

Denitrifikation: Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor

VerfasserInnen: Philippe Saner P.Saner@access.unizh.ch, Pascale Sandmann pascale@sandmann.ch,
Thomas Huber its4tom@gmx.ch, Isabelle Zumsteg izumsteg@hotmail.com

Betreuerin: Christine Lehmann chleh@botinst.unizh.ch

1. Einführung

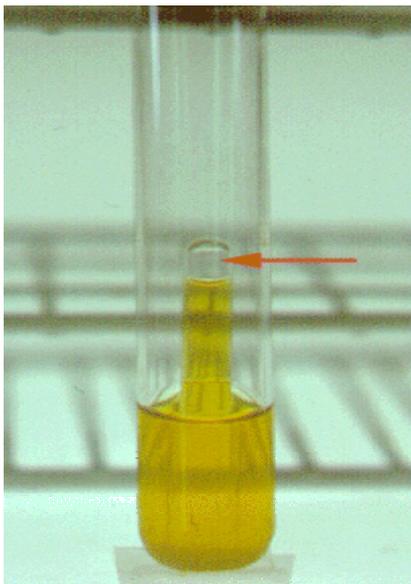
Anaerobe Mikroorganismen, die in einem sauerstoffarmen bzw. sauerstofflosen Milieu leben, haben für ihren Atmungsprozess wenig oder kein O_2 zur Verfügung. Damit sie aber die Elektronen, die bei der Oxidation der organischen Substrate anfallen, abgeben können, benötigen sie einen organischen oder anorganischen Elektronenakzeptor. In unserem Beispiel ist das die oxidierte Form des Stickstoffs, der über mehrere Stufen reduziert werden kann. Der Prozess wird Denitrifikation genannt (siehe Schema in der Experimentieranleitung)

2. Vorgehen

In der ersten Kurswoche wurden Reagenzgläser mit nitrathaltigem (NO_3^-) Nährmedium mit je einer Bakteriensuspension, einer Bodensuspension oder Pansensaft beimpft und bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

In der zweiten Kurswoche testeten wir die auf dem nitrathaltigem Nährmedium gewachsenen Kulturen auf Denitrifikation: Dazu wurde etwas Nitrit-Testlösung zur Bakterienkultur gegeben. Bei **positiver Reaktion**, das heisst Nachweis von Nitrit (NO_2^-), färbt sich die Lösung „pink“. Bei negativer Reaktion färbt sich die Lösung nicht, d.h. es ist kein Nitrit vorhanden. Daraus schliesst man, dass der zu untersuchende Bakterienstamm entweder kein Nitrat zu Nitrit reduzieren kann oder Nitrit bereits weiter reduziert wurde.

3. Experiment



Gasbildung

Abb. 1 Durham-Röhrchen (Reagenzglas mit umgekehrtem Gasnachweisröhrchen) zum Testen der Gasproduktion

Quelle: <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab8/images/prgas.gif>

1. In 4 "Durham" Röhren wurde je 5 ml der von der Assistentin vorbereiteten nitrathaltigen Nährlösung gegeben. (Zusammensetzung ist in der Versuchsanleitung nachzulesen.) Vorsicht! Das umgekehrte Röhren darf keine Luftblase enthalten.
2. Zu 3 RGs wurde 500 µl Bakteriensuspension aseptisch zugegeben:
 - *Pseudomonas syringae*
 - *Escherichia coli*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
3. RG Nr. 4 diente zur Kontrolle und enthielt nur Versuchsmedium aber keine Bakteriensuspension
4. Während 2-7 Tagen wurden die Proben bei 32°C inkubiert.
5. Je 5 µl der Inkubationslösung wurde zu 4 ml destilliertem Wasser pipettiert. Dazu wurden 2 ml Nitrit-Testlösung gegeben.
6. Messung der Absorption der pinkfarbenen Lösungen bei 540 nm am Photometer gegen Kontrolle
7. Bei allfällig farblos gebliebenen Lösungen wurde eine Messerspitze Zink zugegeben, das noch vorhandenes Nitrat chemisch zu Nitrit reduzieren kann und somit Farbänderung zu „pink“ hervorruft. Damit lässt sich mit dem Nitrittest auch Nitrat nachweisen. Ist der Nitrat negativ (keine Verfärbung) und die Gasbildung positiv (Gasblase im Durham-Reagenzglas vorhanden), kann man auf eine vollständige Denitrifikation schließen.

4. Auswertung

Testkultur	Nitrit nachgewiesen	Gasbildung	Verbliebenes Nitrat	ABS (540nm) pink
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+++	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-
Kontrolle	-	-	+	-

5. Schlussfolgerungen

Pseudomonas syringae: Nitrat wurde zu Nitrit reduziert.

E.coli: Unerwarteterweise ist etwas Gasbildung aufgetreten. Normalerweise reduziert *E.coli* Nitrat nur zu Nitrit und nicht weiter. Beim gebildeten Gas könnte es sich deshalb z.B. um CO₂ handeln, was aber mit einer anderen analytischen Methode bestimmt werden müsste.

Pseudomonas aeruginosa: Vollständige Denitrifikation. Da der Nitrit-Nachweis negativ ausfiel, musste getestet werden, ob Nitrat vollständig oder gar nicht abgebaut wurde. Mit Hilfe der ‚Zink Probe‘, die negativ ausfiel, wurde gezeigt, dass alles Nitrat umgesetzt worden war.

Kapitel in Brock-Biology of Microorganisms 9th ed.:

Anaerobe Atmung 15.15

Denitrifikationsprozess 15.16

Stickstoffkreislauf 16.16