Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor: Denitrifikation

Verfasserinnen: Simone Peter s0170515@access.unizh.ch
Dorothea Riniker s0171337@access.unizh.ch
Betreuerin: Christine Lehmann chleh@botinst.unizh.ch

Theorie

BBOM 10. Ausgabe, Kapitel: 17.13, 17.14, 19.12

Einführung

Bei Organismen mit aerober Atmung dient O_2 als Elektronenakzeptor. In der anaeroben Atmung ist ein anorganisches (zum Beispiel NO_3^-) oder ein organisches Molekül (z.B. Fumarat) Elektronenakzeptor. Bei einigen Mikroorganismen stehen aerobe und anaerobe Atmung in Konkurrenz: Wenn O_2 vorhanden ist, wir aerob geatmet, wenn O_2 fehlt, so wird der alternative Elektronenakzeptor reduziert. Man nennt Organismen, die die Möglichkeit besitzen, sowohl aerob, als auch anaerob zu atmen fakultative Anaerobier.
Andere Organismen, die obligaten Anaerobier können gar nicht mit O_2 atmen, sie benötigen ein anderes Oxidationsmittel, vielfach ist O_2 für sie toxisch.
Atmungsvorgänge mit Elektronentransport finden in den Membranen statt. Am meisten Energie wird beim Abbau durch aerobe Atmung gewonnen.
Denitrifikation nennt man den anaeroben Atmungsprozess, bei dem Nitrat zu gasförmigem Distickstoff reduziert wird. Dies geschieht über verschiedene Zwischenstufen und kann vollständig (zu elementarem Distickstoffgas) oder unvollständig (zu Nitrit) verlaufen:

NO_3^-	→	NO_2^-	→	NO/N_2O	→	N_2
Nitrat gelöst		Nitrit gelöst		Stickoxid/Lachgas gasförmig		elementarer Stickstoff gasförmig

Vorgehen

Denitrifikation wurde in nitrathaltiger Nährlösung in Reagenzgläsern an verschiedenen Testkulturen untersucht.

Testkulturen

Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Bacillus megaterium
Pseudomonas putida

Nährlösung: Fleisch- und Hefeextrakt, Pepton, NaCl, K**NO₃** (pH 7)

Negativkontrolle: Nährlösung ohne Bakterien

Kulturbedingungen

- 4 RGs bereitstellen, die jeweils ein umgekehrtes „Durham"-Röhrchen enthalten (dient zur Beobachtung der Gasentwicklung)
- nitrathaltige Nährlösung beigeben
- Kulturröhrchen autoklavieren

- 3 Kulturröhrchen mit den Testkulturen inokulieren, das vierte Röhrchen bleibt unbeimpft, das ist die Kontrolle
- Im „Durham"-Röhrchen dürfen sich bei Inkubationsbeginn keine Gasblasen befinden, sie können durch Umkehren der RG's entfernt werden
- Inkubation bei 30 ° C während 24 Stunden.

Auswertung

Die Testkulturen und die Kontrollprobe werden nun auf Trübung, Gasbildung, sowie auf Nitrit- und Nitratvorkommen untersucht.

N_2 und N_2O Nachweis: Gasblase im umgekehrten „Durham"-Röhrchen. Die beiden Gase wurden nicht unterschieden, dies wäre jedoch mit gaschromatographischen Methoden möglich.

Trübung: Wenn Bakterien gewachsen sind, wird die Nährlösung trüb (die Bakterien streuen das Licht, was als erhöhte scheinbare Absorption gemessen wird)

Nitrit-Nachweis: 4 ml dH_2O werden in ein RG vorgelegt, 20 µl Probe aus jedem Ansatz zupipettiert und mit 1 ml Testreagens gemischt.
Wenn Nitrit vorhanden ist (positive Reaktion), bildet sich ein violetter Azofarbstoff, der photometrisch ($Absorption_{540nm}$) gemessen werden kann.

Nitrat-Nachweis: Wird durchgeführt, wenn sowohl der Nitrit- als auch der Gasnachweis negativ ausfallen. Mit dem Nitratnachweis wird abgeklärt, ob Nitrat durch die Mikroorganismen gar nicht reduziert wurde, also im Medium noch vorhanden ist.
Nach Zugabe des Testreagens und negativem Resultat wird durch Zugabe von wenig Zink-Pulver NO_3^- zu NO_2^- chemisch reduziert, was ebenfalls durch Violettfärbung sichtbar wird.

Resultate

Testkultur	NO_3^- Verbrauch	NO_2^- Bildung	N_2, N_2O Gasbildung	Trübung OD bei 660nm
E. coli	+	+	-	+
S. aureus	+	+	-	+
B. megaterium	+	+	-	+
P. putida	+	(+)	(+)	(+)
Kontrolle	-	-	-	-

E. coli, S. aureus, B. megaterium reduzierten Nitrat zu Nitrit. Es trat keine Gasbildung auf, d.h. das Nitrit wurde nicht weiter reduziert. die Denitrifikation ist also nicht vollständig.
Bei *P. putida* wurde nur wenig Nitrit nachgewiesen. Gleichzeitig trat eine geringe Gasbildung auf.

Diskussion

Um zu zeigen, dass es sich beim gebildeten Gas im „Durham"-Röhrchen um Stickstoffverbindungen handelt, könnte eine Negativkontrolle, d.h. Nährlösung ohne Nitrat aber mit Bakterien angesetzt werden, bei der die Gasbildung dann negativ ausfallen sollte.
Bemerkung.: Beim Nitrat-Nachweis darf nicht zuviel Zink-Pulver zugegeben werden, da sonst die Reduktion von NO_3^- nicht nur zu NO_2^- sondern zu N_2 weiterläuft. In diesem Fall ergibt sich keine Verfärbung.