

# Mikrobieller Abbau halogenierter Kohlenwasserstoffe: Ein Beitrag zur Lösung vieler Umweltprobleme?

Von Rudolf Müller und Franz Lingens\*

*In memoriam Konrad Bernhauer*

Chlorierte Kohlenwasserstoffe finden aufgrund ihrer chemischen und thermischen Stabilität sowie ihrer fungiziden, herbiziden und insektiziden Wirkung breite Anwendung. Leider führen eben diese Eigenschaften auch dazu, daß diese Verbindungen in der Natur äußerst persistent sind; Halbwertszeiten von 15 Jahren und mehr sind keine Seltenheit. In manchen Ländern wurde die Anwendung einiger chlorierter Verbindungen verboten, obwohl sie genau das erwünschte Wirkungsspektrum zeigten (z. B. DDT). Erstaunlicherweise werden dennoch die meisten dieser Verbindungen durch mikrobielle Systeme abgebaut. In vielen Fällen gelang es, bakterielle Reinkulturen zu isolieren, die chlorierte Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle nutzen können. Selbst eine so hoch chlorierte Verbindung wie das Holzschutzmittel und Herbizid Pentachlorphenol kann von einigen Bakterien als einzige Kohlenstoffquelle genutzt werden. Untersuchungen des Abbaus halogenierter Kohlenwasserstoffe führten zur Entdeckung neuer Abbauwege, bei denen sich bisher nicht bekannte enzymatische Reaktionen nachweisen ließen. Es wurden sogar bakterielle Enzyme gefunden, die Halogensubstituenten sowohl in aliphatischen als auch in aromatischen Verbindungen durch Hydroxygruppen oder durch Wasserstoffatome ersetzen. – Die hier beschriebenen neuen Erkenntnisse werden sicherlich in absehbarer Zukunft zu neuen biotechnologischen Verfahren, vor allem auf dem Gebiet der Abwassertechnologie, führen.

## 1. Einleitung

Halogenierte Kohlenwasserstoffe finden in vielen Bereichen unseres täglichen Lebens Anwendung. Sie werden als Lösungsmittel (Chloroform, Trichlorethylen, Chlorbenzol usw.), Isolatorflüssigkeiten (polychlorierte Biphenyle), Holzschutzmittel (Pentachlorphenol), Herbizide und Fungizide verwendet. Dabei gelangen diese Stoffe absichtlich oder unabsichtlich in größeren Mengen in unsere Umwelt und können dort mit den heutigen hochempfindlichen Analysenmethoden beinahe überall nachgewiesen werden<sup>[1,2]</sup>. Da auch die Tagespresse häufig über den Nachweis von chlorierten Verbindungen in der Umwelt und die dadurch möglichen Gefährdungen berichtet, ist die Öffentlichkeit sowohl sensibilisiert als auch verunsichert. Während die meisten vom Menschen in die Natur gebrachten Verbindungen relativ rasch abgebaut werden, sind viele chlorierte Kohlenwasserstoffe äußerst persistent<sup>[3]</sup>. Die schlechte biologische Abbaubarkeit dieser Verbindungen wurde oft darauf zurückgeführt, daß die explosionsartige Belastung der Natur mit neuen Verbindungen erst in diesem Jahrhundert begann und sich die Mikroorganismen noch nicht auf alle diese Stoffe einstellen konnten. Man muß aber auch bedenken, daß die Natur selbst große Mengen an halogenierten Verbindungen produziert, so daß es erstaunlich wäre, wenn sie nicht auch Mechanismen zum Abbau dieser Verbindungen entwickelt hätte. Es ist bekannt, daß die organischen Verbindungen größtenteils durch Mikroorganismen abgebaut werden. In diesem Beitrag soll nun gezeigt werden, ob und wie weit die wichtig-

sten chlorierten Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen abgebaut und somit für die Umwelt unschädlich gemacht werden können.

Zunächst werden kurz die angewendeten Methoden vorgestellt. Wenn im folgenden von Mikroorganismen die Rede ist, dann sind damit in erster Linie Bakterien gemeint. In Böden und Gewässern bilden Bakterien den höchsten Anteil der natürlicherweise vorkommenden Mikroorganismen, und der weitaus größte Teil aller Abbauuntersuchungen wurde auch mit Bakterien durchgeführt. Arbeiten mit Pilzen sind wesentlich seltener beschrieben worden, und über die Abbaufähigkeit von Algen und Protozoen liegen nur wenige Untersuchungen vor.

## 2. Methoden zur Untersuchung des Abbaus von Problemstoffen

Die erste wichtige Voraussetzung für Abbauuntersuchungen ist ein gut reproduzierbarer quantitativer Nachweis der abzubauenden Verbindung. Auf die hierbei auftretenden Probleme soll nicht weiter eingegangen werden, da sie dem Chemiker bekannt sind.

Als nächstes muß eine Quelle für solche Mikroorganismen ausgewählt werden, von denen die Fähigkeit zum Abbau einer speziellen Verbindung erwartet werden kann. Im Falle der halogenierten Kohlenwasserstoffe bieten sich vor allem Boden- oder Wasserproben an, die seit längerem mit diesen Verbindungen kontaminiert sind. Diese Proben werden dann mit dem interessierenden halogenierten Kohlenwasserstoff in verschiedenen Konzentrationen versetzt, feucht gehalten und längere Zeit inkubiert. Dabei ist es sinnvoll, Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Ionenkonzentration und Sauerstoffgehalt zu variieren. Von Zeit zu

[\*] Prof. Dr. F. Lingens, Dr. R. Müller  
Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim  
Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70

Zeit wird die Konzentration der zugesetzten Verbindung gemessen. Ist sie vollständig abgebaut, wird ein Teil des Ansatzes in neues Nährmedium mit der gleichen Verbindung überführt. So lässt sich in den meisten Fällen eine stabile Mischkultur von Mikroorganismen erreichen. Da es aber für den Mikrobiologen befriedigender ist, mit Reinkulturen zu arbeiten, wird in den meisten Fällen versucht, durch geeignete mikrobiologische Verfahren – zum Beispiel Ausplattieren auf Agarplatten und Isolieren von Einzelkolonien – Reinkulturen zu isolieren, welche die eingesetzte Verbindung als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können.

Mit einer solchen Reinkultur ist es möglich, die einzelnen Schritte des Abbaus aufzuklären; Ziel des Biochemikers ist es, mit angereicherten Enzymen aus diesen Bakterien die einzelnen Schritte des Abbaus im Reagensglas nachzuvollziehen. Die so gewonnenen Erkenntnisse können dann für Biotransformationen genutzt werden. Unter Biotransformation versteht man chemische Umwandlungen, die durch Mikroorganismen – genauer gesagt, deren Enzyme – katalysiert werden. Hierbei finden mehrere Techniken Anwendung. Die interessierende Verbindung (das Substrat) kann zum Beispiel während des Wachstums der Bakterien zugesetzt werden; dadurch werden entsprechende Enzyme induziert, welche die gewünschte Umsetzung bewirken. Als Alternative bietet sich die Transformation durch „ruhende Zellen“ an. Hierbei werden die Bakterien in einem optimalen Wachstumsmedium angezüchtet und dann in einem speziellen Transformationsmedium mit dem Substrat versetzt. Eine Variation dieser Methode ist die Verwendung von Mikroorganismen, die an inertem Trägermaterial immobilisiert sind. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, den Biokatalysator einfach im Reaktionsgefäß zurückhalten zu können. Auf diese Weise lassen sich kontinuierliche Biotransformationen durchführen. Wenn bei Verwendung ganzer Zellen Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, ist es notwendig, mit isolierten Enzymen zu arbeiten. Auch in diesem Fall ist die Verwendung immobilisierter Systeme von Vorteil.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, wieweit diese Methoden bei den wichtigsten halogenierten Kohlenwasserstoffen zum Erfolg geführt haben.

### 3. Halogenierte aliphatische Verbindungen

Halogenierte aliphatische Verbindungen finden als Pflanzenschutzmittel und als Lösungsmittel weite Anwendung. Die Weltproduktion von Dichlormethan betrug allein 1982 über 13 Millionen Tonnen<sup>[4]</sup>. Einige dieser Verbindungen wirken cancerogen (z. B. Vinylchlorid), andere können in mutagene Zwischenprodukte umgewandelt werden (z. B. 1,2-Dichlorethan)<sup>[5,6]</sup>. Durch den unachtsamen Umgang vor allem mit Lösungsmitteln auf Halogenalkan-Basis ist es immer wieder zur Verseuchung von Grund- und Trinkwasser gekommen. Außerdem wurde bei der Chlorierung von Trinkwasser und Schwimmbadwasser die Bildung chlorierter aliphatischer Verbindungen nachgewiesen<sup>[7]</sup>. Untersuchungen zum biologischen Abbau dieser Verbindungen sind daher von größtem Interesse. Bei den bisher geprüften chlorierten aliphatischen Verbindungen lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: Erstens die als

Zwischenprodukte bei der chemischen Synthese oder als Lösungsmittel verwendeten Halogenalkane und zweitens die als Desinfektionsmittel oder Herbizide verwendeten Halogenalkansäuren.

#### 3.1. Halogenalkane

Brunner et al.<sup>[8]</sup> gelang die Isolierung eines Bakteriums mit der Fähigkeit, auf Dichlormethan als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Stucki et al.<sup>[9]</sup> beschrieben die Isolierung einer *Hyphomicrobium*-Spezies mit derselben Fähigkeit. In diesem Stamm konnte eine Glutathion-abhängige Deshalogenase nachgewiesen werden, die imstande ist, Dichlormethan in Formaldehyd umzuwandeln. Eine weitere chlorierte C<sub>2</sub>-Verbindung, deren mikrobieller Abbau untersucht wurde, ist das als Desinfektionsmittel verwendete Trichlornitromethan (Chloropicrin)<sup>[10]</sup>. Diese Verbindung wird durch eine *Pseudomonas*-Spezies schrittweise zu Nitromethan abgebaut. Auch der Abbau von Tetrachlorkohlenstoff durch Bakterien ließ sich nachweisen; als Abbauprodukte wurden Chloroform und Kohlendioxid gefunden. Der weitere Abbau von Chloroform durch Bakterien ist ebenfalls bekannt<sup>[11]</sup>.

Bei den chlorierten C<sub>2</sub>-Alkanen ist bisher der mikrobielle Abbau von 1,2-Dichlorethan<sup>[12,13]</sup>, Tetrachlorethylen, Trichlorethylen, den Dichlorethylenen und Vinylchlorid untersucht worden<sup>[14]</sup>. Vogel und McCarthy<sup>[14]</sup> schlugen ein Schema für den Abbau von Tetrachlorethylen 1 unter anaeroben Bedingungen durch eine Mischkultur vor (Abb. 1). Janssen et al.<sup>[12]</sup> beschrieben den Abbau von 1,2-Dichlorethan 2 durch ein Bakterium, das sie als *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 bezeichneten. Durch dieses Bakterium

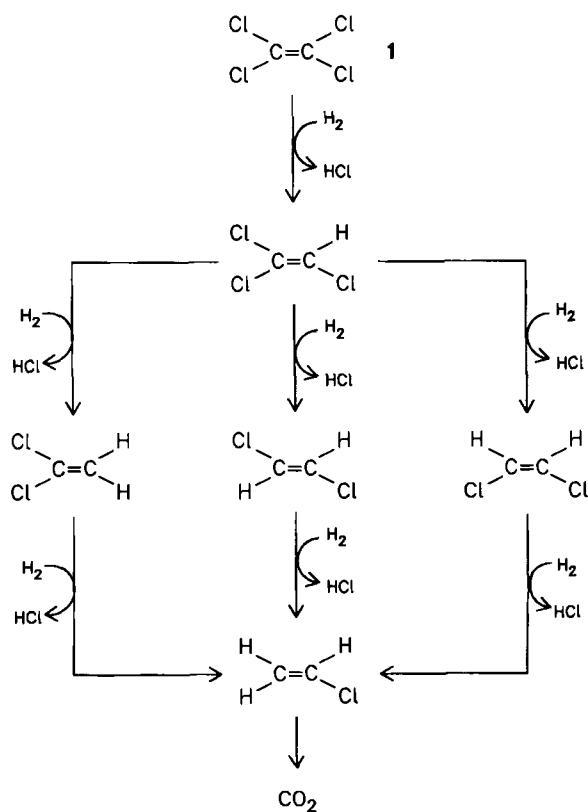


Abb. 1. Abbau von Tetrachlorethylen 1 durch eine Mischkultur unter methanogenen Bedingungen.

wird im ersten Schritt ein Halogensubstituent durch eine Hydroxygruppe ersetzt. Das entsprechende Enzym konnte aus dem Bakterium rein dargestellt werden<sup>[15]</sup>. Der gebildete Chloralkohol 3 wird zunächst über den Aldehyd 4 zur Chloressigsäure 5 oxidiert; dann erst wird das zweite Chloratom entfernt (Abb. 2). Interessant ist der Befund, daß die beiden Deshalogenierungsschritte durch zwei verschiedene Deshalogenasen katalysiert werden<sup>[12]</sup>. Jagnow et al.<sup>[16, 17]</sup> beschrieben den Abbau des als Lindan im Handel erhältlichen Insektizids Hexachlorcyclohexan (HCH) durch obligat und fakultativ anaerobe Bakterien. Dabei tritt Tetrachlorcyclohexan als Zwischenprodukt auf<sup>[17]</sup>. Die vollständige Abbausequenz konnte noch nicht geklärt werden.

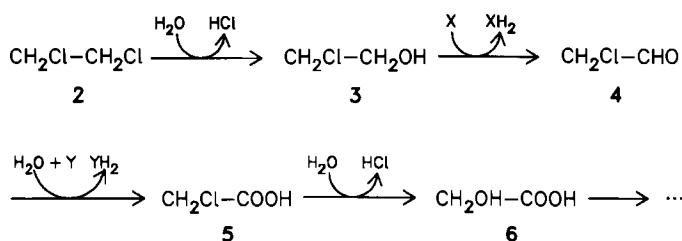


Abb. 2. Abbau von 1,2-Dichlorethan 2 durch *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. Die erhaltene Glyoxalsäure 6 wird auf bekanntem Weg abgebaut.

Obwohl längerkettige halogenierte Verbindungen keine größere wirtschaftliche Bedeutung haben, sei der Vollständigkeit halber erwähnt, daß auch Bakterien gefunden wurden, die 1,5-Dichlorpentan, 1,6-Dichlorhexan, 1,9-Dichlornonan, 1,9-Dibromnonan, 1-Chloroctan, 1-Chlor-, 1-Brom- und 1-Iodheptan deshalogenieren und als einzige Kohlenstoffquelle nutzen können<sup>[18]</sup>.

### 3.2. Halogenalkansäuren

Chloralkansäuren sind sowohl für Säugetiere als auch für andere Organismen giftig. Einige dieser Verbindungen werden als Pestizide eingesetzt<sup>[19]</sup>. Glücklicherweise lassen sie sich durch Mikroorganismen leicht abbauen. Senior et al. konnten Reinkulturen aus Mischkulturen isolieren, die das Herbizid Dalapon (2,2-Dichlorpropionsäure) abbauen; diese Reinkulturen können die Verbindung als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen<sup>[19]</sup>. Mehrere Autoren berichten über die Isolierung von Bakterien, die Chloressigsäure<sup>[20-23]</sup>, Fluorescenssäure<sup>[24, 25]</sup>, Chlorpropionsäure<sup>[26]</sup> und auch die dichlorierten Analoga abbauen. Dabei wird immer im ersten Schritt der Halogensubstituent durch eine Hydroxygruppe ersetzt. Aus Monohalogenäuren bilden sich Hydroxy- und aus Dihalogensäuren Oxosäuren. Die deshalogenierenden Enzyme werden in zwei Klassen eingeteilt, je nachdem, ob sie nur halogenierte Essigsäuren oder auch längerkettige Halogenäuren verwerten<sup>[27]</sup>. Bisher wurden nur Enzyme gefunden, die mit 2-substituierten Carbonsäuren reagieren. Optisch aktive 2-Halogencarbonsäuren können durch verschiedenartige Enzyme umgesetzt werden: In manchen Fällen bleibt die Konfiguration erhalten, in anderen Fällen wird Inversion beobachtet<sup>[26]</sup>. Einige Enzyme setzen nur die L-Isomere um, während andere Enzyme beide Enantiomere verwenden. Diesen Befund macht sich ein enzymatisches Verfahren

zur getrennten Darstellung der beiden optisch aktiven Formen von Milchsäure aus racemischer 2-Chlorpropionsäure zunutze. Dabei wird zunächst nur die L-2-Chlorpropionsäure durch ein für diese Form spezifisches Enzym in D-Milchsäure umgewandelt. Nach Abtrennung der D-Milchsäure von nicht umgesetzter D-2-Chlorpropionsäure wird diese dann durch ein Enzym, das beide Isomere verwerten kann, in L-Milchsäure übergeführt<sup>[28]</sup>. Bisher wurde aber noch kein Enzym gefunden, das nur D-2-Chlorpropionsäure in die wirtschaftlich interessantere L-Milchsäure umwandeln kann.

## 4. Aromatische Verbindungen

### 4.1. Nicht halogenierte aromatische Verbindungen

Der mikrobielle Abbau nicht halogenierter aromatischer Verbindungen wird seit langem intensiv untersucht (Übersichten siehe z. B. <sup>[29-31]</sup>). Zum besseren Verständnis des Abbaus der chlorierten Arene sollen hier zunächst die grundlegenden Prinzipien am Beispiel des aeroben Abbaus von Benzol durch Bakterien aufgezeigt werden (Abb. 3):

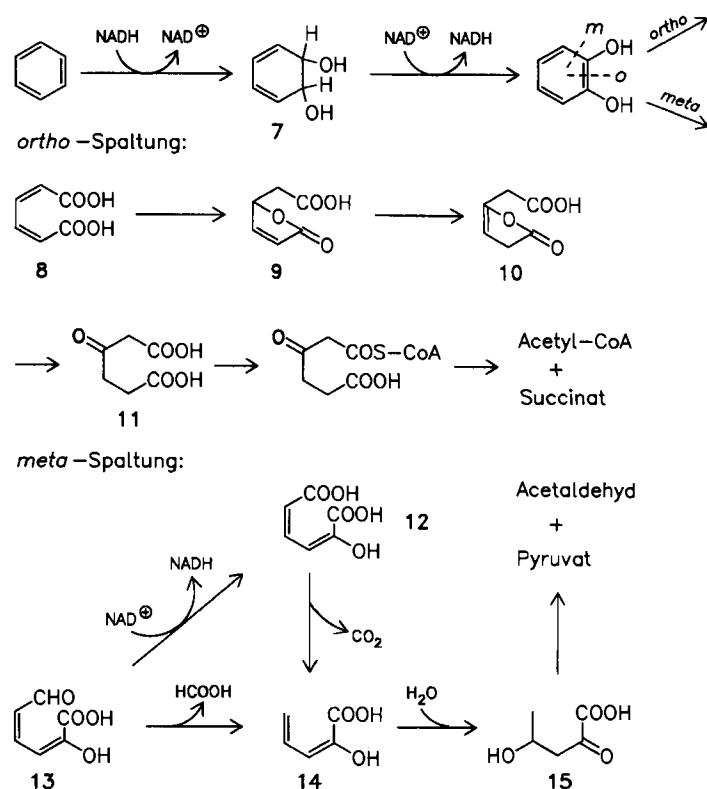


Abb. 3. Bakterieller Abbau von Benzol.

Den Abbau leitet eine Dioxygenase ein, die im ersten Schritt zwei Sauerstoffatome einführt; es entsteht *cis*-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol 7, das durch eine Dehydrogenase in Brenzocatechin umgewandelt wird. In diesem Stadium des Abbaus wird ein zweites Sauerstoffmolekül eingeführt, und der aromatische Ring wird geöffnet. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten: *ortho*-Spaltung – zwischen den Hydroxygruppen – führt zu *cis,cis*-Muconsäure 8, *meta*-Spaltung – benachbart zu den Hydroxygruppen – ergibt den 2-Hydroxymuconsäurealdehyd 13. Auf dem *ortho*-

Weg wird die Muconsäure **8** durch eine Cycloisomerase in Muconolacton **9** übergeführt, das dann zum Enol-lacton **10** isomerisiert. Die daraus durch Hydrolyse freigesetzte Oxoacidinsäure **11** wird nach Veresterung mit Coenzym A durch eine Aldolase in Acetyl-CoA und Succinat gespalten<sup>[32]</sup>.

Der auf dem *meta*-Weg erhaltene 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd **13** kann auf zwei Arten weiterverwertet werden: Entweder wird er durch eine Dehydrogenase in 2-Hydroxymuconsäure **12** übergeführt, die dann zu 2-Hydroxy-2,4-pentadiensäure **14** decarboxyliert werden kann, oder aber er wird direkt durch eine Hydrolase unter Abspaltung von Ameisensäure in diese Verbindung umgewandelt. Der nächste Schritt ist die Anlagerung von Wasser zu 4-Hydroxy-2-oxovaleriansäure **15**. Diese wird schließlich durch eine Aldolase in Acetaldehyd und Pyruvat gespalten<sup>[31]</sup> (Abb. 3). Die Enzyme aus dem Abbau vieler verschiedenartig substituierter Arene wurden inzwischen gereinigt und charakterisiert<sup>[29,33-37]</sup>.

## 4.2. Halogenierte aromatische Verbindungen

### 4.2.1. Polychlorierte Phenole

Polychlorierte Phenole, vor allem Pentachlorphenol, finden weite Anwendung als Fungizide, Herbizide, Desinfektions- und Holzschutzmittel. Jährlich werden mehrere hunderttausend Tonnen produziert und gelangen in die Umwelt<sup>[38]</sup>, etwa 80% davon als Holzschutzmittel. Eine Untersuchung der Seengebiete in Finnland zeigte, daß sich die Chlorphenole über die Nahrungskette in den Fischen anreichern<sup>[39]</sup>. Die Toxizität von Pentachlorphenol wurde intensiv untersucht<sup>[40]</sup>. Diese Verbindung kann Chlorakne und Irritationen der Atemwege hervorrufen; außerdem wurden Leberschäden beobachtet. Da technisches Pentachlorphenol neben niedriger chlorierten Phenolen auch chlorierte Dibenzo[1,4]dioxine als Verunreinigung enthält, sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten, da solche Symptome auch schon durch niedrige Dosen dieser Dioxine hervorgerufen werden können. Leider konnte sich ein Präparat, das dank eines neuen Produktionsverfahrens einen um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Dioxingehalt aufwies, wegen des höheren Preises auf dem Markt nicht durchsetzen<sup>[38]</sup>.

Der Abbau von Pentachlorphenol durch Mikroorganismen wurde von mehreren Autoren beschrieben. Pentachlorphenol ließ sich sowohl anaerob<sup>[41,42]</sup> als auch aerob<sup>[41,43-45]</sup> durch Mischkulturen abbauen. *Guthrie* et al.<sup>[42]</sup> fanden, daß Pentachlorphenol anaerob nach einer Akklimatisierungsphase in ca. zehn Tagen bis unter die Nachweisgrenze (5 µg/L) abgebaut war. *Murthy* et al.<sup>[41]</sup> führten ähnliche Versuche mit Bodenproben und radioaktiv markiertem Pentachlorphenol durch. Dabei wurde festgestellt, daß Pentachlorphenol die CO<sub>2</sub>-Bildung unter anaeroben Bedingungen sehr stark hemmt. 2,3,5,6- und 2,3,4,5-Tetrachlorphenol, 2,3,6-Trichlorphenol und Pentachloranisol wurden als Umsetzungsprodukte gefunden. *Ide* et al.<sup>[46]</sup> inkubierten Bodenproben aus mit Pentachlorphenol behandelten Reisfeldern 30 Tage mit Pentachlorphenol. Die Analyse des sauren Hexanextraktes ergab neben den oben genannten Verbindungen noch 2,3,4,6-Tetrachlorphenol,

2,4,5-Trichlorphenol, 3,4- und 3,5-Dichlorphenol sowie 3-Chlorphenol als Abbauprodukte. Es scheint also erwiesen, daß Mikroorganismen unter anaeroben Bedingungen die fünf Chloratome von Pentachlorphenol schrittweise reduktiv entfernen können.

*Watanabe*<sup>[47]</sup> und *Suzuki*<sup>[48]</sup> gelang es, eine *Pseudomonas*-Spezies zu isolieren, die aerob auf Pentachlorphenol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. *Stanlake* und *Finn*<sup>[49]</sup> isolierten eine gram-positive *Arthrobacter*-Spezies mit denselben Fähigkeiten. Leider ist es in keinem Fall gelungen, die aerobe Abbauspezies aufzuklären. *Suzuki*<sup>[48]</sup> und *Rott* et al.<sup>[50]</sup> konnten jedoch einige Metaboliten isolieren, die sich von denen des anaeroben Abbaus unterscheiden. So wurden von beiden Arbeitsgruppen Tetrachlorbrenzcatechin und Tetrachlorhydrochinon als Abbauprodukte nachgewiesen; daneben fanden *Rott* et al.<sup>[50]</sup> noch Tetrachlorresorcin und die entsprechenden, an einer oder beiden Hydroxygruppen methylierten oder acetylierten Verbindungen. Aus diesen Befunden läßt sich schließen, daß beim aeroben Abbau von Pentachlorphenol zunächst ein Chloratom durch eine Hydroxygruppe ersetzt wird. Ob dabei Sauerstoff eine Rolle spielt oder ob es sich um eine hydrolytische Spaltung der Kohlenstoff-Chlor-Bindung handelt, ist noch unklar. Entsprechende Enzyme konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Wie der weitere aerobe Abbau von Pentachlorphenol verläuft, muß ebenfalls noch geklärt werden.

Über eine interessante Anwendung der Erkenntnisse über den Pentachlorphenolabbau berichten *Edgehill* und *Finn*<sup>[51]</sup>. Sie züchteten Pentachlorphenol-abbauende Bakterien im Fermentor und brachten sie dann auf mit Pentachlorphenol verseuchten Boden aus. Die Anwendung von 10<sup>6</sup> Zellen (ca. 1 mg Bakterien) pro Gramm trockenen Bodens verringerte die Halbwertszeit des Pentachlorphenol-abbaus von zwei Wochen auf unter einen Tag. Somit bietet die Anwendung von Bakterien eine effektive Möglichkeit, um vor allem durch Unfälle verseuchten Boden schnell und kostengünstig zu entgiften.

### 4.2.2. Polychlorierte Biphenyle

Die polychlorierten Biphenyle (PCBs) zeichnen sich durch chemische und thermische Stabilität aus. Sie fanden daher weite Anwendung als Isolatorflüssigkeit in Transformatoren, als Schmiermittel in Vakuumpumpen und Turbinen und als Kühlmittel; außerdem wurden sie bei der Herstellung von Packpapier, Kohlepapier, Tinten, Farben, Reifen und vielen anderen Produkten verwendet. Polychlorierte Biphenyle werden seit 1929 kommerziell hergestellt. Somit ist es nicht weiter verwunderlich, daß sie heute fast überall in unserer Umwelt nachgewiesen werden können. Als stark lipophile Substanzen reichern sie sich über die Nahrungskette vor allem im Fettgewebe von Tier und Mensch an. So wurden in Fischen, Muscheln und Vögeln am Rhein die verschiedensten polychlorierten Biphenyle nachgewiesen<sup>[11]</sup>. Aufgrund des gestiegenen Umweltbewußtseins wird inzwischen nach Ersatz für die polychlorierten Biphenyle gesucht. In der Bundesrepublik Deutschland wurde ihre Produktion inzwischen eingestellt<sup>[52]</sup>. Jedoch befinden sich noch so viele polychlorierte Biphenyle in unserer Umwelt, daß weitere Untersuchungen zum Abbau dieser Verbindungen gerechtfertigt erscheinen.

Akute Vergiftungen mit polychlorierten Biphenylen äußern sich in Chlorakne, verstärkter Hautpigmentierung, Sehstörungen, allgemeiner Schwäche und Leberschäden<sup>[53]</sup>. Leider sind die kommerziell angewendeten polychlorierten Biphenyle keine definierten reinen Verbindungen, sondern mehr oder weniger statistische Mischungen der insgesamt möglichen 209 Isomere. Bisher wurde sowohl der Abbau kommerziell erhältlicher Mischungen<sup>[54-59]</sup> als auch der Abbau definierter Spezies genauer untersucht<sup>[60-70]</sup>. Nur im zweiten Fall sind Aussagen über die Abbauwege möglich, während im ersten Fall aber wohl die praxisrelevanteren Ergebnisse – unter Verwendung von Reinkulturen und undefinierten Mischkulturen – erhalten wurden.

Die umfangreichsten Untersuchungen zur Abbaubarkeit einzelner chlorierter Biphenyle stammen von Furukawa et al.<sup>[65, 70]</sup>. Diese Autoren untersuchten den Abbau von 36 Isomeren mit ein bis fünf Chloratomen durch eine *Alcaligenes*- und durch eine *Acinetobacter*-Spezies. Für die Abbaubarkeit ist sowohl die Anzahl als auch die Position der Chloratome entscheidend. Biphenyle, die alle Chloratome an einem Ring enthalten, sind leichter abbaubar als in beiden Ringen chlorierte Verbindungen. Höher chlorierte Verbindungen sind schwerer abbaubar als niedriger chlorierte. Zweifache Substitution in *o*-Stellung (z. B. 2,2'-oder 2,6') erschwert den mikrobiellen Abbau. Bei 2,4-dichlorierten Biphenylen werden gelbe Produkte der *meta*-Spaltung akkumuliert<sup>[70]</sup>. Aus den anderen Verbindungen bilden sich die entsprechenden chlorierten Benzoesäuren<sup>[65, 67]</sup>. Abbildung 4 zeigt einen vorgeschlagenen allgemeinen Abbauweg. Masse et al.<sup>[64]</sup> fanden in Einklang damit beim Abbau von 4-Chlorbiphenyl durch eine *Achromobacter*-Spezies 4-Chlorbenzoesäure als Hauptprodukt neben geringen Anteilen mehrerer anderer Metaboliten. Setzen sie jedoch ihren Kulturen den von uns isolierten 4-Chlorbenzoesäure-abbauenden Stamm *Pseudomonas* CBS3 zu, so wurde nicht nur die 4-Chlorbenzoesäure vollständig abgebaut, sondern auch alle anderen Metaboliten<sup>[61]</sup>.

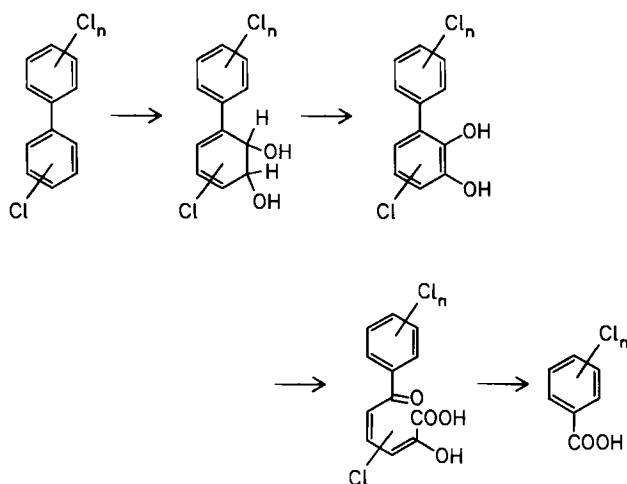


Abb. 4. Abbau von polychlorierten Biphenylen durch *Alcaligenes* sp. Y42 und *Acinetobacter* sp. P6. n = 1-5.

Bei kommerziell erhältlichen Polychlorbiphenyl-Mischungen herrscht allgemein Übereinstimmung, daß die niedrigchlorierten Mischungen (mit ein bis drei Chlor-

atomen) leicht abbaubar sind<sup>[54-56, 58]</sup>. Die höher chlorierten Mischungen dagegen (mit fünf bis zehn Chloratomen) wurden in den meisten Untersuchungen als nicht oder kaum abbaubar bezeichnet. Kopecky gelang es jedoch, Organismen zu isolieren, die Mischungen von polychlorierten Biphenylen mit fünf bis neun Chloratomen (Arochlor 1260) bis unter die Nachweisgrenze abbauen können<sup>[59]</sup>.

Die Beteiligung von Plasmiden am Abbau der polychlorierten Biphenyle wurde von mehreren Autoren nachgewiesen<sup>[71, 72]</sup>. Über die am Abbau beteiligten deshalogenierenden Enzyme ist dagegen bisher noch nichts bekannt. Die polychlorierten Biphenyle sind also prinzipiell durch Mikroorganismen abbaubar, jedoch bleibt die Möglichkeit bestehen, daß einzelne, vor allem höher chlorierte Verbindungen nicht abbaubar sind.

#### 4.2.3. 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan (DDT)

1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan (DDT) wurde intensiv zur Bekämpfung der Malaria als Insektizid eingesetzt. Als jedoch festgestellt wurde, daß DDT in der Natur äußerst persistent ist (Halbwertszeit etwa 15 Jahre)<sup>[3]</sup> und sich zudem in der Nahrungskette anreichert, wurde die

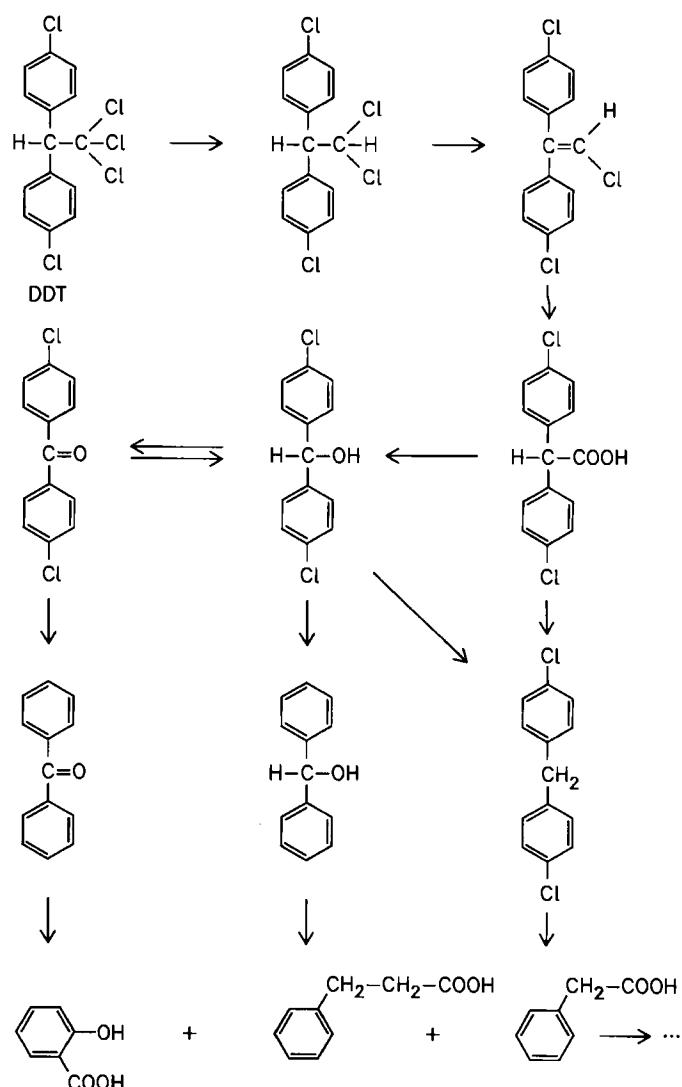


Abb. 5. Abbau von 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan (DDT) durch *Pseudomonas aeruginosa*.

Anwendung von DDT in Nordamerika und Westeuropa gesetzlich untersagt. Erstaunlicherweise gibt es Bakterien, die DDT trotz der hohen Persistenz vollständig abbauen können. Solche Bakterien konnten von mehreren Gruppen isoliert werden<sup>[73, 74]</sup>.

Golovleva und Skryabin<sup>[74]</sup> berichten von einer *Pseudomonas*-Spezies, die DDT im Cometabolismus abbaut. Unter Cometabolismus versteht man die mikrobielle Umwandlung einer Verbindung, hier z. B. DDT, die nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet wird. Da die ersten Schritte des Abbaus, die anaerob verlaufen, keinerlei Energie liefern, ist es verständlich, daß für diese Schritte Nitrat als Elektronenacceptor und Milchsäure als Kohlenstoffquelle nötig sind. Der Abbau der hierbei gebildeten Phenylessigsäure findet dann durch denselben Organismus in Gegenwart von Sauerstoff statt (Abb. 5). Pfaender et al.<sup>[73]</sup> berichten über eine *Hydrogenomonas*-Spezies, die DDT im Cometabolismus bis zu 4-Chlorphenylessigsäure abbaut. Diese Verbindung kann dann durch mehrere Mikroorganismen weiter abgebaut werden<sup>[73, 75]</sup>. Aus diesen

die Seitenkette abgespalten und das entsprechend chlorierte Phenol gebildet. So wurde die Entstehung von 2,4-Dichlorphenol **16** aus 2,4-D und aus 4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure, von 4-Chlor-*o*-kresol aus 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure und von 2,4,5-Trichlorphenol aus 2,4,5-T nachgewiesen<sup>[76, 77]</sup>. Dann allerdings unterscheiden sich die Abbauwege je nach Mikroorganismus. Der Abbau von 2,4,5-Trichlorphenol durch zwei Mikroorganismen führte zu 3,5-Dichlorbrenzcatechin<sup>[78, 79]</sup>. Hier müssen also Enzyme vorhanden sein, die einen Halogensubstituenten vom Aren entfernen können; solche Enzyme konnten aber noch nicht nachgewiesen werden. Für den Abbau von 2,4-Dichlorphenol **16** wurden zwei Wege vorgeschlagen: hydrolytische Abspaltung des Halogens zu 4-Chlorbrenzcatechin<sup>[76]</sup> und Oxidation zu 3,5-Dichlorbrenzcatechin<sup>[77, 80]</sup>. Im Falle des Abbaus durch *Pseudomonas* werden diese Chlorbrenzcatechine zwischen den Hydroxygruppen oxidativ zu Chlormuconsäuren wie **17** umgesetzt<sup>[77]</sup>. Durch *Achromobacter* dagegen werden diese Brenzcatechine neben den Hydroxygruppen gespalten<sup>[81]</sup>.

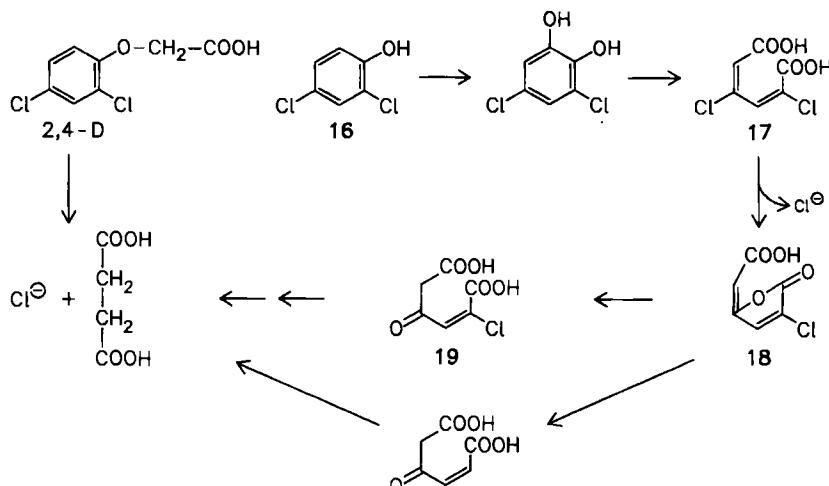


Abb. 6. Mikrobieller Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D).

Beispielen ist ersichtlich, daß es sehr wohl Bakterien gibt, die DDT im Laboratorium vollständig abbauen können. Jedoch zeigt die hohe Persistenz von DDT in der Umwelt, daß das Auffinden von Bakterien mit entsprechenden metabolischen Fähigkeiten allein noch keine Garantie dafür gibt, daß die entsprechenden Abbauvorgänge in der Natur auch tatsächlich in nennenswertem Umfang ablaufen.

#### 4.2.4. Chlorphenoxyacbonsäuren

Ein weiteres Beispiel viel angewandter und wirtschaftlich bedeutsamer aromatischer Chlorverbindungen sind die Chlorphenoxyacbonsäuren, die vor allem als Herbizide gegen zweikeimblättrige Pflanzen Anwendung finden. Am wichtigsten sind 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure (2,4-D), -propionsäure und -buttersäure, 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure und 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T). Im Boden verschwindet 2,4-D sehr rasch, was darauf hindeutet, daß es durch Mikroorganismen abgebaut wird. So konnten tatsächlich Mikroorganismen isoliert werden, die auf den Chlorphenoxyacbonsäuren wachsen oder sie zumindest cometabolisch umsetzen können. Übereinstimmend wird durch alle Mikroorganismen zunächst

(vgl. *ortho*- und *meta*-Spaltung, Abb. 3). Bei der Lactonisierung der Chlormuconsäuren wird ein Chlorsubstituent entfernt. Die Lactone wie **18** werden schließlich analog zum Abbau der unsubstituierten Verbindungen in 2-Chlor-4-oxo-2-hexendisäure **19** („Chlormaleyllessigsäure“) und das unchlorierte Analogon umgewandelt<sup>[82]</sup> (Abb. 6). Für 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure ist ein analoger Abbauweg beschrieben worden<sup>[83-86]</sup>.

#### 4.2.5. Chlorbenzoësäuren

Chlorierte Benzoësäuren treten als Zwischenprodukte beim Abbau mehrerer Verbindungen auf. So wurde zum Beispiel 4-Chlorbenzoësäure **20** als Abbauprodukt der polychlorierten Biphenyle<sup>[5, 67]</sup> und des Herbizids Bidisin<sup>[87]</sup> nachgewiesen. Da die chlorierten Benzoësäuren wenig toxisch und zugleich gut wasserlöslich sind, wurden sie oft als Modellsubstanzen zum Studium des Abbaus von chlorierten Arenen eingesetzt. Mehrere Autoren untersuchten den Abbau der halogenierten Benzoësäuren durch Mischkulturen<sup>[88-91]</sup>. Dabei gelang es, unter aeroben Bedingungen neben 2-, 3- und 4-Chlorbenzoësäure auch 3,4-<sup>[90]</sup> und 2,4-Dichlorbenzoësäure vollständig abzubauen. Unter an-

aeroben Bedingungen dagegen wurde bisher nur die reduktive Deshalogenierung der *m*-substituierten Benzoesäuren nachgewiesen<sup>[92-94]</sup>. Durch Reinkulturen ließen sich die chlorierten Benzoesäuren im Cometabolismus in Gegenwart von unsubstituierter Benzoesäure in die entsprechenden chlorierten Brenzcatechine umwandeln<sup>[95-98]</sup>, die aber nicht weiter metabolisiert werden können; ihre Akkumulation führt zur Vergiftung der Kulturen. Diese Ergebnisse deuten an, daß bei vielen Bakterien die ersten Enzyme des Benzoesäureabbaus auch chlorierte Benzoesäuren umsetzen können. Der entscheidende Schritt des Abbaus scheint in diesen Fällen die Ringspaltung zu sein. Klecka und Gibson<sup>[99]</sup> sowie Bartels et al.<sup>[100]</sup> konnten zeigen, daß in ihren Mikroorganismen die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenasen durch die Chlorbrenzcatechine gehemmt werden. Bei 3-Chlorbrenzcatechin führt die Reaktion des bei der Oxidation entstehenden Säurechlorids mit dem Enzym zur irreversiblen Inaktivierung („Suizid-Effekt“).

Johnston et al.<sup>[101]</sup>, Dorn et al.<sup>[102]</sup> und Grishenkov et al.<sup>[103]</sup> gelang es, jeweils einen *Pseudomonas*-Stamm mit der Fähigkeit zu isolieren, auf 3-Chlorbenzoesäure als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Der *Pseudomonas*-Stamm von Johnston et al. baut 3-Chlorbenzoesäure über 3-Hydroxybenzoesäure ab<sup>[101]</sup>. In diesem Stamm muß also ein noch nicht direkt nachgewiesenes Enzym vorhanden sein, das im ersten Schritt den Halogensubstituenten entfernt. Durch diesen Schritt umgeht der Stamm die Probleme, die bei der Spaltung der Chlorbrenzcatechine sonst auftreten. Die *Pseudomonas*-Stämme von Dorn et al. und von Grishenkov et al. dagegen überführen 3-Chlorbenzoesäure in 3- und 4-Chlorbrenzcatechin und metabolisieren diese über eine *ortho*-Spaltung.

Kawasaki et al.<sup>[104]</sup> sowie Knackmuss et al.<sup>[105-109]</sup> untersuchten den Einfluß der Substituenten auf die Enzyme, die im Abbaupfad die einzelnen Schritte katalysieren. Dabei ließ sich in *Pseudomonas* sp. B13 neben der üblichen Brenzcatechin-1,2-Dioxygenase, die nur geringe Affinität zu den chlorierten Brenzcatechinen hat, ein zweites Enzym mit wesentlich höherer Affinität für diese Substanzen nachweisen<sup>[108]</sup>. Auch bei den Cycloisomerasen, die unter Abspaltung des Chlorsubstituenten die chlorierten Muconsäuren cyclisieren, fanden die Autoren zwei Enzyme, von denen das eine die chlorierten Muconsäuren deutlich schneller umsetzt als das andere<sup>[109]</sup>. Diese beiden zusätzlichen Enzyme sind wohl für das gute Wachstum von *Pseudomonas* sp. B13 auf 3-Chlorbenzoesäure maßgeblich.

Aufgrund dieser Erkenntnisse konnten Stämme konstruiert werden, mit denen sich mehrere chlorierte Verbindungen abbauen lassen. Dazu wurden auf gentechnologischem Wege Enzyme in *Pseudomonas* sp. B13 eingebracht, die chlorierte aromatische Verbindungen in die entsprechenden Chlorbrenzcatechine umwandeln. So ließ sich zum Beispiel eine Benzoat-1,2-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* mt2, die durch das TOL-Plasmid codiert ist, durch Übertragung dieses Plasmids in *Pseudomonas* sp. B13 exprimieren. Da dieses Enzym auch 2- und 4-Chlorbenzoesäure umsetzen kann, wuchsen die Hybridstämme auch auf diesen Verbindungen. Interessant ist der Befund, daß in diesen Hybridstämmen der *meta*-Weg, der ebenfalls vom TOL-Plasmid abhängt, angeblich durch spontane Mutation unterdrückt wird<sup>[110, 111]</sup>. Auch für chlorierte Aniline konnten abbauende Stämme durch genetischen Austausch

zwischen Anilin-abbauenden Bakterien und *Pseudomonas* sp. B13 konstruiert werden. Diese Methode der Kombination mehrerer Abbaupfade ist sicherlich sehr interessant, jedoch darf nicht vergessen werden, daß bisher nur Abbaupfade kombiniert werden können, deren Gene bereits bekannt sind, und daß die erhaltenen Hybridstämme maximal die Summe der Abbaupfade der eingesetzten Stämme enthalten können. Dies kann aber üblicherweise auch wesentlich einfacher durch Verwendung der entsprechenden Mischkultur erreicht werden. Die Erfahrung zeigt, daß in solchen Mischkulturen oft spontan unter selektiven Bedingungen abbauende Bakterien entstehen, die in der Regel genetisch wesentlich stabiler sind als die durch gezielte Genmanipulation erzeugt.

Der Abbau von 4-Chlorbenzoesäure durch bakterielle Reinkulturen wurde mehrfach beschrieben. So gelang es einer amerikanischen<sup>[112]</sup>, einer englischen<sup>[113]</sup>, einer russischen<sup>[114]</sup> und einer deutschen Gruppe<sup>[115]</sup>, jeweils einen *Arthrobacter*-Stamm zu isolieren, der auf 4-Chlorbenzoesäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Außerdem wurden noch eine *Nocardia*- und eine *Pseudomonas*-Spezies angereichert, die ebenfalls auf 4-Chlorbenzoesäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können<sup>[116, 117]</sup>. Von all diesen Bakterien wird der Halogensubstituent im ersten Abbauschritt durch eine Hydroxygruppe ersetzt. Im nächsten Schritt wird eine weitere Hydroxygruppe unter Bildung von 3,4-Dihydroxybenzoesäure 21 eingeführt, die dann von den Mikroorganismen entweder durch *ortho*-<sup>[117]</sup> oder durch *meta*-Spaltung<sup>[116]</sup> abgebaut wird. Bisher wurde in vier Stämmen das Enzym, das die Eliminierung des Halogensubstituenten katalysiert, nachgewiesen<sup>[113, 118, 119]</sup>. Diese Enzyme sind bisher die einzigen Beispiele, bei denen sich auch *in vitro* der direkte Austausch des Halogens am Aren nachweisen ließ. Versuche mit <sup>18</sup>O-markiertem Wasser ergaben, daß der Halogensubstituent durch eine Hydroxygruppe aus dem Wasser ersetzt wird<sup>[120, 121]</sup>.

Beim Abbau von 2-Chlorbenzoesäure durch *Pseudomonas* cepacia wird der Halogensubstituent ebenfalls im ersten Abbauschritt entfernt<sup>[122]</sup>. Allerdings wird hierbei das Aren gleichzeitig unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> oxidiert. Unsubstituiertes Brenzcatechin ist also das erste Zwischenprodukt dieses Abbaupfades; es wird dann durch diesen Stamm *ortho*-gespalten. Eine ähnliche oxidative Abspaltung des Halogens konnte beim Abbau von 4-Chlorphenyllessigsäure 22 durch *Pseudomonas* CBS3 nachgewiesen werden<sup>[123]</sup>. Die Vermutung lag nahe, daß diese Reaktion durch eine unspezifische Dioxygenase bewirkt wurde, die auch das halogenierte Substrat abbauen konnte. Überraschenderweise setzt das Enzymsystem, das 4-Chlorphenyllessigsäure 22 in 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure 23 umwandelt, die unsubstituierte Verbindung jedoch kaum um. In Abbildung 7 sind die Abbaupfade von drei Typen halogenierter Verbindungen durch *Pseudomonas* CBS3 dargestellt.

2-Fluorbenzoesäure<sup>[124-126]</sup> ergibt wie 2-Chlorbenzoesäure zunächst unsubstituiertes Brenzcatechin, das dann über den  $\beta$ -Oxoadipatweg abgebaut wird. Der Abbau von 4-Fluorbenzoesäure dagegen führt in Analogie zum Abbau von 3-Chlorbenzoesäure zu 3- und 4-Fluorbenzocatechin<sup>[127]</sup>. Diese Produkte werden dann *ortho*-gespalten. Entweder bei der anschließenden Cyclisierung oder aber in einem späteren Schritt wird der Fluorosubstituent elimi-

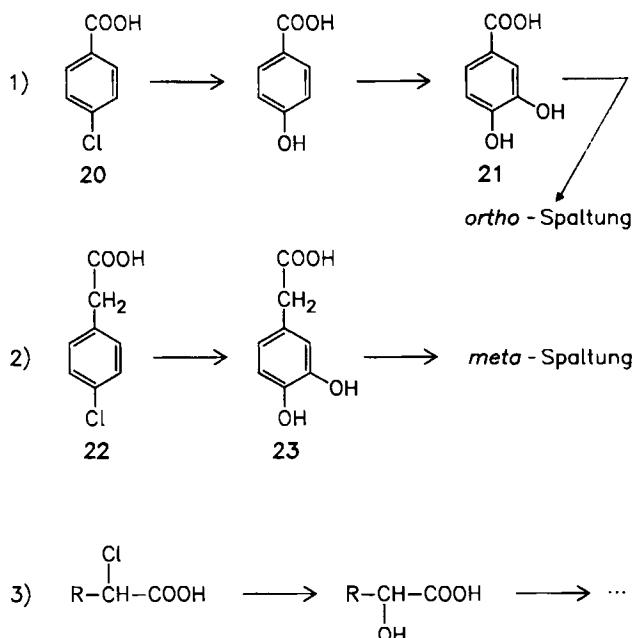


Abb. 7. Möglichkeiten des Abbaus chlorierter Verbindungen durch *Pseudomonas* sp. CBS3: 1) Hydrolytische Abspaltung des Halogens vom Aren beim Abbau von 4-Chlorbenzoësäure 20. 2) Abspaltung des Halogens vom Aren unter gleichzeitiger Oxidation beim Abbau von 4-Chlorphenylessigsäure 22. 3) Hydrolytische Abspaltung des Halogens von aliphatischen 2-Halogencarbonsäuren.

niert. Auch der anaerobe Abbau von 2-Fluorbenzoësäure ist beschrieben worden<sup>[128]</sup>, jedoch konnten bisher weder Zwischenprodukte noch Enzyme dieses Abbauwegs nachgewiesen werden.

#### 4.2.6. Polychlorierte Dibenzof[1,4]dioxine

Die polychlorierten Dibenzodioxine bilden eine Ausnahme unter den hier besprochenen Verbindungen. Sie wurden zu keinem Zeitpunkt absichtlich hergestellt, und trotzdem sind sie weit verbreitet. So wurden selbst in Sedimenten von Seen in Naturschutzgebieten, wo keine Verschmutzung durch menschliche Abfälle zu erwarten war, mehrere chlorierte Dibenzodioxine nachgewiesen<sup>[21]</sup>. Woher kommen diese Dibenzodioxine? Polychlorierte Dibenzodioxine entstehen als Nebenprodukte bei der Herstellung chlorierter Phenole und Biphenyle und können zum Beispiel in Holzschutzmitteln, die Pentachlorphenol enthalten, nachgewiesen werden<sup>[52]</sup>. Eine weitere Quelle für die chlorierten Dibenzodioxine ist die Müllverbrennung<sup>[129]</sup>. So entstehen sie bei der Pyrolyse von Chlorbenzolen, Chlorphenolen und polychlorierten Biphenyle. Jedoch auch in Proben, die bereits 1933 versiegelt worden waren – also bevor diese chlorierten Verbindungen in großen Mengen hergestellt und verkauft wurden –, sind chlorierte Dibenzodioxine enthalten. Dies zeigt, daß sie sich nicht nur durch die Verbrennung der chemisch synthetisierten Chlorverbindungen bilden. Als mögliche Quellen werden Waldbrände und die Chlorierung des Trinkwassers diskutiert<sup>[130]</sup>. In Sedimenten wird ab 1940 eine starke Zunahme der chlorierten Dibenzodioxine beobachtet; dies läßt einen direkten Zusammenhang mit der zu dieser Zeit einsetzenden Synthese der oben erwähnten Chlorverbindungen vermuten.

Einer breiten Öffentlichkeit bekannt wurde das fälschlicherweise als „das Dioxin“ bezeichnete 2,3,7,8-Tetrachlor[1,4]dibenzodioxin (TCDD) durch den Unfall von Seveso<sup>[52]</sup>, wo bei der Synthese von 2,4,5-Trichlorphenol ein Reaktor explodierte und etwa 250 g TCDD freigesetzt wurden. Die damit verbundenen Schädigungen der Bevölkerung von Seveso lösten eine intensive Untersuchung der Eigenschaften von TCDD aus, so daß diese Substanz heute als eine der am besten untersuchten Substanzen gelten kann<sup>[131–136]</sup>. TCDD wirkt bereits in sehr niedrigen Dosen akut toxisch (1 µg/kg Körpergewicht). Die beobachtete erhöhte Krebshäufigkeit ist wohl auf die starke Induktionswirkung von TCDD auf Enzyme des Fremdstoffwechsels zurückzuführen. TCDD muß demnach als Carcinogen bezeichnet werden.

Was können nun Mikroorganismen zum Abbau dieser Verbindungen beitragen? Bei den Untersuchungen zum Abbau chlorierter Dibenzodioxine ergeben sich mehrere Probleme. TCDD ist nur sehr schwer löslich in Wasser und adsorbiert sehr stark an Oberflächen. Dadurch ist die Verfügbarkeit für Mikroorganismen sehr gering, aber auch die quantitative Analytik wird durch diese Eigenschaften sehr erschwert. Dennoch konnten Gibson et al.<sup>[137, 138]</sup> zeigen, daß Bakterien Enzyme bilden können, die TCDD in 1-Stellung hydroxylieren. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß diese Enzyme durch die in der Natur vorkommenden Mengen an TCDD induziert werden. Quensen et al.<sup>[139]</sup> und Philippi et al.<sup>[140]</sup> konnten mit radioaktiv markiertem Material einen geringfügigen Abbau durch Mikroorganismen nachweisen; dabei benutzten sie Lösungsmittel als Lösungsmittelvermittler. Die Abbauprodukte konnten nur im Autoradiogramm auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen werden. Philippi et al. vermuten, daß es sich bei einem von ihnen nachgewiesenen polaren Metaboliten um ein Hydroxytetrachlor[1,4]dibenzodioxin handelt. Eine endgültige Charakterisierung dieser Metaboliten steht noch aus.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Mikroorganismen wohl imstande sind, das gefürchtete Seveso-Gift umzuwandeln. Die in der Umwelt vorkommenden Mengen an dieser Verbindung sind jedoch wahrscheinlich zu gering, um die entsprechenden Enzyme in Bakterien zu induzieren, so daß ein Abbau durch Bakterien, wenn überhaupt, nur in geringem Maße zu erwarten ist. Allerdings wäre es denkbar, daß für akut mit größeren Mengen verseuchte Proben mit geeigneten Lösungsmitteln und entsprechend induzierten Bakterien wie im Falle von Pentachlorphenol eine Entgiftung erreicht werden kann.

Eine interessante Variante zum Abbau von TCDD und anderen Problemstoffen wie DDT, polychlorierten Biphenyle und Hexachlorcyclohexan stellen *Bumpus* et al. vor<sup>[141]</sup>. Diese Autoren fanden, daß ligninabbauende Enzyme, die von Pilzen wie *Phanerochaete chrysosporium* ausgeschieden werden, alle diese Verbindungen abbauen können. Die Autoren führen dies auf die Fähigkeit der Enzyme zurück, Kohlenstoffradikale zu bilden, die dann mit allen in der Umgebung vorhandenen organischen Substanzen unspezifisch reagieren. So konnten die Autoren mit radioaktiv markierten Substanzen bei allen oben genannten Verbindungen die Entwicklung von radioaktiv markiertem CO<sub>2</sub> nachweisen. Inwieweit diese Enzyme technisch im Umweltschutz eingesetzt werden können, bleibt abzuwarten.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Übersicht zeigt, daß Mikroorganismen über eine Reihe von Fähigkeiten zum Abbau halogenierter Kohlenwasserstoffe verfügen. So konnte bisher für fast jede Problemsubstanz ein Organismus gefunden werden, der sie im Laboratorium ganz oder zumindest teilweise abbaut. Die Erfahrung lehrt jedoch, daß viele dieser Substanzen in der Natur nur sehr langsam abgebaut werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Es wäre zum Beispiel möglich, daß die Bakterien mit den entsprechenden Fähigkeiten nicht genügend verbreitet sind oder daß die Bedingungen in der Natur für diese Bakterien nicht günstig sind. Sicherlich werden alle hier besprochenen Substanzen auch in der Natur durch Bakterien abgebaut – die Frage ist nur, wie schnell das geschieht. Halbwertszeiten von 15 Jahren und mehr, wie sie für viele halogenierte Kohlenwasserstoffe in der Natur gefunden werden, sind unbefriedigend. Wie kann nun aber die Isolierung von Bakterien mit der Fähigkeit, bestimmte Substanzen abzubauen, und die Erforschung der Abbauwege zur Lösung des Problems beitragen?

Durch die Untersuchungen der Abbauwege und der daran beteiligten Enzyme wird zunächst einmal unser Wissen über solche Vorgänge in der Natur erweitert. Diese Erkenntnisse über die natürlichen Abbauwege können schon bei der Synthese neuer Verbindungen von Nutzen sein, deren biologische Abbaubarkeit berücksichtigt werden muß. Die isolierten Bakterien oder Enzyme können in manchen Fällen jedoch auch direkt verwendet werden. Als erste Möglichkeit bietet sich der Einsatz dieser spezialisierten Bakterien oder der entsprechenden Enzyme bei starken akuten Verschmutzungen an, wie sie zum Beispiel bei Unfällen auftreten. Ein bereits verwirklichtes Beispiel dafür wurde beim Abbau von Pentachlorphenol beschrieben (Abschnitt 4.2.1). Eine weitere Möglichkeit zum Einsatz dieser Bakterien ist überall dort zu sehen, wo kontinuierlich konstante Mengen an chlorierten Kohlenwasserstoffen anfallen, zum Beispiel in den Abwässern bestimmter Produktionsanlagen. Beispiele hierfür sind die bereits mit Erfolg betriebenen Säulen zum Abbau von Dichlormethan und Tetrachlorethylen. Dabei können die im Laboratorium ermittelten optimalen Bedingungen für entsprechende Bakterien eingehalten werden, so daß sich die Abwässer weitgehend dekontaminieren lassen. Sicher sind die Ergebnisse aus dem mikrobiologischen Laboratorium nicht ohne weiteres in die Praxis zu übertragen. So sind z. B. synergistische Wirkungen in komplexen Gemischen, wie sie in Kläranlagen und in der Umwelt vorliegen, bis jetzt nur wenig erforscht.

Ein weiteres erfreuliches Nebenprodukt der Untersuchungen zum Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe ist die Entdeckung neuer Enzyme, die biotechnologisch zur Synthese eingesetzt werden können. Ein erstes Beispiel hierfür bietet die Herstellung optisch aktiver Milchsäure aus racemischer 2-Chlorpropionsäure (Abschnitt 3.2); es ist zu erwarten, daß in absehbarer Zeit weitere Beispiele folgen werden.

Für das Problem der allgemeinen Verschmutzung unserer Umwelt mit geringen Mengen an Halogenkohlenwasserstoffen lassen sich jedoch bisher keine Patentlösungen erkennen. Es bleibt uns wohl nichts anderes übrig, als auf

dem in manchen Fällen bereits begonnenen Weg weiterzugehen und zu versuchen, diese Umweltverschmutzungen im Ansatz zu verhindern – gemäß den Worten des *Paracelsus von Hohenheim*: Vorbeugen ist besser als Heilen.

*Die in dieser Veröffentlichung zitierten eigenen Arbeiten wurden in dankenswerter Weise vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.*

Eingegangen am 14. Oktober 1985,  
veränderte Fassung am 3. April 1986 [A 589]

- [1] J. H. Koeman, M. C. Ten Noever de Brauw, R. H. De Vos, *Nature (London)* 221 (1969) 1126.
- [2] J. M. Czuczwa, B. D. McVeety, R. A. Hites, *Science* 226 (1984) 568.
- [3] M. Alexander, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 611.
- [4] T. Leisinger, *Experientia* 39 (1983) 1183.
- [5] J. McCann, V. Simmon, D. Streitwieser, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3190.
- [6] C. Malaveille, H. Bartsch, A. M. Barbin, A. M. Camus, R. Montesano, A. Croisy, P. Jacquinon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 (1975) 363.
- [7] T. A. Bellar, J. J. Lichtenberg, R. C. Kroner, *J. Am. Water Works Assoc.* 66 (1974) 703.
- [8] W. Brunner, D. Staub, T. Leisinger, *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (1980) 950.
- [9] G. Stucki, R. Gälli, H.-R. Ebersold, T. Leisinger, *Arch. Microbiol.* 130 (1981) 366.
- [10] C. E. Castro, R. S. Wade, N. O. Belser, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 1184.
- [11] E. J. Bouwer, P. L. McCarthy, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1286.
- [12] D. B. Janssen, A. Scheper, L. Dijkhuizen, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 673.
- [13] G. Stucki, U. Krebsler, T. Leisinger, *Experientia* 39 (1983) 1271.
- [14] T. M. Vogel, N. L. McCarthy, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 1080.
- [15] S. Keuning, D. B. Janssen, B. Witholt, *J. Bacteriol.* 163 (1985) 635.
- [16] K. Haider, G. Jagnow, *Arch. Microbiol.* 104 (1975) 113.
- [17] G. Jagnow, K. Haider, P.-C. Ellwardt, *Arch. Microbiol.* 115 (1977) 285.
- [18] T. Omori, M. Alexander, *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978) 512.
- [19] E. Senior, A. T. Bull, J. H. Slater, *Nature (London)* 263 (1976) 476.
- [20] K. Motosugi, N. Esaki, K. Soda, *J. Bacteriol.* 150 (1982) 522.
- [21] J. H. Slater, D. Lovatt, A. J. Weightman, E. Senior, A. T. Bull, *J. Gen. Microbiol.* 114 (1979) 125.
- [22] A. J. Weightman, J. H. Slater, *J. Gen. Microbiol.* 121 (1980) 187.
- [23] P. Goldman, G. W. A. Milne, D. B. Keister, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 428.
- [24] H. Kawasaki, H. Yahara, K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 2627.
- [25] K. G. Au, C. T. Walsh, *Bioorg. Chem.* 12 (1984) 197.
- [26] A. J. Weightman, A. L. Weightman, J. H. Slater, *J. Gen. Microbiol.* 12 (1982) 1755.
- [27] U. Klages, S. Krauss, F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364 (1983) 529.
- [28] K. Motosugi, N. Esaki, K. Soda, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 805.
- [29] R. Müller, F. Lingens in H. Sund, V. Ullrich (Hrsg.): *Biological Oxidations*, Springer, Berlin 1983, S. 278.
- [30] F. Lingens, *Forum Mikrobiol.* 5 (1979) 240.
- [31] S. Dagley, *Adv. Microb. Physiol.* 6 (1971) 1.
- [32] R. Y. Stanier, L. N. Orton, *Adv. Microb. Physiol.* 9 (1973) 89.
- [33] R. Müller, S. Haug, J. Eberspächer, F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977) 797.
- [34] R. Müller, S. Schmitt, F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* 125 (1982) 579.
- [35] S. Schmitt, R. Müller, W. Wegst, F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365 (1984) 143.
- [36] K. Sauber, C. Fröhner, G. Rosenberg, J. Eberspächer, F. Lingens, *Eur. J. Biochem.* 84 (1977) 89.
- [37] J. Eberspächer, F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 1323.
- [38] D. Dickson, *Nature (London)* 283 (1980) 418.
- [39] J. Paasivirta, J. Saerkkae, T. Leskijaervi, A. Roos, *Chemosphere* 9 (1980) 441.
- [40] R. J. Fiedler, G. S. Sorrie, C. M. Bishop, R. B. Jones, M. J. Van Den Heuvel, *Toxic. Rev.* 5 (1982) 1.
- [41] N. B. K. Murthy, D. D. Kaufman, G. F. Fries, *J. Environ. Sci. Health Part B14* (1979) 1.
- [42] M. A. Guthrie, E. J. Kirsch, R. F. Wukasch, C. P. L. Grady, Jr., *Water Res.* 18 (1984) 451.

[43] I. Watanabe, *Soil Biol. Biochem.* 9 (1977) 99.

[44] L. P. Moos, E. J. Kirsch, R. F. Wukasch, C. P. L. Grady, Jr., *Water Res.* 17 (1983) 1575.

[45] R. Valo, J. Apajalahti, M. Salkinoja-Salonen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 (1985) 313.

[46] A. Ide, Y. Niki, F. Sakamoto, I. Watanabe, H. Watanabe, *Agric. Biol. Chem.* 36 (1972) 1973.

[47] I. Watanabe, *Soil Sci. Plant. Nutr. (Tokyo)* 19 (1973) 109.

[48] T. Suzuki, *J. Environ. Sci. Health Part B* 12 (1977) 113.

[49] G. J. Stanlake, R. K. Finn, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 1421.

[50] B. Rott, S. Nitz, F. Korte, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 306.

[51] R. U. Edgehill, R. K. Finn, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1122.

[52] E. Heckel, *Chem.-Ing.-Tech.* 56 (1984) A390.

[53] D. Pal, J. B. Weber, M. R. Overcash, *Residue Rev.* 74 (1980) 45.

[54] D. Liu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29 (1982) 200.

[55] R. R. Clark, E. S. K. Chian, R. A. Griffin, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 680.

[56] D. Liu, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27 (1981) 695.

[57] E. S. Tucker, V. W. Saeger, O. Hicks, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14 (1975) 705.

[58] K. Furukawa, N. Tomizuka, A. Kamibayashi, *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983) 140.

[59] A. Kopecky in G. S. Omen, A. Hollaender (Hrsg.): *Genetic Control of Environmental Pollutants*, Plenum Press, New York 1984, S. 374.

[60] H.-L. Kong, G. S. Saylers, *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983) 666.

[61] M. Sylvestre, R. Masse, C. Ayotte, F. Messier, J. Fauteux, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 (1985) 192.

[62] M. Sylvestre, R. Masse, F. Messier, J. Fauteux, J.-G. Bisailleur, R. Beaudet, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 871.

[63] M. Sylvestre, *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 1223.

[64] R. Masse, F. Messier, L. Peloquin, C. Ayotte, M. Sylvestre, *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 947.

[65] K. Furukawa, N. Tomizuka, A. Kamibayashi, *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979) 301.

[66] K. Furukawa, K. Tonomura, A. Kamibayashi, *Agric. Biol. Chem.* 43 (1979) 577.

[67] K. Ballschmiter, C. Uglert, H. J. Neu, *Chemosphere* 1 (1977) 51.

[68] K. Furukawa, F. Matsumura, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 251.

[69] M. Ahmed, D. D. Focht, *Can. J. Microbiol.* 19 (1973) 47.

[70] K. Furukawa, K. Tonomura, A. Kamibayashi, *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978) 223.

[71] K. Furukawa, A. M. Chakrabarty, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 619.

[72] G. S. Sayler, H.-L. Kong, M. S. Shields in G. S. Omen, A. Hollaender (Hrsg.): *Genetic Control of Environmental Pollutants*, Plenum Press, New York 1984, S. 117.

[73] F. K. Pfaender, M. Alexander, *J. Agric. Food Chem.* 20 (1972) 842.

[74] L. A. Golovleva, G. K. Skryabin in T. Leisinger, A. M. Cook, R. Hütter, J. Nuesch (Hrsg.): *Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds*, Academic Press, London 1981, S. 287.

[75] A. Markus, U. Klages, F. Lingens, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 431.

[76] I. C. MacRae, M. Alexander, A. D. Rovira, *J. Gen. Microbiol.* 32 (1963) 69.

[77] W. C. Evans, B. S. W. Smith, H. N. Fernley, J. I. Davies, *Biochem. J.* 12 (1971) 543.

[78] R. S. Horvath, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5 (1970) 537.

[79] J. M. Suflita, J. Stout, J. M. Tiedje, *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 218.

[80] J.-M. Bollag, C. S. Helling, M. Alexander, *J. Agric. Food Chem.* 16 (1968) 826.

[81] R. S. Horvath, *Biochem. J.* 119 (1970) 871.

[82] J. M. Tiedje, J. M. Duxbury, M. Alexander, J. E. Dawson, *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969) 1021.

[83] T. I. Steenson, N. Walker, *J. Gen. Microbiol.* 16 (1957) 146.

[84] J. K. Gaunt, W. C. Evans, *Biochem. J.* 122 (1971) 533.

[85] Y. Gamar, J. K. Gaunt, *Biochem. J.* 122 (1971) 527.

[86] J. K. Gaunt, W. C. Evans, *Biochem. J.* 122 (1971) 519.

[87] H. Köcher, F. Lingens, W. Koch, *Weed Res.* 16 (1976) 93.

[88] F. A. Lund, D. S. Rodriguez, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30 (1984) 53.

[89] Y. N. Karasevich, G. M. Zaitsev, *Mikrobiologiya* 53 (1984) 374.

[90] M. J. DiGeronimo, M. Nikaido, M. Alexander, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 619.

[91] D. R. Shelton, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 840.

[92] J. M. Suflita, J. A. Robinson, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1466.

[93] A. Horowitz, J. M. Suflita, J. M. Tiedje, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1459.

[94] J. M. Suflita, A. Horowitz, D. R. Shelton, J. M. Tiedje, *Science* 218 (1982) 1115.

[95] J. R. Spokes, N. Walker, *Arch. Microbiol.* 96 (1974) 125.

[96] W. Veerkamp, R. Pel, O. Hutzinger, *Chemosphere* 12 (1983) 1337.

[97] H. D. Haller, R. K. Finn, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8 (1979) 191.

[98] R. S. Horvath, M. Alexander, *Appl. Microbiol.* 20 (1970) 254.

[99] G. M. Klecka, D. T. Gibson, *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 1159.

[100] I. Bartels, H.-J. Knackmuss, W. Reineke, *Appl. Environ. Microbiol.* 47 (1984) 500.

[101] H. W. Johnston, G. G. Briggs, M. Alexander, *Soil. Biol. Biochem.* 4 (1972) 187.

[102] E. Dorn, M. Hellwig, W. Reineke, H.-J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.* 99 (1974) 61.

[103] V. G. Grishenkov, I. E. Fedechkina, B. P. Baskunov, L. A. Anisimova, A. M. Boronin, L. A. Golovleva, *Mikrobiologiya* 52 (1983) 771.

[104] H. Kawasaki, M. Takao, A. Koiso, K. Tonomura, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 1544.

[105] W. Reineke, H.-J. Knackmuss, *Biochim. Biophys. Acta* 542 (1978) 542.

[106] H.-J. Knackmuss, W. Reineke, *Chemosphere* 6 (1973) 225.

[107] E. Dorn, H.-J. Knackmuss, *Biochem. J.* 174 (1978) 85.

[108] E. Dorn, H.-J. Knackmuss, *Biochem. J.* 174 (1978) 73.

[109] E. Schmidt, H.-J. Knackmuss, *Biochem. J.* 192 (1980) 339.

[110] W. Reineke, D. J. Jeenes, P. A. Williams, H.-J. Knackmuss, *J. Bacteriol.* 150 (1982) 195.

[111] D. K. Chatterjee, A. M. Chakrabarty, *Mol. Gen. Genet.* 188 (1982) 279.

[112] P. J. Chapman, *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 75 (1975) 192.

[113] T. S. Marks, A. R. W. Smith, A. V. Quirk, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 1020.

[114] G. M. Zaitsev, Y. N. Karasevich, *Mikrobiologiya* 50 (1981) 35.

[115] S. Ruisinger, U. Klages, F. Lingens, *Arch. Microbiol.* 110 (1976) 253.

[116] U. Klages, F. Lingens, *FEMS Microbiol. Lett.* 6 (1979) 201.

[117] U. Klages, F. Lingens, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. C1* (1980) 215.

[118] R. Müller, T. P. Armbruster, F. Lingens, *13th Int. Congr. Biochem. Abstr.* 1985, 70.

[119] J. Thiele, R. Müller, F. Lingens, *Abstr. 20. Hauptvers. GDCh* 1985, 172.

[120] R. Müller, J. Thiele, U. Klages, F. Lingens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 (1984) 178.

[121] T. S. Marks, R. Wait, A. R. W. Smith, A. V. Quirk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124 (1984) 669.

[122] G. M. Zaitsev, A. N. Karasevich, *Mikrobiologiya* 53 (1984) 75.

[123] A. Markus, U. Klages, S. Krauss, F. Lingens, *J. Bacteriol.* 160 (1984) 618; A. Markus, D. Krekel, F. Lingens, *J. Biol. Chem.* 261 (1986), im Druck.

[124] K.-H. Engesser, E. Schmitt, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 68.

[125] A. Schreiber, M. Hellwig, E. Dorn, W. Reineke, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 58.

[126] G. W. A. Milne, P. Goldman, J. L. Holtzman, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5374.

[127] D. B. Harper, E. R. Blakely, *Can. J. Microbiol.* 17 (1971) 1015.

[128] U. Schenken, K. Braun, H.-J. Knackmuss, *J. Bacteriol.* 161 (1985) 321.

[129] J. W. A. Lustenhouwer, K. Olie, O. Hutzinger, *Chemosphere* 9 (1980) 501.

[130] L. L. Lamparski, T. J. Nestrick, V. A. Stenger, *Chemosphere* 13 (1984) 361.

[131] H.-J. Knackmuss, J. Hellwig, *Arch. Microbiol.* 117 (1978) 1.

[132] H. Poiger, C. Schlatter, *Chemosphere* 12 (1983) 453.

[133] H. Weber, H. Foiger, C. Schlatter, *Xenobiotica* 12 (1982) 353.

[134] T. Sawahata, J. R. Olson, R. A. Neal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105 (1982) 341.

[135] R. A. Neal, J. R. Olson, T. A. Gasiewicz, L. E. Geiger, *Drug. Metab. Rev.* 13 (1982) 355.

[136] *Dioxin in der Umwelt, Chemie+ Fortschritt, VCI Schriftenreihe Bd. 1*, Verband der Chemischen Industrie, Frankfurt am Main 1985.

[137] G. M. Klecka, D. T. Gibson, *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (1980) 288.

[138] G. M. Klecka, D. T. Gibson, *Biochem. J.* 180 (1979) 639.

[139] J. F. Quensen III, F. Matsumura, *Environ. Toxicol. Chem.* 2 (1983) 261.

[140] M. Philippi, J. Schmid, H. K. Wipf, R. Hütter, *Experientia* 38 (1982) 659.

[141] J. A. Bumpus, M. Tien, D. Wright, S. D. Aust, *Science* 228 (1985) 1434.