

STRATEGIEN DES BAKTERIELLEN ABBAUS VON CHLORAROMATEN

Karl-Heinrich Engesser

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, Azenbergstr. 18
7000 Stuttgart 1

1. Einleitung

Chloraromaten gehören in der Regel zur Klasse der sog. 'Xenobiotika'. Unter diesem Begriff subsumiert man Verbindungen, die der Biosphäre fremd oder sogar gänzlich unbekannt sind. Dazu zählen unter anderem auch Aromaten, die einen oder mehrere Halogen-Substituenten, bzw. Dialkylamino-, Nitro-, Phenoxy-, oder Sulfo-Gruppen tragen. Da diese Strukturelemente erst seit relativ kurzer Zeit in abbaurelevanten Konzentrationen für die Mikroorganismen zugänglich sind, überrascht es nicht, daß bisher keine oder nur sehr gering ausgeprägten korrespondierenden Abbau-potentiale evolviert wurden (Engesser and Fischer, 1991). Aufgabe der gemeinsamen, fächerübergreifenden Anstrengung der Fachdisziplinen Mikrobiologie, Chemie, Genetik sowie Verfahrenstechnik muß es deshalb sein, in kurzer Zeit solche geforderten Abbauaktivitäten zu selektieren, zu kombinieren oder auf gentechnischem Wege neu zu schaffen. Damit soll ein Beitrag geleistet werden zur Reinhaltung unserer Umwelt und zum Schutz der Menschen vor den nachgewiesenen oder zu vermutenden Gefahren, die von solchen Stoffen ausgehen.

2. Generelle Voraussetzungen für den Abbau von Aromaten

Einige Grundvoraussetzungen für den Abbau von Aromaten jeglicher Art seien hier trotz ihrer Trivialität nochmals deutlich herausgehoben: Es sind einmal Enzyme erforderlich, die eine **geeignete Reaktionspezifität** zum Abbau von Xenobiotika aufweisen sollten (Problem der Enzymrekrutierung bzw. -evolution), zum anderen müssen diese Enzyme dann vorhanden oder **induziert** sein, wenn sie gebraucht werden (Problem der Induktion) und schließlich sollten Enzymsequenzen allein oder in Kombination so **zusammenwirken**, daß ein **vollständiger Abbau** und nicht nur Biotransformation oder Cometabolismus resultiert. So weisen zum Beispiel Benzoat-abbauende Bakterien ein Enzym auf, das die 1,2-Dioxygenierung dieses Wachstumssubstrates katalysiert. Bietet man nun als zweites Substrat noch

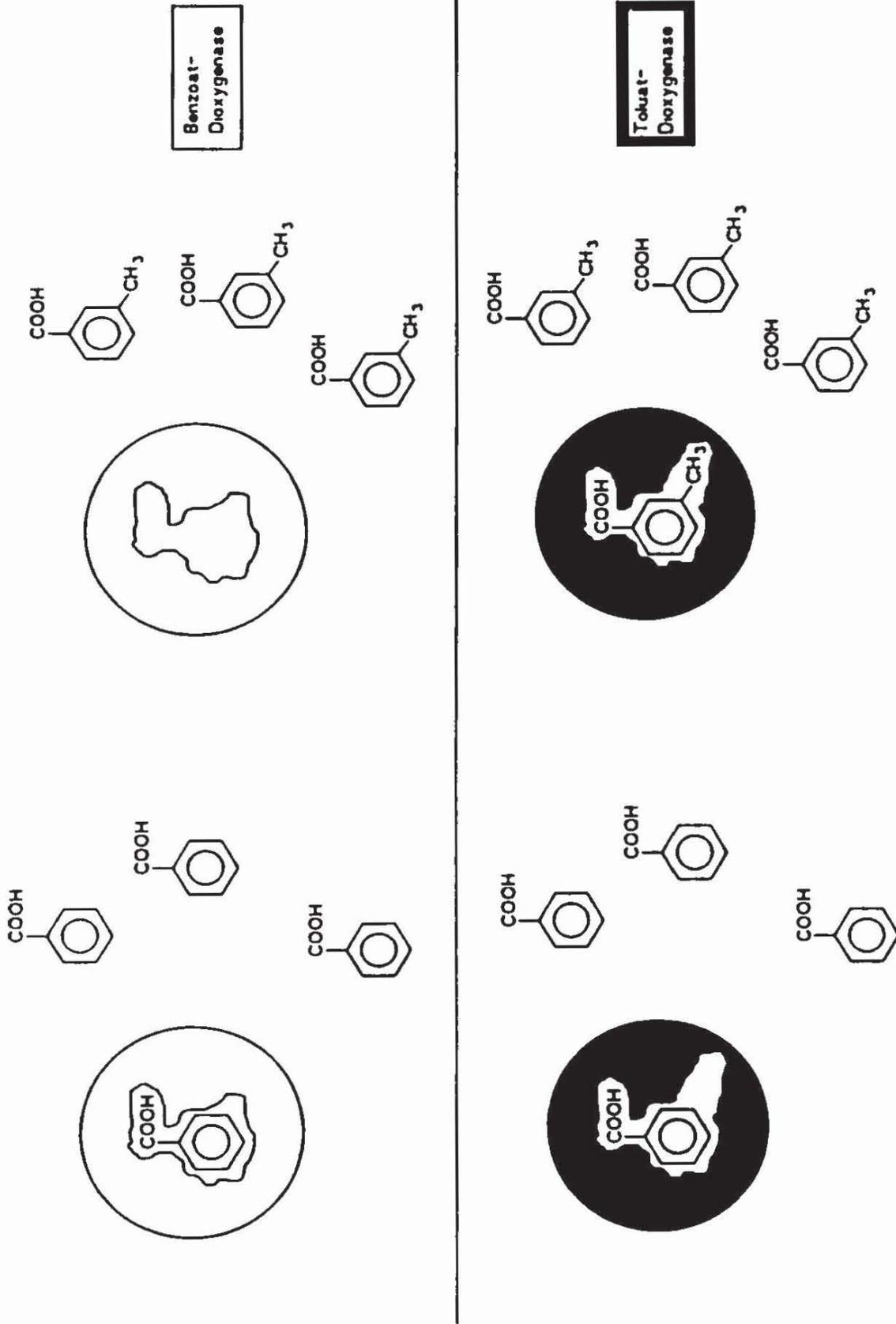


Abb. 1: Die Bindung von Benzoesäure bzw. substituierten Derivaten an Benzoat- oder Toluat-1,2-Dioxygenasen. Benzoatdioxygenasen vermögen im Gegensatz zu Toluatdioxygenasen 3-substituierte Benzoate nur schlecht, 4-substituierte Benzoate häufig gar nicht umzusetzen.

4-Chlorbenzoat an, so erlebt man in aller Regel, daß dieses Substrat nicht abgebaut, ja nicht einmal ansatzweise metabolisiert werden kann. Die sehr hohe Substratspezifität dieser Klasse von Dioxygenasen verhindert somit jeglichen Abbau (eine graphische Repräsentation für das Substratpaar Benzoat/3-Methylbenzoat findet sich in Abb. 1). Beobachtungen von Reineke und Mitarbeitern zufolge (Reineke and Knackmuss, 1978) gibt es in der Natur jedoch Toluat-Dioxygenasen, deren geringe Substratspezifität einen Umsatz von 4-Chlorbenzoat mit zufriedenstellender Geschwindigkeit zuläßt. Durch Etablierung solcher Enzyme in Stämmen, die zwar zum Abbau von Umwandlungsprodukten des 4-Chlorbenzoats befähigt sind, dieses Substrat aber selbst nicht angreifen können, entstehen Hybride, die einen Totalabbau bewerkstelligen können.

Im zweiten oben skizzierten Fall sind Abbau-kompetente Enzyme zwar vorhanden, werden jedoch, trotzdem sie dringend benötigt werden, von der Zelle nicht oder nicht in ausreichendem Maße hergestellt (ungenügende Induktion). Am Beispiel des 2,4-Dichlorphenol-Abbaus läßt sich zeigen, daß dieses Substrat zwar von Zellen des Stammes *Alcaligenes eutrophus* JMP134 nach Wachstum auf 2,4-Dichlorphenoxyacetat leicht und vollständig abgebaut werden kann, alleine angeboten jedoch zur Abtötung der Kultur führt. Abhilfe schafft hier die Isolation von sogenannten konstitutiven Mutanten des erwähnten Stammes, die die Abbauenzyme in jeder Wachstumsphase bilden und nicht nur wenn sie mit chlorierten Aromaten konfrontiert werden.

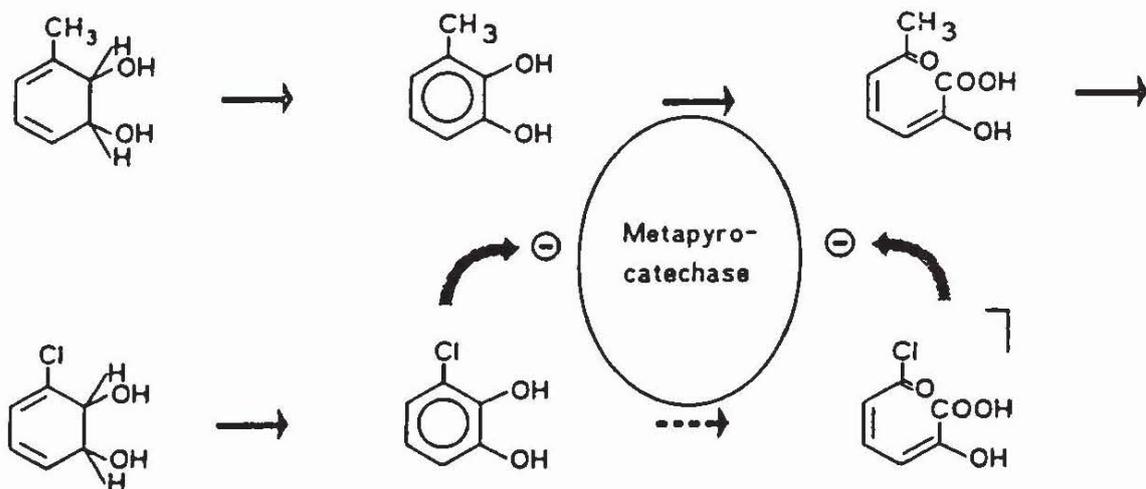


Abb. 2: Inaktivierung der Metapyrocatechase beim Umsatz von 3-Chlorcatechol

Das dritte obengenannte Kriterium fordert den vollständigen Abbau der zu beseitigenden Verbindungen. Ein Beispiel hierfür lieferten die Untersuchungen zum Abbau von Substratgemischen, bestehend aus den Modellverbindungen 3-Methyl- und 3-Chlorbenzoat. Für beide Verbindungen bestehen komplette Abbauewege, die gut untersucht sind (Dorn and Knackmuss, 1978, Don et al., 1985, Murray et al., 1972, Reineke et al., 1978, Williams and Murray, 1974; siehe auch Schlömann, in vorliegendem Buch). Verabreicht man diese beiden Substrate hingegen im Gemisch, so tritt wechselseitig eine Inhibition des Abbaus der jeweils anderen Verbindung auf. So wird beim Abbau von 3-Chlorbenzoat durch 3-Methylbenzoat metabolisierende Bakterien beobachtet, daß das intermediär aus 3-Chlorbenzoat gebildete 3-Chlorbrenzcatechin das Schlüsselenzym des Methylbenzoat-Abbaus, die Methylbrenzcatechin-2,3-Dioxygenase (Metapyrocatechase) suizidartig zerstört (Abb. 2). Dadurch kommt sowohl der Abbau des Methylbenzoats als auch, hervorgerufen durch die Akkumulation toxisch wirkender Brenzcatechine, der Umsatz des Chlorbenzoats zum Stillstand. Alle Versuche, inaktivierungsfeste Varianten dieser meta-spaltenden Schlüsselenzyme zu isolieren, waren nicht vom Erfolg gekrönt.

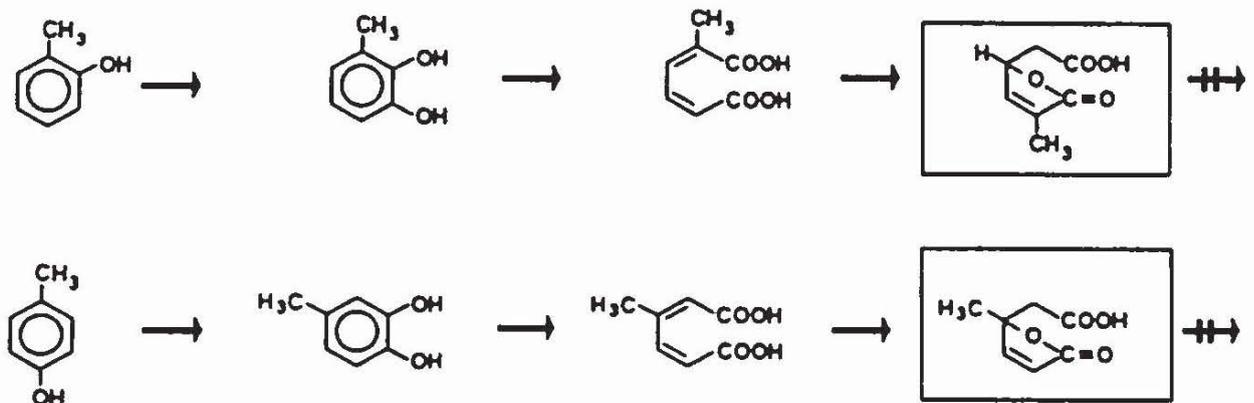


Abb. 3: Akkumulation von Methylactonen durch Chloraromaten metabolisierende Bakterien

Aus diesem Grunde wurde eine zweite Strategie verfolgt, die in der Verwendung von 3-Chlorbenzoat abbauenden Bakterien bestand. Diese verwenden den Chloraromaten über einen vom erwähnten meta-Weg völlig verschiedenen Weg, den sog. Chlorortho-Weg. Bei dieser Stoffwechsel-Variante werden die ebenfalls gebildeten Brenzcatechin-Derivate unter Bildung von Muconsäuren gespalten. Der sich an-

schließende Metabolismus führt über Lactone als wichtigsten Leitverbindungen zu Intermediaten des Tricarbonsäurezyklus. Wie oben angedeutet, gelingt ein produktiver Metabolismus von methylsubstituierten Brenzcatechinen über diesen ortho-Weg nicht, stattdessen kommt es zur Akkumulation von methylsubstituierten Lactonen (Abb. 3; Knackmuss et al., 1976). Dieser unerwünschten Akkumulation von dead-end Produkten konnte durch Isolierung von Methylacton-verwertenden Bakterien begegnet werden (Taeger et al., 1988). Auf diese Weise konnte zunächst in Mischkultur, und nach Übertragung der entsprechenden Gene auch in konstruierten Reinstämmen ein vollständiger Metabolismus eines Gemisches von Methyl- und Chlorbenzoat erreicht werden. Dieses Beispiel zeigt auch, daß es in bestimmten Fällen unabdingbar sein kann, die Biochemie und Physiologie von Abbauprozessen genauestens verstehen zu lernen, um dann Engstellen des Gesamtstoffwechsels beheben zu können oder die Fehlleitung von inkompatiblen Substraten in ungeeignete Abbauwege verhindern zu können (Schmidt et al., 1985).

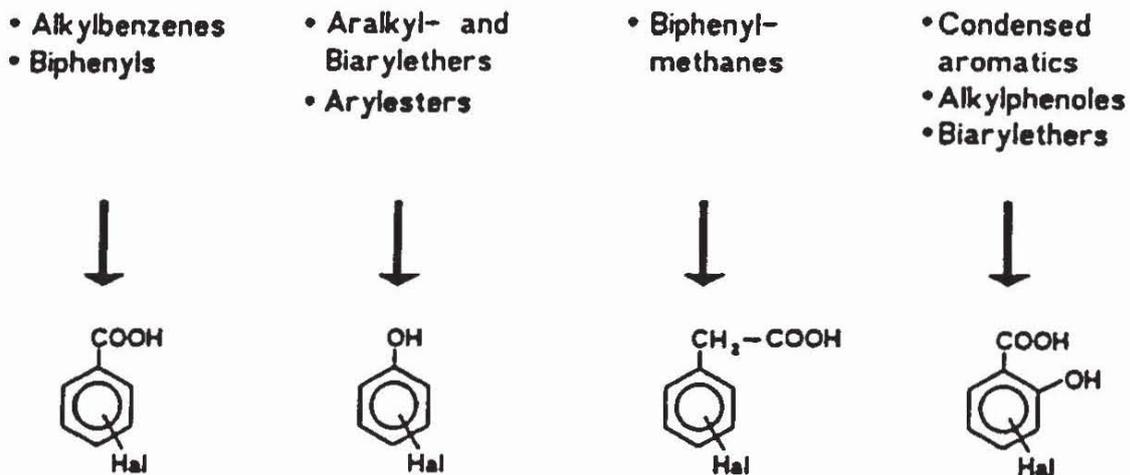


Abb. 4: Vereinfachung komplexer Aromatenstrukturen im Zuge des Metabolismus zu zentraleren Intermediaten

3. Prinzipien des Abbaus von Xenobiotika

Beim Abbau von Aromaten scheint die Natur generell einem sehr ökonomischen Prinzip zu folgen, nämlich der Metabolisierung einer größtmöglichen Zahl von Substraten über eine kleinstmögliche Anzahl zentraler Abbauwege. Demnach wird eine große Anzahl von Verbindungen zunächst zu einer wesentlich kleineren Anzahl von Intermediaten metabolisiert (Abb. 4), deren Abbau dann seinerseits zu zahlenmäßig noch weiter reduzierten zentralen Intermediaten kanalisiert wird (eine

umfassende Übersicht hierzu findet sich in Engesser and Fischer, 1991). Am Beispiel des Abbaus von DDT (1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan) kann dies gut demonstriert werden. Zunächst wird in einem cometabolischen Prozeß das DDT bis zur Stufe des 4,4'-Dichlordiphenylmethans umgesetzt (Wedemeyer, 1967). Ein zweiter Stamm setzt dann den Metabolismus unter Bildung von 4-(Chlorphenyl)acetat fort (Focht and Alexander, 1971).

Solche einfacheren Intermediate werden von Bakterien grundsätzlich in drei verschiedenen Weisen angegangen und dabei in ihrer strukturellen Komplexität weiter reduziert:

Der Halogen-Substituent kann einerseits **hydrolytisch** entfernt werden (Weg [H] in Abb. 5). Dabei wird anstelle des Halogens eine Hydroxylgruppe eingeführt. Mechanistisch gut untersucht ist dieser Vorgang beim Abbau von 4-Chlorbenzoat durch eine Vielzahl von Bakterien. Da eine direkte Hydrolyse der Chlor-Kohlenstoff-Bindung aufgrund chemischer Gesetzmäßigkeiten nicht gelingen kann, schaltet das Bakterium eine energieaufwendige Aktivierungsreaktion vor, die Bildung eines Acetyl-CoA Esters. Aus diesem Intermediat heraus gelingt die Addition von Wasser unter nachfolgender Eliminierung des Chlorsubstituenten und Rekonstituierung des freien Aromaten glatt (Löffler et al., 1991, Löffler and Müller, 1991).

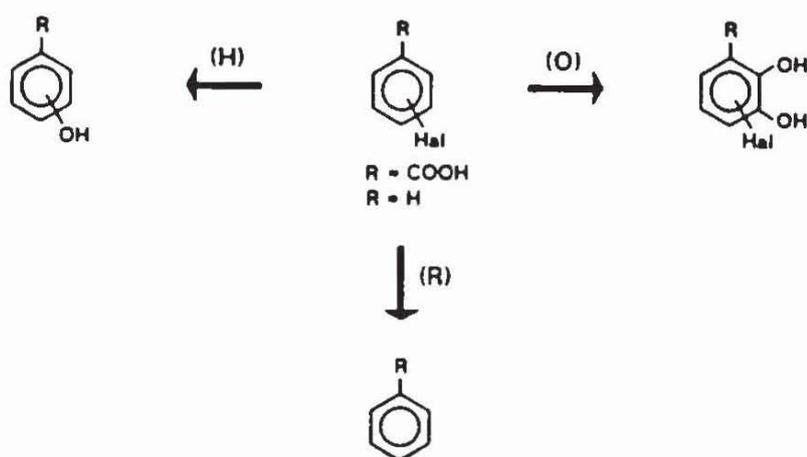


Abb. 5: Verschiedene Prinzipien des Halogenaromatenabbaus.
(Erläuterungen siehe Text)

Als zweite Abbauvariante für Halogenaromaten ist der Abbau unter **Einfügung molekularen Sauerstoffs** zu nennen (Weg [O] in Abb. 5). Hierbei kann entweder in einer sauerstoffabhängigen Primärreaktion ein instabiles Diendiol-Derivat erzeugt werden, das spontan Halogenid abspaltet (sog "frühe" Halogenid-Eliminierung) oder unter einstweiligem Erhalt der Halogen-Kohlenstoff-Bindung ein Metabolismus eingeschlagen werden, der bis zu einer aliphatischen Zwischenstufe führt, aus der

leicht Halogenid eliminiert werden kann ("späte Eliminierung"). Ein Beispiel für die erste Alternative stellt der Abbau verschiedenster, in 2-Stellung substituierter Benzoate durch einen *Pseudomonas* Stamm dar (Abb. 6). Seine Abbaufähigkeiten beschränken sich dabei nicht auf Halogenbenzoate, sondern erstrecken sich auch auf andere Substrate, die in 2-Stellung anionisch abspaltbare Substituenten tragen (Engesser and Fischer, 1991).

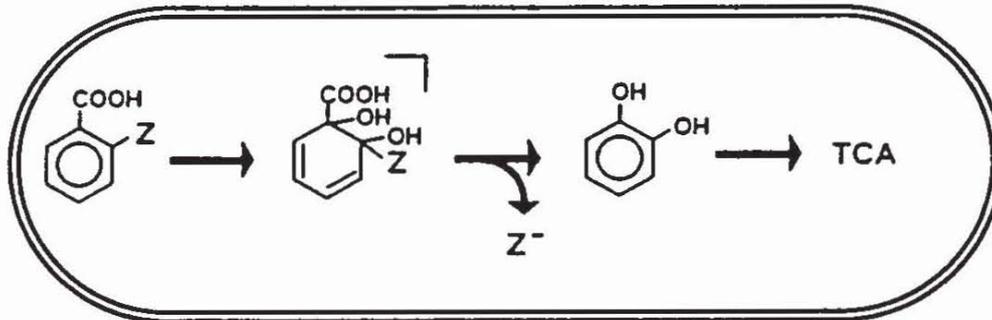


Abb.6: Abspaltung anionisch eliminierbarer Substituenten aus Benzoesäurederivaten nach initialer Dioxygenierung in *Pseudomonas putida* CLB 250 (Z steht für verschiedenste, anionisch eliminierbare Substituenten)

Die sog. "späte" Eliminierung ist durch mannigfaltige Untersuchungen gut bestätigt und verläuft demzufolge über instabile, chloresubstituierte Muconsäurelactone, die spontan Chlorid eliminieren (Evans et al., 1971, Gaunt and Evans, 1988, Schmidt and Knackmuss, 1980).

Die dritte Abbaualternative besteht in einer reduktiven Dechlorierung (Weg [R] in Abb. 5). Vor allem in anaerobem Milieu vermögen viele Bakterien, Halogenaromaten quasi als 'electron-sink', d.h. zur Regenerierung ihrer reduzierten Coenzyme einzusetzen. Hierbei können sogar - oder besser gesagt, gerade - höher halogenierte Verbindungen glatt zu einfach oder zweifach chlorierten Endprodukten umgesetzt werden, die dann allerdings unter anaeroben Verhältnissen keinem weiteren Abbau unterliegen. Am Beispiel des Abbaus von 2,4,5-Trichlorphenoxyacetat (2,4,5-T) lässt sich dieser Sachverhalt gut demonstrieren (Sufliya et al., 1984). Alle diese obengenannten Mechanismen können auch in einem einzigen Bakterium realisiert sein, wie es für den Abbau von Pentachlorphenol nachgewiesen werden konnte.

Es wird Gegenstand einer intensiven Zusammenarbeit verschiedenster Disziplinen sein müssen, diese im Labor teilweise sehr gut verstandenen Mechanismen auch unter 'real world'-Bedingungen anzuwenden, um die teilweise sehr erheblichen Altlastenprobleme nicht zuletzt auch in den neuen Bundesländern mit Aussicht auf Erfolg auch biotechnologisch angehen zu können (Engesser and Fischer, 1991).

- Don, R. H., A. J. Weightman, H.-J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 161:85-90.
- Dorn, E., and H.-J. Knackmuss. 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.* 174:73-84.
- Engesser, K. H., and P. Fischer. 1991. Degradation of haloaromatic compounds, p.15-54, vol. 2. Springer-Verlag, London.
- Evans, W. C., B. S. W. Smith, H. N. Fernley, and J. I. Davis. 1971. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122:543-551.
- Focht, D. D., and M. Alexander. 1971. Aerobic cometabolism of DDT analogues by *Hydrogenomonas* sp.. *J. Agric. Food Chem.* 19:20-22.
- Gaunt, J. K., and W. C. Evans. 1988. Metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate by a soil Pseudomonad. Ring-fission, lactonizing and delactonizing enzymes. *Mol. Gen. Genet.* 211:113-120.
- Knackmuss, H.-J., M. Hellwig, H. Lackner, and W. Otting. 1976. Cometabolism of 3-methylbenzoate and methylcatechols by a 3-chlorobenzoate utilizing Pseudomonas: Accumulation of (+)-2,5-dihydro-4-methyl- and (+)-2,5-dihydro-2-methyl-5-oxo-furan-2-acetic acid. *European J. Appl. Microbiol.* 2:267-276.
- Löffler, F., and R. Müller. 1991. Identification of 4-Chlorobenzoyl-Coenzyme-A as Intermediate in the Dehalogenation Catalyzed by 4-Chlorobenzoate Dehalogenase from *Pseudomonas* sp CBS3. *FEBS Letters* 290(1-2):224-226.
- Löffler, F., R. Müller, and F. Lingens. 1991. Dehalogenation of 4-Chlorobenzoate by 4-Chlorobenzoate Dehalogenase from *Pseudomonas* Sp CBS3 - An ATP/Coenzyme-A Dependent Reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176(3):1106-1111.
- Murray, K., C. J. Dugleby, J. M. S. Sala-Trepat, and P. A. Williams. 1972. The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the meta cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. *Eur. J. Biochem.* 28:301-310.
- Reineke, W., and H.-J. Knackmuss. 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of benzoic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 542:412-423.
- Reineke, W., W. Otting, and H.-J. Knackmuss. 1978. Cis-dihydrodiols microbially produced from halo- and methylbenzoic acids. *Tetrahedron* 34:1707-1714.
- Schmidt, E., and H.-J. Knackmuss. 1980. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochem. J.* 182:339-347.
- Schmidt, E., I. Bartels, and H.-J. Knackmuss. 1985. Degradation of 3-chlorobenzoate by benzoate or 3-methylbenzoate-utilizing cultures. *FEMS Microbiol. Ecology* 31:381-389.
- Suffita, J. M., J. Stout, and J. M. Tiedje. 1984. Dechlorination of (2,4,5-trichlorophenoxy)acetic acid by anaerobic microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 32:218.
- Taege, K., H.-J. Knackmuss, and E. Schmidt. 1988. Biodegradability of mixtures of chloro- and methylsubstituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:603-608.
- Wedemeyer, G. 1967. Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes*. *Appl. Microbiol.* 15:569-574.
- Williams, P. A., and K. Murray. 1974. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2. Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 120:416-423.