

ANGEWANDTE CHEMIE

105. Jahrgang 1993

Heft 10

Seite 1437–1564

Bakterien und der Abbau von Chemikalien: Natürliche und durch Kombination oder Konstruktion Erreichbares

Von Gerhard Gottschalk * und Hans-Joachim Knackmuss

Das natürliche Abbaupotential von Bakterien für synthetische Verbindungen ist größer als häufig angenommen; es erstreckt sich auf viele Heteroarene und sogar bestimmte Chlorarene. Erst die Häufung von Substituenten am aromatischen Ring oder ganz bestimmte Substitutionsmuster verleihen Verbindungen Fremdstoffcharakter. Darüber hinaus führen zufällige Veränderungen von Fremdstoffen durch bestimmte Enzyme mit geringer Substratspezifität häufig zu Produkten, die erst recht Fremdstoffcharakter haben. Hier kann aber eine Lenkung des Abbaus oder die Kooperation mehrerer Bakterienarten zum Ziel führen. Schließlich lassen sich durch natürlichen oder induzierten Gentransfer hybride Abbauwege konstruieren, durch die eine Mineralisierung von Fremdstoffen möglich wird, die bislang als persistent galten; unter Mineralisierung wird dabei der Abbau organischer Substanz zu Kohlendioxid und anorganischen Salzen verstanden. Nach einer Einführung in die Welt der Bakterien und ihre Rolle in der Natur wird ihr natürliches Abbaupotential zunächst am Beispiel aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe vorgestellt. Anschließend wird erörtert, welche Substituenten aromatischen Verbindungen Fremdstoffcharakter verleihen, aber auch, wie diese Substanzen dennoch abgebaut werden können.

1. Die zwei Gesichter der Bakterien

Bakterien geht im allgemeinen kein guter Ruf voraus. Man denkt von ihnen als pathogene Organismen, als die Erreger von Pest, Cholera, Typhus, Tuberkulose und Geschlechtskrankheiten. Nur zu verständlich, hat doch die Pest im Mittelalter weit mehr Menschen hinweggerafft als kriegerische Auseinandersetzungen. Der größte Pestzug aller Zeiten ereignete sich in den Jahren 1347 bis 1352^[1, 2]. Ausgehend vom Schwarzen Meer wurde die Pest von Seefahrern und Kaufleuten in die angrenzenden Länder getragen. Von Italien breitete sie sich über Zentraleuropa aus und schwang wieder zurück nach Osten, eine Todespur von etwa 30–

40 Millionen Menschen hinterlassend; dies entspricht etwa einem Drittel der damaligen Bevölkerung Europas. Auch die Cholera gehörte zu den Geißeln der Menschheit; die letzte große Cholera-Epidemie auf deutschem Boden suchte 1892 Hamburg heim. Ihre Bekämpfung wurde von Robert Koch persönlich geleitet. Aber noch immer geht von dem Erreger *Vibrio cholerae* Gefahr aus, wie die jüngsten Nachrichten aus Südamerika belegen. Neue pathogene Bakterien machen hin und wieder von sich reden, so der Erreger der 1976 erstmalig in Philadelphia bei einem Veteranentreffen beobachteten „Legionärskrankheit“. Wie sich später herausstellte, wurden die Veteranen während der Nachtruhe über die Klimaanlage des Hotels mit einem neuartigen Bakterium infiziert. Viele erkrankten an Lungenentzündung und 31 starben. Das Bakterium ist seitdem unter dem Namen *Legionella pneumophila* bekannt^[3].

Dies ist das eine Gesicht der Bakterien; das andere ist ein überaus freundliches; es betrifft die nützliche und damit verbunden auch die lebenswichtige Rolle der Bakterien im Zu-

[*] Prof. Dr. G. Gottschalk

Institut für Mikrobiologie der Universität
Grisebachstraße 8, D-37077 Göttingen
Telefax: Int. + 551/3937-93

Prof. Dr. H.-J. Knackmuss

Institut für Mikrobiologie der Universität
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart

sammenhang mit den Stoffkreisläufen der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel auf unserem Planeten.

Es sind die grünen Pflanzen und die phototrophen Bakterien, die Kohlendioxid mit Hilfe des Sonnenlichts in organische Substanz umwandeln und damit die Lebensgrundlage für alle anderen Organismen auf der Erde schaffen. Ein Teil dieser organischen Substanz wird von den phototrophen Organismen selbst und ein weiterer Teil durch die Nahrungskette der Tiere zu Kohlendioxid veratmet. Große Mengen pflanzlicher und tierischer Substanz sterben jedoch ab und Fäulnis setzt ein, ein Prozeß, der im wesentlichen von Mikroorganismen bewerkstelligt wird. Überall auf unserem Planeten fällt organische Substanz an: im Boden, in den Sedimenten der Gewässer, in unserer zivilisierten Welt, aber auch in den riesigen Abwasserströmen und den Mülldeponien. Überall sind Mikroorganismen am Werk, um diese organischen Substanzen letztlich zu mineralisieren und dadurch das Kohlendioxid wieder der Atmosphäre zuzuführen^[4].

In Abbildung 1 sind die Stoffflüsse getrennt nach Kontinenten und Ozeanen zusammengestellt. Rund 200 Gigatonnen Kohlenstoff in Form von Biomasse werden jährlich oxidiert und der Atmosphäre als CO₂ zugeführt, schätzungsweise 70 % davon durch die Aktivität von Pilzen und Bakterien.^[5] Namentlich die Pilze mineralisieren Holz und andere cellulosehaltige Materialien; der beachtliche Anteil der Bakterien an der Zersetzung organischen Materials hat im wesentlichen drei Gründe:

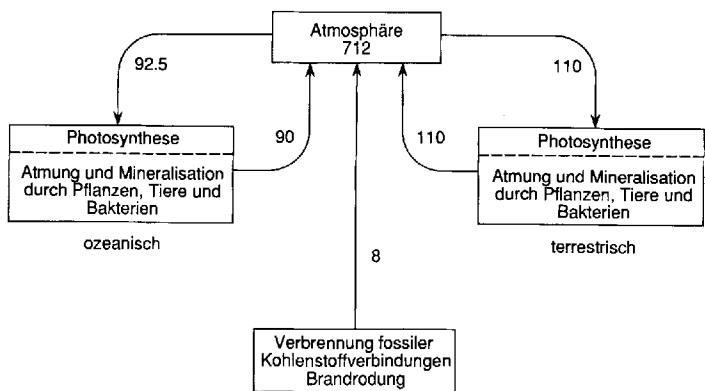


Abb. 1. Kohlenstoffkreisläufe auf den Kontinenten und in den Ozeanen sowie Kohlenstoffeintrag in die Atmosphäre durch Verbrennungsprozesse. Angaben in Gigatonnen (10^9 t) Kohlenstoff.

1) Das Substratspektrum der Bakterien in ihrer Gesamtheit entspricht der Vielfalt der natürlich vorkommenden Verbindungen. Dies wird durch unsere Erfahrung dokumentiert, daß sich auf der Erdoberfläche oder in den Gewässern keine natürliche organische Verbindung auf Dauer anhäuft. Hinter dieser Leistung steht ein gewaltiges Abbaupotential, das Kohlenwasserstoffe, eine Vielzahl aromatischer Verbindungen und beispielsweise auch chlorhaltige Verbindungen mit einschließt und bereits in direktem Zusammenhang mit dem Schadstoffabbau steht.



Gerhard Gottschalk, geboren 1935 in Schwedt/Oder, studierte von 1953–1959 Chemie an der Humboldt-Universität in Berlin, kam 1960 als Diplomchemiker nach Göttingen und promovierte dort 1963 bei H. G. Schlegel mit einer Arbeit über die Biosynthese von Poly-β-hydroxybuttersäure. Nach einem zweijährigen Postdoktoranden-Aufenthalt bei H. A. Barker am Department of Biochemistry der University of California at Berkeley, USA, habilitierte er sich 1967 an der Universität Göttingen für das Fach Mikrobiologie. 1969 wurde er nach Münster und 1970 nach Göttingen berufen, wo er seitdem tätig ist. Er war zweimal Gastprofessor an der University of California at Berkeley, ist Mitglied der Akademie der Wissenschaften zu Göttingen und war vor der Einführung der Präsidialverfassung einer der letzten Rektoren der Göttinger Universität. 1992 erhielt er zusammen mit A. Steinbüchel und H. G. Schlegel den Philip-Morris-Forschungspreis „Herausforderung Zukunft“. Seine Forschungsschwerpunkte sind der Energiestoffwechsel anaerober Bakterien, insbesondere der der Methanbildenden Bakterien, die Enzymologie und die genetische Organisation mikrobieller Stoffwechselprozesse sowie Fragen des biologischen Abbaus; er ist Autor des Lehrbuchs „Bacterial Metabolism“.



Hans-Joachim Knackmuss, geboren 1936 in Halle/Saale, studierte Chemie in Heidelberg von 1957–1962. In seiner Diplom- und Doktorarbeit (1963–1964) bei Richard Kuhn am Max-Planck-Institut in Heidelberg befaßte er sich mit der Synthese von Naturstoffen, insbesondere im Hinblick auf die Struktur des Bakterioidindigoins. Nach einem einjährigen Postdoktoranden-Aufenthalt bei M. P. Starr am Department of Bacteriology der University of California, Davis, USA, habilitierte er sich 1970 an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken für das Fach Biochemie. Nach Umhabilitation in Göttingen war er 1973–1979 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München in Göttingen. 1979 folgte er einem Ruf an die Universität-Gesamthochschule Wuppertal und leitet seit 1986 das Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung mikrobieller Systeme für die gezielte Biotransformation synthetischer Verbindungen und für die Eliminierung von Fremdstoffen aus der Umwelt. Die Arbeiten zu Physiologie und Enzymologie des mikrobiellen Fremdstoffabbaus und der experimentellen Evolution neuer katabolischer Aktivitäten in Mikroorganismen sind die Grundlage für biologische Entsorgungstechniken, welche er in einer in Personalunion geleiteten Abteilung am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart entwickelt.

2) Bakterien sind an die verschiedensten Bedingungen angepaßt; in Tabelle 1 sind eine Reihe dieser Bedingungen zusammengestellt. Besonders einige Archaeabakterien (Archaea), häufig auch Extremophile genannt, bevölkern Standorte, an denen man sich aufgrund der äußeren Gegebenheiten (Temperatur, pH, Druck oder Ionenstärke) kaum noch Leben vorstellen kann.

Tabelle 1. Grenzen bakteriellen Wachstums [a].

Bedingung	Grenzbereich	Beispiele
Temperatur	90–110 °C	<i>Pyrodictium occultum</i>
pH-Wert	15–0 °C 3–1.5 9–11	<i>Methanopyrus kandleri</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Acidianus briareyi</i> <i>Bacillus alcalophilus</i>
Salinität	bis 5.2 M NaCl	<i>Halobacterium halobium</i>
O ₂ -Konzentration	gegen 0 % um 1 % 20 %	Gärer wie methanogene Bakterien oder Clostridien microaerophile Bakterien wie <i>Thiomicrospira denitrificans</i> häufige Boden- und Wasserbakterien

[a] Beispiele aus Lit. [6] und [7].

3) Bakterien weisen eine enorm hohe Stoffwechselaktivität auf. Dies hängt unter anderem mit ihrer Kleinheit und dem damit verbundenen hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis zusammen. In Abbildung 2 ist schematisch ein Schnitt durch eine Bakterienzelle wiedergegeben. Man sieht,

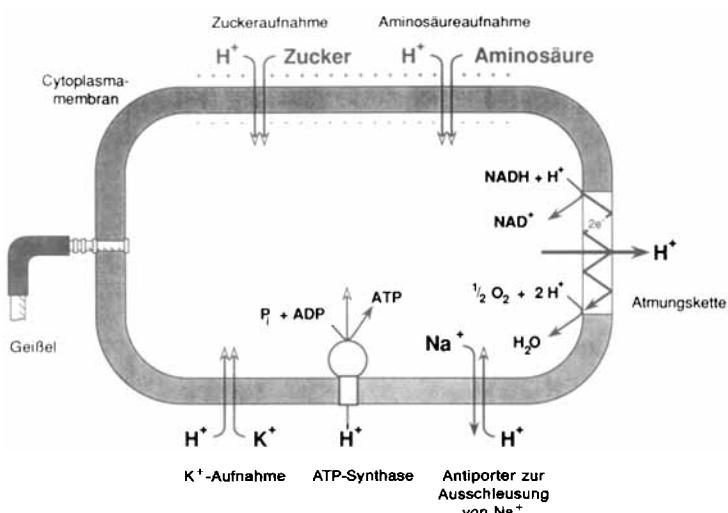


Abb. 2. Schematische Darstellung einer Bakterienzelle mit Blick auf die zahlreichen Funktionen, die in der Cytoplasma-Membran lokalisiert sind. Die sich ganz außen befindende Zellwand ist nicht dargestellt, ebenfalls nicht der intermediärstoffwechsel in der Cytoplasma-Membran.

dass Funktionen der Energiegewinnung und natürlich des Stofftransports in der das Zellinnere umgebenden Cytoplasma-Membran lokalisiert sind. Je größer nun die Fläche dieser Membran im Vergleich zu dem zu versorgenden Volumen des Cytoplasmas ist, desto mehr Substrate und desto mehr Energie in Form von ATP können für die Synthesemaschinerie im Cytoplasma zur Verfügung gestellt werden. Beispielsweise atmet der Stickstoffixierer *Azotobacter vinelandii* 2000mal schneller als Lebergewebe; auch das Wachstum und die Vermehrung von Bakterienzellen sind ungleich schneller.

So kann sich eine *Escherichia coli*-Zelle unter optimalen Bedingungen alle 20 Minuten teilen, und dies ist nicht einmal der Rekord: Manche Bakterienarten brauchen für eine Generation lediglich 11 Minuten. Was für ein Potential in einer so schnellen Zellvermehrung steckt, soll an einem (wenn auch letztlich utopischen) Beispiel veranschaulicht werden:

Die Frage ist, wieviel Bakterienmasse aus einer einzigen *E. coli*-Zelle entstehen würde, wenn diese sich 48 Stunden lang mit einer Generationszeit von 20 Minuten vermehrte. Es würden sich 144 Zellteilungen in diesem Zeitraum ereignen und $N = 1 \times 2^{144} = 10^{43}$ Zellen entstehen. Eine *E. coli*-Zelle wiegt 10^{-12} Gramm – das ergäbe 10^{25} Tonnen; unsere Erde wiegt 6×10^{21} Tonnen, also entstünde etwa die 1000fache Erdmasse an Bakterien. Diese Rechnung zeigt, daß das Wachstum von *E. coli* und natürlich auch von anderen Bakterien stark limitiert sein muß, insbesondere durch verwertbare Substrate, aber auch durch gebildete Produkte. Es deutet jedoch an, daß unter geeigneten Bedingungen Verwertbares schnell durch Bakterien aufgezehrt werden kann.

2. Auf eine energetisierte Cytoplasma-Membran kommt es an

Bakterien sind keine leblosen Biokatalysatoren, kein Netz voller Enzyme, das durch ein wäßriges Milieu schwimmt und alles hindurchläßt, irgendwie umsetzt und wieder nach außen abgibt. Bakterien sind gut von ihrer Umgebung abgeschirmte Kompartimente; die Konzentrationsunterschiede zwischen innen und außen sind gewaltig. So beträgt die K⁺-Konzentration in einer Bakterienzelle etwa 250 mM (außen ist sie häufig 20 mM oder niedriger), die Na⁺-Konzentration liegt bei nur wenigen mM und das auch durchaus im Meerwasser, das 600 mM an Na⁺ ist. Das, was eine Zelle nach außen abschirmt, ist die Cytoplasma-Membran; sie besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, die mit Proteinen durchsetzt ist^[8]. Diese Membran bildet nicht einfach nur eine Hülle um das Zellinnere, sie ist darüber hinaus „energetisiert“, und zwar dadurch, daß über der Membran ein Protonengradient anliegt. Dies hat zur Folge, daß es innen alkalischer ist als außen, was wiederum dazu führt, daß die Membran geladen ist, innen negativ und außen positiv. Beide Parameter faßt man zur protonenmotorischen Kraft zusammen (Abb. 2).

Diese Energetisierung der Cytoplasma-Membran ist untrennbar mit der Lebensfähigkeit einer Bakterienzelle verbunden. Sie ermöglicht die Selektivität von Stoffaufnahme und Stoffabgabe, seien es nun anorganische Ionen oder geladene oder neutrale organische Verbindungen, und sie ermöglicht im allgemeinen auch die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Substrate werden also von den Bakterien aufgenommen, teilweise über die Atmungskette oxidiert, und es wird die gerade erwähnte protonenmotorische Kraft an der Membran aufgebaut^[9]. Substratmangel führt dazu, daß die Bakterien die Energetisierung der Membran nicht sehr lange aufrecht erhalten können und sterben; aber auch von vorhandenen Substraten geht Gefahr aus. Sind sie lipophil, so können sie die Energetisierung der Membran zerstören und die ATP-Synthese verhindern. Eine solche entkoppelnde Wirkung haben Verbindungen wie 2,4-Dinitrophenol, Tetrachlorsalicylanilid oder auch schwache organische Säuren, die in undissoziierter Form die Phospholipid-

schicht überwinden^[10], im Zellinnern wieder dissoziieren und so den pH-Gradienten zwischen innen und außen dissipieren (Abb. 3). Aus diesem Grunde sind organische Säuren wie Essigsäure oder Milchsäure gute Konservierungsmittel. Lösungsmittel wie Toluol oder Butanol wirken auf andere Weise; sie brennen gleichermaßen Löcher in die Membran und unterbinden so das Aufrechterhalten von Ionengradienten. Um so bemerkenswerter ist es, daß Horikoshi et al. einige Stämme von *Pseudomonas putida* und *P. aeruginosa* isolieren konnten, die auf Agar unter einer 2 mm dicken Schicht von Toluol, *p*-Xylol, Cyclohexan oder *n*-Heptanol wachsen^[11]. Obwohl Ausnahmen, sind diese Stämme hochinteressant, und die zugrundeliegenden Toleranzmechanismen sollten so schnell wie möglich aufgeklärt werden.

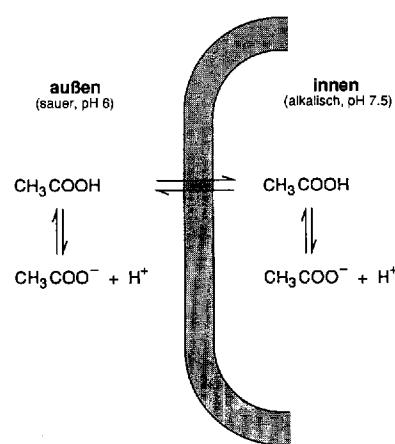
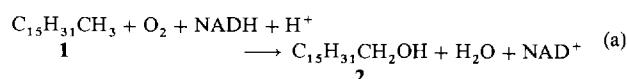


Abb. 3. Die entkoppelnde Wirkung schwacher organischer Säuren. Es kommt zum Konzentrationsausgleich der undissozierten Säuren innen und außen. Dieser wird erst erreicht, nachdem die pH-Differenz weitgehend aufgehoben ist.

Aus dem gerade Gesagten wird deutlich, daß Substratmangel, aber auch ein bestimmtes Substratangebot für Bakterien problematisch sein kann. Gerade lipophile Verbindungen sind eine potentielle Gefahr, der die Mikroorganismen im allgemeinen dadurch entgehen können, daß sie diese Verbindungen schneller metabolisieren als sie in die Nähe der Zellen diffundieren. Wäßriges Mileu, niedrige Konzentrationen an solchen Verbindungen und die Möglichkeit der enzymatischen Umsetzung sind also die Grundvoraussetzungen für den Abbau vieler Substanzen, seien sie nun natürlichen oder synthetischen Ursprungs.

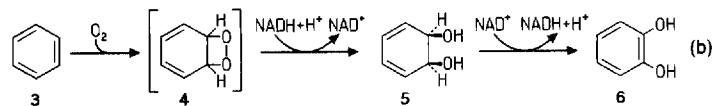
3. Bereits der Abbau natürlicher Verbindungen ist faszinierend

Nur durch wenige Beispiele soll hier dokumentiert werden, daß die Vielfalt der Reaktionen, der sich Mikroorganismen zum Substratabbau bedienen, weit über die Glykolyse und damit verwandte Reaktionen hinausgeht. Am Abbau von aliphatischen und von aromatischen Verbindungen ist im allgemeinen Sauerstoff direkt beteiligt. Aliphatische Kohlenwasserstoffe wie **1** werden durch Monooxygenase-Reaktionen in primäre Alkohole wie **2** umgewandelt [Gl. (a)]^[18].



Hierfür ist charakteristisch, daß neben dem zu oxidierenden Kohlenwasserstoff ein zelleigenes Coenzym, beispielsweise Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) oxidiert wird. Die entstehenden primären Alkohole lassen sich dann über die Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren umsetzen, welche nach Aktivierung durch Veresterung mit Coenzym A der β -Oxidation unterworfen werden können.

Bei aromatischen Verbindungen sieht die Abbaustrategie folgendermaßen aus: Durch „Dioxygenase-Reaktionen“ werden Verbindungen mit zwei benachbarten Hydroxygruppen gebildet, im einfachsten Falle das Cyclohexadienol **5**, das dann in einer separaten NAD⁺-abhängigen Reaktion zu Brenzcatechin **6** dehydriert wird [Gl. (b)]. Dioxygenasen, die



den aromatischen Ring angreifen, sind Mehrkomponentensysteme (Abb. 4). Eine Reduktasekomponente, ein Flavoprotein, übernimmt Elektronen von NADH und leitet diese über Ferredoxin auf die eigentliche Oxygenase; diese enthält Eisen-Schwefel-Zentren und speziell Fe²⁺ im Reaktionszentrum der Oxygenierung^[12]. Einige dieser Dioxygenasen sind

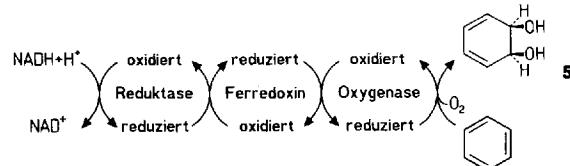


Abb. 4. Benzol-Dioxygenase – ein Dreikomponentensystem.

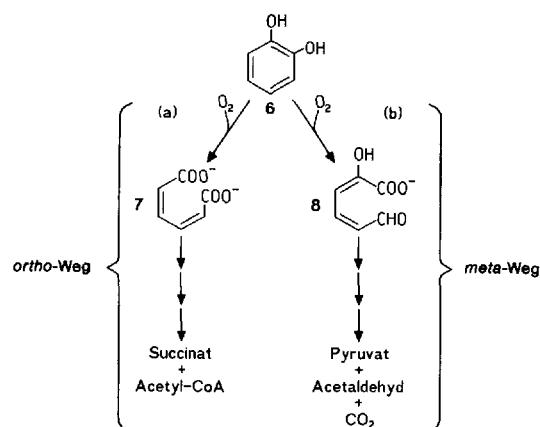
in Tabelle 2 zusammengestellt. Benzoat- und *ortho*-Phthalat-Dioxygenase sind Zweikomponentensysteme, bei denen Elektronen über Eisen-Schwefel-Zentren direkt von der Reduktase auf die Oxygenase übertragen werden. Brenzcate-

Tabelle 2. Multikomponentensysteme zur Hydroxylierung von Arenen (Dioxygenasen).

Dioxygenase	Reduktase M [a] Flavin	Ferredoxin Fe-S-Zentrum	Oxygenase M	Fe-S-Zentrum	Fe-S-Fe ²⁺		
Benzol-1,2-	60	FAD	–	12	168	+	+
Toluol-2,3-	46	FAD	–	15	151	+	–
Naphthalin-1,2-	36	FAD	2 Fe-2 S	14	158	+	–
Benzoat-1,2-	38	FAD	2 Fe-2 S	–	201	+	+
<i>ortho</i> -Phthalat-1,2-	34	FMN	2 Fe-2 S	–	217	+	–

[a] Molmasse in Kilodalton. Daten aus Lit. [12] und [15].

chin **6** und Protocatechusäure werden dann mit Sauerstoff zwischen den Hydroxygruppen (*ortho*-Spaltung) oder unmittelbar daneben (*meta*-Spaltung) zerteilt, und es entstehen aus **6** *cis,cis*-Muconsäure bzw. 1-Hydroxymuconaldehydsäure oder entsprechende Derivate (Schema 1). Die Fähigkeit zur Spaltung des aromatischen Ringsystems ist unter Bakterien erstaunlich weit verbreitet; die erforderlichen Gene liegen entweder auf dem Bakterienchromosom (häufig bei der *ortho*-Spaltung) oder auf entsprechenden Plasmiden (vorzugs-



Schema 1. Spaltung von Brenzcatechin 6 durch eine 1,2- oder 2,3-Dioxygenase.

weise bei der *meta*-Spaltung). Letztere bestehen wie das Chromosom aus ringförmiger doppelsträngiger DNA, sind aber sehr viel kleiner (etwa 1 % der Größe des Chromosoms) und tragen häufig auch Gene, deren Produkte Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika vermitteln.

Auch Heteroarene sind ohne weiteres biologisch abbaubar^[13]. Schließlich finden sie sich in der Natur reichlich, in Nucleinsäuren, einigen Aminosäuren, Vitaminen und Alkaloiden. Der mikrobielle Angriff unsubstituierter Heterocyclen wird häufig dadurch eingeleitet, daß eine Hydroxygruppe in Nachbarschaft zum Heteroatom eingeführt wird. Das Hydroxy-Sauerstoffatom stammt hier nicht aus molekularem Sauerstoff (O_2), sondern aus Wasser, und die Enzyme enthalten den Molybdän-Cofaktor und zusätzlich meistens Flavine (Tabelle 3).

Tabelle 3. Molybdoenzyme, die Heterocyclen mit Wasser hydroxylieren.

Enzym	weitere prosthetische Gruppen	Produkt
Xanthin-DH [a]	FAD, Fe/S	Harnsäure
Nicotin-DH	FAD, Fe/S	6-Hydroxynicotin
Isonicotinsäure-DH	FAD	6-Hydroxyisonicotinsäure
Picolinsäure-DH	FAD	6-Hydroxypicolinsäure
Chinolin-DH	FAD	2-Hydroxychinolinsäure
Furan-2-carboxyl-CoA-DH		5-Hydroxyfuran-2-carboxyl-CoA

[a] DH = Dehydrogenase.

Der in Bakterien vorkommende Molybdän-Cofaktor – jetzt als Bactoperin bezeichnet – ist ein Molybdopterin-Guanin- oder Cytosin-Dinucleotid (Abb. 5)^[14]. Wie er an der Einführung der Hydroxygruppe beteiligt ist, gibt der für die Xanthin-Dehydrogenase-Reaktion postulierte Mechanismus in Abbildung 6 wieder^[15].

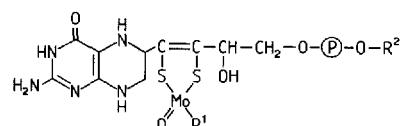


Abb. 5. Der Molybdän-Cofaktor. $R^1 = O$: Nitrat-Reduktase, Sulfit-Oxidase; $R^1 = S$: die meisten bekannten Molybdoenzyme; $R^1 = Se$: einige Molybdoenzyme anaeroben Bakterien; $R^2 = \text{Cytosin-}$ oder $\text{Guanosinmonophosphat}$; $\textcircled{P} = \text{Phosphodiestergruppe}$.

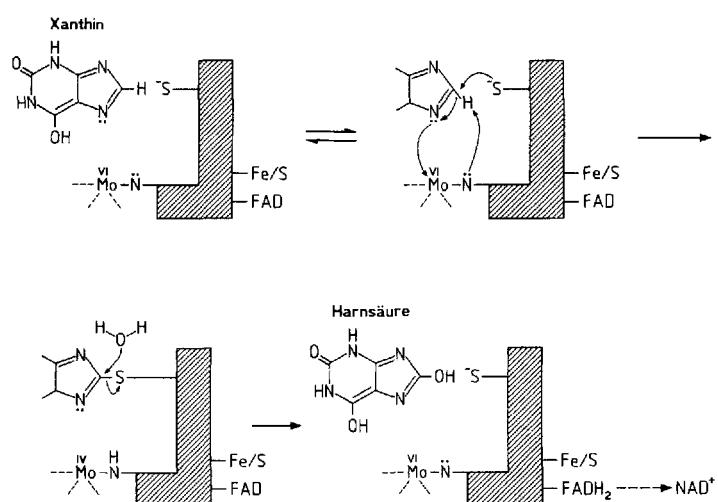


Abb. 6. Möglicher Mechanismus der Xanthin-Dehydrogenase-Reaktion [15]. Der schraffierte Bereich stellt das Enzym mit den aktiven Zentren (S-Gruppe und redoxaktive Komponenten) dar.

Es ist einleuchtend, daß diese Enzyme zusätzlich Flavin-Adenin-Nucleotid (FAD) und auch Eisen-Schwefel-Zentren enthalten. Das im Zuge der Hydroxylierung zu Mo^{IV} reduzierte Mo^{VI} muß über Eisen-Schwefel-Zentren und FAD wieder oxidiert werden, wobei die Elektronen letztlich auf NAD^+ übertragen werden.

4. Für einige synthetische Verbindungen fehlen geeignete Abbaumechanismen

Unter den synthetischen Verbindungen, die vorsetzlich oder unbeabsichtigt in die Umwelt gelangen, gibt es solche mit Fremdstoffcharakter. Substituenten wie Chlor und Brom oder die Sulfonsäure- und Nitrogruppe sind in Naturstoffen relativ selten anzutreffen. Gänzlich unbekannt als Substituenten am Aren sind Fluor oder Fluoralkyl sowie die Phenylazogruppe. Nicht allein die Art der Substituenten, sondern auch deren Zahl und Position können einer synthetischen Verbindung Fremdstoffcharakter verleihen. So kann der in Naturstoffen häufig anzutreffende Methylsubstituent den biologischen Abbau einer synthetischen Verbindung erschweren. Methyl in vicinaler Position zu einem bereits vorhandenen Substituenten behindert an aromatischen Strukturen den Primärangriff durch Oxygenasen und den Abbau aliphatischer Verbindungen durch β -Oxidation.

Da die Mikroorganismen solchen xenobiotischen Strukturen im Laufe der Evolution nicht ausgesetzt waren, ist es klar, daß entsprechende Abbaumechanismen nicht entwickelt wurden. Das Fehlen bestimmter Enzyme für den Fremdstoffabbau in natürlichen Biozönosen ist eine der Ursachen für die Persistenz dieser Stoffe.

Die von den Mikroorganismen für den Abbau der Naturstoffe hervorgebrachten Enzyme haben keine absolute Substratspezifität. Dementsprechend unterliegen Fremdstoffe „zufälligen“ stofflichen Veränderungen, die man als Cometabolismus bezeichnet^[16]. Diese Reaktionen führen in der Regel nicht zur Mineralisation der Stoffe, d.h. sie werden nicht vollständig zu CO_2 , H_2O , anorganischen Stickstoffverbindungen etc. abgebaut. Stattdessen entstehen komplexe Produktgemische, die weiteren biologischen und chemischen Folgereaktionen unterliegen (siehe Abschnitt 6). Für die am

Cometabolismus beteiligten Mikroorganismen ist dieser ohne Energiegewinn. Da die aktive Biomasse nicht zunimmt und der oxidative Abbau für die Funktion der Oxygenasen sogar Energie, beispielsweise NADH, verbraucht, verlaufen cometabolische Reaktionen in der Regel langsam und sind von außen nur durch Zufüttern von Wachstumssubstraten zu beschleunigen. Wir sprechen beim Cometabolismus von einem unproduktiven oder, wenn Energieverlust und Zellschädigung eintritt, sogar von einem kontraproduktiven Stoffabbau. Die cometabolisch aktiven Organismen benötigen deshalb ein Cosubstrat, um Energie bereitzustellen und cometabolisch wirksame Enzyme zu induzieren.

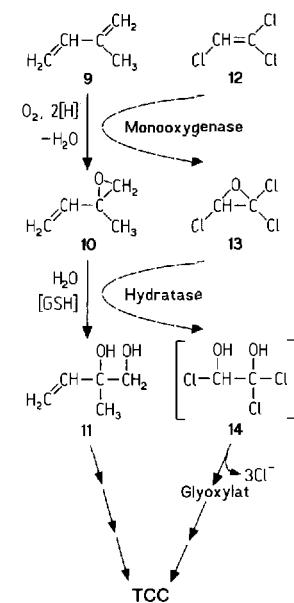
5. Prozeßführung und Cosubstrat können entscheidend sein

Ungeachtet der genannten Probleme gibt es eine Fülle von Beobachtungen, die cometabolische Umsetzungen von Fremdstoffen als entscheidende Reaktionsschritte für den biologischen Abbau identifizieren. Ein Beispiel ist Nitrobenzol, welches durch aerobe Bakterien schwer abgebaut wird. Dagegen ist die Fähigkeit zur Gratzireduktion von Nitrobenzol zu Anilin, d. h. zur cometabolischen Reduktion durch unspezifische, eigentlich für andere Reaktionen gebildete Enzyme, eine in anaeroben Bakterienpopulationen (Faulschlamm) generell vorhandene Eigenschaft. Das in Gegenwart von Elektronendonoren wie Glucose oder Alkoholen in glatter Reaktion entstehende Anilin ist durch eine nachgeschaltete aerobe Abbaustufe ohne weiteres vollständig abbaubar^[16b].

Die unspezifische Gratzireduktion von Fremdstoffen ist auch auf andere elektrophile Verbindungen übertragbar. Sie birgt ein bislang weitgehend ungenutztes Potential, oxidativ schwer angreifbare Verbindungen dem vollständigen biologischen Abbau durch aerobe Mikroorganismen zu erschließen. So werden durch Gratzireduktion Azoverbindungen zu aromatischen Aminen gespalten, die dann dem elektrophilen Angriff durch Oxygenasen zugänglich sind (siehe Abschnitt 7). Aus hochchlorierten Verbindungen wie Tetrachlorethen oder polychlorierten Biphenylen kann ein Teil der Chlorsubstituenten reduktiv abgespalten werden^[17, 18], was die Persistenz der Verbindungen gegenüber einem oxidativen mikrobiellen Abbau wesentlich vermindert.

Während Tetrachlorethan durch Oxygenasen sehr langsam angegriffen wird, nimmt die Geschwindigkeit der Oxydation in der Reihe Trichlorethen **12**, Dichlorethen und Vinylchlorid deutlich zu^[19]. Hier sind Monoxygenasen besonders wirksam, deren natürliche Funktion die Oxidation von Naturstoffen wie Methan, Alkylarenen^[20] oder Alkenen ist^[21]. Als besonders wirksam haben sich Isopren-abbauende Bakterienstämme erwiesen^[22]. Das durch eine Monoxygenase zuerst gebildete 3,4-Epoxy-3-methyl-1-butene (Isoprenoxid) **10** (Schema 2) wird durch ein Glutathion(GSH)-abhängiges Enzym zum Diol **11** hydrolysiert. Dieser Enzymaktivität verdanken es die Isopren-abbauenden Zellen, daß sie im Gegensatz zu methylotrophen Bakterien hohe Konzentrationen an **12** tolerieren. Während die Methan-Monoxygenasen der methylotrophen Bakterien durch das bei der Cooxidation von **12** entstehende hochreaktive Epoxid **13** irreversibel inaktiviert werden^[23], liefert die entsprechende Reaktion bei Isopren-abbauenden Zellen ohne Aktivitäts-

verlust drei Äquivalente Chlorid. Der Vorteil von Isopren **9** gegenüber Methan als Cosubstrat besteht darin, daß dieses wegen der Struktur analogie zu **12** solche Bakterien in ihrem Wachstum begünstigt, die durch eine Epoxid-Hydrolase drei Äquivalente Chlorid abspalten und sich dadurch vor der Suizidinaktivierung schützen. Eine Freisetzung der aus **12** zu



Schema 2. Initialreaktionen des Abbaus von Isopren und des Cometabolismus von Trichlorethen (gestrichelte Pfeile) durch *Rhodococcus erythropolis* JE77. TCC = Tricarbonsäure-Cyclus.

erwartenden Menge Chlorid wird auch beobachtet, wenn **12** von Bakterien umgesetzt wird, die mit Isopropylbenzol (Cumol) als Energiesubstrat isoliert wurden^[20]. Hier ist offenbar die direkte Bildung von **14** auf eine unspezifische Isopropylbenzol-2,3-Dioxygenase zurückzuführen.

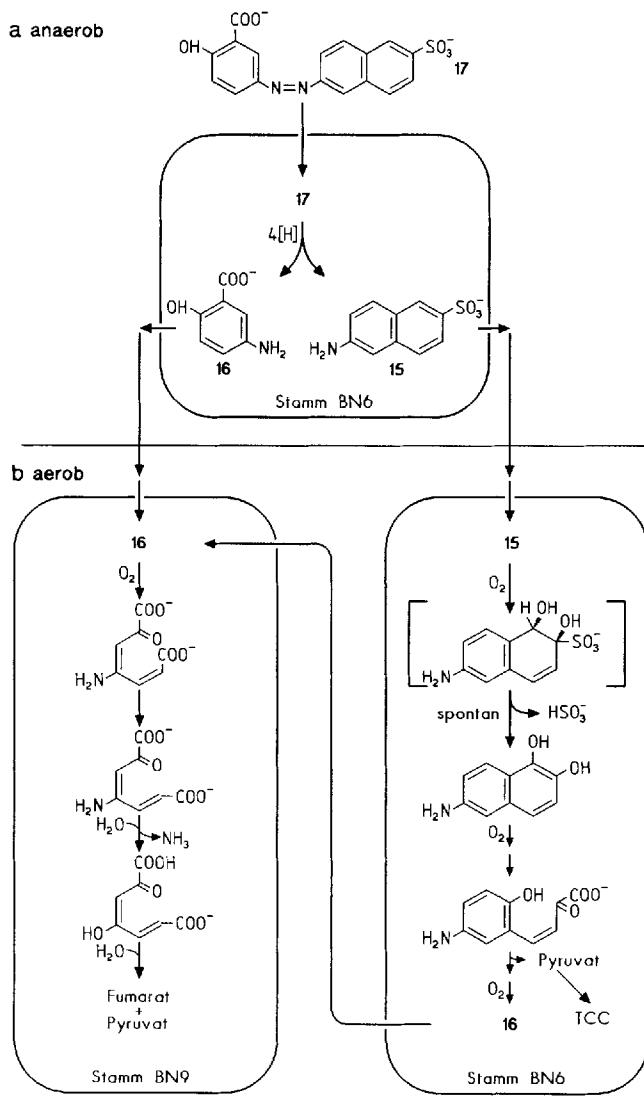
6. Bakterien helfen sich gegenseitig beim Fremdstoffabbau

Mit zunehmender Komplexität des Fremdstoffes können Cooxidationsreaktionen zwar noch eine stoffliche Veränderung bewirken, jedoch ist ein vollständiger Abbau im Sinne der Mineralisation nicht mehr zu erwarten. Die Vielfalt der in einer Mischbiozönose vorhandenen Abbauaktivitäten verursacht eine mindestens genauso große Vielzahl von Produkten. Aus aromatischen Verbindungen entstehen unter anderem die in Abschnitt 3 erwähnten aromatischen 1,2-Diole, welche sich durch Autoxidation und Polymerisation dem weiteren biologischen Abbau entziehen und damit die Abbauleistung biologischer Kläranlagen ungünstig beeinflussen.

Eine Verbesserung des biologischen Abbaugrades eines Fremdstoffes ist dann zu erwarten, wenn innerhalb einer Mischbiozönose vorhandene Aktivitäten des Partialabbaus sich gegenseitig ergänzen und unter Beteiligung mehrerer Organismen schließlich die Mineralisierung des Stoffes bewirken.

Tatsächlich gibt es solche syntrophen Wechselwirkungen innerhalb von Mischkulturen, die zu einer vollständigen Mineralisierung komplexer Fremdstoffe führen. Beispielhaft sei hier der aerobe Abbau von 6-Aminonaphthalin-2-sulfonat **15** diskutiert (Schema 3)^[24]. Die Fähigkeit zum Partial-

abbau von substituierten Naphthalinen bis zur Stufe der entsprechenden Salicylate ist eine ubiquitäre Eigenschaft. Entscheidend für die Selektion Naphthalinsulfonat-abbauender Bakterien ist die Fähigkeit zur regioselektiven Dioxygenierung in 1,2-Stellung (vgl. auch Lit.^[40]). Dadurch wird die C-S-Bindung labil und die Sulfonsäuregruppe als Sulfit abgespalten. Die Folgereaktionen entsprechen dem bekannten



Schema 3. Mineralisation von Mordant Yellow 17 durch einen Anaerob-Aerob-Prozeß unter Verwendung einer syntrophenen Mischkultur: Die reduktive Spaltung von 17 durch Zellen von *Pseudomonas vesicularis* BN6 unter anaeroben Bedingungen (a) ergibt 6-Aminonaphthalin-2-sulfonat 15 und 5-Aminosalicylat 16 im Molverhältnis 1:1. Diese Substanzen werden unter aeroben Bedingungen (b) vollständig und produktiv abgebaut: Nach Desulfonierung und Ringöffnung gewinnt der Stamm BN6 Pyruvat als verwertbaren Metaboliten. Das gebildete 16 wird als „Dead-end“-Produkt ausgeschieden, durch den Begleitorganismus *Pseudomonas* sp. BN9 aufgenommen und als Wachstumssubstrat genutzt. Für einen kontinuierlichen Abbauprozess muß Biomasse aus der aeroben in die anaerobe Stufe zurückgeführt werden.

Naphthalin-Abbau und liefern Pyruvat, das als Wachstumssubstrat dienen kann. Allerdings wird dieser für die Bakterien gewinnbringende Partialabbau durch die Anhäufung von toxischen Salicylaten und deren Oxidationsprodukten beeinträchtigt. Erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von Bakterien, welche durch eine komplementäre Abbausequenz das aus 15 entstehende 5-Aminosalicylat 16 verwerten, wird der Fremdstoff vollständig und produktiv abgebaut.

Bezeichnenderweise ist ein stabiler kontinuierlicher Abbauprozess durch diese Mischkultur^[25] nur dann zu erzielen, wenn die am Abbau beteiligten Partnerstämme auf einem inertem Träger (wie Quarzsand) fixiert werden. Offensichtlich erleichtert der intensive Kontakt zwischen den am Träger haftenden Zellen der Partnerorganismen den Interspezies-Transfer von 16, d.h. die Übertragung dieses Metaboliten von einem Bakterienstamm auf den anderen. Substratverluste durch Fehlleiten von Zwischenprodukten oder durch Autoxidation von 16 können durch die Immobilisierung der Bakterien vollständig zurückgedrängt werden.

Die durch die Verwertung von 15 als Wachstumssubstrat entstehenden Bakterienzellen der Mischkultur haben bei Abwesenheit von O₂ die zuvor erwähnte Eigenschaft der Gratiereduktion von sulfonierte Azofarbstoffen. So wird Mordant Yellow 17 unter anacrobden Bedingungen quantitativ in 15 und 16 gespalten (Schema 3a), welche in einer nachgeschalteten aeroben Stufe vollständig mineralisiert werden^[26]. Die Fähigkeit zur reduktiven Spaltung der Azogruppe haben jedoch nur Zellen des Stammes BN6, wenn diese mit Naphthalinsulfonat angezüchtet wurden. Offensichtlich hat nur dieser Organismus ein Transportsystem für Sulfonate, das „zufällig“ auch 17 in die Zellen einschleust und damit der Reduktion zugänglich macht.

7. Amino- und Nitrogruppen können als Stickstoffquelle dienen

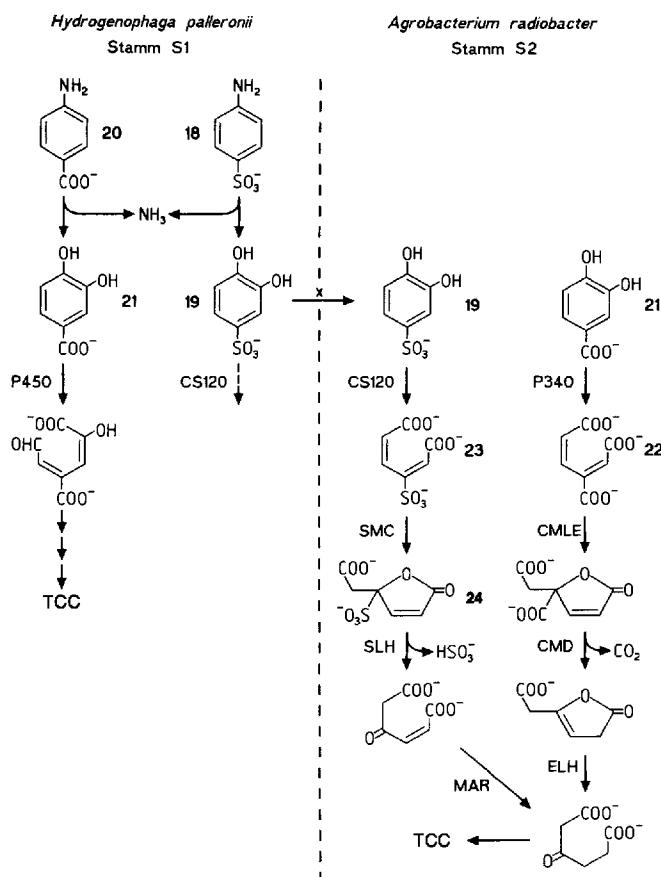
Die Verwertung eines Fremdstoffes als Wachstumssubstrat erfordert in der Regel den vollständigen Abbau des Kohlenstoffgerüstes zu Zwischenprodukten des Grundstoffwechsels. Früher oder später im Abbauweg müssen Substituenten, die den Fremdstoffcharakter bedingen, meist als Anionen abgespalten werden. Komplexere Strukturen können deshalb dem vollständigen biologischen Abbau widerstehen, weil zu viele neuartige Reaktionsschritte erforderlich sind. Die klassische Anreicherungskultur, wobei der Fremdstoff die einzige und wachstumslimitierende Kohlenstoff- und Energiequelle für die Bakterien ist, kann deshalb versagen, und der Fremdstoff scheint dann biologisch nicht abbaubar zu sein.

Geänderte Selektionsbedingungen können jedoch zu einer völlig anderen Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit führen. Bei Anwesenheit eines leicht abbaubaren Substrates (z.B. Glucose oder Malat) und unter Stickstoffmangelbedingungen gewinnen solche Bakterien einen Wachstumsvorteil, die ihren Stickstoffbedarf aus der Abspaltung von Amino- oder Nitrogruppen befriedigen können. Anstelle einer kompletten Abbausequenz genügt hier unter Umständen ein einziges Abbauenzym, z.B. eine Ammoniak- oder Nitrit-abspaltende Dioxygenase.

Beispielhaft sei hier Sulfanilat 18 genannt, welches unter gewöhnlichen kohlenstofflimitierten Wachstumsbedingungen dem Abbau widersteht. Anders als beim Metabolismus von 15 (Schema 3) wird 18 durch *Hydrogenophaga palleronii* mit einer Dioxygenase zuerst zu 3,4-Dihydroxybenzolsulfonat 19 desaminiert (Schema 4). Diese Reaktion entspricht der Desaminierung des Naturstoffes 4-Aminobenzoat 20 zu Protocatechuat 21. Das Benzoat 20 dient dem Stamm 1 nicht nur als Stickstoffquelle, sondern kann über den Protocatechuat-4,5-Dioxygenase(P450)-Weg auch als Kohlenstoff-

quelle verwertet werden kann. **19** wird durch das Enzym P45O allerdings nicht gespalten.

Dagegen hat *Agrobacterium radiobacter* (Stamm S2) die Eigenschaft, sowohl **21** als auch das strukturale Analoge **19** zwischen den Diolgruppen durch eine 3,4-Dioxogenase zu spalten und über eine dem bekannten 3-Oxoadipat-Weg analoge Abbausequenz vollständig zu mineralisieren. Anstelle der aus dem Protocatechuat-Weg bekannten Enzyme der Ringspaltung (P34O) und Cycloisomerisierung (CME) von Carboxymuconat **22** werden im Falle der sulfonanalogen Substrate **19** und **23** Isoenzyme (CS12O bzw. SMC) wirksam.



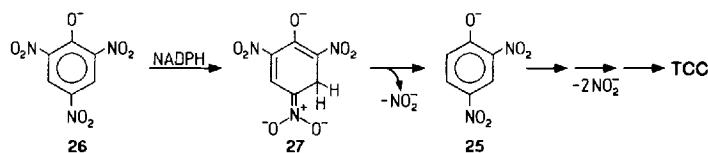
Schema 4. Abbau von Sulfonat **18** durch eine syntrophe Mischkultur: *Hydrogenophaga palleronii* (Stamm S1) verwertet 4-Aminobenzoat **20** via Protocatechuat **21** und desaminiert entsprechend **18** zu 3,4-Dihydroxybenzolsulfonat **19**. Nach Interspeziestransfer von **19** (x) übernimmt vorwiegend *Agrobacterium radiobacter* (Stamm S2) dessen Ringöffnung. Dieser Stamm baut **21** über den bekannten 3-Oxoadipat-Weg ab. **18** wird über einen weitgehend analogen Weg assimiliert, erfordert jedoch zusätzliche Enzyme: Brenzcatechin-4-sulfonsäure-1,2-Dioxogenase (CS12O), Sulfonylmuconat-Cycloisomerase (SMC), Sulfolacton-Hydrolase (SLH) und Maleylacetat-Reduktase (MAR). ELH = Enol-Lacton-Hydrolase.

Die Abspaltung von Sulfit auf der Stufe des Sulfolactons **24** erfordert ein einzigartiges Enzym, die Sulfolacton-Hydrolase (SLH), da die Carboxymuconolacton-Decarboxylase (CMD) des klassischen Protocatechuat-Weges diese Reaktion nicht katalysiert kann. Die Maleylacetat-Reduktase (MAR) wird im Protocatechuat-Weg nicht benötigt. Dieses Enzym wird beim Wachstum mit **19** als Substrat synthetisiert und ist, wie aus Abbauwegen von Resorcin und von Halogenarenen bereits bekannt, dafür verantwortlich, daß diese mit dem 3-Oxoadipat-Weg konvergieren.

Die Bakterienstämme S1 und S2 bilden bei Kultivierung mit **18** als einzige Stickstoff-, Schwefel- und Energiequelle

eine stabile Syntrophie^[27]. Stamm S2 ist dabei auf die einleitende Ammoniakabspaltung durch eine selektive Dioxygenase vom Stamm S1 angewiesen. Dieser kann **18** zunächst nur als Stickstoffquelle verwerten, da dessen Enzym CS12O das Intermediat **19** unter normalen O₂-Partialdrücken zu langsam spaltet. Wie *Hydrogenophaga* am 3,4-Dihydroxybenzolsulfonat als Kohlenstoff- und Energiequelle partizipiert, ist noch ungeklärt.

Grundsätzlich lassen sich auch Bakterien aus der Natur gewinnen, die aus Nitroarenen unter aeroben Bedingungen Nitrit abspalten und sich durch dessen Assimilation mit Stickstoff versorgen. Bei entsprechenden Kulturbedingungen werden sogar Nitrophenole abgebaut, die wegen ihrer hohen Toxizität bislang als „nicht-biologiefähig“ galten^[28]. Bezeichnenderweise entwickeln sich bei der Selektion mit 2,4-Dinitrophenolat **25** oder Pikrat **26** als einzige Stickstoffquelle nur Gram-positive Bakterien (vorwiegend Rhodokokken), und zwar solche, die gegen die entkoppelnde Wirkung dieser Zellgifte weitgehend unempfindlich sind^[29]. Da **26** von Oxygenasen nur schwer oxidiert wird, gehen, wie in Schema 5 dargestellt, diese Bakterien einen ungewöhnlichen Weg. Sie übertragen H⁺ aus NADPH auf den Kern, ohne Nitrogruppen zu reduzieren^[30].



Schema 5. *Rhodococcus erythropolis* HLPM1 verwertet Pikrat **26** und 2,4-Dinitrophenolat **25** als Stickstoffquelle. Als Primärmetabolit nachgewiesen ist der Meisenheimer-Komplex **27**, der enzymatisch unter Abspaltung von Nitrit zu **25** abgebaut wird.

Der entstehende Meisenheimer-Komplex **27** ist stabil und spaltet unter der Wirkung eines zusätzlichen Enzyms Nitrit ab, wobei Rearomatisierung zu **25** eintritt. Dieses wird vollständig abgebaut, wobei pro Mol **25** nahezu zwei Mole NO₂⁻ freigesetzt werden.

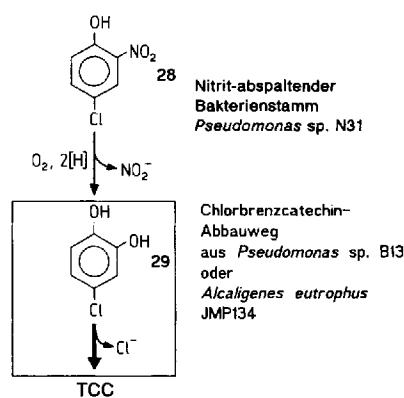
8. Maßgeschneiderte Bakterien mit hybriden Abbauwegen

In der biologischen Entsorgungstechnik kommen fast ausschließlich mikrobielle Mischpopulationen zum Einsatz. Diese bergen gegenüber organischen Substraten natürlicher Herkunft ein vielseitiges Abbaupotential, welches das einzelner Spezies weit überschreitet. Die vollständige Mineralisation und Verwertung von Fremdstoffen erfordert jedoch, wie am Beispiel von **18** und **15** erläutert, ein komplexes Zusammenspiel von Partialaktivitäten innerhalb der Mischpopulation. Dieser syntrophe Abbau ist wegen der Möglichkeit des Verlustes und des Fehlleitens von Metaboliten vielfältigen Störinflüssen ausgesetzt. Unter realen Bedingungen wird ein erheblicher Teil von Fremdstoffen durch cometabolische Reaktionen zu undefinierten, meist dunklen höhermolekularen Produkten umgewandelt, die wie Huminstoffe einem raschen biologischen Abbau nicht zugänglich sind. Hier wird deutlich, daß die Interaktion von Mikroorganismen mit komplementären Abbaueigenschaften im Sinne eines vollständi-

gen Abbaus kritisch sein kann und Fremdstoffe oder deren Metabolite in unproduktiven Abbaupfaden „versickern“ sowie abiotischen Folgereaktionen unterliegen können.

Bakterienzellen, die über komplexe Abbaupfade verfügen und Fremdstoffe vollständig und produktiv abbauen, sollten dementsprechend einen klaren Selektionsvorteil genießen. Unter den Bedingungen der kontinuierlichen Kultivierung in einer Abwasserbehandlungsanlage würde sich der Zuwachs dieser Spezialisten, die Fremdstoffe vollständig mineralisieren, selbstregulierend auf das jeweilige Angebot an Fremdstoffen einstellen und den unproduktiven Abbau durch Co-metabolanten zurückdrängen.

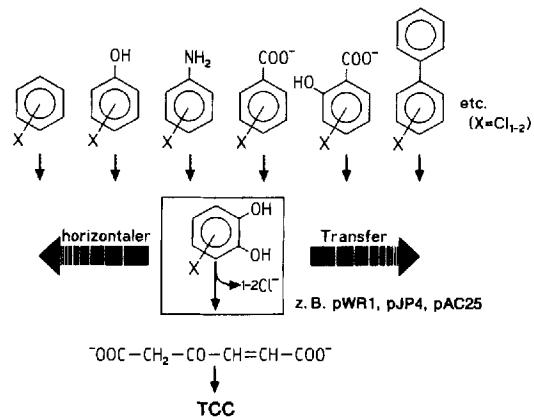
Daß Bakterien mit neuen kompletten Abbaupfaden unter geeigneten Selektionsbedingungen wirklich entstehen können, veranschaulicht das Beispiel der Chlornitrophenole. Diese haben wie andere Nitrophenole wegen ihrer entkoppelnden Wirkung auf die Atmungskette hohe Bakterientoxizität. Wählt man die Selektionsbedingungen so, daß in Gegenwart einer leicht verwertbaren Verbindung (z.B. Succinat) 4-Chlor-2-nitrophenol **28** in niedriger Konzentration vorliegt ($\leq 0.5 \text{ mM}$) und alleinige Stickstoffquelle ist, so lassen sich leicht Bakterien isolieren, die durch Oxygenierung **28** zu 4-Chorbrenzatechin **29** und Nitrit umwandeln (Schema 6). Nitrit und Succinat ermöglichen dann das Wachstum der Bakterien.



Schema 6. Abbau von 4-Chlor-2-nitrophenol **28** durch in vivo konstruierte Hybridstämme von *Pseudomonas* sp. N31 oder *Alcaligenes eutrophus* JMP134.

Die leicht selektierbare Eigenschaft des Partialabbaus von **28** zu **29** kann jedoch unter realen Bedingungen der Abwasserbehandlung nicht zum Tragen kommen, da Stickstofflimitierung dort kaum zu realisieren ist. Darüber hinaus unterliegt das sich anhäufende **29** der Autoxidation und weist ebenfalls Bakterientoxizität auf. Hier können Bakterienstämme Abhilfe schaffen, die Chorbrenzatechine assimilieren und bei denen sich diese komplementäre Eigenschaft (Schema 7) auf einem übertragbaren genetischen Element, z.B. auf den Plasmiden pJP4, pWR1 oder pAC25 befindet^[41]. Dadurch können spontan Hybridstämme mit kompletten Abbaupfaden entstehen. Diese durch natürlichen Gentransfer entstandenen Bakterien bauen **28** vollständig ab und nutzen diese Verbindung als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle^[31].

Wie am Beispiel von **28** veranschaulicht, lassen sich neue hybride Abbaueigenschaften für eine Vielzahl anderer Chlorarene wie Chlorbenzoate, Chlorphenole, Chloraniline, Chlor-salicylate, Chlorbenzole, Chlorphenoxyacetate^[41] und Chlor-biphenyle^[39] durch natürlichen Genaustausch entwickeln^[32].



Schema 7. Prinzip der Evolution hybrider Abbauwege für Chlorarene: Chlorarene werden durch Aren- oder Methylaren-abbauende Bakterien zu Chorbrenzatechinen cometabolisiert. Durch Akquisition der Gene für den Chorbrenzatechin-Abbau (vgl. Schema 8) können hybride Abbauwege entstehen, die den vollständigen Abbau der Chlorarene ermöglichen. Donorstämme für diese Gene sind Bakterien, die **30** oder **31** verwerten und die die katabolische Information auf Plasmiden wie pWR1, pJP4 oder pAC25 tragen.

Grundlage für dieses Evolutionspotential sind die natürlichen cometabolischen Aktivitäten, die Chlorarene zu Chorbrenzatechinen cooxidieren. Enzyme, die Methylarene abbauen, sind hier wegen der Struktur analogie mit den entsprechenden chlorsubstituierten Verbindungen besonders wirksam.

Bakterien mit der komplementären Eigenschaft zur Assimilation von Chorbrenzatechinen bilden in natürlichen Populationen zwar nur eine Randgruppe, sie sind jedoch ubiquitär. Durch Substrate mit geringer Bakterientoxizität wie 3-Chlorbenzoat **30** oder 2,4-Dichlorphenoxyacetat **31** (Schema 8) lassen sich solche Spezialisten aus Boden- oder Gewässerproben relativ leicht anreichern und in Reinkultur gewinnen^[33].

Es ist bemerkenswert, daß die katabolische Sequenz für **30** und **31** derjenigen des klassischen Benzoat-Weges (3-Oxoacidat- oder *ortho*-Weg) analog ist (Schema 8). Bestimmte Enzyme, z.B. die Chorbrenzatechin-1,2-Dioxygenasen (CC12O) und die Chormuconat-Cycloisomerasen (CMC und DCMC) sind Isoenzyme, die nicht nur die entsprechenden halogen-substituierten, sondern auch die gewöhnlichen chlorfreien Substrate umsetzen. Diese Enzyme werden nur beim Wachstum mit **30** (*Pseudomonas* sp. B13) oder **31** (*Alcaligenes eutrophus*) gebildet. Die gewöhnliche Brenzatechin-1,2-Dioxygenase (C12O) und Muconat-Cycloisomerase (MC, Schema 8) des 3-Oxoacidat-Weges sind gegenüber chlorsubstituierten Metaboliten wenig wirksam.

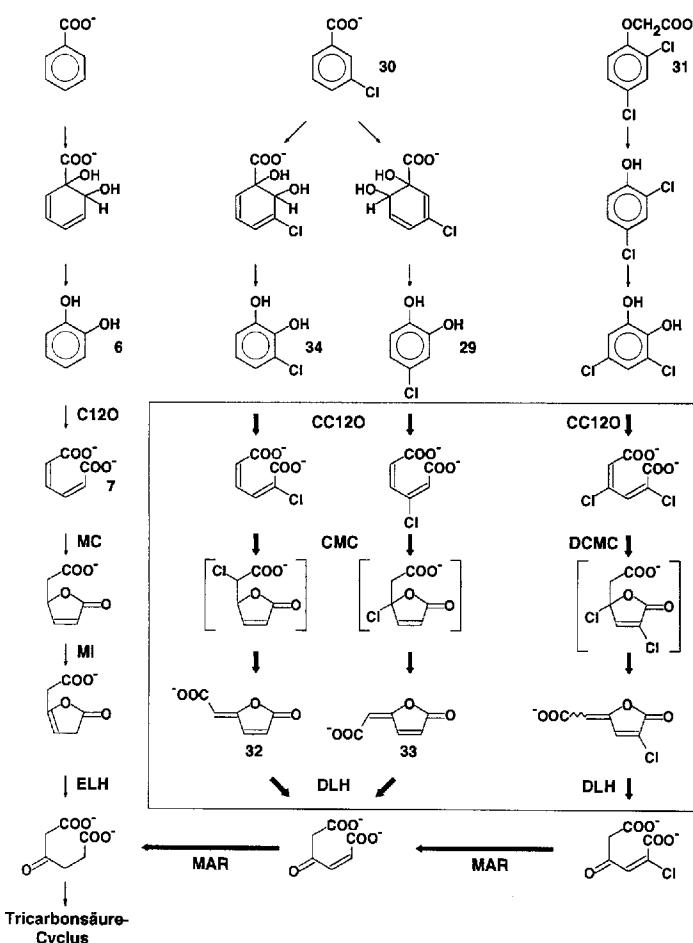
Die zum Teil hohen Homologien in den Aminosäuresequenzen der Isoenzyme deuten darauf hin, daß die Enzyme für den Chloraren-Abbau aus den entsprechenden Proteinen des klassischen *ortho*-Weges hervorgegangen sind. Aus der Häufigkeit der Änderungen der DNA-Sequenz, die sich nicht in der Aminosäuresequenz auswirken, läßt sich abschätzen, daß zumindest das Enzym CMC aus dem 3-Chlorbenzoat-Abbau und das Enzym DCMC aus dem 2,4-Dichlorphenoxyacetat-Abbau von den klassischen Muconat-Cycloisomerasen (MC) divergierten lange bevor anthropogene Substrate, d.h. Produkte der chemischen Industrie, die Evolution dieser Proteine begünstigen konnte^[34].

Beim Sulfolacton-hydrolysierenden Enzym (SLH in Schema 4) des Sulfobrenzatechin-Weges hatten wir bereits ein für den Fremdstoffabbau einzigartiges Enzym kennenge-

lernt, das hinsichtlich seiner katalytischen Wirkung keine Analogie im Protocatechuat-Weg hat.

In der Dienlacton-Hydrolase (DLH) des modifizierten *ortho*-Weges (Schema 8) finden wir ein Enzym, welches nur die Dienlactone **32** und **33**, jedoch nicht die entsprechenden Lactone des klassischen *ortho*-Weges (siehe Benzoat-Abbau in Schema 8) angreift^[135]. Inwieweit diese Hydrolasen dennoch miteinander verwandt sind, wird gegenwärtig untersucht.

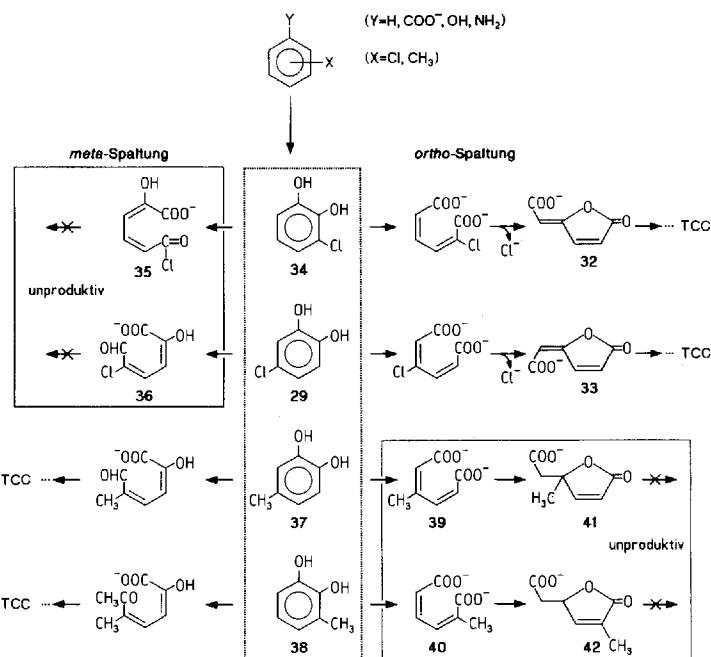
Normalerweise existieren der klassische^[8] und der modifizierte *ortho*-Weg nebeneinander, wobei ersterer chromosomal und letzterer meist plasmidisch kodiert (in Schema 6, 7 und 8 jeweils durch Umrandung gekennzeichnet) vorliegt und die entsprechenden Enzyme nur in Gegenwart chlorierter Verbindungen gebildet werden. Bei Substratgemischen von Arenen und Chlorarenen treten beide Wege in Aktion, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen.



Schema 8. Für den Abbau von Chlor- und Dichlorarenen wie 3-Chlorbenzoat **30** bzw. 2,4-Dichlorphenoxyacetat **31** sind in Bakterien (z.B. *Pseudomonas* sp. B13 oder *Alcaligenes eutrophus* JMP134) Reaktionsfolgen verwirklicht, welche derjenigen des bekannten *ortho*-Weges (Brenzcatechin-Zweig des 3-Oxoadipat-Weges [8]) analog sind. Beim Wachstum mit Chlorarenen werden für den Abbau von Chlrbrenzcatechinen spezifische Enzyme synthetisiert, welche gegenüber den dabei auftretenden Metaboliten hohe Aktivitäten aufweisen (Enzyme des „modifizierten *ortho*-Weges“ durch dicke Pfeile gekennzeichnet).

Eine völlig andere und für die Bakterien fatale Situation ergibt sich, wenn Chlor- und Methylarene gleichzeitig vorliegen^[136]. Letztere bewirken die Synthese der Enzyme des *meta*-Weges^[8]. Aufgrund der sterischen Analogie spaltet die *meta*-Pyrocatechase nicht nur methyl-, sondern auch chlor-substituierte Brenzcatechine (Schema 9). Aus **34** entsteht da-

bei das Säurechlorid **35**, welches das ringspaltende Enzym durch Acylierung irreversibel inaktiviert. Die *meta*-Spaltung von **29** erzeugt stabile chlorhaltige Dead-end-Metabolite, vorwiegend 5-Chlor-5-formyl-2-hydroxpenta-2,4-dienoat **36**.



Schema 9. Aufgrund eingeschränkter Spezifität der Chlrbrenzcatechine abbauenden Enzyme (modifizierter *ortho*-Weg in Schema 8) und der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase des *meta*-Weges [8] können Methylarene in den *ortho*-Weg und Chlorarene in den *meta*-Weg fehlgeleitet werden. Daraus entstehen Stoffinkompatibilitäten, wenn z.B. Gemische von Chlor- und Methylarenen vorliegen und dadurch beide Abbauwege gleichzeitig induziert werden.

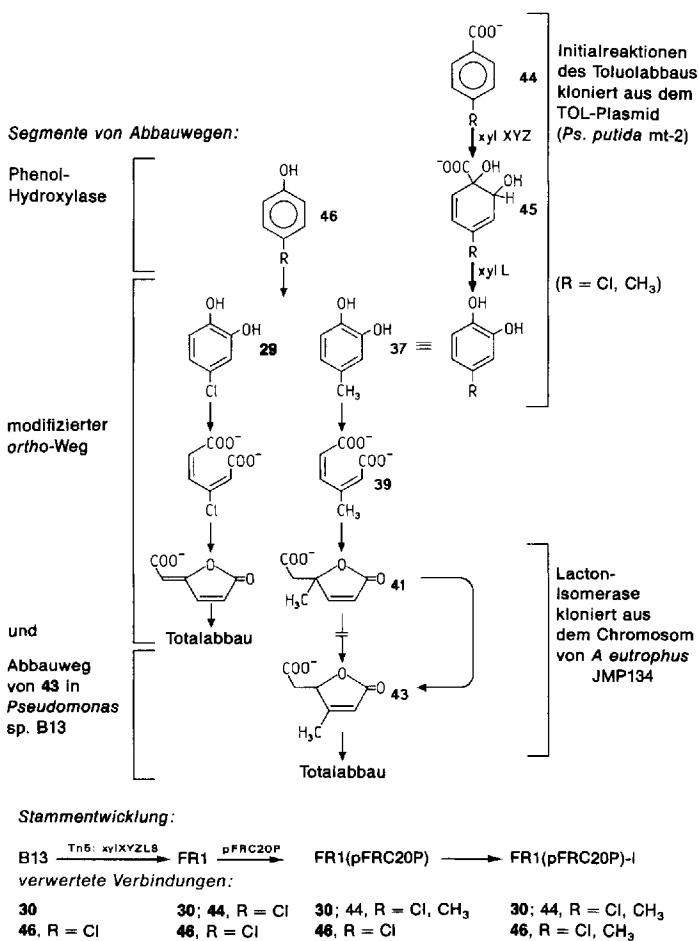
Offenbar ist der *meta*-Weg für den Abbau von Chlorarenen nicht nur unproduktiv, sondern verliert in Gegenwart hoher Konzentrationen an Chlorarenen wegen der Inaktivierung der Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase auch für den produktiven Abbau von Methylarenen seine Wirksamkeit. Darüber hinaus wird die Unverträglichkeit von Methyl- und Chlorarenen noch verstärkt, indem die Methylbrenzcatechine **37** und **38** leicht in den modifizierten *ortho*-Weg des Chlrbrenzcatechin-Abbaus fließen. Dieser Abbau führt jedoch ebenfalls in eine Sackgasse, da die entsprechenden Methylmuconsäuren **39** bzw. **40** keine Dienlactone bilden können. Deshalb sind die Methyllactone **41** und **42** Dead-end-Metabolite, die durch enzymatische Cycloisomerisierung in optisch reiner Form angehäuft wird.

Die zuvor diskutierte Evolution neuer Abbauwege für Chlorarene unter Beteiligung von Initialenzymen des Methylaren-Abbaus erfordert die Abschaltung des für Methylarene essentiellen *meta*-Weges^[8]. Dementsprechend haben Bakterienstämme, welche die Fähigkeit zum Abbau von Chlorarenen erlangt haben, gleichzeitig das Potential zur Verwertung von Methylarenen eingebüßt. Es ist bezeichnend, daß zunächst instabile Hybridstämme entstehen, welche in Gegenwart von Chlorarenen den *meta*-Weg durch Suizidinaktivierung von C23O abschalten. Bei längerer Kultivierung mit Chlorarenen setzen sich schneller wachsende Spontanmutanten durch. Diese haben das Strukturge von C23O durch Insertion inaktiviert und umgehen damit die kostspielige Regulation durch Suizidinaktivierung von C23O^[137].

9. In vitro manipulierte Abbaustämme als Ultima ratio

Obwohl es Mikroorganismen gibt, welche Chlorarene abbauen können oder diese Fähigkeit unter Rekrutierung von Enzymen des Methylaren-Abbaus rasch evolvieren können, ist das gleichzeitige Auftreten von Methyl- und Chlorarenen offenbar fatal. Ein Ansatz, mit dem es möglicherweise gelingt, diese inkompatiblen Stoffgemische vollständig und produktiv abzubauen, wäre ein multifunktioneller *ortho*-Weg, der nicht nur die Assimilation von Arenen und Chlorarenen ermöglicht, sondern auch durch *ortho*-Spaltung Methylarene als Wachstumssubstrate erschließt^[36].

Für die Entwicklung eines solchen multifunktionellen *ortho*-Weges entsprechend Schema 10 ist *Pseudomonas* sp. B13 geradezu ideal, da dieser Organismus **6** und die Chlorbrenzcatechine **34** und **29** durch *ortho*-Spaltung abbaut und keine den Chloraren-Abbau störende *meta*-Spaltungsaktivität aufweist. Für die Assimilation von **37** fehlt hier lediglich ein Enzym, welches **41** in das isomere 3-Methylallacton **43** umwandelt. Letzteres ist dann wie das Muconolacton des bekannten *ortho*-Weges (siehe Schema 7) zum Enollacton isomerisierbar und damit in analoger Reaktionsfolge vollständig abbaubar.



Schema 10. In-vitro-Konstruktion eines hybriden Abbauweges für den Simultanabbau von Chlor- und Methylarenen: Der Stamm *Pseudomonas* sp. B13 erwirbt die Fähigkeit zum Abbau von 4-Chlorbenzoat (**44, R = Cl**) durch Insertion der Gene des Initialenzymes des Toluolabbaus (TOL-Plasmid). Die zusätzlich rekrutierte Lacton-Isomerase aus dem Chromosom von *Alcaligenes eutrophus* ermöglicht auch den Abbau von 4-Methylbenzoat (**44, R = CH₃**). Der Konstruktionsstamm FR1 (pFRC20P) kann 4-Chlorbenzoat und 4-Methylbenzoat gleichzeitig verwerten, nach spontaner Mutation (Stamm FR1(pFRC20P)-1) auch 4-Chlorphenol (**46, R = Cl**) und 4-Methylphenol (**46, R = CH₃**).

Das Gen für die erforderliche Lacton-Isomerase wurde auf dem Chromosom von *Alcaligenes eutrophus* JMP134 gefunden. Nach Klonierung auf einem Cosmidvektor (pFRC20P) wurde die entsprechende Eigenschaft konjugativ auf den Stamm B13 übertragen. Um die neu erworbene Fähigkeit zur Assimilation von **37** durch *ortho*-Spaltung für ein selektives Wachstumsubstrat nutzen zu können, wurden mit einem hybriden Transposon (Tn5: xyl XYZLS) dem Stamm B13 zuvor die Gene der Initialenzyme des Toluolabbaus inseriert. Durch die Genprodukte Toluat-1,2-Dioxygenase (xyl XYZ), Cyclohexadienol-1-carboxylat-Dehydrogenase (xyl L) sowie einem regulatorischen Gen (xyl S) erwirbt der Stamm B13 Initialenzyme des Abbaus mit erniedrigter Substratspezifität und damit zunächst die Fähigkeit zur Verwertung von 4-Chlorbenzoat (**44, R = Cl**). Durch die konjugativ rekrutierte Isomerase tritt zusätzlich die Fähigkeit zum Abbau von 4-Methylbenzoat (**44, R = CH₃**) in Funktion. Das konstruierte B13-Derivat FR1(pFRC20P) baut dann gleichzeitig 4-Chlor- und 4-Methylbenzoat (**44, R = Cl** bzw. **CH₃**) ab, ohne daß Teile des Substratgemisches fehlgeleitet werden oder als Dead-end-Metabolite in die Kulturflüssigkeit abgegeben werden.

Praxisrelevanter als Chlor- und Methylbenzoate sind Mischungen aus Chlorphenolen und Kresolen. Da der Stamm B13 a priori 4-Chlorphenol (**46, R = Cl**) vollständig abbauen kann, sollte das Derivat auch die Fähigkeit zum Abbau von Kresol erwerben können. Dies erfordert jedoch eine Spontanmutation (Mutationsrate $10^{-7} - 10^{-8}$), durch welche das Bakterium (Stamm FR1(pFRC20P)-1) „lernt“, Kresol (**46, R = CH₃**) als Induktor der Chlorphenol-Hydroxylase zu „erkennen“.

Die Evolution eines komplexen Abbauweges kann, wie das Beispiel des Simultanabbaus von Chlor- und Methylarenen lehrt, eine Vielzahl genetischer Ereignisse erfordern (vgl. Lit.^[38]). Da diese nacheinander stattfinden müssen und durch Selektion nur der letzte Entwicklungsschritt begünstigt ist, kann dieser Prozeß in der Natur nur sehr langsam voranschreiten. Offensichtlich erfordert die Neukombination in der Natur vorhandener Aktivitäten des Partialabbaus zu neuen funktionsfähigen Abbausequenzen für Fremdstoffe einen klaren Konstruktionsplan, bei dem jeder einzelne Entwicklungsschritt mit einem entsprechenden Selektionsprinzip verknüpft sein muß. Ist dies erfüllt, so lassen sich durch genetische Manipulation kritische Reaktionsschritte überwinden. Durch Mobilisierung bestimmter Gene und Genblöcke, welche unspezifische multifunktionelle Abbausequenzen kodieren, wird das Evolutions- und Abbaupotential natürlicher Bakterienpopulationen gegenüber strukturverwandten Fremdstoffen entscheidend erhöht.

Ein wesentlicher Vorteil der experimentellen Evolution von Abbauwegen besteht in der Möglichkeit des planvollen, gezielten Vorgehens. Dieses erfordert jedoch detaillierte Kenntnisse der Biochemie und Regulation des Fremdstoffabbaus sowie die Analyse der Organisation der entsprechenden Gene.

Da für die Mehrzahl der in der Praxis relevanten Fremdstoffe noch die erforderlichen Grundlagenkenntnisse fehlen, ist bei der Anwendung mikrobieller Abbaumethoden momentan eine eher pragmatische, wissenschaftlich weniger anspruchsvolle Vorgehensweise angezeigt. Um die Abbauleistung natürlicher Biozönosen gegenüber Fremdstoffen zu steigern, sind Maßnahmen, welche den Nährstoff- und Energiebedarf der Mikroorganismen befriedigen und der Einsatz

von Hilfssubstraten, welche die Keimzahlen cometabolisch aktiver Organismen erhöhen und damit den natürlichen Gentransfer begünstigen, beim gegenwärtigen Kenntnisstand noch die Methode der Wahl.

Eingegangen am 5. November 1992 [A 918]

- [1] F. Boile, *Mensch und Mikrobe*, Safari, Berlin, **1954**, S. 12–94.
[2] M. Vasold, *Pest, Not und schwere Plagen*, C. H. Beck, München, **1991**.
[3] O. Günther, *Forum Mikrobiol.* **1980**, 8–10.
[4] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1992**, S. 1–12.
[5] S. H. Schneider, *Sci. Am.* **1989**, 38–47.
[6] A. Balows, H.-G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer, *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, **1992**.
[7] K. Horikoshi, *Microorganisms in Alkaline Environments*, VCH, Weinheim, **1991**.
[8] G. Gottschalk, *Bacterial Metabolism*, 2. Aufl., Springer, Berlin, **1986**.
[9] T. A. Krulwich, *Bacterial Energetics*, Academic Press, New York, **1990**.
[10] P. Dürre, H. Bahl, G. Gottschalk in *Handbook on Anaerobic Fermentations* (Hrsg.: L. E. Erickson, D. Y.-C. Fung), Dekker, New York, **1988**, S. 187–206.
[11] A. Inoue, K. Horikoshi, *Nature* **1989**, 338, 264–265.
[12] S. Fetzner, R. Müller, F. Lingens, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 279–290.
[13] K. König, J. R. Andreesen, *Bioengineering* **1992**, 8, 78–84.
[14] L. Johnson, K. V. Rajagopalan, O. Meyer, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, 283, 542–545.
[15] K. König, Dissertation, Universität Göttingen, **1991**.
[16] a) D. Janke, W. Fritsche, *J. Basic Microbiol.* **1985**, 25, 603–619; b) O. Dickel, H.-J. Knackmuss, *Biodegradation*, im Druck.
[17] W. W. Mohn, J. M. Tiedje, *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 482–507.
[18] A. H. Neilson, *J. Appl. Bacteriol.* **1990**, 69, 445–470.
[19] J. Ewers, Dissertation, Universität Stuttgart, **1991**.
[20] a) B. Dabrock, J. Riedel, J. Bertram, G. Gottschalk, *Arch. Microbiol.* **1992**, 158, 9–13; b) B. Dabrock, B. Averhoff, G. Gottschalk, unveröffentlicht.
[21] B. D. Ensley, *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, 42, 283–299.
[22] J. Ewers, D. Freier-Schröder, H.-J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.* **1990**, 154, 410–413.
[23] B. G. Fox, J. G. Bornemann, L. P. Wackett, J. D. Lipscomb, *Biochemistry* **1990**, 29, 6419–6427.
[24] B. Nörtemann, J. Baumgarten, H. G. Rast, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, 52, 1195–1202.
[25] D. C. Hempel, M. Lindert, *GWF Gas-Wasserfach: Wasser/Abwasser* **1990**, 131, 528–535.
[26] W. Haug, A. Schmid, B. Nörtemann, D. C. Hempel, A. Stoltz, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, 57, 3144–3149.
[27] B. Feigel, H.-J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.* **1993**, 159, 124–130.
[28] C. Bruhn, H. Lenke, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, 53, 208–210.
[29] H. Lenke, D. H. Pieper, C. Bruhn, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 2928–2932.
[30] H. Lenke, H.-J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 2933–2937.
[31] C. Bruhn, R. C. Bayly, H.-J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.* **1988**, 150, 171–177.
[32] W. Reineke, H.-J. Knackmuss, *Annu. Rev. Microbiol.* **1988**, 42, 263–287.
[33] M. L. Rochkind-Dwbinsky, G. S. Sayler, J. W. Blackburn, *Microbiological Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*, Dekker, New York, **1987**.
[34] M. Schlömann, *Biologische Abwasserreinigung 1. Biologischer Abbau von Chlorkohlenwasserstoffen* (Hrsg.: B. Weigert), Technische Universität Berlin, **1992**, S. 87–109.
[35] M. Schlömann, D. H. Pieper, H.-J. Knackmuss, *Pseudomonas: Biotransformation, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*, (Hrsg.: S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglesias, S. Kaplan), Am. Soc. Microbiol., Washington, **1990**, S. 185–196.
[36] F. Rojo, D. H. Pieper, K. H. Engesser, H.-J. Knackmuss, K. N. Timmis, *Science* **1987**, 238, 1395–1398.
[37] W. Reineke, *J. Basic Microbiol.* **1986**, 26, 551–567.
[38] J. R. van der Meer, W. M. de Vos, S. Harayama, A. H. B. Zehnder, *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 677–694.
[39] J. Havel, W. Reineke, *FEMS Microbiol. Lett.* **1991**, 78, 163–170.
[40] A. M. Cook, T. Leisinger in *Environmental Biotechnologie* (Hrsg.: H. Verachtert, W. Verstraete), Koninklijke Vlaamse Ingenieursvereniging, Brüssel, **1991**, S. 353–367.
[41] W. M. Coco, U. M. X. Sangodkar, R. K. Rothmel, A. M. Chakrabarty in *Biotechnology and Biodegradation* (Hrsg.: D. Kamaly, A. M. Chakrabarty, G. S. Omenn), Gulf Publishing Company, **1990**, S. 43–59.

ABONNIEREN STATT FOTOKOPIEREN

Zeitschriften-Beiträge sind mit Sachverstand und Sorgfalt aus dem großen Berg von Informationen ausgewählt, geschrieben, zusammengestellt...

... ergeben zielgerechte Informationen: Erfahrungen, die man kaufen kann.

Denn uns liegt daran, daß Sie als Leser mit erweitertem Wissen und vermehrten Einsichten gut gerüstet sind.

Dies ist in Gefahr, wenn Zeitschriftenaufsätze kopiert werden!

Deutsche Fachpresse, Frankfurt am Main, Bonn

Fotokopien werden nicht abonniert...

... und das bedeutet langfristig, daß Fachzeitschriften und wissenschaftlichen Zeitschriften die wirtschaftliche Basis entzogen wird.

... und außerdem: Sie als Leser sollen immer ein komplettes Heft in die Hand bekommen, damit Ihr Wissen nicht einseitig wird...

... und damit IHRE ZEITSCHRIFT auch künftig für Sie da ist.