreien YNB-Minimalmedium kultiviert, damit bei der erforderlichen hohen Konzentration dieser Standardstickstoffquelle die Konzentration der gelösten Bleiionen nicht durch den Sulfatanteil vermindert wird.

Bei der ersten Analysemethode wurde die Konzentration an Bleiionen in den Kulturen photometrisch durch Extraktion der Bleiionen mit einer Dithizon-Chloroformlösung und Bildung eines gefärbten Dithizonkomplexes bestimmt. Durch Zugabe einer tartrat- und cyanidhaltigen Maskierungslösung zur Probe vor der Extraktion war es möglich selektiv das Blei in Gegenwart von Spurenelementen aus der Nährlösung zu bestimmen. Aufgrund der hohen Phosphatkonzentration der YNB-Nährlösung ließ sich nicht alles Bleiphosphat, das direkt nach der Zugabe des Bleiacetats ausgefallen war, von der Maskierungslösung wieder auflösen. Direkt nach dem Zusammenmischen ließen sich nur 87 % des zugesetzten Bleis extrahieren. Da nach der Zugabe von Hefe und Schwefel innerhalb einer kurzen Zeit eine deutliche H_2S -Bildung einsetzte und das entstandene Bleisulfid bei der Extraktion nicht erfaßt wurde, sank der extrahierbare Anteil der zugesetzten Bleiionen nach 2 h bereits auf 60 %. Nach 24 h Inkubation ist das gelöste Blei durch

die H_2S -Bildung der Hefekulturen soweit immobilisiert worden, daß sich keine Bleiionen mehr extrahieren ließen.

Tab. 4.2 Die Immobilisierung von Blei durch die H_2S -Bildung von Hefekulturen. Dargestellt sind der nach Dithizonextraktion photometrisch bestimmte Gehalt an extrahierbaren Bleiionen und der auf die Ausgangskonzentration bezogene extrahierbare Anteil des Bleis in den Hefekulturen. Die Hefe wurde in einem ammoniumsulfatfreien YNB-Harnstoff-Minimalmedium (0,17 % YNB, 38 mM Harnstoff) mit 16 mg hydrophilem Schwefel pro 100 ml Ansatz, in Gegenwart von 1 mM Bleiacetat und Quarzsand bei Raumtemperatur inkubiert.

Zeitpunkt	Gehalt an extrahierbaren Bleiionen [mM]	Extrahierbarer Anteil des zugesetzten Bleis [%]
nach Zusammenmischen	0,87	87
nach 2 h	0,60	60
nach 24 h	$< 10^{-4}$	0

Außerdem sollte der extrahierbare Anteil des zugesetzten Bleis auch mit einem genormten Analyseverfahren bestimmt werden. Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der UVE GmbH in Neuss durchgeführt. Die Hefe wurde unter den gleichen Bedingungen wie in dem zuvor beschriebenen Experiment kultiviert. Zur Extraktion wurde ein leicht modifiziertes Standardverfahren verwendet. Das Blei wurde mit CaCl_2 -Lösung extrahiert, um zusätzlich zum wasserlöslichen Blei auch das Blei aus der austauschbaren Fraktion zu erfassen. Um eine Oxidation des Bleisulfids zu vermeiden wurde unter Stickstoff-Atmosphäre extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der Bleigehalt der Extrakte durch Optische-Emissions-Spektrometrie nach Anregung im induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES) bestimmt. In Abbildung 4.3 und Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der ICP-OES-Analysen dargestellt. Hierbei zeigt sich, daß durch die H_2S -Bildung der Hefe etwa 97 % des zugesetzten Bleis immobilisiert wurden.

Tab. 4.3 Die Immobilisierung von Blei durch die H_2S -Bildung von Hefekulturen. Dargestellt sind der mittels ICP-OES bestimmte Gehalt an extrahierbarem Blei und der auf die Ausgangs-konzentration bezogene extrahierbare Anteil des Bleis in unterschiedlich lang inkubierten Hefekulturen. Die Kultur-bedingungen sind identisch mit den Angaben in Tab. 4.2.

Zeitpunkt	Gehalt an extrahierbarem Blei [mM]	Extrahierbarer Anteil des zugesetzten Bleis [%]
nach Zusammenmischen	0,86	86
nach 2 h	0,72	72
nach 4 h	0,57	57
nach 5 d	0,10	10
nach 8 d	0,02	2
nach 26 d	0,04	4

Ein Vergleich der Tabelle 4.2 mit Tabelle 4.3 zeigt, daß die Ergebnisse der beiden Analyseverfahren weitgehend übereinstimmen. Die Hefe ist aufgrund ihrer H_2S -Bildung in der Lage den anfangs hohen Anteil an leicht extrahierbarem Blei in kurzer Zeit zu verringern und durch Erzeugung von schwerlöslichem Bleisulfid das Blei bis auf einen geringen Anteil zu immobilisieren.

4.4 Online-Messung der H_2S -Entwicklung im Rahmen von Batch-Fermentationen

Im Rahmen von Batch-Fermentationen in einem belüfteten und thermostatisierten 1l-Fermenter wurden durch Online-Messungen Informationen über den Zeitverlauf der H_2S -Entwicklung erhalten. Von Interesse waren die H_2S -Bildung direkt nach Zugabe von hydrophilem Schwefel und die Fähigkeit der Hefe zur langfristigen H_2S -Bildung. Durch die gleichzeitige Registrierung von H_2S in der Fermenterabluft und der Kulturparameter Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential, Trübung bzw. OD_{600} ,

Glucose- und Ethanolkonzentration wurde der Verlauf der Kultur überwacht und geprüft, welchen Einfluß die Umsetzung von Schwefel auf das Wachstum und den Substratumsatz hat.

Um den variablen Einfluß komplexer Medienbestandteile auf die H_2S -Bildung auszuschließen, wurde ein SD-Minimalmedium auf der Basis von Yeast-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren eingesetzt. Es enthält 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Stickstoff- und Schwefelquelle. Bei Wachstum auf YPD-Vollmedium war zwar der Biomassegehalt gegenüber dem SD-Minimalmedium erhöht, aber in Gegenwart von Schwefel war mit der erhöhten Biomasse kein entsprechender Anstieg des H_2S -Gehalts in der Fermenterabluft verknüpft. Damit sowohl das Wachstum auf Glucose als auch auf Ethanol in einem möglichst kurzen Zeitrahmen verfolgt werden konnte, wurde dem Medium nur 1 % Glucose statt der üblichen 2 % Glucose zugesetzt.

Zum Vergleich ist in Abbildung 4.3 über dem Verlauf einer typischen Fermentation mit Schwefelzugabe eine Fermentation ohne Schwefel dargestellt. Für eine bessere Übersicht sind nur die Verläufe der H_2S -, Glucose- und Ethanolkonzentration sowie der OD_{600} - und Trübungswerte abgebildet. Man erkennt die Diauxie in der Wachstumskurve, die für eine aerobe Batch-Kultur von *S. cerevisiae* charakteristisch ist. In der ersten Phase wird Glucose verbraucht und daraus Biomasse und Ethanol gebildet. Nach Umsatz der Glucose wird der in der ersten Phase gebildete Ethanol als C-Quelle für eine zweite Wachstumsphase genutzt. Die Kurve der kontinuierlichen Trübungsmessung korreliert in Abb. 4.3 B gut mit der diskontinuierlichen Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Der Verlauf der Ethanolbildung mit einem Maximum nach etwa 8 Stunden und der dort erreichte Maximalgehalt von etwa 4 g/l stimmt gut mit Literaturdaten für eine Fermentation mit 1 % Glucose überein (Käppeli, 1986). Während des exponentiellen Wachstums unter aeroben Bedingungen und mit Sulfat als Schwefelquelle kam es zu keiner nennenswerten H_2S -Bildung. Dies entspricht der erwarteten strengen Regulation der Sulfatreduktion (Thomas et al., 1995; Jiranek et al., 1995).

Nach der Zugabe von hydrophilem Schwefel war für kurze Zeit eine erhebliche H_2S -Konzentration in der Abluft meßbar. Der für die H_2S -Bildung optimale Zeitpunkt der Schwefelzugabe liegt zu Beginn des Ethanolabbaus. Die Höhe der maximalen H_2S -Konzentration in der Abluft fiel bei einer Zugabe während des exponentiellen Wachstums der Hefe um etwa die Hälfte geringer aus. Der späte Zeitpunkt der

Zugabe minimiert auch den in den Reihenversuchen beobachteten negativen Einfluß des Schwefels auf das Hefewachstum. Das Ausmaß der H_2S -Bildung schwankte etwas bei verschiedenen Präparationen des hydrophilen Schwefels und nahm mit zunehmendem Alter der Präparation generell ab. Nach Zugabe des hydrophilen

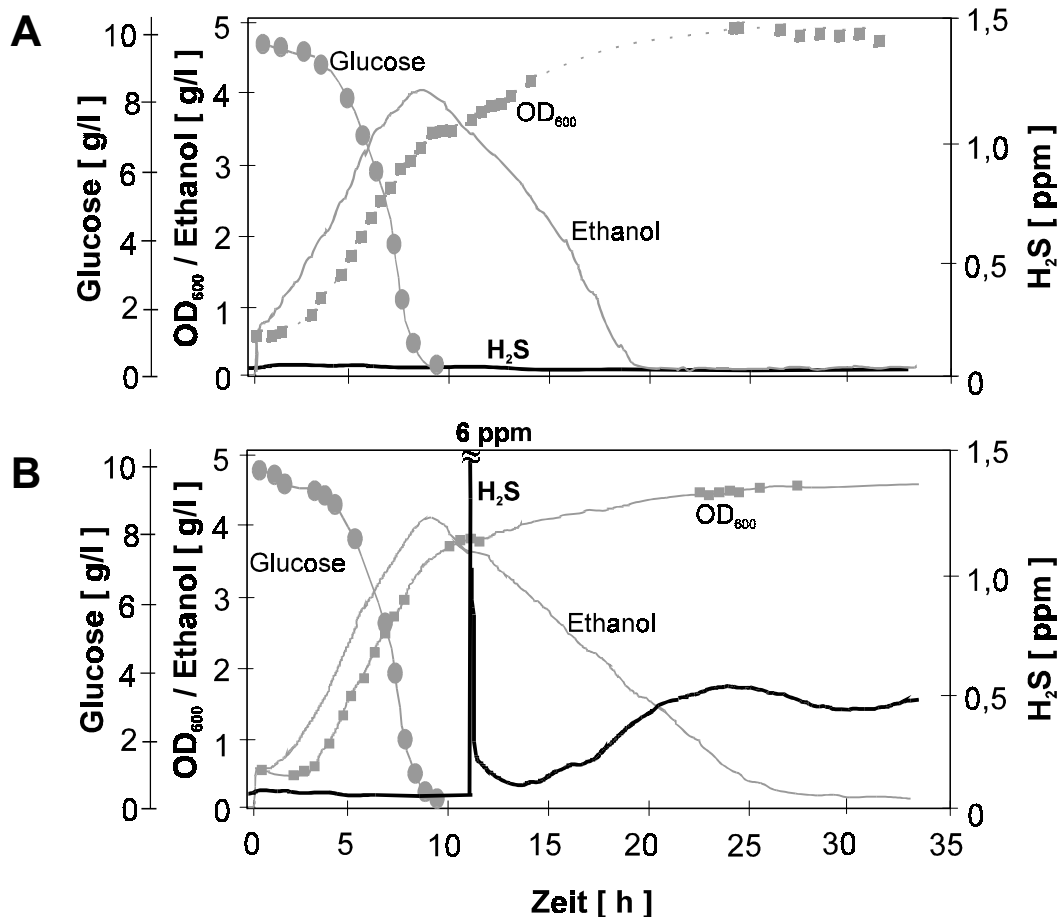


Abb. 4.3 Verlauf zweier Fermentationen ohne (A) und mit einer Zugabe von 9 mg hydrophilem Schwefel nach etwa 11 Stunden (B). Dargestellt sind der Glucoseumsatz, die H_2S -Bildung, die Ethanolbildung, die diskontinuierlich bestimmten OD_{600} -Werte und in (B) zusätzlich die kontinuierlich gemessene Trübung. Die Hefe wurde in SD-Minimalmedium (0,67 % YNB ohne Aminosäuren mit 1 % Glucose) kultiviert.

Schwefels kommt es, wie man in Abbildung 4.3 B im Vergleich zu Abbildung 4.3 A erkennen kann, zu einer kurzzeitigen Hemmung und insgesamt zu einer Verlangsamung des Ethanolabbaus. In Fermentationen ohne Schwefel ist der Alkohol nach etwa 18 Stunden abgebaut. In der Literatur ist für den Ethanolabbau ebenfalls eine Zeit von etwa 18 Stunden angegeben (Käppeli, 1986). In Anwesenheit

von Schwefel ist der Abbau erst nach etwa 26 Stunden beendet. Während des Ethanolabbaus kommt es zu einem erneuten Anstieg der H_2S -Bildung mit einem Maximum gegen Ende der Ethanolumsetzung (Abb. 4.3 B). Diese zweite, lang andauernde Phase der H_2S -Bildung war nach dem Beenden der Datenaufzeichnung noch nicht abgeklungen. Dies zeigt, daß die Hefe auch nach Abschluß ihres Wachstums die Fähigkeit zur H_2S -Bildung besitzt.

Es wurde postuliert, daß die Umsetzung des Schwefels durch von der Hefe gebildete "reduzierende" Substanzen erfolgt, die an der Zelloberfläche den Schwefel chemisch zu H_2S reduzieren (Schütz & Kunkee, 1977). Die in Abbildung 4.3 B gezeigte, kurzfristig intensive H_2S -Bildung unmittelbar nach der Schwefelzugabe könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, daß eine schnelle Umsetzung des Schwefels durch akkumulierte extrazelluläre Substanzen erfolgte. In dem folgenden Experiment sollte deshalb geklärt werden, ob an der Umsetzung des Schwefels Substanzen beteiligt sind, die von der Hefe ins Medium sekretiert werden, und ob sich die Umsetzung auf den intra- oder extrazellulären Bereich eingrenzen läßt. Für das Experiment wurde eine Hefekultur mit konstanter H_2S -Bildung aufgrund einer vorausgegangenen Zugabe an 18 mg hydrophilem Schwefel zu Beginn des Ethanolabbaus eingesetzt. Nach einer Vorlaufzeit zur Registrierung der Ausgangswerte der Sensoren wurden die Hefezellen durch Zentrifugation kurz entfernt und zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Die Fortsetzung erfolgte nachdem der zellfreie Überstand dem Fermenter wieder zugeführt worden war (Abbildung 4.4). Das zellfreie Kulturmedium wies noch eine leichte Resttrübung auf, die aber nicht durch Hefezellen verursacht war. Der verbliebene Schwefelwasserstoff wurde durch die weiterlaufende Belüftung des Fermenters langsam ausgeblasen. Dies führte zu einem leichten Anstieg des Redoxpotentials. Nach etwa einer viertel Stunde ließ sich praktisch kein Schwefelwasserstoff mehr in der Fermenterabluft nachweisen. Die erneute Zugabe von 18 mg Schwefel zum zellfreien Medium bewirkte keinen Anstieg der H_2S -Konzentration in der Fermenterabluft. Eine rein chemische Umsetzung zu Schwefelwasserstoff aufgrund sekretierter Stoffwechselprodukte fand nicht statt. Erst nachdem die auf Eis gelagerten Hefezellen mit einer kleinen Menge sterilem Wasser wieder zurück in den Fermenter gespült worden waren, kam es ohne erneute Zugabe an hydrophilem Schwefel wieder zu dem typischen H_2S -Gipfel. Gleichzeitig erreichte das Trübungssignal wieder den Ausgangswert. Von der kurzzeitig erhöhten H_2S -

Konzentration wurde zwangsläufig auch das Redoxpotential beeinflusst. Dieses Experiments zeigte, daß der Schwefel nicht durch sekretierte, niedermolekulare Substanzen reduziert wird, sondern daß die Hefezellen unmittelbar an der Umsetzung beteiligt sind.

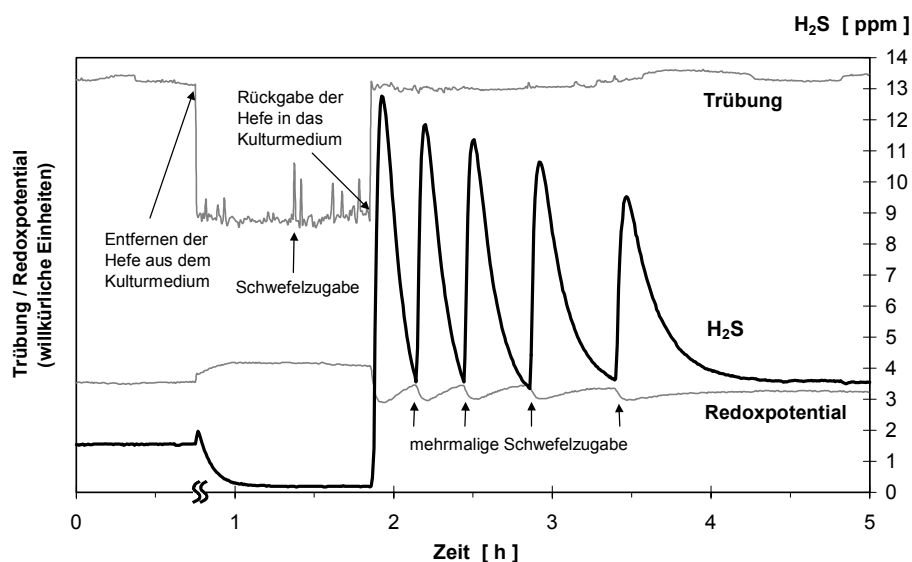


Abb. 4.4 H₂S-Entwicklung in Abwesenheit der Hefezellen und in deren Anwesenheit bei mehreren aufeinanderfolgenden Schwefelzugaben. Parallel dazu wurden die Trübungs- und Redoxpotentialänderungen verfolgt. Für das Abzentrifugieren der Hefezellen wurde die Registrierung der Meßdaten kurzzeitig unterbrochen. Die hinzugefügte Schwefelmenge betrug jeweils 18 mg.

Um zu untersuchen, ob extrazelluläre Reaktionszentren für die Schwefelreduktion existieren und ob die H₂S-Bildung durch die Hefe oder durch den hydrophilen Schwefel limitiert wird, wurden in einem zweiten Teil des Experiments mit vier weiteren aufeinanderfolgenden Schwefelzugaben versucht extrazelluläre Reaktionszentren abzusättigen. Der Schwefel wurde immer dann zugegeben, wenn der H₂S-Gehalt der Fermenterabluft wieder auf etwa 3,5 ppm gesunken war. Obwohl die zugegebene Schwefelmenge von 18 mg immer gleich blieb, ist nach jeder weiteren Schwefelzugabe eine deutliche Abnahme der maximalen Peakhöhe mit einer gleichzeitigen Zunahme der Peakbreite erkennbar (Abbildung 4.4). Eine vollständige Ab-sättigung von möglichen extrazellulären Reaktionszentren war demnach auch nach mehrfacher Zufuhr von Schwefel nicht möglich. Dennoch deutet die mit jeder Zufuhr zunehmend langsamer werdende Umsetzung des Schwefels auf eine Beeinflussung

solcher Reaktionszentren hin. Die H_2S -Bildung scheint jedenfalls durch den Schwefel limitiert zu sein, da mit jeder Schwefelzugabe ein neuer Anstieg der H_2S -Konzentration verbunden ist und sich nach dessen Auslaufen eine von der Schwefelmenge abhängige Erhöhung der H_2S -Konzentration andeutet. Beispielsweise fällt die H_2S -Konzentration nach der letzten Schwefelzugabe beim Auslaufen des H_2S -Gipfels nicht weiter in Richtung Ausgangslevel ab, sondern geht in eine konstante H_2S -Konzentration von etwa 3,5 ppm über. Dies ist eine deutliche Erhöhung gegenüber dem ebenfalls konstanten Ausgangswert von 1,5 ppm zu Beginn dieses Experiments.

4.5 Reduktion von hydrophilem Schwefel durch verschiedene Hefezellfraktionen

Da bislang keine konkreten Vorstellungen existieren, wie *S. cerevisiae* den hydrophilen Schwefel reduziert, wurde in den folgenden Experimenten die Schwefel-Reduktase Aktivität in der Zelle lokalisiert. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen und durch fraktionierte Zentrifugation in drei Zellfraktionen getrennt. Fraktion 1 enthielt den gesamten Zellaufschluß. Daraus wurde Fraktion 2 mit Zellwänden und Kernen bei 700 g abgetrennt. Fraktion 3 bestand aus dem Überstand dieser Zentrifugation. Aus diesem Überstand wurden durch eine Zentrifugation bei 20.000 g als Sediment die Fraktion 4, hauptsächlich Plasmamembranen, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien, erhalten. Das im Überstand verbliebene Cytosol bildete die Fraktion 5. Die einzelnen Zellfraktionen wurden in Anwesenheit von Schwefel mit NADH, NADPH oder Glucose als Reduktionsmittel inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Sulfidkonzentration in den Ansätzen bestimmt.

Die Sulfidbildung verlief mit allen Fraktionen sehr langsam dafür aber über einen langen Zeitraum. Erst nach 4,5 h ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Fraktionen feststellen. In den Ansätzen mit den höchsten Umsätzen war zu diesem Zeitpunkt ein Großteil des Schwefels umgesetzt worden. Die Tabelle 4.4 enthält die Angaben über die Sulfidbildung bezogen auf die Proteinmenge. In Abbildung 4.5 sind die Daten für die Sulfidbildung der einzelnen Zellfraktionen bezogen auf die Proteinmenge für drei Zeitpunkte dargestellt.

Tab. 4.4 Spezifische Sulfidbildung einzelner Zellfraktionen nach 4,5 h Inkubation. Die Zellfraktionen wurden ohne Zusatz (K), mit 0,2 mM NADH (N), mit 0,2 mM NADPH (P) oder mit 0,1% Glucose (G) inkubiert. Die Numerierung der Zellfraktionen entspricht der Legende in Abb. 4.5.

Zellfraktion	Protein- konzentration	Kontrolle	NADH	NADPH	Glucose
	[g / l]	[$\mu\text{mol Sulfid pro g Protein}$]			
1	1,9	4,9	30,7	102,0	9,0
2	1,1	22,4	46,2	129,0	36,5
3	1,7	1,2	10,1	56,9	1,4
4	5,0	1,8	3,1	24,8	2,5
5	0,8	6,7	22,3	103,6	2,3

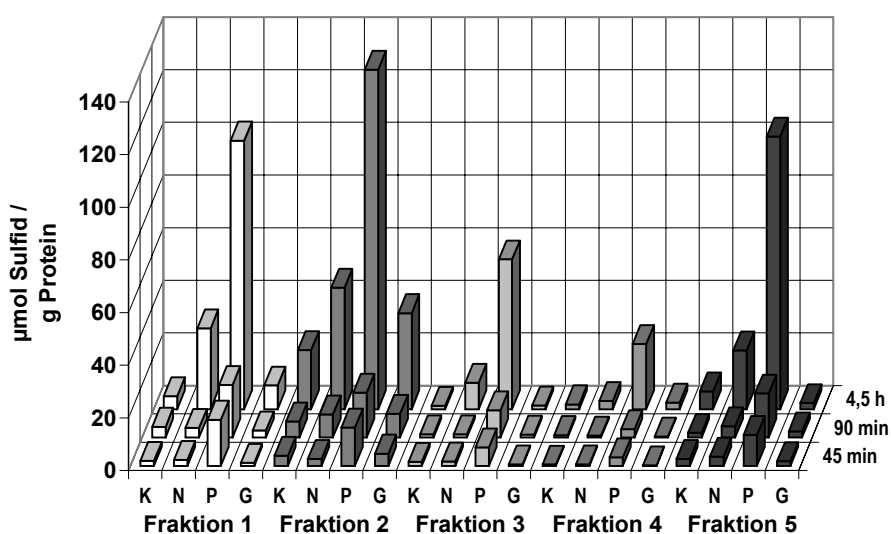


Abb. 4.5 Spezifische Sulfidbildung der Zellfraktionen. Die Zellfraktionen wurden in Gegenwart von Schwefel 45 Minuten, 90 Minuten und 4,5 h ohne Zusatz (K), mit 0,2 mM NADH (N), mit 0,2 mM NADPH (P) oder mit 0,1% Glucose (G) inkubiert. Fraktion 1 ist der Gesamtzellaufschluß, Fraktion 2 enthält im wesentlichen die Zellwände und Kerne, Fraktion 3 das Cytosol und leichte Zellorganellen, Fraktion 4 die Plasmamembranen, das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien und Fraktion 5 das Cytosol.

Bei einem Vergleich der drei Reduktionsmittel wird deutlich, daß nur mit NADPH größere Mengen Schwefel zu Sulfid umgesetzt werden. Dies steht im Einklang mit anderen Reduktionen des Schwefelstoffwechsels, die ebenfalls NADPH-abhängig ablaufen. Sowohl in Tabelle 4.4, als auch in Abbildung 4.5 ist zu erkennen, daß sich die Schwefel-Reduktase Aktivität hauptsächlich in der Fraktion mit den Zellwänden und Zellkernen (Fraktion 2) und in der cytosolischen Fraktion (Fraktion 5) befand. Bei einem Vergleich der Kontrollansätze, ihnen wurde kein Reduktionsmittel zugesetzt, fällt auf, daß in dem Kontrollansatz von Fraktion 2 überproportional viel Sulfid gebildet wurde. Dies läßt auf einen erhöhten Anteil an membranständigen oder an die Zellwände gebundenen Substanzen mit freien Thiolgruppen in dieser Fraktion schließen, die chemisch mit dem Schwefel reagieren. Dabei könnte es sich um Thiole aus reduzierten Disulfidbrücken der Mannoproteine handeln, deren Freisetzung durch den Dithioerythritol-haltigen Aufschlußpuffer verstärkt wurde. Die NADPH-Abhängigkeit der Sulfidbildung, die insbesondere in der cytosolischen Fraktion auftritt, weist darauf hin, daß die Reduktion des Schwefels zumindest teilweise auf enzymatischen Weg erfolgt. Vermutlich sind an der Umsetzung Enzyme beteiligt, die antioxidativ wirkende Thiolverbindungen, wie Glutathion oder Thioredoxin, die mit dem Schwefel reagieren, NADPH-abhängig reduzieren.

4.6 Nachweis einer NADPH-abhängigen, enzymatischen Schwefelreduktion in der cytosolischen Zellfraktion der Hefe

Zum Nachweis einer NADPH-abhängigen, enzymatischen Sulfidbildung in der cytosolischen Fraktion wurde die NADPH-Oxidation durch die native bzw. hitzedenaturierte Cytosolfraktion spektroskopisch bei 340 nm verfolgt. Spektroskopische Veränderungen in diesem Wellenlängenbereich treten allerdings auch durch den Umsatz des eingesetzten Schwefels auf. Bei der Herstellung des verwendeten hydrophilen Schwefels durch saure Disproportionierung von Thiosulfat entstehen zunächst überwiegend S₆ und S₇-Ringe, während Cyclooctaschwefel nur einen geringen Anteil ausmacht (Steudel & Mäusle, 1979). Cyclooctaschwefel zeigt ein lösungsmittelunabhängiges Spektrum mit einem charakteristischen Doppelmaximum in der Region 260-280 nm. Die kleineren Schwefelringe zeigen daneben eine deutliche Absorption bei einer Wellenlänge > 300 nm (Steudel et al., 1988). Außerdem kommt es bei Verwendung von hydrophilem Schwefel zur Trübung

durch einen hohen Anteil an feinen Schwefelteilchen und Schwefelkolloiden. Zusätzlich bilden sich bei der Ansäuerung der Thiosulfatlösung noch Sulfane und Polythionsäuren als Nebenprodukte durch bimolekularen Substituententausch:



Spektren alkalisch wässriger Lösungen von Polysulfiden (Schwarzenbach & Fischer, 1960) und Polysulfiden gemischt mit Polythionaten (Klimmek, 1991) zeigen eine Absorption im Bereich um 360 nm. Für die optische Verfolgung der NADPH-Oxidation wurde deswegen die Diodenarray-Spektroskopie eingesetzt. Damit war es möglich die spektralen Änderungen bei 340 nm durch Änderungen der NADPH-Konzentration von störenden zusätzlichen Absorptionen des Schwefels zu differenzieren.

In Abbildung 4.6 sind für drei Messungen auf der linken Seite die Spektren der 300 Meßzyklen in Form eines Oberflächendiagramms und auf der rechten Seite die Extinktionsverläufe bei 340 nm dargestellt. In der Messung (a) wurde native Cytosolfraktion und in der Messung (b) wurde hitzedenaturierte Cytosolfraktion eingesetzt. Die Messung (c) wurde ohne Cytosolfraktion durchgeführt. Die Zugabe an aktiver Zellfraktion bei 50 Sekunden (Pfeil 1) führt aufgrund ihrer Trübung zu einer Untergrundabsorption. Da in der hitzedenaturierten Zellfraktion viele ausgefallenen Proteine abgetrennt wurden, fällt bei ihrer Zugabe der Extinktionsanstieg deutlich geringer aus. Bei der Messung ohne die Cytosolfraktion fehlt er ganz. Nach 90 Sekunden Meßzeit (Pfeil 2) erscheint nach der NADPH-Zugabe das typische Spektrum mit dem Absorptionsmaximum bei 340 nm. In der Cytosolfraktion befinden sich keine Substanzen die zu diesem Zeitpunkt bereits zu einer nennenswerten NADPH-Oxidation führen. Deshalb bleibt danach die Extinktion bei 340 nm bei allen drei Messungen nahezu konstant. Unterschiede in den Extinktionsverläufen bei 340 nm treten erst nach Zugabe des hydrophilen Schwefels bei 2,5 Minuten (Pfeil 3) auf. Zunächst kommt es aufgrund der Absorption des Schwefels zu einem Extinktionsanstieg. Die sich anschließende Extinktionsabnahme unterscheidet sich bei der Messung mit der aktiven Cytosolfraktion deutlich von den anderen beiden Messungen. Obwohl sich während der Messung die Umwandlung der Schwefelkolloide und die NADPH-Oxidation überlagern, ist das vollständige Verschwinden der NADPH-Absorptionsbande in dem Oberflächendiagramm von Messung (a) deutlich

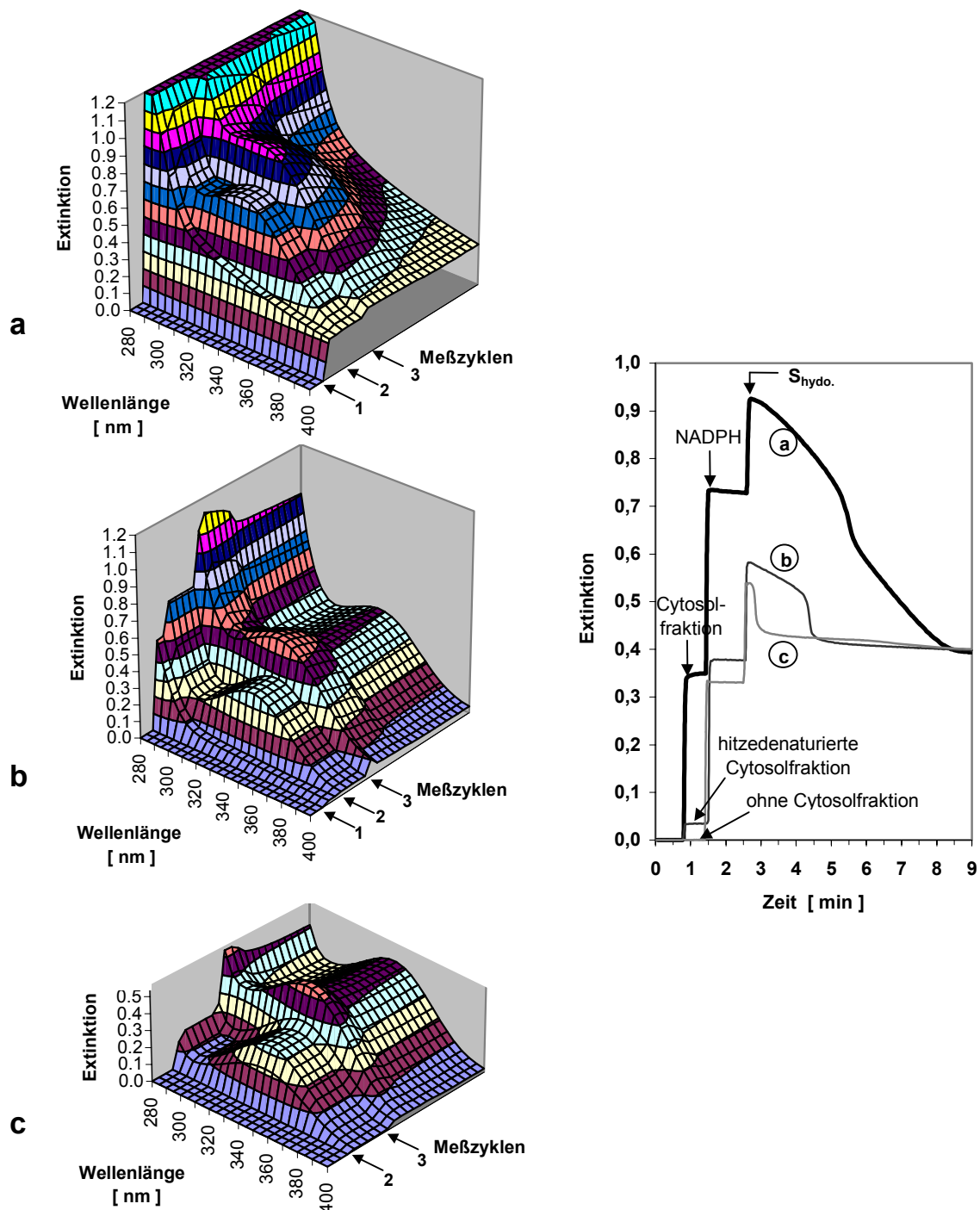


Abb. 4.6 3D-Oberflächendiagramme und Extinktionsverläufe der NADPH-Oxidation durch hydrophilen Schwefel. Die Messungen wurden mit jeweils 20 μ l nativer Cytosolfraction (a), hitzenaturierter Cytosolfraction (b) und ohne Cytosolfraction (c) (Pfeil1) in glutathionhaltigem (0,3 mM) Tris-Cl/EDTA-Puffer pH 7,5 mit 67 μ M NADPH (Pfeil2) und 0,2 mM Schwefel (Pfeil3) durchgeführt.

zu sehen. Daß es sich bei der NADPH-Oxidation, die durch die Schwefelzugabe gestartet wurde um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, wird anhand der Messungen (b) und (c) deutlich. In diesen Messungen kommt es zwar für kurze Zeit auch zu einer Extinktionsabnahme bei 340 nm, letztlich bleibt aber in beiden Fällen das NADPH-Spektrum erhalten. Die unterschiedlich schnellen Extinktionsabnahmen der Extinktionsverläufe (b) und (c) beruhen auf einer Umwandlung bei den Schwefelkolloiden. Da diese durch Proteine stabilisiert werden (Jander & Blasius, 1988), nimmt die Geschwindigkeit der Umwandlung mit abnehmenden Proteingehalt von (a) über (b) nach (c) zu.

4.7 Reduktion des hydrophilen Schwefels mit NADPH durch isolierte Glutathionreduktase aus *S. cerevisiae*

Die Reaktionen im vorigen Abschnitt wurden mit glutathionhaltigem Puffer durchgeführt, weil durch den Glutathionzusatz ein beschleunigender Einfluß auf die Schwefelreduktion durch die native Cytosolfraktion festzustellen war. Glutathion stellt in Hefe mit einem Gehalt von 1% bezogen auf das Trockengewicht (Elskens et al., 1991) die wichtigste niedermolekulare Thiolverbindung dar und ist somit der naheliegende intrazelluläre Reaktionspartner des Schwefels. Der Hefe fehlen die spezifischen Schwefelreduktasen der Bakterien, wie beispielsweise das Tetrahaem Cytochrom c_3 oder die membrangebundene Polysulfidreduktase. In einem Modellsystem wurde deshalb untersucht, ob die Reaktionsprodukte von reduziertem Glutathion (GSH) mit Schwefel NADPH-abhängig von der Glutathionreduktase umgesetzt werden. Es wurden Reaktionsansätze mit verschiedenen Substratverhältnissen in einer Rührküvette durch Diodenarray-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich untersucht. Verfolgt wurde einerseits die NADPH-Oxidation mit Hilfe des Extinktionsverlaufs bei 340 nm. Weiterhin wurden mit Hilfe der Extinktionsverläufe bei anderen Wellenlängen und Differenzspektren zusätzliche Informationen über die Umsetzung des Schwefels erhalten.

Abbildung 4.7 zeigt einen typischen Extinktionsverlauf bei 340 nm, wie er mit einem leichten Überschuß an NADPH gegenüber dem eingesetzten hydrophilen Schwefel erhalten wurde. Dabei mußte ein Kompromiß zwischen dem gerade noch reproduzierbar zu pipettierenden Volumen an hydrophilem Schwefel und nicht zu hohen Extinktionen bei der NADPH-Zugabe gefunden werden. In die Küvette mit Tris-Cl/EDTA

Puffer wurden bei 20 Sekunden zunächst hydrophiler Schwefel pipettiert, was zu einem leichten Extinktionsanstieg führte (Abb. 4.7). Darauf folgte der Zusatz einer etwa vierfachen Menge an GSH bei etwa 1 Minute was durch Reaktion mit dem Schwefel sofort zu einer Abnahme der Extinktion um etwa 50% führte. Bei 2 Minuten wurde ein leichter Überschuß an NADPH gegenüber dem Schwefel dazupipettiert. Damit stieg die Extinktion auf etwa 1,6 und blieb konstant bei diesem Wert. Gestartet wurde die enzymatische Umsetzung mit Glutathionreduktase. Ein geringer Teil des NADPH wurde sehr schnell oxidiert. Danach folgte eine langsame Extinktionsabnahme, in der nach etwa 15 Minuten Meßzeit der größte Teil des NADPHs oxidiert worden war.

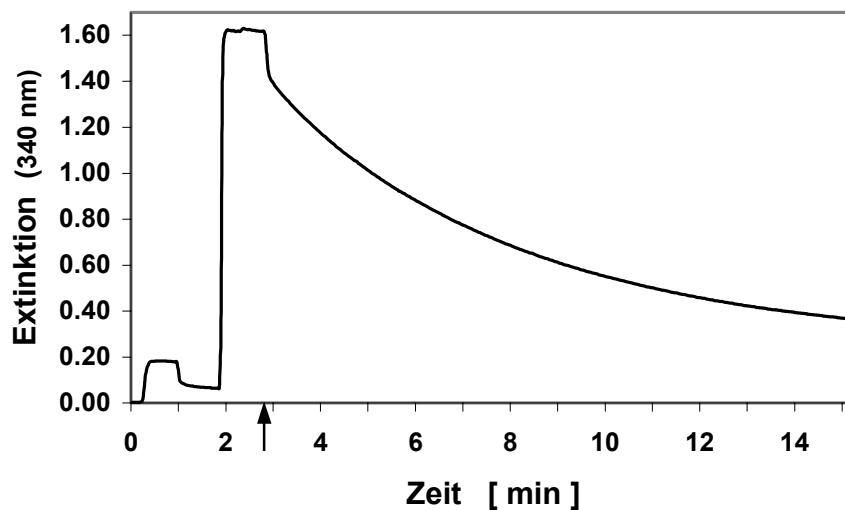


Abb. 4.7 Reduktion von hydrophilem Schwefel mit NADPH und GSH durch isolierte Glutathionreduktase aus *S. cerevisiae*. Zur Verfolgung der Schwefelzugabe und Änderungen der NADPH-Konzentration ist der Extinktionsverlauf bei 340 nm dargestellt. Es wurden hydrophiler Schwefel bei 20 Sekunden, etwa die vierfache Menge GSH bei 1 Minute und ein Überschuß an NADPH gegenüber dem Schwefel bei 2 Minuten dazupipettiert. Gestartet wurde mit 1,6 U/ml Glutathionreduktase in der Küvette (siehe Pfeil).

Da die Glutathionreduktase offensichtlich die NADPH-abhängige, glutathionvermittelte Reduktion des Schwefels katalysiert, wurde in weiteren Experimenten zunächst die Abhängigkeit der Enzymreaktion von der Schwefelkonzentration unter Glutathionüberschuß, und nachfolgend unter Schwefelüberschuß mit verschiedenen Glutathionkonzentrationen untersucht.

Wie in Abbildung 4.8 dargestellt wurde in fünf Ansätzen mit einer GSH-Konzentration von 1 mM und unterschiedlichen Konzentrationen an hydrophilem Schwefel die NADPH-Oxidation verfolgt. In dem Ansatz ohne Schwefel wird kein NADPH oxidiert. In Anwesenheit von Schwefel dagegen findet ähnlich wie in dem vorherigen Experiment (Abb. 4.8) eine zweiphasige Reaktion statt. Die in der schnellen Phase umgesetzte Menge an NADPH ist ebenso proportional zur eingesetzten Schwefelmenge, wie die Geschwindigkeit in der langsamen Phase der NADPH-Oxidation. Die Geschwindigkeit der schnellen NADPH-Oxidation steigt dagegen nicht proportional mit der Schwefelmenge.

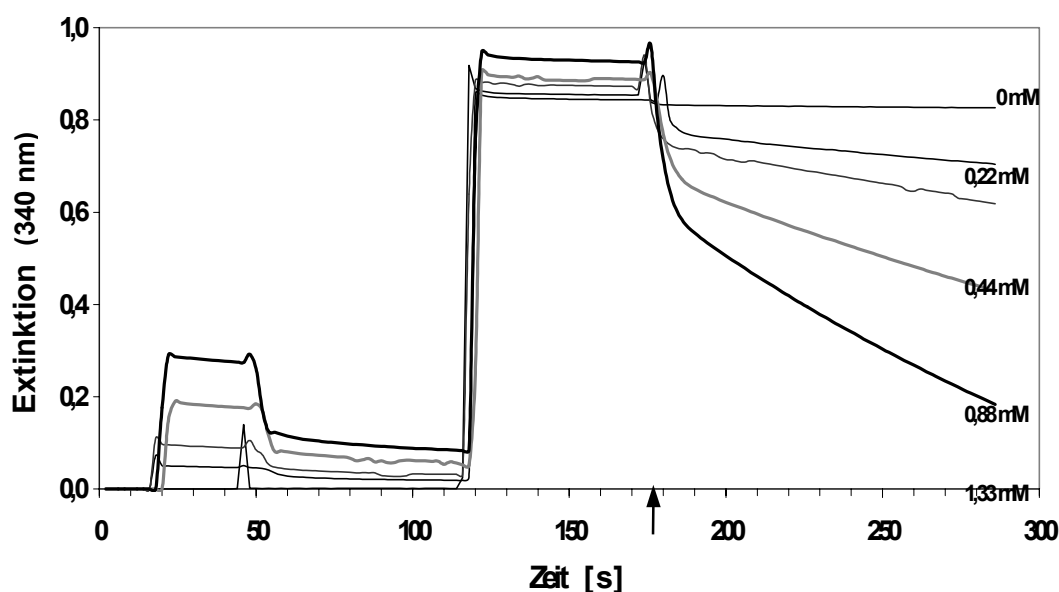


Abb. 4.8 Abhängigkeit der NADPH-Oxidation von der zugesetzten Schwefelmenge bei GSH-Überschuß. Dargestellt sind die bei 340 nm verfolgten Extinktionsverläufe der von der Glutathionreduktase katalysierten NADPH-Oxidationen. Die Extinktionsänderungen vor der NADPH-Zugabe bei 120 Sekunden Meßzeit werden bei 20 Sekunden durch die Zugabe des Schwefels und bei 50 Sekunden durch die Zugabe des GSH (1mM) verursacht. Gestartet wurde mit 1,7 U/ml Glutathionreduktase in der Küvette (siehe Pfeil). Angegeben ist die Anfangskonzentration an Schwefel.

In Abbildung 4.9 sind die Verhältnisse mit einem Überschuß an Schwefel und verschiedenen Glutathionkonzentrationen dargestellt. Die eingesetzte Schwefelmenge entspricht der höchsten Konzentration in Abbildung 4.8. Es wird deutlich, daß sich

bei konstanter Schwefelkonzentration der Umsatz in der schnellen Phase der NADPH-Oxidation durch eine Erhöhung der GSH-Konzentration steigern läßt. Für die langsame NADPH-Oxidation gilt aber hier, daß die Geschwindigkeit um so höher ist, je größer der Schwefelüberschuß ist. Es ist zu vermuten, daß schon über das eingestellte Glutathion-zu-Schwefel Verhältnis der Vorreaktion eine bestimmte Produktverteilung festgelegt wird, und die einzelnen Produkte unterschiedlich schnell von der Glutathionreduktase umgesetzt werden. Daraus ergeben sich unterschiedliche Anteile an schneller und langsamer NADPH-Oxidation.

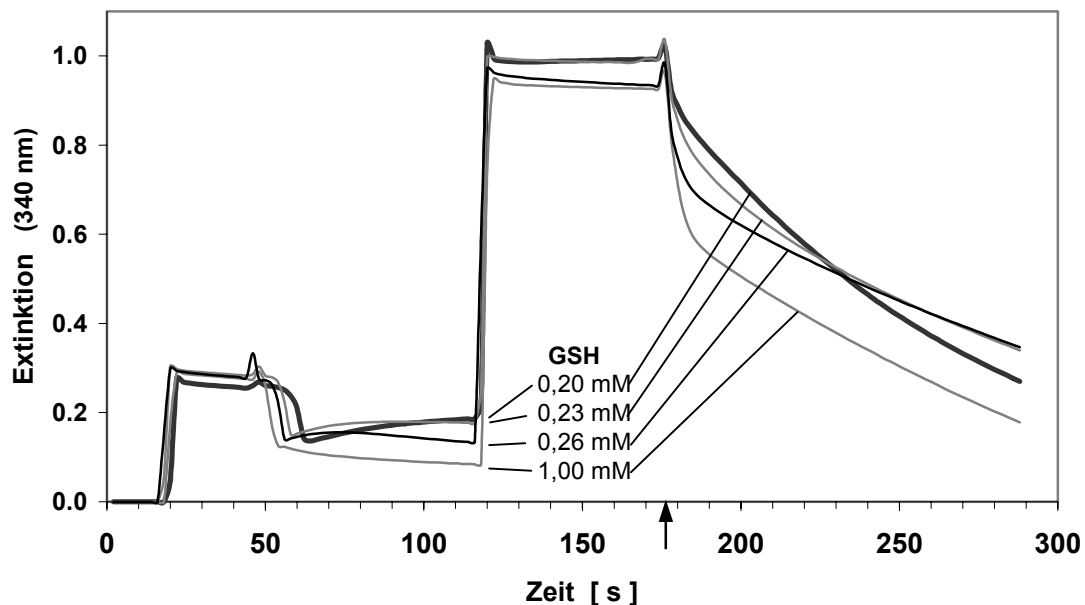


Abb. 4.9 Der Verlauf der Extinktion bei 340 nm in Abhängigkeit von der zugesetzten Glutathionmenge bei Schwefelüberschuß. Die Zugaben erfolgten analog zu Abb. 4.7: Schwefel bei 20 Sekunden, GSH bei 50 Sekunden und NADPH bei 120 Sekunden Meßzeit. Die Schwefelkonzentration in der Küvette betrug jeweils 1,33 mM. Gestartet wurde mit 1,7 U/ml Glutathionreduktase in der Küvette (siehe Pfeil). Den Extinktionsverläufen ist die jeweils eingesetzte GSH-Konzentration zugewiesen.

Die Anfangsgeschwindigkeit der schnellen NADPH-Oxidation liegt bei 1 mM GSH und 1,33 mM Schwefel bei etwa $10 \mu\text{M/s}$ entsprechend einer Wechselzahl von 100 s^{-1} . Nach Bergmeyer (Bergmeyer, 1974) besitzt die Glutathionreduktase eine maximale Wechselzahl von 217 s^{-1} für die Umsetzung von Glutathiondisulfid (GSSG) bei einem K_M -Wert für GSSG von $60 \mu\text{M}$. In der schnellen Reaktion werden $50 \mu\text{M}$

NADPH umgesetzt. Unter der Annahme, daß in der schnellen Phase sämtliches NADPH ausschließlich für die Reduktion von GSSG verbraucht wird, läßt sich aus der Reaktionsstöchiometrie für den Beginn der Umsetzung eine GSSG-Konzentrationen in Höhe des K_M -Wertes ableiten. Die Umsatzgeschwindigkeit für den Ansatz mit 1 mM GSH und 1,33 mM Schwefel korreliert also gut mit den publizierten Daten für eine Reduktion von GSSG in der schnellen Reaktion. In Abhängigkeit des Glutathion-zu-Schwefel-Verhältnisses entstehen bei den anderen Ansätzen unterschiedliche Mengen GSSG als Produkt der Umsetzung von Glutathion mit Schwefel. Ein Vergleich mit Literaturdaten in Tabelle 4.5 zeigt, daß die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der schnellen NADPH-Oxidation nicht für alle Ansätze so gut mit den Literaturdaten korrelieren.

Tab. 4.5 Geschwindigkeit der schnellen NADPH-Oxidation in Abhängigkeit von der GSSG-Konzentration. Es sind die eingesetzte Glutathion-(GSH)-Konzentration und die aus dem NADPH-Verbrauch abgeleitete GSSG-Konzentration angegeben. Die sich aus der abgeleiteten GSSG-Konzentration ergebende Geschwindigkeit der NADPH-Oxidation wird mit der aus Literaturdaten (Bergmeyer, 1974) berechneten Geschwindigkeit verglichen.

Eingesetzte Glutathion (GSH) konzentration [μM]	Abgeleitete GSSG- Konzentration [μM]	Geschwindigkeit der NADPH- Oxidation [μMs^{-1}]	theoretische Ge- schwindigkeit nach Literaturdaten [μMs^{-1}]
200	19,8	7,8	5,4
233	30,4	10,1	7,3
266	35,7	11,1	8,1
1000	51,6	11,3	10,0

Für eine Abschätzung liegen die Werte dennoch in der richtigen Größenordnung und die Abweichungen beruhen möglicherweise darauf, daß die Literaturwerte (Bergmeyer, 1974) unter anderen Versuchsbedingungen bestimmt wurden.

Da sich die schnelle und die langsame NADPH-Oxidation überlagern und die Zwischenprodukte der Reaktion von Glutathion mit Schwefel weder in der Literatur beschrieben noch mit einem vertretbaren Aufwand ermittelt werden konnten, war es mit dem zur Verfügung stehenden Daten nicht möglich konkrete Reaktionsgeschwindigkeiten für die langsame NADPH-Oxidation anzugeben beziehungsweise aus der Literatur abzuleiten. Es ist aber anzunehmen, daß in der langsamen NADPH-Oxidation Produkte umgesetzt werden, die aufgrund eines nukleophilen Angriffs von reduziertem Glutathion auf den Schwefel entstanden sind. Wenn man die Konzentrationen des eingesetzten GSH mit den abgeleiteten Konzentrationen des GSSG vergleicht (Tab. 4.5) wird deutlich, daß unter Schwefelüberschuß von dem eingesetzten reduzierten Glutathion nur ein geringer Teil in oxidiertes Glutathion umgewandelt wird. Der größte Teil des Glutathions liegt also vermutlich an Schwefelketten gebunden vor.

Anhand von spektroskopischen Veränderungen, die nach Zugabe des Glutathions zum Schwefel auftreten, läßt sich die Reaktion des Glutathions mit dem Schwefel beschreiben. In Differenzspektren zeigt sich die Entstehung von Polysulfidverbindungen, die jeweils aus der Differenz zwischen einem Spektrum nach 80, beziehungsweise 120 Sekunden, und einem Spektrum zu einem frühen Zeitpunkt, bei etwa 60 Sekunden errechnet wurden (Abb. 4.10 A). Bei einem Vergleich der Differenzspektren mit einem Spektrum von anorganischem Polysulfid (Abb. 4.10 B) kann man eine gute Übereinstimmung zwischen den Maxima in den Differenzspektren und den Absorptionsschultern des Polysulfids erkennen. Ein deutlicher Schwefelüberschuß führt zu Differenzspektren mit positiver Extinktion, was eine Bildung von Polysulfiden anzeigt, während ein Glutathion-zu-Schwefel-Verhältnis von 1 : 1,3 zu Differenzspektren mit negativer Extinktion führt, was auf einen Abbau von Polysulfiden hindeutet. Da die in dem Polysulfidspektrum erkennbare starke Absorption der Polysulfide bei 250 nm sich bei den Absolutspektren kaum mit der Kettenlänge ändert, tendiert die Extinktion bei den Differenzspektren dort gegen Null.

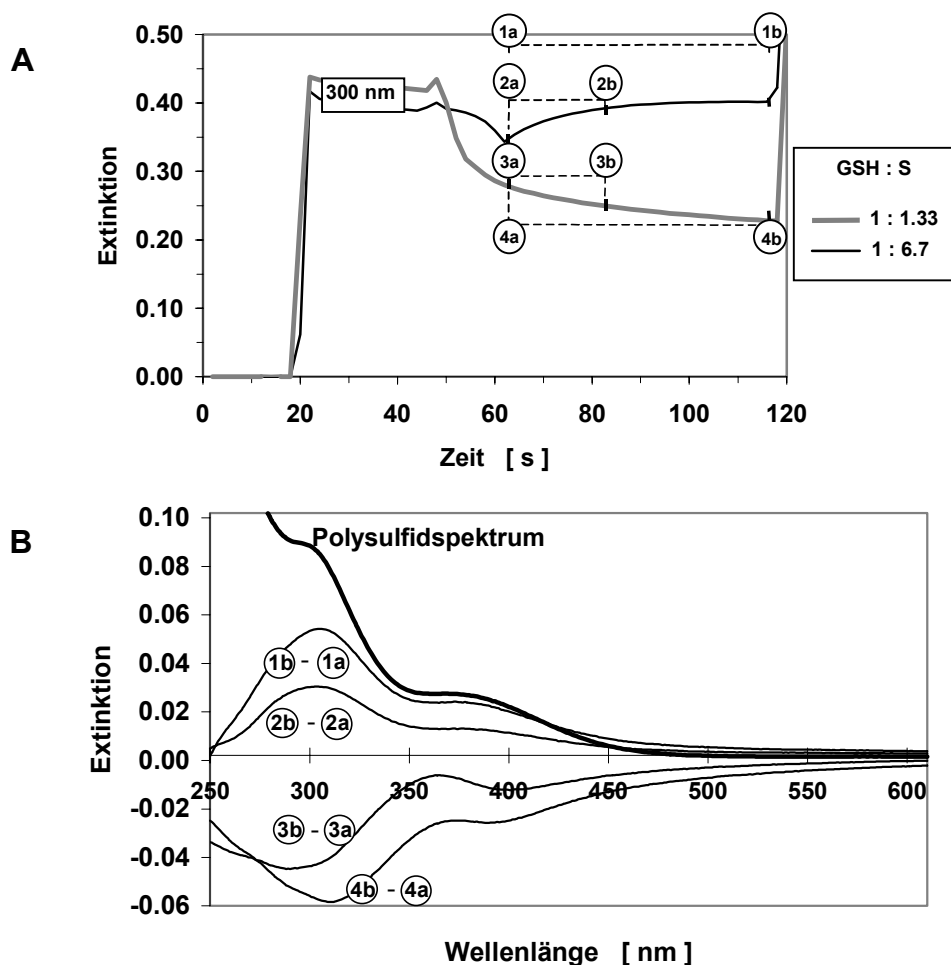


Abb. 4.10 Abbau und Entstehung von Polysulfidverbindungen während der Reaktion von Glutathion mit hydrophilem Schwefel. In (A) wird die Auswahl der Zeitpunkte für die Berechnung von je zwei Differenzspektren anhand der Extinktionsverläufe bei 300 nm für zwei verschiedene Glutathion-zu-Schwefel-Verhältnisse verdeutlicht. In (B) sind die Differenzspektren dargestellt. Zum Vergleich ist das Spektrum von anorganischem Polysulfid mit abgebildet.

4.8 Verstärkung der Reduktion des hydrophilen Schwefels zu Sulfid durch Hefe bei Überexpression des *GSH1*-Gens

In den *in vitro* Experimenten, bei denen der Schwefel zum einen durch die Enzyme der Cytosolfraktion und zum anderen durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig reduziert wurde, konnte die wichtige vermittelnde Rolle des Glutathions gezeigt und seine Wirkung zum Teil beschrieben werden. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob sich diese Ergebnisse auch auf *in vivo* Verhältnisse übertragen lassen. Dazu wurde durch eine Steigerung der Syntheserate die Glutathionkonzentration in der Zelle erhöht. Die γ -Glutamylcysteinsynthetase, in Hefe mit Gsh1p bezeichnet, katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Glutathionsynthese und wird durch Glutathion feedback-inhibiert (Huang et al., 1988 und Meister, 1988a,b). In Hefe hat das Produkt des *GSH1*-Gens essentielle Funktionen (Ohtake & Yabuuchi, 1991, Lisowsky, 1993). Es ist bekannt, daß die Erhöhung der *GSH1*-Gendosis durch Transformation eines Wildtyp-Hefestammes mit dem *GSH1*-Gen auf einem Multi-copy-Plasmid zu einem achtfachen Anstieg der Gsh1p-Aktivität, aber nur zu einem moderaten Anstieg des Glutathiongehalts um 66 %, führt, weil eine strenge Regulation der Aktivität auf Proteinebene erfolgt (Grant et al., 1997). Das Plasmid mit dem *GSH1*-Gen wurde freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. T. Lisowsky zur Verfügung gestellt, so daß die Wirkung eines erhöhten Glutathiongehaltes auf die H₂S-Bildung der Hefe untersucht werden konnte. Dazu wurde der Leucin-auxotrophe *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2-1D mit einem Derivat des YEp351 Plasmid transformiert, das sowohl das *GSH1* Gen als auch das *LEU2* Gen aus Hefe enthält, und die Transformanten wurden auf Leucin-Prototrophie selektioniert. Für einen Vergleich der Schwefel-Reduktionseigenschaften eines *GSH1*-Überexpressionstammes wurde der auch in den anderen Experimenten dieser Arbeit eingesetzte CEN.PK113-1A Stamm, ein aus dem CEN.PK2 abgeleiteter Stamm mit Wildtypeigenschaften, ausgewählt. Beide Stämme wurden über Nacht als Vorkulturen in nach Bedarf supplementiertem SD Minimalmedium angezogen (OD₆₀₀ = ~ 0,2) und dann wurde hydrophiler Schwefel mit einer Endkonzentration von 12 mg/l zugesetzt. Ein Teil der Kulturen wurde aerob, auf einem Schüttler belüftet, der andere Teil anaerob, im Brutschrank stehend, bei jeweils 30 °C inkubiert. Nach 24 h und 48 h wurden Proben für eine Sulfidbestimmung entnommen.

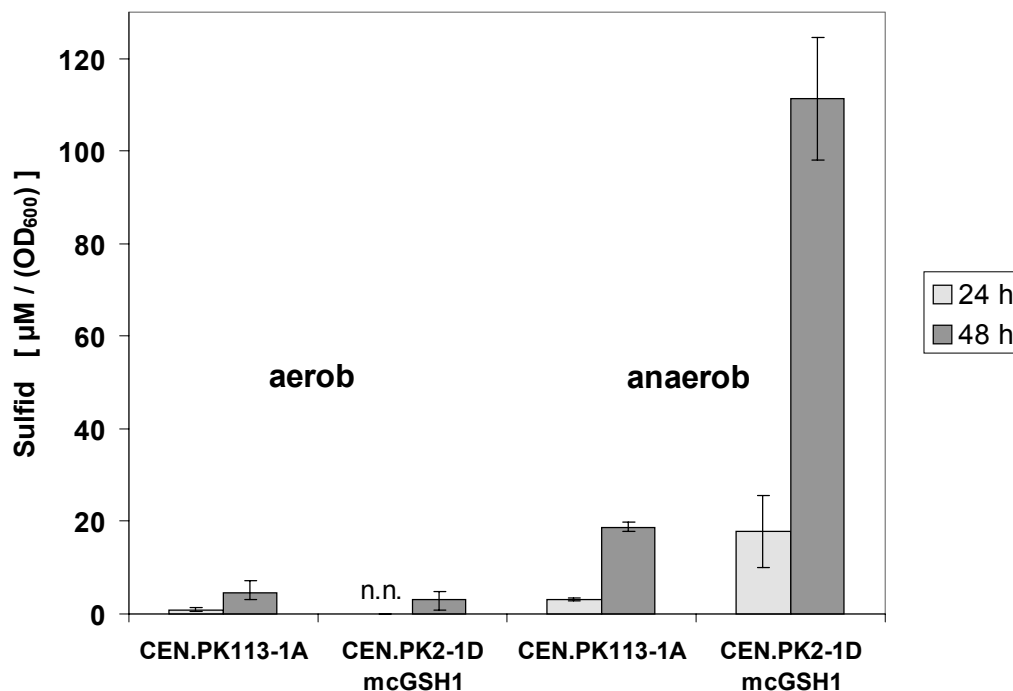


Abb. 4.11 Sulfidkonzentrationen in aeroben und anaeroben Kulturen eines Wildtyp-Stammes und eines *GSH1*-Überexpressionsstammes. Die Werte wurden auf die optische Dichte der Kulturen bezogen. Aerob wurden drei und anaerob zwei unabhängige Kulturen angesetzt. Als Balken sind die aus den unabhängigen Kulturen erhaltenen Mittelwerte mit den entsprechenden Abweichungen der höchsten und niedrigsten Werte dargestellt.

Abbildung 4.11 zeigt die auf die optische Dichte bezogenen Sulfidkonzentrationen der Kulturen zu den entsprechenden Probenahmezeiten. Nach 24 h waren die gemessenen Sulfidgehalte in allen Fällen zu gering um vergleichende Aussagen treffen zu können. Bei aerober Inkubation des *GSH1*-Überexpressionsstammes CEN.PK2-1DmcGSH1 ließ sich zu diesem Zeitpunkt noch kein Sulfid nachweisen. Nach 48 h ergaben sich zwischen den aerob inkubierten Kulturen des CEN.PK113-1A Wildtyp-Stammes und des *GSH1*-Überexpressionsstammes bei den ermittelten Sulfidkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede. Vermutlich fand unter aeroben Bedingungen keine Anreicherung des Sulfids in den Kulturen statt. Unter anaeroben Bedingungen wurde dagegen von dem *GSH1*-Überexpressionsstamm gegenüber dem Wildtyp-Stamm etwa 6 mal mehr Sulfid erzeugt. Diese Erhöhung der Schwefelreduktaseaktivität liegt in der selben Größenordnung wie die von Grant et al.

beobachtete Gsh1p-Aktivitätssteigerung nach einer Transformation mit dem identischen Multi-copy-Plasmid (Grant et al., 1997).

5 Diskussion

Durch eine langfristige Fixierung läßt sich das Gefährdungspotential von Schwermetallen in Böden deutlich verringern. Ein in dieser Arbeit untersuchter Ansatz ist eine Erzeugung von Schwefelwasserstoff durch Hefe um Schwermetalle als Sulfide zu immobilisieren.

5.1 Der Einsatz von Schwefel ermöglicht unter Umgehung der streng regulierten Sulfatreduktion eine Erzeugung von Schwefelwasserstoff mit *S. cerevisiae*

In Reihenversuchen wurde untersucht, welchen Einfluß Schwefel im Vergleich zu anderen anorganischen Schwefelquellen auf das Hefewachstum und die Bildung von H_2S hat. Mit Sulfat wurde die höchste Zelldichte erreicht, aber es wurden keine nachweisbaren H_2S -Mengen ins Medium freigesetzt. Die Gründe dafür sind die strenge Regulation der Aufnahme (Doyle & Slaughter, 1998) und der Reduktion (Thomas et al., 1992 und 1995) von Sulfat. Sowohl mit Thiosulfat als auch mit Schwefel wird die strenge Regulation der H_2S -Bildung umgangen und es kommt zur Freisetzung von H_2S . Mit Thiosulfat ergaben sich kaum Auswirkungen auf die erreichbare Zelldichte. Die Zugabe von hydrophilem Schwefel zu den Hefekulturen in sulfathaltigem Minimalmedium führte dagegen zu einem verringerten Wachstum, um 25 % unter aeroben und 33 % unter anaeroben Bedingungen. Dennoch setzte die Hefe mit Schwefel die größte H_2S -Menge frei. Daß mit Thiosulfat geringere Sulfidkonzentrationen im Medium akkumulieren, liegt möglicherweise daran, daß ein Schwefelatom des Thiosulfats über die streng regulierte Sulfitreduktase zu Sulfid umgesetzt werden muß. Die Sulfitreduktase unterliegt, wie schon in der Einleitung erwähnt, der Transkriptionskontrolle und der Feedback-Hemmung durch Sulfid (Hansen & Kielland-Brandt, 1996). Es ist deshalb denkbar, daß die Sulfidmenge aus der Abspaltung des Sulfanschwefelatoms die Sulfitreduktase bereits gehemmt hat. In aeroben Kulturen findet bei ausreichender Belüftung nur eine geringe Akkumulation von H_2S statt, da es in die offene Gasphase entweicht. Im geschlossenen System der anaeroben Kulturen kommt es dagegen zu einer Anreicherung von H_2S . Die erreichbaren Konzentrationen sind allerdings begrenzt. Unter Verwendung von

Standardmedien mit 16 mg/l hydrophilem Schwefel wurden H_2S -Konzentrationen zwischen 13 μM für aerobe und 26 μM für anaerobe Bedingungen erhalten. Damit liegen die Werte für die H_2S -Konzentration in der selben Größenordnung wie nach der Vergärung von Most mit 16 mg/l Netzschwefel, wo am Ende Werte von 10 bis 12 μM H_2S bestimmt wurden (Rauhut & Kürbel, 1994). Auch die in dieser Arbeit mit dem Wildtyp-Stamm in schwefelhaltigen Minimalmedium bestimmten maximalen H_2S -Konzentrationen wie 26 μM H_2S in den Reihenversuchen, 40 μM H_2S in den Kontrollkulturen zur Immobilisierung von Bleiionen und Bleiverbindungen und 50 μM H_2S in den Kontrollkulturen bei der Überexpression von GSH1 stimmen recht gut mit den in der Literatur angegebenen H_2S -Maximalwerten, wie 35 μM H_2S (Schütz und Kunkee, 1977) und 32 μM H_2S (Rauhut & Kürbel, 1994), überein. Offensichtlich wird die Schwefelreduktion durch eine Produkthemmung begrenzt. Die Sulfidakkumulation kann zum einen durch das intrazelluläre Redoxpotential, oder zum anderen durch eine inhibitorische Wirkung des H_2S auf die beteiligten Enzyme limitiert werden.

5.2 In Anwesenheit von Schwefel wird die verstärkte Bildung von H_2S durch Schwermetalle induziert

In den Zellen von Eukaryonten existieren verschiedene metallspezifische Entgiftungssysteme. Dazu gehört auch die kürzlich entdeckte Slf1p vermittelte Biomineralisation von Kupfer als Kupfersulfid in der Zellwand von *S. cerevisiae* (Yu et al., 1996). Vermutlich sollen die zellinternen Entgiftungssysteme durch die bereits außerhalb der Zelle stattfindende Bildung von Kupfersulfid entlastet werden. Zink und Cadmium dagegen ließen sich aus dem Medium auch durch eine Überexpression des *SLF1*-Gens nicht aus dem Medium ausfällen (Yu et al., 1996). Die genaue Funktion des Slf1p-Proteins ist noch nicht bekannt, aber vermutlich können die anderen Metalle nicht als Sulfide ausgefällt werden, weil durch Slf1p keine Induktion der H_2S -Freisetzung stattfindet. In dieser Arbeit führte die H_2S -Bildung der Hefe in schwefelhaltigen Medien zur unspezifischen Präzipitation verschiedener Schwermetalle. Insbesondere bei den Schwermetallen Quecksilber, Kupfer und Blei wurden dunkel gefärbte Sulfidausfällungen beobachtet. Die Beeinflussung der H_2S -Bildung durch Schwermetalle wurde am Beispiel von Blei untersucht. Kulturen des

WT-Stammes PK113-1A wurden in SD-Minimalmedium mit hydrophilem Schwefel und Bleiacetatkonzentrationen von 0, 0,5, 1 und 2 mM sowohl aerob, als auch anaerob bei 30 °C angezogen. Generell war zu beobachten, daß eine höhere Bleiacetatkonzentration im Medium auch eine stärkere Sulfidbildung zur Folge hat. Die Anwesenheit von 2 mM Bleiacetat führte zu einer achtfachen Steigerung der akkumulierten Sulfidmenge. Die Hauptmenge des Sulfids liegt dabei als Bleisulfid vor. Für die Verstärkung der Sulfidbildung lassen sich zwei mögliche Gründe anführen. Es könnte sich zum einen um eine Gleichgewichtsverschiebung handeln und zum anderen ist auch eine Induktion der H₂S-Bildung bei der Hefe denkbar. Wie bereits beschrieben ist die Anreicherung von H₂S im Medium beschränkt. Die Beschränkung kann durch eine Gleichgewichtsverschiebung durch lösliche Bleiverbindungen im Medium aufgehoben werden, weil diese ständig H₂S aus dem Medium binden, wodurch die Hefe dann in den bleiacetathaltigen Kulturen insgesamt deutlich mehr H₂S bilden kann, als in den Kontrollkulturen. Eine Induktion der H₂S-Bildung durch Bleiverbindungen ist bei diesem Experiment nicht nachweisbar. Ein Hinweis auf eine Induktion ergibt sich allerdings aus der Beobachtung, daß die gebundenen Sulfidmenge in den bleiacetathaltigen, aeroben Kulturen auch nach 20 Stunden noch zunimmt, während in den bleiacetatfreien Kulturen kein Sulfid mehr nachweisbar ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen Metallzugabe und verstärkter Bildung von säurelabilem Sulfid wurde auch bei den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* nachgewiesen (Murasugi et al., 1984; Dameron et al., 1989). Wie es zu der verstärkten Sulfidbildung in diesen Hefen kommt ist nicht bekannt.

Die Effizienz der Immobilisierung von löslichen Schwermetallverbindungen wurde am Beispiel von Blei näher untersucht. Da es sich um ein Modellexperiment handelte wurde auf den Einsatz von Boden verzichtet, um zusätzliche Adsorptionseffekte auszuschließen. Die Hefe wurde statt dessen mit Bleiacetat und Schwefel in einem Quarzsand-YNB-Harnstoffmedium ohne Ammoniumsulfat kultiviert. Die Bestimmungen der mit Dithizon extrahierbaren Bleiionen, beziehungsweise des wasserlöslichen oder mit Calcium austauschbaren Bleis zeigten, daß die Bleiionen und lösliche Bleiverbindungen durch das von der Hefe gebildete Sulfid zu 97 % immobilisiert wurden.

5.3 Wie wird der hydrophile Schwefel von der Hefe zu H_2S umgesetzt ?

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, daß eine langfristige Immobilisierung der Schwermetalle mit dem von der Hefe aus Schwefel erzeugten Schwefelwasserstoff grundsätzlich möglich ist. Dennoch ermöglicht erst ein genaueres Bild über die biochemischen Vorgänge bei der Schwefelreduktion biologische Erfordernisse beim Einstellen der Bedingungen im Boden zu berücksichtigen.

Im Rahmen von Batch-Fermentationen mit Glucose im belüfteten und mit Sensoren ausgestatteten Laborfermenter wurde der zeitliche Verlauf der H_2S -Bildung mit hydrophilem Schwefel als Schwefelquelle untersucht. Die Umsetzung des Schwefels ließ sich in zwei unterschiedlich lang dauernde H_2S -Bildungsphasen aufteilen.

Eine Schwefelzugabe führte zunächst zu einer kurzfristigen, heftigen H_2S -Bildung, die innerhalb von Minuten wieder um etwa 80 - 90 % abnahm. Die Höhe des Spitzenwertes wurde hauptsächlich durch den Zeitpunkt der Schwefelzugabe und durch das Alter der Schwefelpräparation beeinflusst. Als optimal für einen möglichst hohen Spitzenwert der H_2S -Entwicklung erwies sich die Zugabe von Schwefel aus einer frischen Schwefelpräparation zu Beginn des Ethanolabbaus. Die Reduktion des Schwefels unterliegt nicht der strengen Regulation der Sulfatreduktion. Daher fällt dieser Zeitpunkt auch nicht mit dem in der Literatur ermittelten Maximum der Sulfitreduktaseaktivität während der exponentiellen Wachstumsphase zusammen (Jiranek et al., 1995). Der schnelle Anstieg der H_2S -Konzentration, der direkt nach der Schwefelzugabe auftritt, ist nicht auf Substanzen, die von der Hefe ins Medium sekretiert werden, zurückzuführen. Diese Möglichkeit ließ sich durch vorübergehendes Entfernen der Hefezellen aus der Kultur ausschließen. Nach Zugabe des hydrophilen Schwefels zum zellfreien Kulturmedium blieb ein Anstieg der H_2S -Konzentration aus. Erst nach der Rückführung der Hefezellen in den Fermenter kam es wieder zum raschen Anstieg der H_2S -Konzentration. Die schnelle Reduktion des Schwefels findet vermutlich an extrazellulären Reaktionszentren statt, die für den Schwefel direkt zugänglich sind. Mit mehreren aufeinanderfolgenden Schwefelzugaben wurde versucht die vermuteten Reaktionszentren abzusättigen. Eine vollständige Absättigung gelang nicht. Wenn man die Fläche des H_2S -Gipfels überschlägig integriert (etwa $1,6 \text{ ppm} \cdot \text{h}$), diesen Wert mit der Begasungsrate ($0,045 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) multipliziert und das erhaltene H_2S -Volumen ($0,07 \text{ ml}$) für einen Vergleich mit

der eingesetzten Schwefelmenge (9 mg) umrechnet, wird deutlich, daß in dieser Phase etwa 1 % des eingesetzten Schwefels von der Hefe zu H_2S umgewandelt wird. Die schnelle Schwefelreduktion ist offensichtlich auf eine leicht umzusetzende Komponente des Schwefels zurückzuführen. Der geringe Anteil dieser Komponente an der Schwefelpräparation verhindert eine Absättigung der extrazellulären Reaktionszentren. Ein Hinweis, daß es sich bei den extrazellulären Reaktionszentren um Thiolgruppen handeln könnte, ergibt sich aus den Bestimmungen der Schwefelreduktaseaktivität in Hefezellfraktionen. Die Zellwände und Zellkerne enthaltende Fraktion setzte auch ohne zugesetzte Reduktionsmittel aus dem hydrophilen Schwefel Sulfid frei. Das läßt sich mit einer Reduktion des Schwefels durch den nukleophilen Angriff von Thiolgruppen erklären. Es könnte sich dabei zum Beispiel um Thiolgruppen aus teilweise reduzierten Disulfidbrücken der Mannoproteine handeln (Nobel et al., 1989, 1990a,b; Lipke & Ovale, 1998). Die über Disulfidbrücken vernetzten Mannoproteine bestimmen die Permeabilität der Zellwand und machen 40% der Zellwandmasse aus (Zlotnik et al., 1984; Lipke & Ovale, 1998). Es ist außerdem bekannt, daß die Hefe in Abhängigkeit vom internen Redoxgleichgewicht exofaciale Thiolgruppen präsentieren kann (Lesuisse & Labbe, 1992). Die Menge der Disulfidbrücken in *S. cerevisiae* liegt zwischen 33 und 90 μmol pro g Frischgewicht (Nobel et al., 1990a,b). Im belüfteten Fermenter entwickelte sich üblicherweise eine Hefebiomasse von etwa 8 g Feuchtgewicht. Die direkt nach der Schwefelzugabe entwickelte H_2S -Menge von etwa 3 μmol , die maximal 1 % der eingesetzten Schwefelmenge darstellt, ist also mit einem nukleophilen Angriff von Thiolgruppen aus teilweise reduzierten Disulfidbrücken vereinbar.

Nach dem Auslaufen des nach der Schwefelzugabe beobachteten H_2S -Gipfels folgte eine langfristige über Stunden andauernde H_2S -Entwicklung. Ob die langfristige H_2S -Bildung extrazellulär oder intrazellulär abläuft konnte nicht geklärt werden. Ein Weg, wie der Schwefel in die Zelle gelangen könnte ist nicht bekannt. Vorstellbar wäre eine Aufnahme gelöster Polysulfide, die sich aus Schwefel und H_2S bilden. Für die Beteiligung einer intrazellulären Schwefelreduktion spricht der Nachweis einer cytosolischen Schwefelreduktaseaktivität *in vitro*. Die Cytosolfraktion von Hefezellen zeigte eine NADPH-abhängige Sulfidbildung. Die Reaktion wurde durch reduziertes Glutathion im Puffer analog zu der Schwefelreduktion bestimmter Bakterien (Zöphel et al., 1988) beschleunigt. Glutathion ist außerdem die wichtigste niedermolekulare Thiolverbindung in Hefe (Elskens et al., 1991). Es dient der Hefe zur Entgiftung

schädlicher Substanzen. GSH steht im Redoxgleichgewicht mit GSSG, wobei das Gleichgewicht deutlich auf der Seite von GSH liegt und NADPH-abhängig durch die Glutathionreduktase aufrechterhalten wird (Grant et al., 1996). Dieses Enzym kann auch Glutathiontrisulfid und Glutathionpersulfid (GSSH) umsetzen (Moutiez et al., 1994). Da der Hefe spezifische Schwefelreduktasen fehlen, wird angenommen, daß vor der Schwefelreduktion eine Umsetzung mit Glutathion stattfindet und daß die aus dieser Umsetzung resultierenden Reaktionsprodukte durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig umgesetzt werden. Dieser Reaktionsablauf wurde mit isolierter Glutathionreduktase aus Hefe in der Küvette nachvollzogen. Die spektroskopischen Daten zeigten, daß nach der Reaktion des hydrophilen Schwefels mit reduziertem Glutathion eine von der Glutathionreduktase katalysierte, biphasische Umsetzung der entstandenen Reaktionsprodukte mit NADPH stattfand. Für die Glutathionreduktase-katalysierte Umsetzung von Glutathiontrisulfid mit NADPH wurde ebenfalls ein biphasischer Reaktionsablauf gefunden (Moutiez et al., 1994). Wie dort durch HPLC und massenspektrometrische Daten belegt wurde, entsteht bei der schnellen Reduktion von Glutathiontrisulfid mit NADPH Glutathionpersulfid als Zwischenprodukt, das in einer langsamen Reaktion von der Glutathionreduktase mit NADPH weiter zu GSH und H_2S umgesetzt wird (Moutiez et al., 1994). Aus den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten läßt sich eine Geschwindigkeit der schnellen Reaktion ableiten, die mit publizierten Daten für die Glutathionreduktase-katalysierte Reaktion von GSSG übereinstimmt. Für die langsame NADPH-Oxidation ist so ein Vergleich nicht möglich. Da über die genaue Zusammensetzung des Reaktionsgemisches von Glutathion und Schwefel nichts bekannt ist, kann über die Reaktionen und ihre Geschwindigkeiten, die für eine langsame NADPH-Oxidation sorgen, keine Angaben gemacht werden. Auch bei Moutiez (Moutiez et al., 1994) wurden keine Zahlenwerte für die langsame Reaktionsgeschwindigkeit genannt. Da von dem eingesetzten Glutathion nur ein kleiner Teil bei der Reaktion mit dem Schwefel zu GSSG oxidiert wurde, ist anzunehmen, daß bei der langsamen NADPH-Oxidation Substanzen umgesetzt werden, bei denen das Glutathion an Schwefelketten gebunden ist. Differenzspektren der nicht-enzymatischen Vorreaktion von Glutathion mit Schwefel zeigen, je nach Glutathion-zu-Schwefel-Verhältnis tatsächlich einen Auf- beziehungsweise Abbau von Polysulfiden.

Die hier vorgestellten Daten lassen sich gut mit dem Modell einer Glutathionreduktase-katalysierten Umsetzung der Reaktionsprodukte von Glutathion

und Schwefel beschreiben. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß bei einer intrazellulären Reduktion des Schwefels zunächst eine Reaktion mit Glutathion, oder anderen Thiolen stattfindet, an die sich eine enzymkatalysierte Umsetzung der Reaktionsprodukte zu H_2S anschließt. Die Beobachtung, daß auch eine verstärkte Expression von *GSH1*, einem Gen des Glutathionsynthesewegs, zu einer erhöhten H_2S -Bildung führt, stützt diese Annahme. Grant (Grant et al., 1997) ermittelte eine 8-fache Steigerung der Gsh1p-Aktivität im Überexpressionsstamm, der jedoch nur eine 66 %ige Erhöhung der Glutathionkonzentration gegenübersteht. Dies wird mit der bekannten Feedback-Regulation dieses Enzyms erklärt (Grant et al., 1997). Die hier in einem schwefelhaltigen Medium beobachtete Erhöhung der Schwefelreduktaseaktivität um den Faktor 6 liegt überraschenderweise in derselben Größenordnung wie die Gsh1p-Aktivitätssteigerung. Daß die Schwefelreduktaseaktivität so stark erhöht ist, könnte darauf hinweisen, daß die Gesamtkonzentration des Glutathions in der Zelle bei Überexpression von *GSH1* in Gegenwart von Schwefel anders als unter Standardbedingungen deutlich stärker zunimmt. Die Feedback-Hemmung ist in Gegenwart von Schwefel vermutlich deutlich verringert, weil die Konzentration des freien, reduzierten Glutathions durch Reaktion mit dem Schwefel vermindert wird. Unterstützt durch enzymatische Reaktionen führt die erhöhte Glutathionsynthese zu einer verstärkten H_2S -Bildung.

5.4 Erst mit dem zusätzlichen Einsatz von Hefe erreicht man die nötige Flexibilität bei der biologischen Erzeugung von H_2S

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, daß mit dem Einsatz von Hefe und Schwefel eine Freisetzung von H_2S zur Immobilisierung von Schwermetallen erreicht werden kann. Der Einsatz von Hefe gegenüber sulfatreduzierenden Bakterien weist erhebliche Vorteile auf, da preisgünstige, zuckerhaltige industrielle Nährstoffquellen, wie Melasse direkt verwertet werden können. Hefe läßt sich außerdem leicht in großen Mengen kultivieren und ist damit leicht verfügbar. Außerdem ist die Bestimmung der aktiven H_2S -bildenden Zellen während des Sanierungsverlaufs um ein vielfaches einfacher, denn ein erhöhter Aufwand für eine strikt anaerobe Kultivierung in Medien mit niedrigem Redoxpotential ist bei Hefe nicht nötig. Ein weiterer Vorteil ist, daß sich die H_2S -Bildung vermutlich gezielt über die

Zeitabstände der Zugaben von Hefe oder Schwefel steuern läßt, da beim Aufeinandertreffen von Hefe und Schwefel sofort eine heftige H_2S -Bildung einsetzt, die dann mit geringerer Intensität für eine gewisse Zeit andauert. Durch den Einsatz von Schwefel, unter Umgehung der transkriptions- und feedback-regulierten Sulfatreduktion, ist eine langfristige H_2S -Bildung mit der Hefe möglich. Die Bildung von H_2S ist somit nicht mehr von der Sulfitreduktase abhängig, die nur während des exponentiellen Wachstums ausreichend aktiv ist. Bei den Batch-Fermentationen im Laborfermenter hat sich gezeigt, daß die Hefe auch bei ständiger Belüftung in der Lage ist H_2S zu bilden. Bisher werden für die Ausfällung von Schwermetallen aus belasteten Wässern großflächig angelegte künstliche Teichgebiete eingesetzt, da die sulfatreduzierenden Bakterien nur an der Grenzfläche zwischen Wasser und sauerstofffreiem Sediment H_2S bilden (Graff, 1997). Durch den Einsatz von Hefe und Schwefel könnte es möglich sein auch in Anlagen, die weniger Platz beanspruchen, Schwermetalle aus sauerstoffhaltigen Wasser mit H_2S auszufällen. Die Hefe besitzt gegenüber den sulfatreduzierenden Bakterien noch einen weiteren Vorteil. Im Gegensatz zu den sulfatreduzierenden Bakterien ist mit ihr auch eine H_2S -Bildung unter sauren Bedingungen möglich. Dies zeigte sich bei der Kultivierung mit dem nur gering puffernden SD-Minimalmedium. Es stellte sich üblicherweise ein pH-Wert zwischen 3 und 4 ein, der etwa dem pH von zu vergärendem Most entspricht (Rauhut & Kürbel, 1994). Eine Anhebung des Boden-pH-Wertes bis in den neutralen Bereich zur Verbesserung der Lebensbedingungen der sulfatreduzierenden Bakterien wäre nicht mehr erforderlich. Es würde ausreichen den pH-Wert soweit anzuheben, bis eine ausreichende Fällung und Immobilisierung der Metalle erreicht wird. Damit ist es möglich die Sanierung auch bei versauerten Böden als in-situ Verfahren durchzuführen. Eine Behandlung des Bodenwassers oder der Bodenaufschlammungen in externen, präzise auf die Ansprüche der sulfatreduzierenden Bakterien abgestimmten Reaktoren ist daher nicht mehr zwingend notwendig (Barnes et al., 1991; Dvorak et al., 1992; White et al., 1997). Als besonders günstig für das in-situ Verfahren hat sich in dieser Arbeit herausgestellt, daß es beim Einsatz von Hefe und Schwefel in der Zone mit hoher Schwermetallbelastung zu einer Verstärkung der H_2S -Bildung kommen kann.

6 Literatur

- Appia-Ayme C., Guliani N., Ratouchniak J., Bonnefoy V. (1999) Characterization of an Operon Encoding Two c-Type Cytochromes, an aa₃-Type Cytochrome Oxidase, and Rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4781-4787
- Barnes L.J., Janssen F.J., Sherren J., Versteegh J.H., Koch R.O., Scheeren P.J.H. (1991) *Trans. Inst. Chem. Eng.* **69**, 184-186
- Beck T. (Hrsg.) (1968) Mikrobiologie des Bodens, BLV Bayerischer Landwirtschaftsverlag
- Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher T., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E., Pfeiderer G. (1953) Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555-577
- Bergmeyer H.U. (Hrsg.) (1974) Methoden der enzymatischen Analyse Band I, 3. Aufl. VCH Weinheim
- Beveridge T.J., Fyfe W.S. (1995) Metal fixation by bacterial cell walls, *Can. J. Earth Sci.* **22**, 1892-1898
- Bosecker K. (1984) Biodegradation of sulfur minerals and its application for metal recovery In: Müller A., Krebs B. (Hrsg.) Studies in Inorganic Chemistry Band 5 - Sulfur: Its Significance for Chemistry, for the Geo-,Bio- and Cosmosphere and Technology, Elsevier Amsterdam
- Brenes-Pomales A., Lindegren G., Lindegren C.C. (1955) Gene control of copper sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* (London) **136**, 841-842
- Calmano W., Ahlf W. (1988) Bakterielle Laugung von Schwermetallen aus Baggerschlamm - Optimierung des Verfahrens im Labormaßstab, *Wasser und Boden* **1**, 30-32
- Chauncey T.R., Westley J. (1983) The Catalytic Mechanism of Yeast Thiosulfate Reductase, *J. Biol. Chem.* **258**, 15037-15045
- Cherest H., Surdin-Kerjan Y. (1992) Genetic Analysis of a New Mutation Conferring Cysteine Auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of the Sulfur Metabolism Pathway, *Genetics* **130**, 51-58

- Dameron C.T., Reese R.N., Mehra R.K., Kortan A.R., Caroll P.J., Steigerwald M.L., Brus L.E., Winge D.R. (1989) Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallies, *Nature* **338**, 596-597
- De Nobel J. G., Klis F.M., Munnik T., Priem J., Van den Ende H. (1990a) An Assay of Relative Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* **6**, 483-490
- De Nobel J. G., Klis F.M., Priem J., Munnik T., Van den Ende H. (1990b) The Glucanase-Soluble Mannoproteins Limit Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **6**, 491-499
- De Nobel J.G., Dijkers C., Hooijberg E., Klis F.M. (1989) Increased Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after Treatment with Dithiothreitol or EDTA, *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2077-2084
- Di Menna M. E. (1957) The Isolation of Yeasts from Soil, *J. gen. Microbiol.* **17**, 678-688
- Di Menna M.E. (1959)) Some Physiological Characters of Yeasts from Soils and Allied Habitats, *J. gen. Microbiol.* **20**, 13-23
- Doyle A., Slaughter JC. (1998) Methionine and sulphate as competing and complementary sources of sulphur for yeast during fermentation, *J. Inst. Brew.* **104**, 147-155
- Dvorak D.H., Hedin R.S., Harry M.E., McIntire P.E. (1992) Treatment of Metal-Contaminated Water Using Bacterial Sulfate Reduction: Results from Pilot-Scale Reactors, *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 609-616
- Elskens M.T., Jaspers C.J., Penninckx M.J. (1991) Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 637-644
- Entian K-D., Kötter P. (1998) Yeast Mutant and Plasmid Collections, In: Brown A.J.P., Tuite M. (Hrsg.), *Methods in Microbiology Band 26: Yeast Gene Analysis*, Academic Press San Diego
- Evangelou V.P., Zhang Y.L. (1995) A Review: Pyrite Oxidation Mechanisms and Acid Mine Drainage Prevention, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **25**, 141-199
- Fauque G.D. (1994) Sulfur Reductase from Thiophilic Sulfate-Reducing Bacteria, *Meth. Enzymol.* **243**, 353-367
- Fogel S., Welch J.W. (1982) Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5342-5346

- Fortin D., Davis B., Southam G., Beveridge T.J. (1995) Biogeochemical phenomena induced by bacteria within sulfidic mine tailings, *J. Indust. Microbiol.* **14**, 178-185
- Fowler T.A., Holmes P.R., Crundwell F.K. (1999) Mechanism of Pyrite Dissolution in the Presence of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2987-2993
- Gadd G.M., White C. (1993) Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology ?, *TIBTECH* **11**, 353-359
- Graff M. (1997) Biotechnische Verfahren zur Behandlung und Vermeidung schwefelsaurer Grund- und Bergbauwässer, *Umwelttechnik Forum* **2**, 17-18
- Grant C.M., MacIver F.H., Dawes I.W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.* **29**, 511-515
- Grant C.M., MacIver F.H., Dawes I.W. (1997) Glutathione Synthetase Is Dispensable for Growth under Both Normal and Oxidative Stress Conditions in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Due to an Accumulation of the Dipeptide γ -Glutamylcysteine, *Mol. Biol. Cell* **8**, 1699-1707
- Grösz J., Braunsteiner W. (1989) Quantitative Determination of Glucose, Fructose, and Sucrose, and Separation of Fructo-Oligosaccharides by means of TLC, *J. Planar Chromatogr.* **2**, 422-423
- Gyllang H., Winge M., Korch C. (1989) Regulation of SO₂ formation during fermentation, *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Zürich, 347-354
- Hagler A.N., Ahearn D.G. (1987) Ecology of aquatic yeasts In: Rose A.H., Harrison J.S. (Hrsg.) *The yeasts*, Band 1, 2. Aufl. Academic Press New York
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid, *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hansen J., Kielland-Brandt M.C. (1996) Inactivation of MET2 in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer, *J. Biotechnol.* **50**, 75-87
- Hansen T.A. (1993) Carbon Metabolism of Sulfate-Reducing Bacteria In: Odom J.M., Singleton R. (Hrsg.) *The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives* Springer New York
- Hidetoshi T., Movi T., Okumura Y., Kitabakate K., Tsumura Y. (1992) *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 130-133

- Holmes D. (1999) Miners in miniature: Rock is not the easiest of materials to deal with, especially when it comes to extracting any metal buried inside it, but help may be at hand from bacteria, *Chemistry & Industry* 4 January, 20-24
- Huang C., Moore W.R., Meister A. (1988) On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2464-2468
- Ingledeu W.J. (1982) *Thiobacillus Ferrooxidans*: The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph, *Biochim. Biophys. Acta* **683**, 89-117
- Iwantscheff G. (Hrsg.) (1972) Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse 2. Aufl., VCH Weinheim
- Jander G., Blasius E. (Hrsg.) (1988) Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie 12. Aufl., Hirzel Stuttgart
- Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A. (1995) Regulation of Hydrogen Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 461-467
- Käppeli O. (1986) Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts, *Adv. Microb. Physiol.* **28**, 181-209
- Klimmek O., Kröger A., Steudel R., Holdt G. (1991) Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulphide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport, *Arch. Microbiol.* **155**, 177-182
- Kneer R., Kutchan T.M., Hochberger A., Zenk M.H. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* contain heavy metal sequestering phytochelatins, *Arch. Microbiol.* **157**, 305-310
- Korch C., Mountain H.A., Gyllang H., Winge M., Brehmer P. (1991) A mechanism for sulfite production in beer and how to increase sulfite levels by recombinant genetics, *Proc. Eur. Brew. Congr.*, Lisbon, 201-208
- Krahn R., Henkler R-D., Enßlin W., Bartsch U. (1999) Biotechnologische Sanierung von schwermetallhaltigen Böden und Wässern *Europäisches Patent* 0827430, Biotechnological purification of soil and water containing heavy metals *United States Patent* 5,968,359
- Kunz P. (Hrsg.) (1992) Umwelt-Bioverfahrenstechnik Vieweg
- Le Faou A., Rajagopal B.S., Daniels L., Fauque G. (1990) Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world, *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 351-382

- Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. (1999) Yap1 and Skn7 Control Two Specialized Oxidative Stress Response Regulons in Yeast, *J. Biol. Chem.* **274**, 16040-16046
- Lesuisse E., Labbe P. (1992) Iron Reduction and Trans-Plasma Membrane Electron Transfer in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant Physiol.* **100**, 769-777
- Lipke P.N., Ovale R. (1998) Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges, *J. Bacteriol.* **180**, 3735-3740
- Lisowsky T. (1993) A high copy number of yeast γ -glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation, *Curr. Genet.* **23**, 408-413
- Lovley D.R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, *Microbiol. Rev.* **55**, 259-287
- Mattheß G., Weßling E. (1996) Sanierungsverfahren: Chemische Fixierung In: Neumaier H., Weber H.H. (Hrsg.) Altlasten - Erkennen, Bewerten, Sanieren 3. Aufl. Springer Berlin
- Mehra R.K., Tarbet E.B., Gray W.R., Winge D.R. (1988) Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ -glutamylpeptides in *Candida glabrata*, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8815-8819
- Meister A. (1988a) Glutathione Metabolism and Its Selective Modification, *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208
- Meister A. (1988b) On the discovery of glutathione, *TIBS* **13**, 185-188
- Merck-Firmenbroschüre: Die chemische Untersuchung von Wasser, 13. Aufl.
- Miehlich G. (1989) Was ist Boden oder vom Unbehagen des Dr. Sauer beim Umgang mit Mutter Erde In: Behrens D., Wiesner J. (Hrsg.) Beurteilung von Schwermetallkontaminationen im Boden, Dechema Frankfurt am Main
- Murasugi A., Wada Nakagawa C., Hayashi Y. (1984) Formation of Cadmium-Binding Peptide Allomorphs in Fission Yeast, *J. Biochem.* **96**, 1375-1379
- Neumaier H. (1996) Sanierungsverfahren In: Neumaier H., Weber H.H. (Hrsg.) Altlasten - Erkennen, Bewerten, Sanieren 3. Aufl. Springer Berlin
- Nordstrom D.K. (1982) Aqueous pyrite oxidation and the consequent formation of secondary iron minerals, In: Hossner L.R., Kittrick J.A., Fanning D.F. (Hrsg.) Acid Sulfate Weathering: Pedogeochemistry and Relationship to Manipulation of Soil Minerals, Soil Science Society of America Press Madison WI

- Ohio State University Research Foundation (1971) Acid Mine Drainage Formation and Abatement, Water Pollut. Control Res. Ser. DAST-42-14210 FPR-04/71, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Ohtake Y., Yabuuchi S. (1991) Molecular Cloning of the γ -Glutamylcysteine Synthetase Gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* **7**, 953-961
- Omura F., Shibano Y., Fukui N., Nakatani K. (1995) Reduction of hydrogensulfide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 58-62
- Pattaragulwanit K., Brune D.C., Trüper H.G., Dahl C. (1998) Molecular genetic evidence for extracytoplasmatic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*, *Arch. Microbiol.* **169**, 434-444
- Rabinowitz J.C. (1978) Analysis of Acid-Labile Sulfide and Sulfhydryl Groups, *Meth. Enzymol.* **53**, 275-277
- Rauhut D., Kürbel H. (1994) Die Entstehung von H₂S aus Netzschwefel-Rückständen während der Gärung und dessen Einfluß auf die Bildung von böckserverursachenden schwefelhaltigen Metaboliten in Wein, *Vitic. Enol. Sci.* **49**, 27-36
- Reardon E.J., Moddle P.M. (1985) Gas diffusion measurements on uranium mill tailings: implications to cover layer design, *Uranium* **2**, 111-131
- Reese R.N., Winge D.R. (1988) Sulfide stabilization of the cadmium- γ -glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biol. Chem.* **263**, 12832-12835
- Roy A.B., Trudinger P.A. (Hrsg.) (1970) The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur, Cambridge Univ. Press Cambridge
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1986) Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press New York
- Scheffer F., Schachtschabel P. (Hrsg.) (1998) Lehrbuch der Bodenkunde 14. Aufl. Enke Stuttgart
- Schütz M., Kunkee R.E. (1977) Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast, *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 137-144
- Schwarzenbach G., Fischer A. (1960) Die Acidität der Sulfane und die Zusammensetzung wässriger Polysulfidlösungen, *Helv. chim. Acta.* **53**, 1365-1390
- Seim R. (Hrsg.) (1981) Minerale - Sammeln und Bestimmen, 1. Aufl. Neumann Leipzig

- Serrano R. (1988) H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution, *Methods. Enzymol.* **157**, 533-544
- Sillitoe R.H., Folk R.L., Saric N. (1996) Bacteria as Mediators of Copper Sulfide Enrichment During Weathering *Science* **272**, 1153-1155
- Singer P.C., Stumm W. (1970) Acid Mine Drainage: The Rate-Determining Step, *Science* **167**, 1121-1123
- Singleton R. (1993) The Sulfate-Reducing Bacteria: An Overview In: Odom J.M., Singleton R. (Hrsg.) The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives Springer New York
- Soni R., Carmichael J.P., Murray J.A.H. (1993) Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure, *Curr. Genet.* **24**, 455-459
- Steudel R., Holdt G., Göbel T. Hazeu W. (1987) Chromatographische Trennung höherer Polythionate S_nO₆²⁻ (n=3...22) und deren Nachweis in Kulturen von *Thiobacillus ferrooxidans*; molekulare Zusammensetzung bakterieller Schwefelausscheidungen, *Angew. Chem.* **99**, 143-146
- Steudel R., Jensen D., Göbel P. (1988) Optical Absorption Spectra of the Homocyclic Sulfur Molecules S_n (n=6,7,8,9,10,12,15,20) in Solution, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **92**, 118-122
- Steudel R., Mäusle H.-J. (1979) Säurezersetzung von Natriumthiosulfat: Molekulare Zusammensetzung des ausfallenden Schwefels, *Z. anorg. allg. Chem.* **457**, 165-173
- Stohs S.J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321-336
- Suthersan S.S. (1996) Insitu anaerobic reactive zone for insitu metals precipitation and to achieve microbial de-nitrification, United States Patent 5,554,290
- Thiele D.J. (1988) *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene, *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2745-2752
- Thomas D., Barbey R., Henry D., Surdin-Kerjan Y. (1992) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation, *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2021-2028

- Thomas D., Kuras L., Barbey R., Cherest H., Blaiseau P.L., Surdin-Kerjan Y. (1995) Met30p, a Yeast Transcriptional Inhibitor That Responds to S-Adenosylmethionine, Is an Essential Protein with WD40 Repeats, *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6526-6534
- Tuovinen O.H., Niemella S.I., Gyllenberg H.G. (1971) Effect of mineral nutrients and organic substances on the development of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 517-527
- Tuttle J.H., Dugan P.R. (1976) Inhibition of growth, iron, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds, *Can. J. Microbiol.* **22**, 719-730
- Wakatsuki T. (1995) Metal oxidoreduction by microbial cells, *J. Indust. Microbiol.* **14**, 169-177
- Watterson J.R. (1992) *Geology* **20**, 315-318
- Wedepohl K.H. (1984) Sulfur in the earth's crust, its origin and natural cycle In: Müller A., Krebs B. (Hrsg.) Studies in Inorganic Chemistry Band 5 - Sulfur: Its Significance for Chemistry, for the Geo-,Bio- and Cosmosphere and Technology, Elsevier Amsterdam
- Wemmie J.A., Szczypka M.S., Thiele D.J., Moye-Rowley W.S. (1994) Cadmium Tolerance Mediated by the Yeast AP-1 Protein Requires the Presence of an ATP-binding Cassette Transporter-encoding Gene, YCF1, *J. Biol. Chem.* **269**, 32592-32597
- White C, Gadd G.M. (1997) An internal sedimentation bioreactor for laboratory-scale removal of toxic metals from soil leachates using biogenic sulphide precipitation, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 414-421
- White C., Sharman A.K., Gadd G.M. (1998) An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals, *Nature Biotechnology* **16**, 572-575
- Wielinga B., Lucy J.K., Moore J.N., Seastone O.F., Gannon J.E. (1999) Microbiological and Geochemical Characterization of Fluvially Deposited Sulfidic Mine Tailings, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1548-1555
- Würdig G., Woller R. (Hrsg.) (1989) Handbuch der Lebensmitteltechnologie - Chemie des Weines, Ulmer Stuttgart
- Yamagata S. (1980) Occurrence of low molecular weight O-acetylserine sulfhydrylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biochem.* **88**, 1419-1427

- Yu W., Farrell R.H., Stillman D.J., Winge D.R. (1996) Identification of *SLF1* as a New Copper Homeostasis Gene Involved in Copper Sulfide Mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2464-2472
- Żądziński R., Maszewski J., Bartosz, G. (1996) Transport of glutathione S-conjugates in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biol. Int.* **20**, 325-330
- Zlotnik H., Fernandez M.P., Bowers B., Cabib E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity, *J. Bacteriol.* **159**, 1018-1026
- Zöphel A., Kennedy M.C., Beinert H., Kroneck P.M.H. (1988) Investigations on microbial sulfur respiration, *Arch. Microbiol.* **150**, 72-77

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Rahmen einer Industriekooperation mit der Firma ICI Lacke Farben GmbH, Hilden.

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Ulrich Schulte für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen interessanten Gespräche bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hanns Weiss danke ich für die Bereitstellung des Laborplatzes und sein Interesse an dem Thema.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Dr. Thomas Lisowsky bedanke ich mich für praktische Tips und die "GSH1-Gendosis", mit der meine Hefen nach "erfolgreicher Ausrüstung" ihre Überlegenheit im H_2S -Wettbewerb mit sulfatreduzierenden Bakterien gnadenlos ausspielen konnten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rolf-Dieter Henkler von der Firma ICI für sein persönliches Engagement bei der Entwicklung neuer Ansätze im Bereich *bioremediation*, das auch diese Arbeit ermöglicht hat. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für den Einblick in die Sanierungspraxis und für die Möglichkeit zu interessanten Fachgesprächen, unter anderem mit Wissenschaftlern aus Melbourne und Aberdeen.

Bei Herrn Dr. Walther Enßlin vom HGH Hilden und Herrn Fahrney von der Uni Wuppertal möchte ich mich für die gerätetechnische Unterstützung und ihre Diskussionsbereitschaft bedanken.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft danken. Die netten Institutsrunden bei Sekt und Kuchen und vor allem die Abende, an denen nicht nur der Kühlraum sondern auch die Eismaschine volle Leistung bringen mußte, werden mir sicher fehlen. Darüber hinaus danke ich den "Genforschern" Dr. Frank Bürger und Jörg Hennemann, die mir bei meinen molekularbiologischen Experimenten beratend zur Seite standen. Meinen Laborkolleginnen Reinhild Wurm, Martina Roelevink und Vassiliki Tsalastra danke ich für die schöne gemeinsame Zeit während meiner Promotion und Vassiliki Tsalastra zusätzlich für das geduldige Ertragen diverser Geruchsbelästigungen an der Sterilbank.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, vor allem meinen Eltern, die mich immer und in allen Lebenslagen unterstützt haben und jederzeit für mich da waren.